

Université du Québec

Mémoire présenté à  
l'Université du Québec à Trois-Rivières  
comme exigence partielle de la  
Maîtrise es Sciences de l'Environnement

par

Chantal Lamontagne

Écotoxicité et pathogénicité d'*Aeromonas hydrophila*  
pour les grenouilles léopards (*Rana pipiens*) du  
lac Saint-Pierre.

Janvier 1991

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## Table des matières

	page
Liste des figures.....	iv
Liste des tableaux.....	v
Liste des annexes.....	viii
Remerciements.....	ix
Sommaire.....	x
1. Introduction.....	1
2. Historique.....	4
3. Taxonomie.....	7
4. Généralités.....	10
4.1. Description générale de la bactérie.....	10
4.1.1. Morphologie.....	10
4.1.2. Croissance.....	10
4.1.3. Réactions biochimiques.....	11
4.1.4. Sérotypie.....	11
4.1.5. Habitat et isolement.....	12
4.2. Pathogénicité.....	13
4.3. Facteurs étiologiques.....	25
4.3.1. Aspect biologique.....	25
4.3.2. Écologie d' <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	28
4.4. Virulence.....	31
4.4.1. Adhésion.....	32
4.4.2. Facteurs d'agression.....	33
5. Protocole expérimental.....	36

5.1. Choix des sites d'échantillonnage.....	36
5.2. Période d'échantillonnage.....	37
5.3. Méthodologie sur le terrain.....	38
5.3.1. Méthode de capture des spécimens.....	38
5.3.2. Méthode d'échantillonnage de paramètres sélectionnés.....	42
5.4. Isolement d' <i>Aeromonas hydrophila</i> chez la grenouille.....	43
5.4.1. Prélèvement de tissus.....	43
-peau.....	44
-muscle.....	44
-sang.....	44
5.4.2. Ensemencement et milieu de culture.....	46
5.4.3. Identification d' <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	46
5.4.3.1. Identification au genre.....	47
5.4.3.2. Identification à l'espèce.....	47
5.4.4. Détermination de la toxicité et de la pathogénicité d' <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	48
5.4.4.1. Préparation de doses infectantes.....	48
5.4.4.2. Infection par voie intra-musculaire.....	50
5.5. Traitement statistique.....	50
6. Résultats.....	52
6.1. État de la qualité de l'eau au lac Saint-Pierre.....	52
6.1.1. Qualité physico-chimique et matières en suspension.....	52
6.1.1.1. Variations intersites.....	52
6.1.1.2. Variations saisonnières.....	53
6.1.2. Qualité bactériologique: Densité d' <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	62
6.1.2.1. Variations intersites de la densité d' <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	62

6.1.2.2. Corrélation entre les paramètres physico-chimiques, matières en suspension et la densité d' <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	63
6.2. Présence de la maladie des pattes rouges au lac Saint-Pierre au printemps.....	67
6.3. Dose létale 50 des souches d' <i>Aeromonas hydrophila</i> (DL50).....	69
6.3.1. Sélection des souches amphibiennes.....	69
6.3.2. Comparaison de souches ichtyenne et amphibienne.....	70
7. Discussion.....	74
7.1. État de la qualité de l'eau au lac Saint-Pierre.....	74
7.1.1. Physico-chimie et matières en suspension.....	74
7.2. Relation entre <i>Aeromonas hydrophila</i> et les paramètres du milieu aquatique.....	76
7.3. Épidémiologie de la maladie des pattes rouges.....	82
7.4. Différence de virulence entre les souches ichtyenne et amphibiennes d' <i>A. hydrophila</i> .....	84
7.4.1. Différence entre les souches amphibiennes.....	84
7.4.2. Poissons et grenouilles adultes.....	85
7.4.3. Grenouilles adultes et grenouilles juvéniles.....	87
8. Conclusion.....	91
9. Bibliographie.....	93
10. Annexes.....	106

## Liste des figures

page

Figure.1. Photo d' une grenouille atteinte de la maladie des pattes rouges.....23

Figure.2. Évolution des symptômes de la maladie des pattes rouges chez  
la grenouille.....24

Figure.3. Densités moyennes d' *Aeromonas hydrophila* durant les différents mois de  
l'année.....30

Figure.4. Localisation des sites autour du lac Saint-Pierre.....41

## Liste des tableaux

	page
Tableau I. Patron biochimique d' <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	14
Tableau II. Différenciation entre: <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Aeromonas caviae</i> , <i>Aeromonas sobria</i> et <i>Aeromonas salmonicida</i> .....	16
Tableau III. Vocation des sites choisis du lac Saint-Pierre.....	40
Tableau IV. Liste des paramètres échantillonnés et des méthodes employées.....	45
Tableau V. Patron biochimique d' <i>Aeromonas hydrophila</i> avec le système API-20E.....	49
Tableau VI. Valeurs moyennes ( $\pm$ : écart-type) des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension pour les différents sites situés autour du lac Saint-Pierre au printemps (25, 29 et 30 Mai, 1989).....	54
Tableau VII. Valeurs moyennes ( $\pm$ : écart-type) des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension pour les différents sites situés autour du lac Saint-Pierre en été (18, 19, 20 et 24 juillet, 1989).....	55
Tableau VIII. Valeurs moyennes ( $\pm$ : écart-type) des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension pour les différents sites situés autour du lac Saint-Pierre à l'automne (6 et 7 octobre, 1989).....	56

Tableau IX. Résultats de l'analyse factorielle de variance (Fanova) pour la comparaison intersite des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension.....	57
Tableau X. Résultats de l'analyse factorielle de variance (Fanova) pour la comparaison interrive des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension.....	58
Tableau XI. Valeurs moyennes ( $\pm$ écart-type) des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension pour les rives nord et sud du lac Saint-Pierre pour les périodes printanière, estivale et automnale.....	59
Tableau XII. Valeurs ( $\pm$ écart-type) minimale, maximale et moyenne des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension retrouvées au lac Saint-Pierre lors des échantillonnages printanier, estival et automnal pour l'ensemble des sites.....	60
Tableau XIII. Résultats de l'analyse factorielle de variance (Fanova) pour la comparaison intersaison des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension.....	61
Tableau XIV. Concentrations moyennes ( $\pm$ écart-type) d' <i>Aeromonas hydrophila</i> (UFC/ml) retrouvées à chacun des sites situés autour du lac Saint-Pierre lors des échantillonnages printanier, estival et automnal (chaque valeur représente la moyenne de trois relevés; Annexe.2.).....	64

Tableau XV. Résultats de l'analyse factorielle de variance (Fanova) pour la comparaison intersite de la densité d' <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	65
Tableau XVI. Relation ( $r^2$ ; régression linéaire ) entre la densité d' <i>Aeromonas hydrophila</i> et les différents paramètres physico-chimiques et matières en suspension au lac Saint-Pierre pour les trois périodes de l'année.....	66
Tableau XVII. Fréquence printanière de la maladie des pattes rouges pour l'ensemble des sites situés autour du lac Saint-Pierre.....	71
Tableau XVIII. Symptômes engendrés chez <i>Rana pipiens</i> par l'injection de différentes souches d' <i>Aeromonas hydrophila</i> ( dose injectée: $10^7$ bactéries/ml).....	72
Tableau XIX. Comparaison de la D.L.50 pour la souche ichtyenne (LL <sub>1</sub> ) et la souche amphibienne (S.5) d' <i>Aeromonas hydrophila</i> chez la grenouille léopard ( <i>Rana pipiens</i> ).....	73

## Liste des annexes

	page
Annexe 1.....	106
-Calcul de la D.L.50 par la méthode de Reed et Muench (1938).....	106
-Calcul de la D.L.50 pour la souche ichtyenne LL <sub>1</sub> chez les grenouilles adultes.....	106
-Calcul de la D.L.50 pour la souche ichtyenne LL <sub>1</sub> chez les grenouilles juvéniles.....	107
-Calcul de la D.L.50 pour la souche amphibienne S.S. chez les grenouilles adultes.....	108
 Annexe 2.....	 109
-Évaluation des densités bactériennes.....	109
-Valeurs en UFC/ml ( $\pm$ écart-type) qui ont servi à l'évaluation des densités bactériennes par site et par saison.....	 109

## Remerciements

Mes remerciements des plus sincères s'adressent tout d'abord à mon directeur de recherche, le Dr. Raymond Leclair pour la pertinence et la perspicacité de ses remarques et conseils, de son soutien moral qui fut des plus appréciés et de sa très grande disponibilité.

Je tiens également à remercier les docteurs Guy Charpentier et Jacques Boisvert pour les précieux conseils, ainsi que M. Jean-Louis Benoit pour ses encouragements et son aide technique. Mes remerciements vont aussi à René Perreault et Sylvie Flageole pour leur participation à ce projet.

En dernier lieu, j'aimerais exprimer toute ma reconnaissance à mes parents et à mon époux pour leur encouragement constant et leur patience exemplaire à mon égard.

## Sommaire

*Aeromonas hydrophila* est une bactérie ubiquiste de l'écosystème aquatique qui, bien que considérée comme résidente normale de la flore intestinale des grenouilles, a la capacité d'engendrer chez ces dernières " la maladie des pattes rouges " qui est une forme de septicémie hémorragique.

La densité de cette bactérie, étudiée dans sept sites autour du lac Saint-Pierre, montre une phase maximale au printemps. Ce résultat vient corroborer le fait que cette maladie se manifeste exclusivement à cette période de l'année. De plus, ces bactéries montrent une relation positive avec la quantité de matières en suspension pour cette même période, ces dernières constituant une source d'éléments nutritifs.

Un stress physiologique chez l'animal associé à un faible indice de conditionnement seraient à l'origine du déclenchement de cette pathologie.

En laboratoire, une différence de virulence a été mise en évidence entre les souches ichtyenne et amphibiennne. La souche isolée de truites arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) moribondes est beaucoup plus virulente que les souches amphibiennes extraites chez la grenouille léopard (*Rana pipiens*) et les souches aquatiques provenant de sites propices du lac Saint-Pierre.

La similitude entre les D.L.50 obtenues pour la souche ichtyenne virulente ( $LL_1$ ) ( $10^{4.60}$ : truites;  $10^{4.47}$ : grenouilles) suggère que le pouvoir bactéricide du sérum amphibien pourrait être analogue à celui des poissons. Ces deux espèces pourraient en l'occurrence posséder la même sensibilité à l'infection induite par *Aeromonas hydrophila* pour cette

même souche (LL<sub>1</sub>).

Par contre les juvéniles montrent une résistance accrue par rapport à celle des grenouilles adultes; la différence serait expliquée en partie par l'incidence des phénomènes d'hibernation et de métamorphose sur le système immunitaire de l'animal.

## 1. Introduction

*Aeromonas hydrophila* est considéré comme un organisme ubiquiste de l'écosystème aquatique (Hazen *et al* , 1978) et un pathogène primaire s'établissant communément, chez les poïkilothermes (Shotts, 1984), escargots (Mead, 1969), poissons (Hazen, 1979), amphibiens (Carr *et al* , 1976), reptiles (Shotts *et al* , 1972; Gorden *et al* , 1979), et chez des homéothermes incluant les humains (Von Graevenitz et Zinterhofer, 1970; Gurwith *et al* , 1977).

Des infections fatales chez le poisson, qui se manifestent par des lésions et des hémorragies cutanées, peuvent prendre des proportions épidémiques autant dans les populations naturelles (Snieszko, 1974; Hazen, 1979) que dans les piscicultures (Trust et Sparrow, 1974).

Chez la grenouille, cette bactérie est l'agent responsable de la maladie des pattes rouges, appelée septicémie hémorragique, et qui provoque la mort de nombreux spécimens particulièrement au printemps au sortir de l'hibernation (Hird *et al* , 1981).

Les cas de maladie des pattes rouges ("Red leg disease") sont de plus en plus nombreux en milieu naturel (Franz, 1966; Don Hunsaker et Potter, 1960; Hird *et al* , 1981; Hird *et al* , 1983). *A. hydrophila* se retrouve même en milieu où les conditions sont adverses (eau claire et froide; 13°C) à celles auxquelles cette maladie est habituellement associée (Lee et Franz, 1973). Le pathogène a été soupçonné d'être en partie responsable du déclin des populations de grenouille léopard du nord-est des États-Unis (Anonyme, 1973), et on a récemment démontré qu'il a éliminé tous les individus métamorphosés d'une population de *Rana muscosa* vivant en altitude en Californie (Bradford, 1989).

Ces infections se déclarent en dépit du fait que le pathogène fasse partie de la flore normale de ces poïkilothermes (Hird *et al* , 1981). Ceci pourrait s'expliquer par l'existence d'une variation de virulence à l'intérieur même de l'espèce dont seule la souche la plus virulente serait responsable de la maladie, tel que l'a démontré l'étude de Lalonde (1981) effectuée sur les truites arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*).

Au Canada et aux États-Unis, plusieurs cas, parfois fatals, d'infections gastro-intestinales ou de septicémies suivies d'endocardites sont rapportés pour l'homme (Gurwith *et al* , 1977; Ketover *et al* , 1973; Cumberbatch *et al* , 1979). Celui-ci peut être en contact avec la bactérie par consommation d'eau contaminée ou par envahissement de lésions cutanées en contact avec l'eau ou lors de manipulations de spécimens animaux infectés.

Au lac Saint-Pierre, une cinquantaine de pêcheurs tirent profit de l'exploitation des stocks naturels de grenouilles et nombreux sont ceux qui consomment la chair de leurs cuisses malgré les cas fréquents de grenouilles atteintes de la maladie des pattes rouges (Leclair, 1985). D'après Paquin (1982) plus de 80000 grenouilles, et 9000 ouaouarons ont été capturés au cours de l'automne 1979 et du printemps-été 1980. La période de chasse, récemment règlementée (1988) débute le 15 juillet et se termine le 15 novembre. (Benoit *et al* , 1988). Une part des grenouilles chassées est utilisée comme matériel expérimental, et une autre est réservée à des fins de consommation personnelle.

Le problème émane de l'absence de contrôle sanitaire des animaux capturés. Effectivement aucune notion d'hygiène n'est appliquée puisque les grenouilles capturées sont vendues à des particuliers et non aux poissonneries ou aux restaurants (Benoit *et al* , 1988). *Aeromonas hydrophila* représente donc un problème hautement significatif pour la

santé publique (Seidler *et al* , 1980).

Les buts de cette étude sont d'évaluer l'état de santé des populations de grenouilles léopards (*Rana pipiens*) du lac Saint-Pierre et d'acquérir des connaissances concernant les pouvoirs pathologique et écotoxicologique d'*Aeromonas hydrophila*.

Les objectifs permettant d'atteindre ces buts étaient:

- 1/ D'évaluer pour plusieurs sites, l'importance de l'infection sur les rives Nord et Sud du lac Saint-Pierre.
- 2/ D'établir les liens potentiels des différents facteurs ( mois, sites ) et paramètres physico-chimiques avec la densité du pathogène.
- 3/ De déterminer la pathogénicité et la toxicité ( DL50 ) de souches d'*Aeromonas hydrophila* d'origine ichthyenne et amphibienne.  
et
- 4/ D'évaluer le degré de virulence d'*Aeromonas hydrophila* par une comparaison de la pathogénicité et de la toxicité de ces souches chez les grenouilles adultes et les juvéniles.

## 2. Historique

C'est en 1890 que Zimmerman isola, pour la première fois, la bactérie (*Bacillus punctatus*) de l'eau (Popoff et Véron, 1976; LeMinor et Véron, 1982).

Un article de Russel (1898) nous informe que Sanarelli, en 1891, procura un nom et fournit une description de la bactérie. Lors de ses expériences d'inoculation de grenouilles, une infection accidentelle provoqua la mort rapide de ces animaux; il orienta alors ses travaux vers la cause de cette mortalité. Suite à ces travaux, il isola du sang de grenouilles, la bactérie qu'il nomma *Bacillus hydrophilus fuscus*, et qu'il décrivit selon différents milieux de culture .

Cette bactérie était pathogène tant envers les animaux à sang froid (grenouilles, crapauds, salamandres, lézards, anguilles d'eau douce et crapets soleil) qu'envers les animaux à sang chaud (porcs de guinée, lapins, souris, souris de campagne, nouveau-nés de chats et de chiens, poulets et pigeons). Selon Sanarelli, l'eau semblerait être la source de *Bacillus hydrophilus fuscus* (Russel, 1898).

En 1893, Trambusti identifia l'organisme tel que décrit par Sanarelli. Il dirigea plutôt ces travaux sur l'action physiologique des produits de croissance bactérienne (précipités et solubles dans l'alcool) isolés de cultures pures, sur les grenouilles. Il étudia aussi les réactions chimiques sur les muscles, le cerveau et la moelle épinière chez les grenouilles après les avoir injectées avec les produits toxiques de ces microorganismes (Russel, 1898; Kulp et Borden, 1942).

Roger (1893) au cours de cette même année, découvrit et identifia cette bactérie. Il l'isola non seulement du sang mais aussi des organes et de l'eau dans laquelle baignaient les animaux infectés. Il fit une brève description des signes cliniques apparents des grenouilles malades (Russel, 1898; Kulp et Borden, 1942).

Russel en 1898 fournit une étude substantielle concernant *Bacillus hydrophilus* et de ses effets pathogènes. Ses travaux concernent:

- le comportement des animaux infectés.
  - les effets pathologiques internes ( autopsie ) et externes.
  - l'examen bactériologique du sang, des organes et fluides du corps.
  - la morphologie de la bactérie dont l'observation du flagelle.
  - la description culturelle et biochimique.
  - la température léthale pour la bactérie.
  - la motilité par observation microscopique.
  - l'histologie des organes d'animaux infectés.
  - l'effet des deux types de toxines isolées de la bactérie:
    - type soluble dans l'alcool
    - type insoluble dans l'alcool,
- de même que la virulence de chacune d'elles ( Russel, 1898 ).

Il indique que l'infection par *Bacillus hydrophilus* se ferait via des lésions superficielles de la peau ( Kulp et Borden, 1942 ).

Emerson et Norris en 1905 donnent le nom de "red leg disease" (ou maladie des pattes rouges) à la maladie provoquée par *Bacillus hydrophilus fuscus*, décrivant bien de cette façon la congestion de la circulation au niveau du bas ventre et des jambes des grenouilles. Leur étude porta sur de nombreux aspects dont: l'état pathologique des grenouilles, sur les produits de cultures bactériennes et sur la relation entre la maladie et la destruction des érythrocytes.

Depuis, plusieurs chercheurs ont porté de l'intérêt à cette maladie et certains résultats de ces études, de même que d'autres aspects historiques sont indiqués dans les deux prochains chapîtres.

### 3. Taxonomie

Cette bactérie a tout d'abord été connue sous le nom de *Bacillus ranicida* par Ernst en 1890 et par Weldin en 1926-27, de *Bacillus hydrophilus fuscus* par Sanarelli en 1891 et de *Bacterium hydrophilus fuscus* en 1897 par Chester qu'il modifia pour *Bacillus hydrophilus* en 1901 (Kulp et Borden, 1942).

Lehman et Neumann (1931) donne le nom de *Bacterium ranicida* à ce bacille (Kulp et Borden, 1942). Les éditions de 1923 et 1934 du Bergey's Manual le reconnaissent ensuite sous *Proteus hydrophilus* (Kulp et Borden, 1942; Shotts, 1984). Kaplan (1953) le modifie pour *Pseudomonas hydrophilus* (Gibbs *et al.*, 1966).

Le genre *Aeromonas* est proposé par Kluyver et Van Niel en 1936 (Schubert, 1974; Popoff et Véron, 1976; Shotts, 1984). Stenier (1943) adopte *Aeromonas hydrophila* (Chester) (Schubert, 1974; Shotts, 1984), mais la taxonomie des *Aeromonas* motiles engendre une vive controverse entre les chercheurs (Popoff, 1984). Pour Bergey's Manual, ce n'est qu'à la 7<sup>ième</sup> édition que le nom *Aeromonas* est accepté (Shotts, 1984).

Lors de la 8<sup>ième</sup> édition, Bergey's Manual revise la nomenclature et suggère que *A. hydrophila* soit divisé en trois sous-espèces soient; ssp *hydrophila*, ssp *anaerogenes*, ssp *proteolytica*, et que *A. punctata* soit séparé en deux sous-espèces soit ssp *punctata* et ssp *caviae* (Schubert, 1974).

C'est lors de cette même édition qu'*Aeromonas salmonicida* fut divisé en trois sous espèces (ssp *salmonicida*, ssp *achromogenes*, ssp *masoucida*) suite à son acceptation comme groupe non-motile lors de la 7<sup>ième</sup> édition. Cette bactérie fut connue antérieurement sous les noms de *Bacterium salmonicida* (Lehman et Neumann, 1896), *Bacillus salmoni-*

*cida* (Lehman et Neumann: Kruse, 1896) et de *Proteus salmonicida* (Lehman et Neumann: Pribam, 1933) (Schubert, 1974).

La conservation seule d'*A. hydrophila* est suggérée par McCarthy en 1975 (a) et appuyée par McInnes et coll. en 1979, après une étude basée sur la recombinaison de l'ADN entre les différents membres du genre *Aeromonas*.

Popoff et Véron (1976) proposent de retenir deux espèces, *A. hydrophila* (biotype 1 et 2) et *A. sobria*, d'après une étude de caractères des souches; ils sont appuyés par Neilson (1978) et Shaw et Hodder (1978).

Finalement McCarthy (1975 b) et, Popoff et Véron (1976) proposent que la sous-espèce *proteolytica* soit retirée (Popoff, 1984).

Au cours des années plusieurs noms ont été attribués à la bactérie *Aeromonas hydrophila* dont:

*Bacillus hydrophilus fuscus* (Sanarelli, 1891)

*Bacillus hydrophilus* (Chester, 1901)

*Proteus hydrophilus* (Bergey's *et al*, 1923: Chester)

*Bacillus ichthyosmius* (Hammer, 1917).

*Escherichia ichthyosmia* (Bergey's *et al*, 1923: Hammer).

*Bacterium hydrophilum* (Weldin et Levine, 1923: Chester).

*Pseudomonas fermentans* (von Wolzogen-Kühr, 1932).

*Proteus ichthyosmius* (Bergey's *et al*, 1934: Hammer).

*Flavobacterium fermentans* (Bergey's *et al*, 1934: von Wolzogen-Kühr).

*Proteus melanovogenes* (Miles et Halnan, 1937).

*Aeromonas hydrophila* (Stanier, 1943: Chester)

*Pseudomonas hydrophila* (Breed *et al.*, 1948: Chester)

*Pseudomonas ichthyosmia* (Breed *et al.*, 1948: Hammer).

*Vibrio jamaicensis* (Caselitz, 1955).

(Schubert, 1974; Khardori et Fainstein, 1988).

Ceci s'explique par le fait qu'*Aeromonas* fut classé dans de nombreux genres soient: *Proteus*, *Pseudomonas*, *Flavobacter*, *Achromobacter*, *Escherichia* et *Aerobacter*. En 1943 Stanier souligne la nécessité de regrouper ces bactéries dans le genre *Aeromonas* qui avait été préalablement créé par Kluyver et Van Niel en 1936. La proposition fut acceptée en 1957 et enfin le genre *Aeromonas* pu être inclu dans la famille des *Vibrionaceae* en 1966 (Lefrancis et Véron, 1982).

Dans la 9ième édition du Bergey's manual on distingue quatre espèces qui ont été séparées en deux groupes en se basant sur la motilité. Les bactéries non-motiles sont regroupées en une seule espèce et constituent le premier groupe: *Aeromonas salmonicida* dont trois sous-espèces, ssp *salmonicida*, ssp *achromogenes* et ssp *masoucida*. Le deuxième groupe quant à lui comprend les bactéries motiles qui se divisent en trois espèces: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* et *Aeromonas sobria* (Popoff, 1984; Khardori et Fainstein, 1988).

## 4 Généralités

### 4.1. Description générale de la bactérie

#### 4.1.1. Morphologie

*Aeromonas hydrophila* se présente généralement sous forme de batonnêt droit (1 à 3,5µm de longueur et 0,3 à 1µm de diamètre) possédant un flagelle monotriche polaire (Popoff, 1984). Ces bacilles à gram négatif, motiles, sont dépourvus de capsules ou de spores et sont anaérobies facultatifs (Russel, 1898; LeMinor et Véron, 1982; Popoff, 1984), non luminescents (Smith, 1976).

#### 4.1.2. Croissance

Ces bactéries se cultivent très bien dans un milieu de culture comme une gélose ou un bouillon nutritif, mais la gélose au sang procure à *A. hydrophila* un milieu favorable à sa croissance (Ewing et Hugh, 1974; Khardori et Fainstein, 1988).

Ces bacilles se retrouvent sur une grande échelle de température variant entre 4°C et 45°C. Ils possèdent une température de croissance optimale d'environ 30°C. Leur croissance minimale se situe à 5°C alors qu'elle est très rapide entre 18°C et 38°C, et est inhibée à 50°C (Russel, 1898; Rouf et Rigney, 1971; Ewing et Hugh, 1974).

*A. hydrophila* a la capacité de résister à des pH variant de 5.2 à 9.8, à presque toutes les salinités, à des turbidités variant de 0 à 395 unités Jackson. Seule la conductivité semble avoir un effet significatif sur la densité de cette bactérie (Hazen *et al*, 1978).

En raison de cette habileté à vivre sous une grande variété de conditions environnementales dans les eaux naturelles, mises à part les conditions extrêmes de chaleur, de pollution ou de salinité; *A. hydrophila* possède une distribution cosmopolite (Hazen *et al*, 1978).

#### 4.1.3. Réactions biochimiques

Les réactions biochimiques d'*A. hydrophila*, de souches aquatique ou animale, face aux différents tests ou milieux de culture, sont présentées au tableau I. Cette information peut servir de référence lors d'une comparaison avec le patron biochimique de cette bactérie obtenu par le système API-20E, conçu pour l'identification de souches d'origine humaine.

Les caractéristiques permettant la différenciation des espèces et des sous-espèces du genre *Aeromonas* se retrouvent au tableau II.

#### 4.1.4. Sérotypie

Par le passé des investigations préliminaires ont été effectuées sur certains antigènes O (somatique) et H (flagellaire), mais ces études n'ont pas eu de suite.

Des études d'agglutination ayant pour but de démontrer l'hétérogénéité antigénique et la possibilité de sérotypie ont suivi: Miles et Miles en 1951, Kjems en 1955, Ewing et coll. en 1961 et De Meuron et Peduzzi en 1979. En 1984, Popoff et Lallier procèdent à une étude de sérotypie d'*Aeromonas* motiles basée principalement sur l'antigène O et l'antigène WC. Une souche est classifiée selon un séro-groupe particulier si les cellules bouillies sont agglutinées par un seul antisérum de ce type et non par des antisérums ayant d'autres

spécificités. Ils en viennent à la conclusion que la sérotypie des *Aeromonas* motiles doit être basée principalement sur leur antigène O.

La sérotypie s'avère un outil précieux pour permettre la détection et la caractérisation des souches virulentes et non virulentes.

#### 4.1.5. Habitat et isolement

Ces pathogènes sont des organismes ubiquistes dans l'environnement aquatique (Shotts, 1984). Ils ont été isolés de l'eau de surface, de l'eau du robinet, de l'eau de puit, de l'eau distillée autant que de l'eau d'égoût, du sol (Ewing *et al*, 1960; Lindbert *et al*, 1973; Phillips *et al*, 1974; Eurell *et al*, 1978), de la nourriture (Barnhart, 1989) et de boues activées (Neilson, 1978).

Ils se retrouvent habituellement en eau douce et dans les eaux de mer recevant des apports réguliers d'eau douce (Hazen *et al*, 1978; Rippey et Cabelli, 1980). Une infection causée par *Aeromonas* chez la morue franche (*Gadus morhua*), causant des ulcères chez cette dernière, a été rapportée en eaux salées (Larsen et Jensen, 1977). Selon Schubert, ces bactéries sont en plus ou moins grande concentration dans les eaux de surface mais en concentration supérieure à celle d'*Escherichia coli* ou d'*Enterobacter* avec lesquels il y a rivalité de croissance et non pas de comportements antagonistes (Le Minor et Véron, 1982; Brock *et al*, 1984).

*A. hydrophila* est isolé à partir d'une grande variété d'échantillons d'origine humaine dont le sang des patients fébriles, le suintement de blessures et d'ulcères, le pus d'ostéomyélite, le prélèvement de la gorge, l'urine, la bile ainsi que les fecès de personnes atteintes.

tes de diarrhée (Ketover *et al* , 1973; Schubert, 1974; Gurwith *et al* , 1977; Cumberbatch *et al* , 1979).

Ces microorganismes sont par contre des habitants normaux de l'eau (Rippey et Cabelli, 1980; Hazen *et al* , 1978), de la peau (Horsley, 1977) et de la flore intestinale des poissons (Trust et Sparrow, 1974 ) et d'autres poïkilothermes (Gorden *et al* , 1979; Hird *et al* , 1981).

#### 4.2. Pathogénicité

Il n'y a pas si longtemps, *A. hydrophila* était considéré comme un pathogène opportuniste de faible virulence. Mais après avoir constaté les effets et l'étendue des infections découlant de cette bactérie, celle-ci est maintenant reconnue comme un pathogène primaire (Gurwith *et al*, 1977; Davis *et al* , 1978).

Effectivement de nombreuses maladies sont causées par cette bactérie de même qu'une grande variété d'espèces en sont les victimes.

En ce qui a trait aux humains, de nombreux cas d'infections à travers le monde (Europe, Colombie, Inde, États-Unis, Thaïlande, Canada) depuis les vingt dernières années sont signalés (Von Graevenitz et Zinterhofer, 1970; Gurwith *et al* , 1977; Smith, 1980; Khardori et Fainstein, 1988).

Tableau I. Patron biochimique d' *Aeromonas hydrophila*

Tests ou Substrats	Réactions
Acétate de sodium	d
Adonitol	-
Arabinose	d
Arginine d'hydrolase (milieu MØELLER)	d
Catalase	+
Cellobiose	d
Citrate (SIMMONS) (CHRISTENSEN'S)	d d
Croissance sur cetrimide	-
Croissance sur KCN	+ ou -
Croissance (géluse McConkey)	+
Croissance sur eau peptonée (sans NaCl)	+
Dulcitol	-
Esculine	+ ou -
Fermentation du galactose	+
Gélatine	22°C charbon + + + gaz d
Glucose	acide + d
Glycérol	d
Hydrolyse	amidon + gélatine + ADN + ARN +
Indole	+ ou -
Inositol	-
Lactose	d
Lipase (huile de maïs)	+
Lysine décarboxylase	-
Maltose	+

(suite du Tableau I)

Mannitol	acide	+
	gaz	d
Mannose		+
Malonate, Mucate		-
Mélezitose		-
Mélobiose		-
Méthyl rouge	37°C	+
	26°C	+ ou -
Motilité		+
Nitrate réduit	en gaz	-
	en nitrite	+
non réduit (Zn <sup>+</sup> )		-
Ornithine décarboxylase		-
Oxydase		+
Phénylalanine déaminase		+ ou -
Raffinose		-
Rhamnose		-
Salicine		d
Sorbitol		d
Sulfure d'hydrogène (gélose TSI ou KI)		-
Sucrose		d
Tréhalose		+
Tube hémolyse (érythrocyte de mouton)		+ ou -
Tryptophane		-
Tween 80 estérase		+
Tétrationate réductase		d
Uréase		-
Vogues Proskauer	37°C	- ou +
	26°C	+ ou -
Xylose		-

(Ewing et Hugh, 1974; Popoff, 1984).

d: différentes réactions

+: positive; -: négative

Tableau II. Différenciation entre: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria* et *Aeromonas salmonicida*.

caractéristiques	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
				<i>salmonicida</i>	<i>ochromogenes</i>	<i>mesocida</i>
motilité	+	+	+	-	-	-
<u>milieu liquide:</u>						
<u>flagellé</u>						
(monotriche)	+	+	+	-	-	-
(lophotriche)	-	-	-	-	-	-
<u>coccobacilles</u>						
(paire, chaîne ou groupe)	-	-	-	+	+	+
<u>batônnets</u>						
(seul ou en chaîne)	+	+	+	-	-	-
<u>pigment brun</u>						
(soluble ds l'eau)	-	-	-	+	-	-
<u>croissance à 37°C</u>						
(bouillon nutritif)	+	+	+	-	-	-
<u>production d'indole</u>						
(eau peptonée 1%)	+	+	+	-	+	+
<u>hydrolyse d'esculine</u>	+	+	-	+	-	+
<u>croissance KCN</u>						
(technique de Møeller)	+	+	-	-	-	-
<u>utilisation:</u>						
L-histidine						
et L-arginine	+	+	-	-	-	-
L-arabinose	+	+	-	+	-	+
<u>Fermentation:</u>						
salicine	+	+	-	d	d	d
sucrose	+	+	+	-	+	+
<u>mannitol</u>	+	+	+	+	-	+
<u>inositol</u>	-	-	-	-	-	-
(décomposition)						
<u>acétoine du glucose</u>						
(Vogues-Proskauer)	+	-	d	-	-	-

(suite du Tableau II)

---

<u>Gaz du glucose</u>	+	-	+	+	-	+
<u>H<sub>2</sub>S de la cystéine</u>	+	-	+	-	-	+

---

-: négative

+: positive

d: différence entre les souches

(Popoff, 1984).

*A. hydrophila* est un pathogène intestinal potentiel. Une incidence élevée d'infections gastro-intestinales est relevée chez les enfants de moins de deux ans (Agger *et al*, 1985). De ces infections découle principalement la gastro-entérite, qui est accompagnée de fièvre, de douleurs abdominales, de nausées, de diarrhées, de vomissements et de déshydratation (Von Graevenitz et Zinterhofer, 1970). Ces symptômes sont aigus ou sévères chez les enfants et chroniques chez les adultes (Holmberg *et al*, 1986).

Le spectre d'infection s'est grandement élargi depuis; maintenant cette bactérie est aussi considérée comme étant un pathogène potentiel pour les yeux, les tissus osseux, musculaires et cutanés.

Il en résulte une variété de syndromes cliniques dont les nécroses musculaires, particulièrement des muscles squelettiques, méningites, amygdalites, ulcérations cornéennes, endocardites, infections de blessures chirurgicales et non chirurgicales, ostéomyélites, otites, arthrites, infections des voies respiratoires, cellulite, infections du conduit urinaire et péritonites (Smith, 1980; Khardori et Fainstein, 1988). Aucun des patients impliqués dans ces cas n'étaient atteints de maladies malignes ou d'immuno-dépression (Smith, 1980).

De nombreux cas de septicémie ont aussi été rapportés, mais cette infection aiguë ne se développe que chez des sujets atteints au préalable de cirrhose du foie, d'immunodépression, de leucémie ou d'autres formes de maladies malignes (Ketover *et al*, 1973; Khardori et Fainstein, 1988).

En général, ces infections originent d'un contact de la peau avec une eau contaminée, ou d'une ingestion d'eau non traitée (Smith, 1980; Khardori et Fainstein, 1988). L'homme en ayant de nombreuses activités récréatives ou autres liées au milieu aquatique, s'expose à un réel danger lorsque ce dernier est contaminé par la bactérie (Seidler *et al*, 1980), celle-ci ne constituant pas une composante normale de la flore intestinale chez l'humain (Smith, 1980; Khardori et Fainstein, 1988).

Quelques cas d'infections concernant les mammifères ont été observés. Par exemple, elle provoque une diarrhée néo-natale chez le porc (Dobrescu, 1978), des avortements chez les bovins (Wohlegemuth *et al*, 1972), de septicémie chez les chiens (Pierce *et al*, 1973) et des maladies chez les lièvres (Oudar *et al*, 1974) et les animaux à fourrures (vison, renard, phoque) (Dahle et Nordstoga, 1968).

Ce sont surtout les animaux à sang froid pour qui cette bactérie s'avère un pathogène très important (Khardori et Fainstein, 1988).

Par exemple chez le serpent, elle provoque une stomatite ulcéreuse *i.e.* une inflammation ulcéreuse de la cavité buccale qui conduit à une septicémie. À ce stade la mort survient rapidement (Punzo, 1975).

Chez la salamandre, des cas d'oedème, de rougeurs des tissus sous-cutanés et d'anorexie ont été observés. La tortue présente aussi des oedèmes et des rougeurs sous-cutanées des tissus, en plus de formation de pus gélatineux et des cas de septicémie (Boyer *et al*, 1971)

Une lenteur au niveau du comportement est observée chez les crocodiles en captivité dans les zoos. *A. hydrophila* chez ces individus constitue plus de 40% des cas de maladie bactérienne (Shotts, 1984).

Chez le poisson, Bullock *et al* (1971) décrivent quatre formes cliniques de la septicémie hémorragique: aiguë (peu de symptômes ou lésions); subaiguë (ascites, vésicules, abcès, protusion des écailles); chronique (ulcères, furoncles) et latente (absence de lésion).

Chez les grenouilles et les têtards, *A. hydrophila* fait partie de la flore intestinale normale (Gibbs, 1973; Hird *et al*, 1981; Shotts, 1984).

Cette bactérie est surtout reconnue pour la maladie des pattes rouges ("red leg disease") qu'elle cause principalement chez les grenouilles, plus particulièrement chez la grenouille léopard (*Rana pipiens*) (Gibbs *et al*, 1966; Van Der Waaij *et al*, 1974; Hird *et al*, 1981), de même que chez les salamandres et les crapauds. C'est une septicémie hémorragique *i.e.* une hémorragie des capillaires sanguins. Les bactéries entrent dans le flux sanguin et sont rapidement réparties dans toutes les parties du corps. Elles installent des foyers locaux d'infection dans différents organes à partir desquels s'échappent du pus qui se dirige vers le flux sanguin, où les bactéries se multiplient rapidement. Éventuellement tous les organes du système sont affectés, et la mort en résulte (Don Hunsaker et Potter, 1960; Hawker et Linton, 1971).

Cette maladie est facilement reconnaissable, car les signes cliniques sont évidents chez la grenouille. Il y a présence d'ulcères cutanés, gonflement de la région abdominale dû à une inflammation viscérale, rougeurs aux pattes arrière et au bas ventre, comportement anorexique et léthargique, convulsions et hémoptysie (Figure 1) (Frye, 1985; Khardori et Fainstein, 1988). L'évolution des symptômes est représentée à la Figure 2.

Chez les têtards, les symptômes sont surtout au niveau comportemental. Il y a amaigrissement de l'animal conséquence d'un comportement anorexique; les déplacements sont faibles voire même inexistants, donc cessation de la nage; ils demeurent immobiles près de la surface ou sur le fond (Nyman, 1986).

Il demeure toujours qu'une septicémie hémorragique peut provoquer une mort très rapide due à une densité élevée d' *A. hydrophila* et ne présenter que peu ou pas de signes cliniques observables (Kulp et Borden, 1942; Gibbs *et al* , 1966).

Russel (1898) a observé un changement au niveau du comportement des grenouilles adultes atteintes. Les mouvements sont très lents, il y a cessation des sauts et la posture est modifiée de semi-érection à une position horizontale.

L'autopsie chez de tels animaux a révélé diverses modifications des organes comme; la présence de taches hémorragiques à la surface de la langue, l'infiltration plus ou moins grande du sang dans les muscles des cuisses, le rougissement des muscles des jambes et de l'abdomen, l'accumulation de larges quantités de fluides entre la peau et les muscles et dans les cavités, une pâleur et une flaccidité du muscle cardiaque mais de façon inconsistante, une flaccidité de la rate avec taches hémorragiques (Emerson et Norris, 1905), le gonflement de l'estomac et de l'intestin, l'accumulation de matières gélatineuses dans les viscères (Russel, 1898), et un assombrissement brun-rouge ou noir du foie avec taches hémorragiques ( Shotts, 1984 ).

D'un point de vue histologique, il y a présence de nécroses focales dans la rate, le foie, le cerveau et la moelle épinière avec une congestion dans les autres organes.

Lors d'hémorragie intramusculaire, il y a destruction des fibres musculaires (Russel, 1898) ce qui forment des régions nécrotiques dans les muscles (Shotts, 1984 ). De plus le sang montre une anémie et une leucocytose très avancée (Emerson et Norris, 1905).



Figure 1. Photo d'une grenouille atteinte de la maladie des pattes rouges.

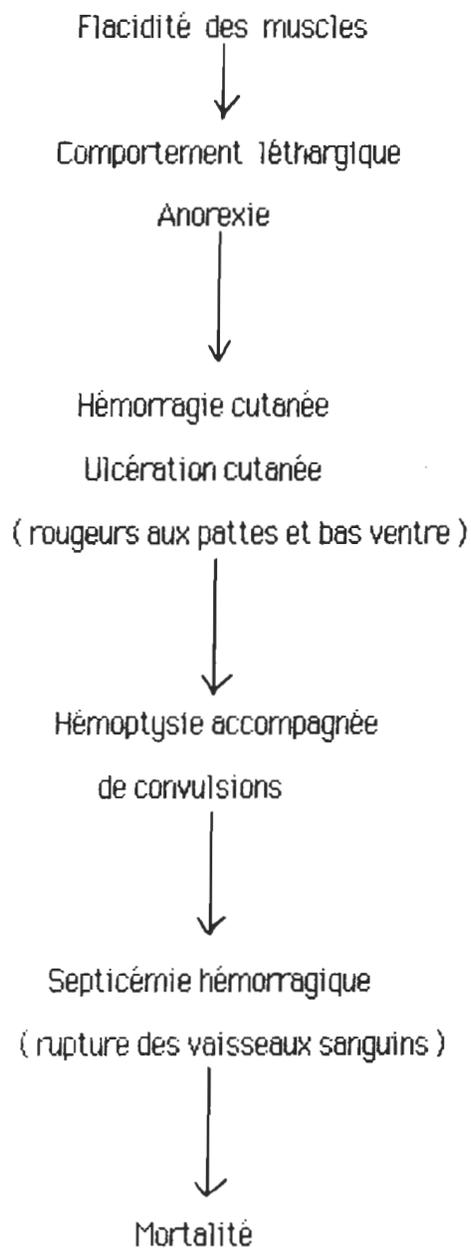


Figure 2. Évolution des symptômes de la maladie des pattes rouges chez la grenouille ( Frye, 1985; Khardori et Fainstein, 1988).

### 4.3. Facteurs étiologiques

#### 4.3.1. Aspect biologique

De façon générale, la maladie des pattes rouges causée par *A. hydrophila* résulte d'un stress subi par l'hôte (Gibbs *et al* , 1973; Glorioso *et al* , 1974; Rigney *et al* , 1978; Hird *et al* , 1981; Shotts, 1984).

Ketover, Young et Armstrong (1973) suggèrent que même chez l'humain, le stress aurait un rôle à jouer au niveau de la voie d'infection intestinale dans le cas où cette infection conduit à une septicémie.

Chez les mammifères, ce stress peut prendre différentes formes. Par exemple, la privation de nourriture, d'eau ou de litière procure un stress chez la souris (Tannock *et al* , 1974).

*A. hydrophila* fait partie de la flore normale de l'alligator; un stress, comme par exemple le trappage, associé à une température de plus de 20,5°C auront la capacité de provoquer une augmentation rapide de la bactérie conduisant à la mort de l'hôte (épizootie) (Gorden *et al*, 1979). Chez le poisson une culture intensive induit ce stress (Trust, 1975).

Chez les grenouilles de laboratoire, les blessures causées par la capture, l'exposition à des températures élevées durant le transfert des animaux, le manque de nourriture, la surpopulation dans les contenants, le manque de propreté des contenants, la présence de fer, de zinc, de roches ou de graviers dans le fond du contenant (Emerson et Norris, 1905) ainsi que le confinement du milieu et la faible circulation de l'eau sont tous

des facteurs pouvant causer un stress chez les grenouilles. Il en résulte une rapide prolifération de la bactérie, ce qui facilite la manifestation de la maladie (Carr *et al*, 1976).

Dans une population naturelle de grenouilles, nombreux sont les facteurs menant à des conditions de stress. Carr et coll. (1976) rapportent qu'une surpopulation, une altération de la température environnementale, une faible quantité d'oxygène et un manque de nourriture induisent un affaiblissement de la santé et augmentent la susceptibilité aux maladies bactériennes.

Chez les têtards, la surpopulation, le manque de nourriture et la présence de blessures sont des facteurs qui contribuent à l'affaiblissement des défenses immunologiques. La multiplication des bactéries est alors très rapide, et achemine l'animal vers une mort certaine (Nyman, 1986).

Une sursaturation de l'eau en gaz contribue aussi à l'augmentation de la densité d'*A. hydrophila* chez les têtards. L'étude de Colt et coll. (1984 a) effectuée sur les têtards de ouaouaron a démontré qu'une exposition chronique produit des dommages au niveau du tube gastro-intestinal et permet ainsi une augmentation de la population de la bactérie au niveau des reins et du sang. Cela provoque un gonflement de l'intestin et de la vessie, qui se constate aisément par l'observation des sujets flottant à la surface de l'eau.

Concernant les grenouilles adultes, ce phénomène de sursaturation produit des changements physiques du mucus des membranes intestinales permettant ainsi à la flore intestinale de passer à travers la barrière de mucus du tube gastro-intestinal (Colt *et al*, 1984 b).

Une exposition chronique engendre une septicémie (Colt *et al*, 1984 b). Cet état de sur-saturation de l'eau est un phénomène retrouvé naturellement dans les lacs et rivières au printemps, les grenouilles sont donc confrontées à ce facteur dès leur sortie de l'hibernation.

Selon Carr *et al* (1976), l'hibernation constitue un stress considérable sur les grenouilles. Les conditions d'hibernation provoquent un hypofonctionnement du système immunitaire chez ces hibernants, soit à cause de la basse température, soit à cause de l'hibernation elle-même. Cette basse température procure une pression sélective en diminuant la densité de bactéries présentes, mais en favorisant par contre la croissance de bactéries psychrophiles facultatives, tel *A. hydrophila*. Cette condition offre un avantage pour la survie et la maintenance de ces bactéries, mais la raison demeure inconnue (Carr *et al*, 1976; Banas *et al*, 1988).

La privation de la nourriture durant l'hibernation est un facteur qui, combiné à la basse température de la saison, facilite grandement la colonisation d'*A. hydrophila* dans le tube intestinal des grenouilles; ces dernières se retrouvent à ce moment là en désavantage microbien (*i.e.* une majorité de bactéries potentiellement pathogènes) pendant et immédiatement après l'hibernation (Van Der Waij *et al*, 1974; Carr *et al*, 1976; Hird *et al*, 1981).

En général, quel que soit le stress jumelé à l'hibernation, l'invasion bactérienne est favorisée, et selon la densité de bactéries et le degré de virulence de ces dernières, il pourra en résulter une septicémie hémorragique.

#### 4.3.2. Écologie d'*Aeromonas hydrophila*

Une étude de Hazen (1979) indique que la population d'*A. hydrophila* prolifère avec l'augmentation de la température au printemps et en été car les éléments nutritifs sont disponibles, alors qu'en automne et en hiver elle diminue avec la baisse de température (Figure 3) (Hazen, 1979). Malgré que les travaux de Hazen (1979) aient été effectués en Caroline du Sud sous un climat plus chaud que celui retrouvé au Québec, on peut s'attendre à retrouver un cycle comparable d'abondance dans les eaux du lac Saint-Pierre. Seidler *et al* (1980) obtiennent le même genre de patron et ce dans un milieu plus froid (rivière Anacostia, Washington.D.C.).

Quant à l'étude de Rippey et Cabelli (1980), effectuée en région tempérée (Rhode Island), elle rapporte effectivement que les concentrations bactériennes déclinent de façon importante à partir du mois d'octobre pour atteindre leur minimum en décembre et qu'elles sont plus importantes à la fin du printemps et en été.

Ces deux études viennent corroborer les résultats de Hazen (1979) et permet donc de considérer cette étude comme outil de référence.

La pollution des eaux par la matière organique (Hazen, 1979; Rippey et Cabelli, 1980; Rippey et Cabelli, 1989) particulièrement celle d'origine piscicole (Lewis et Bender, 1961; Collins *et al*, 1975; Shotts, 1984) est un facteur qui favorise la multiplication et la survie de ces microorganismes.

La pollution thermique originant par exemple d'une centrale nucléaire contribue aussi à augmenter la densité d'*A. hydrophila*, surtout à l'endroit où la température est la plus élevée (Hazen, 1979).

*A. hydrophila* isolé de milieux pollués a démontré une augmentation de sa résistance aux antibiotiques; la pollution s'avère donc un facteur très favorable pour ces bactéries (Seidler *et al*, 1960).

La conductivité est le seul paramètre physico-chimique qui ait été mis en corrélation avec les concentrations d'*A. hydrophila* dans l'eau (Hazen *et al*, 1978).

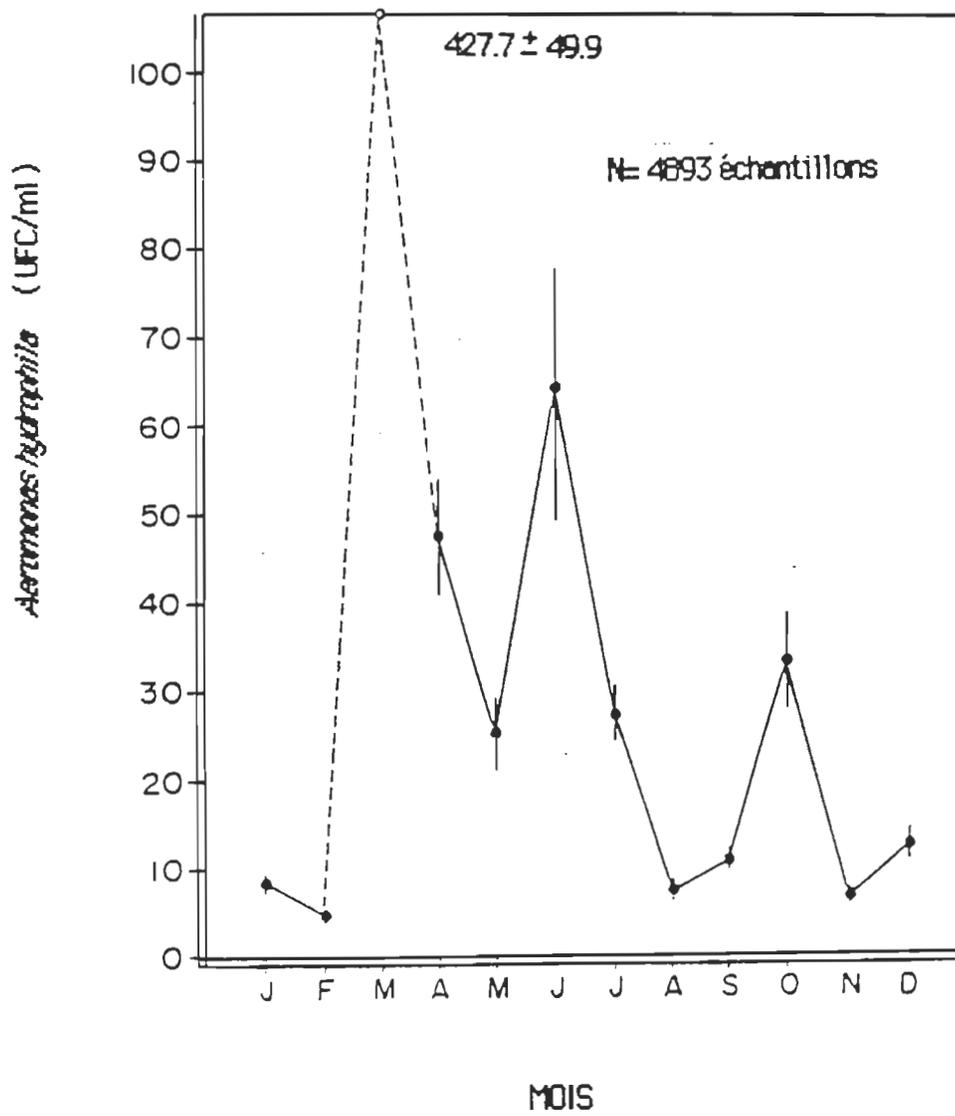


Figure 3. Densité moyenne d' *Aeromonas hydrophila* durant les différents mois de l'année (HAZEN, 1979). UFC: unité formant une colonie.

#### 4.4. Virulence

Des études basées sur la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) ont permis de déceler l'existence de différents degrés de virulence chez les souches d'*A. hydrophila* (Mittal *et al.*, 1980; Lalonde, 1981). L'étude de Leblanc (1982) a répertorié jusqu'à 130 souches d'*A. hydrophila* issues de poissons sains et moribonds, de mammifères et de l'eau dont 111 étaient de biotype I *i.e.* aérobies et 19 de biotype II *i.e.* anaérobies ; elles sont donc très nombreuses. Les souches pathogènes appartiennent surtout au biotype I (Schubert, 1974).

Les souches originant de la flore normale de poissons sains et de l'environnement démontrent une virulence variant de faible à moyenne, alors que celles isolées de poissons moribonds sont les plus virulentes (De Figueiredo et Plumb, 1977; Lalonde, 1981). Ces souches appartiennent à un même séro-groupe, LL<sub>1</sub> (Mittal *et al.*, 1980; Lalonde, 1981). Il demeure toutefois impossible d'affirmer si ces souches sont indigènes ou simplement transitoires (Van Der Waaij *et al.*, 1974).

L'étude de Lalonde (1981) chez la truite suggère qu'il ne suffit pas que la souche virulente soit présente dans le tube digestif pour qu'il y ait maladie. En effet, un stress de type physique ou environnemental est nécessaire afin de déclencher la maladie (Ketover *et al.*, 1973; Van Der Waaij *et al.*, 1974; Carr *et al.*, 1976; Gordon *et al.*, 1979; Shotts, 1984).

L'étude de Mittal *et coll.* (1980) sur les groupes d'*Aeromonas* motiles effectuée sur les truites arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) démontre que les D.L.50 des différentes souches d'*Aeromonas hydrophila* varient de 10<sup>4</sup> à 10<sup>7</sup> cellules/ml par voie intra-musculaire.

Mittal et coll.(1980) ont trouvé que les souches virulentes peuvent être différenciées des souches de faible virulence par les caractéristiques de surface cellulaire et par sérotypie, car toutes les souches virulentes testées présentent une relation antigénique avec la souche LL1. Il est donc possible de reconnaître les souches très virulentes par des méthodes sérologiques. Mais l'auteur n'exclut pas l'existence possible de souches pouvant appartenir à d'autres sérogroupes.

L'existence de cette relation entre les caractéristiques de surface cellulaire et la virulence pourrait être exploitée dans les laboratoires de diagnostic pour les maladies piscicoles dues aux *Aeromonas* motiles. La signification des isolats d'*Aeromonas hydrophila* pourrait être facilement mesurée par le test d'acriflavine suivi de l'obtention d'une stabilité après bouillonnement.

#### 4.4.1. Adhésion

L'infection est initiée par l'adhésion des cellules bactériennes aux cellules épithéliales ou endothéliales de l'hôte. Cette adhérence est facilitée par la présence de pili (Brinton, 1977) en plus de l'existence de chimiotactisme envers le mucus de l'animal (Hazen *et al* , 1982). La nature hydrophobe de la surface de la bactérie est aussi impliquée dans l'attachement aux tissus. 72% des *Aeromonas* possèdent un potentiel adhésif (déterminé par HIC: hydrophobic interaction chromatography), ce qui indique clairement qu'elles possèdent des propriétés hydrophobiques de surface cellulaire (Jiwa, 1983).

#### 4.4.2. Facteurs d'agression

Une fois l'adhésion complétée, ce sont les facteurs d'agression de la bactérie qui deviennent actifs.

*A. hydrophila* produit plusieurs enzymes extracellulaires ayant une activité toxique potentielle. Elles participent au développement des lésions cellulaires chez l'hôte. Les diastases, les lipases, les DNase, les lécithinases et les élastases en sont les principales (Khardori et Fainstein, 1988).

Cette bactérie produit aussi deux hémolysines, alpha et beta-hémolysine, qui sont toutes deux des toxines extracellulaires. Elles sont responsables de lésions hémorragiques et nécrotiques (LeMinor et Véron, 1982; Khardori et Fainstein, 1988).

L'alpha-hémolysine a un effet cytotoxique, qui est réversible, sur les cellules HeLa et les fibroblastes embryonnaires de poumons humains. Alors que la beta-hémolysine a un effet toxique, qui est irréversible, sur plusieurs systèmes cellulaires comprenant les fibroblastes diploïdes des poumons humains et les cellules HeLa (Khardori et Fainstein, 1988).

L'endotoxine est aussi l'un de ces facteurs d'agression, par contre la pathologie qui en découle ne dépend pas de la spécificité du pathogène, mais plutôt de l'âge et de la susceptibilité de l'hôte ainsi que de la qualité de l'environnement (Nowotny, 1969).

Finalement, *A. hydrophila* produit une entérotoxine qui demeure un sujet très controversé de nos jours. Elle serait intimement liée à des cas de diarrhée et de gastro-entérite (LeMinor et Véron, 1982). Cette entérotoxine pourrait avoir un effet cytotonique;

*i.e.* une stimulation du médiateur de l'AMP cyclique dans la séquence d'évènements cellulaires, soit cytotoxique causant un dommage à la cellule ou la mort de cette dernière. Selon Chakraborty *et al* (1984), *A. hydrophila* produit une entérotoxine cytotonique bien distincte de la cytotoxine et de l'hémolysine issues de cette bactérie (Khardori et Fainstein, 1988).

Lalonde (1981) suggère suite à ses travaux sur les facteurs de virulence des souches d'*Aeromonas hydrophila* chez la truite que les activités hémolytiques et entérotoxiques ne semblent pas constituer les facteurs toxiques. Une étude du surnageant composé d'une fraction possédant l'activité protéasique et une fraction responsable de la production d'œdème de la souche LL1 a montré que l'activité toxique pour la truite est reliée au facteur causant l'œdème suite à une injection intra-dermique chez le lapin.

L'action des toxines dépend en grande partie de la capacité du pathogène à persister à l'intérieur de l'hôte et d'une densité suffisante de la bactérie pathogène afin de produire suffisamment de toxines lytiques pour induire une histopathologie (Gorden *et al*, 1979) *i.e.* l'envahissement des membranes des vaisseaux sanguins d'où la septicémie hémorragique (Ketover *et al*, 1973).

Chez les grenouilles, le facteur d'agression est difficile à cerner. L'étude de Rigney et coll. (1978) démontre que l'hémolysine ou l'endotoxine ne sont nullement toxiques pour ces dernières, sauf si on les injecte simultanément.

Le mécanisme par lequel *A. hydrophila* cause la maladie des pattes rouges proviendrait probablement d'une interaction du complexe entre l'endotoxine et l'hémolysine. Rigney et coll. (1978) suggèrent que des facteurs de stress soient à l'origine du déclenche-

ment de la maladie de façon épidémique par l'interaction du complexe endotoxine-hémolytine.

L'action toxique serait-elle déclenchée par une combinaison des toxines chez les grenouilles ? De nombreuses recherches restent à être effectuées dans ce domaine afin de déterminer le ou les facteur(s) réel(s) d'agression déclenchant la maladie des pattes rouges.

## 5. Protocole expérimental

La détermination de la présence des pattes rouges de même que la prise des spécimens ont eu lieu en des sites bien déterminés (section 5.1). Des grenouilles moribondes ont été récoltées dans le but d'isoler la bactérie *A. hydrophila* dont la caractérisation du genre et de l'espèce a été vérifiée à l'aide du système API-20E (API Laboratory products) et des critères proposés par Popoff et Véron (1976).

Les grenouilles dont l'état de santé semblait satisfaisant ont été capturées, et ont servi à la détermination des toxicités d'*A. hydrophila* isolé de souche ichtyenne et amphibiène.

### 5.1. Choix des sites d'échantillonnage

*Aeromonas hydrophila* est naturellement présent dans les eaux du lac Saint-Pierre et des cas de maladies des pattes rouges chez les grenouilles léopards sont sporadiquement rapportés pour certains secteurs de la rive sud (Leclair Jr, 1985 : et informations personnelles données à Leclair Jr par des chasseurs de grenouilles). L'absence de surveillance systématique de ces infections empêche toute évaluation quantitative de l'occurrence de la maladie.

*Rana pipiens* est l'espèce dominante d'anoures dans la plaine inondable du lac Saint-Pierre comme en témoignent les données d'exploitation compilées par Paquin (1982) et une étude récente des habitats préférentiels d'anoures (Beauregard et Leclair Jr, 1988). Hormis les poissons, c'est l'espèce faunique la plus susceptible d'être en contact avec l'homme et lui transmettre la bactérie pathogène.

Les sites à l'étude sont situés sur les rives Nord et Sud du lac Saint-Pierre. Leur choix est fonction de l'aspect récréatif que l'on y retrouve, jumelé aux observations antérieures, ainsi qu'à un certain degré de pollution. La description de ces sites se retrouve au Tableau III et leur localisation à la figure 4.

## 5.2. Période d'échantillonnage

L'étude de Hird et coll. (1981) montre que les populations d'*Aeromonas* sont prépondérantes au printemps et en début de saison estivale et déclinent en fin de l'été et en début de l'automne. La période d'échantillonnage a donc couvert préférentiellement les mois de mai, juillet et octobre. Elle fut particulièrement intense pour les deux premières semaines du mois de mai car c'est à cette période que se manifeste habituellement la maladie. La superficie échantillonnée pour chacun des sites était une bande riveraine d'au moins une centaine de mètres de long.

Pour chaque site, trois relevés des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension ont été effectués et ce, durant la même journée. Une distance de 5 m séparait chaque relevé et ce, à une profondeur moyenne de 0.5 m. L'emplacement des relevés a été choisi en considération de l'accessibilité du milieu aquatique pour la faune amphibiennne.

L'échantillonnage printanier s'est échelonné du 8 au 30 mai 1989 pour tous les sites sélectionnés. Trois campagnes d'échantillonnage ont été effectuées pour les sites 1 (8, 20 et 30 mai), 3 (15, 17 et 29 mai) et 7 (21, 22 et 30 mai) et deux campagnes pour les sites 2 (23 et 29 mai), 4 (24 et 29 mai), 5 (11 et 25 mai) et 6 (21 et 30 mai). Les valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension rapportées concernent les périodes d'échantillonnage coïncident avec les relevés des densités bactériennes soient le 25 mai pour le site 5, le 29 mai pour les sites 2, 3 et 4, et le 30 mai pour

les sites 1, 6 et 7.

L'échantillonnage estival s'est échelonné du 18 au 24 juillet. Le site 7 (Baie-du-Fèbvre /Nicolet) n'a pas été étudié à ce moment en raison de l'assèchement complet du plan d'eau. Une campagne d'échantillonnage a été réalisée pour cette période soit le 18 juillet pour les sites 3 et 4, le 19 juillet pour les sites 1 et 2, le 20 juillet pour le site 6 et le 24 juillet pour le site 5.

L'échantillonnage automnal, quant à lui, s'est étalé sur deux jours soient les 6 et 7 octobre 1989. Le site 5 n'a pas été échantillonné en raison de sa faible densité de grenouilles malgré la vaste étendue du site, de l'absence de grenouilles atteintes de la maladie des pattes rouges ainsi que de la difficulté d'accessibilité du site et des coûts occasionnés. Une campagne d'échantillonnage a été réalisée le 6 octobre pour les sites 2 et 3 et le 7 octobre pour les sites 1, 4 et 6.

### 5.3. Méthodologie sur le terrain

#### 5.3.1. Méthode de capture des spécimens

À partir des sites sélectionnés, des grenouilles moribondes et des juvéniles sains ont été capturés à la main. Le port des gants de vinyle (Fisher) était de mise et ce, pour chacun des animaux afin d'éviter d'une part une infection et d'autre part une contamination des sujets vu le caractère contagieux de la maladie (Hird *et al.*, 1981). Chaque grenouille était ensuite placée dans un sac Whirl-Pak stérile (Fisher) (Hazen *et al.*, 1978; Hird *et al.*, 1981). Pour les juvéniles, 10 ml d'eau déminéralisée stérile ont été ajoutés à chacun de ces sacs.

Les grenouilles adultes saines ont dû être en majeure partie approvisionnées chez Anilab (grenouilles locales) en raison de la difficulté de récolte d'un grand nombre de grenouilles sur un court laps de temps pour les besoins de l'expérience. Le temps de récolte des grenouilles saines s'est déroulé entre les mois de juillet et août, une période durant laquelle l'indice de condition relative n'est plus en relation avec la période de reproduction mais plutôt avec une période de croissance corporelle en cours (Leclair et Castanet, 1987). Ces sujets sont alors en bonne condition dite idéale pour l'application des tests de toxicité et de pathogénicité.

Au laboratoire, ces animaux ont ensuite été transférés dans des contenants de plastique individuels (Kluger, 1977; Hird *et al*., 1981) renfermant environ 5 ml d'eau déminéralisée stérile afin d'éviter toute contamination originant de l'eau; leur isolement permet d'enrayer la propagation rapide de la maladie qui pourrait en découler suite à un contact avec un seul animal malade. Quotidiennement, chaque contenant était lavé avec de l'alcool 70% puis rincé avec un mélange d'eau déminéralisée stérile et d'alcool 70% (3 ml d'alcool dans 7 ml d'eau; dilution 3:10) afin d'enrayer toute formation de film bactérien. Les contenants étaient ensuite approvisionnés d'eau déminéralisée stérile ( $\approx$  5 ml). La photopériode (16 h de lumière : 8 h d'obscurité) a été maintenue en laboratoire tout au long de l'expérience. Les grenouilles ont été gardées sous observation pendant 7 jours avant le traitement afin de permettre une adaptation aux conditions expérimentales.

Tableau III. Vocation des sites choisis au lac Saint-Pierre.

	sites*	Secteur	Vocation	Activités Récréatives
Rive Nord	1	Pointe-du-lac	Faunique: conservation ( f & h )	[p]; I & O ( f & h ) [p]
	2	Yamachiche	idem	idem [a]; C (+)
	3	Louiseville	idem	idem [a]; C (+)
	4	Maskinongé	idem	idem [a]; C (+)
Rive Sud	5	Baie Lavallière	Faunique: mise en valeur ( f & h )	[p]; I & O ( f & h ) [a]; C (+++) & réserve
	6	Commune de Baie-du-Fèbvre	Faunique & Agricole	[p]; I & O ( f & h ) [a]; C(+)
	7	Baie-du-Fèbvre/Nicolet	Faunique & Agricole conservation & mise en valeur	[p]; I & O ( f & h ) [a]; C (+)

Légende:

( f )= faune

( h )= habitat

[p] = activités projetées

[a] = activités actuelles

C = chasse

I & O= site d'interprétation et d'observation

+ = aire d'utilisation faible

++ = aire d'utilisation moyenne

+++ = aire d'utilisation forte

\* : La localisation des sites se retrouvent à la Figure 4.

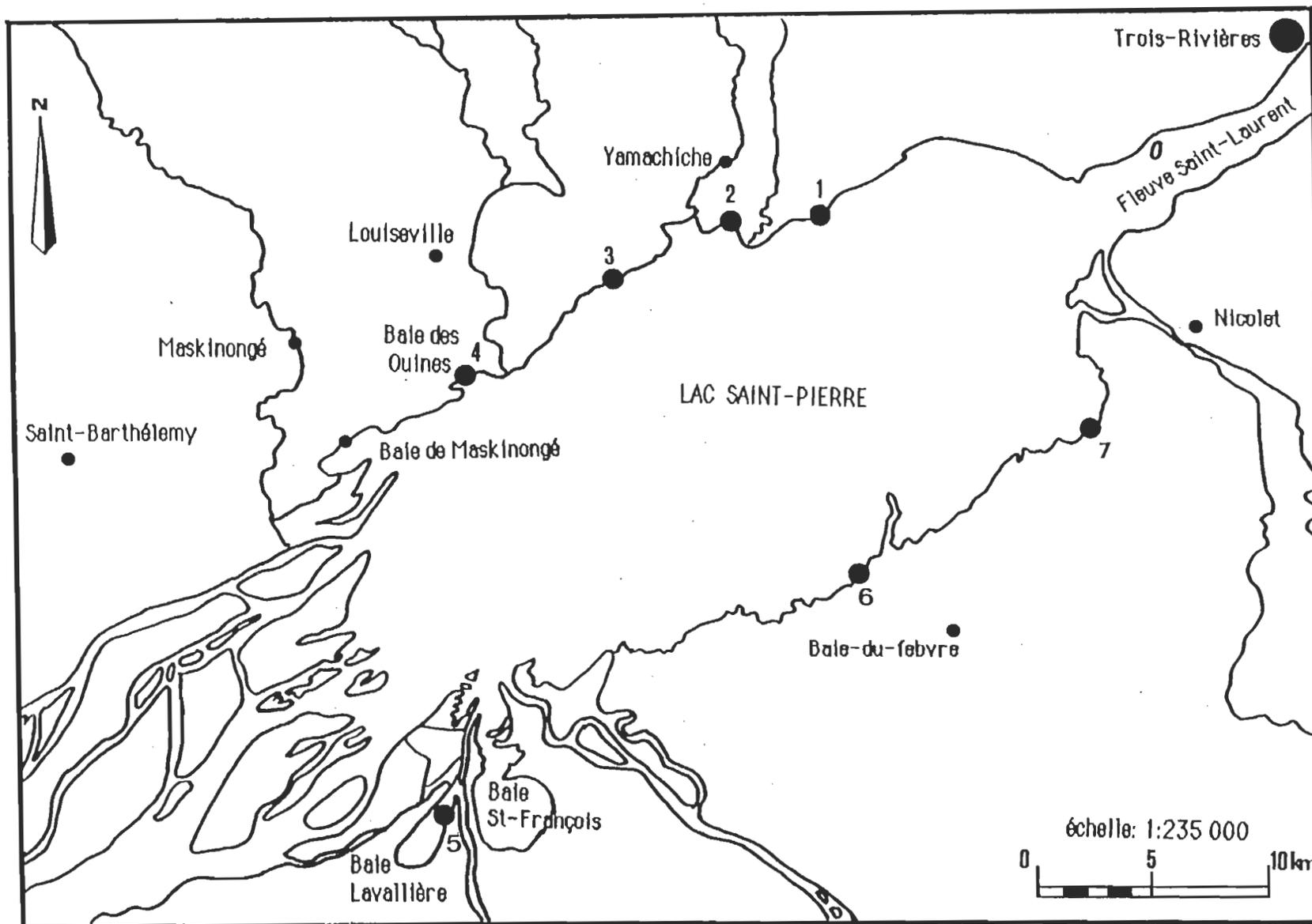


Figure 4 Localisation des stations autour du lac Saint-Pierre.

### 5.3.2. Méthodes d'échantillonnage des paramètres sélectionnés

#### Paramètres physico-chimiques

Les paramètres sélectionnés sont indiqués au tableau III de même que l'appareillage employé pour chacun d'eux (Hazen *et al.*, 1978; Hazen, 1979; Seidler *et al.*, 1980). L'échantillonnage s'est déroulé parallèlement à la capture des spécimens durant les mois de mai, juillet et octobre.

#### Matières en suspension

Les matières en suspension ont été mesurées par la méthode employée par l'EPA (*Manual of Methods for Chemical Analysis of water and Wastes*, 1974). La méthode est basée sur l'utilisation de la membrane filtrante. Les échantillons d'eau ont été prélevés à 10 cm sous la surface de l'eau à l'emplacement des relevés des densités bactériennes.

#### Densité d'*Aeromonas hydrophila* en milieu naturel

Les densités d'*A. hydrophila* ont été déterminées par la méthode de la membrane filtrante et s'expriment en UFC/ml (unité formant une colonie). Trois échantillons d'eau à 10 cm de la surface à environ 5 m de distance les uns des autres provenant de l'environnement immédiat de chacun des sites ont été prélevés pour trois différents mois de l'année à l'aide de contenants stériles. Les contenants ont été maintenus sur de la glace, dans l'obscurité, durant le transport (<4hrs) jusqu'au laboratoire afin d'éviter une croissance bactérienne (Hazen *et al.*, 1978 ; Hazen, 1979; Hird *et al.*, 1981).

Les trois campagnes d'échantillonnage ont été effectuées comme citées précédemment dans la section 5.2.

Une quantité minimale de 1,0 ml de chacun de ces échantillons (Hazen *et al*, 1978) a été prélevée de façon stérile. Trois dilutions pour chacun des échantillons ont été effectuées soient 1:10, 1:50 et 1:100 dans de la solution saline stérile (0.85%). Puis une quantité totale de 10,0 ml de chacune des dilutions a été filtrée et ce, en triplicat, à travers un papier filtre quadrillé de 0,45µm (Millipore Inc.). Ensuite chacun de ces filtres a été déposé sur un milieu Rimler-Shotts (Shotts et Rimler, 1973) et incubé à 37°C, pour éviter la croissance d'*Aeromonas salmonicida* qui peut croître à une température plus basse, pendant une période maximale de 24 heures (Hazen *et al*, 1978; Hazen, 1979; Charpentier, 1988).

Les colonies jaunes et jaunes à point noir ont subi un test d'oxydase afin de s'assurer de la présence d'*Aeromonas hydrophila* et d'exclure la possibilité de celle de *Citrobacter* spp ou autres organismes (Shotts et Rimler, 1973)

Ensuite une proportion de 10% des colonies de chacun des pétris a subi les tests d'API-20E (Hazen *et al*, 1978) de même que les 4 tests proposés par la nomenclature de Popoff et Véron (1976) afin de confirmer les résultats obtenus.

#### 5.4. Isolement d' *Aeromonas hydrophila* chez la grenouille

##### 5.4.1. Prélèvements de tissus

Le mode de prélèvement des tissus est basé sur la méthodologie de plusieurs auteurs dont Boulanger (1977), Hird et coll.(1981), et Frye (1985). L'animal présentant des signes cliniques externes évidents de la maladie a été sacrifié par décapitation et des échan-

tillons de peau, de muscles et de sang du coeur ont été prélevés.

#### Peau-

Une pièce de un cm<sup>2</sup> a été prélevée sur le côté interne de la cuisse, là où la rougeur est la plus prononcée. L'endroit avait été préalablement tamponné avec de l'alcool 70% pour assurer l'élimination des germes extérieurs. L'échantillon a ensuite été broyé dans 1,0 ml de solution saline stérile puisensemencé.

#### Muscles-

Une pièce de un cm<sup>3</sup> a été retirée du côté interne de la cuisse puis broyée dans 1,0 ml de solution saline stérile etensemencée.

#### Sang-

À l'aide d'une seringue de type tuberculine stérile, 3 à 4 gouttes de sang provenant du coeur ont étéensemencées directement sur gélose.

Tableau IV. Liste des paramètres échantillonnés et des méthodes employées.

Paramètres	Méthodes employées
Densité d' <i>Aeromonas hydrophila</i> (UFC/ml)	Méthode de la membrane filtrante
O <sub>2</sub> dissous (mg/l)	HydroLab (Surveyor II)
Température (°C)	HydroLab (Surveyor II)
Salinité (o/oo)	HydroLab (Surveyor II)
Conductivité (µmhos/cm)	HydroLab (Surveyor II)
pH-eau	HydroLab (Surveyor II)
Potentiel redox (mVolt)	HydroLab (Surveyor II)
Matières en suspension (mg/l)	membrane filtrante (méthode de l'EPA: Environmental Protection Agency)

#### 5.4.2. Encemencement et milieu de culture

La gélose au sang (BBL; Armand Frappier) a été utilisée pour l'ensemencement car elle favorise la croissance d'*A. hydrophila* (Boulanger, 1977; Leblanc, 1982; Kulp et Borden, 1942). Un repiquage a été effectué par la technique de l'épuisement afin de purifier les souches (Charpentier, 1988).

Ensuite un repiquage a été effectué sur milieu Rimler-Shotts (Boulanger, 1977; Hazen *et al*, 1978; Gorden *et al*, 1979; Hazen, 1979; Seidler *et al*, 1980) car ce dernier s'avère un milieu sélectif et différentiel pour ces bactéries. Elles deviennent jaunes au contact de ce milieu et cette réaction est caractéristique des *Aeromonas* (Shotts et Rimler, 1973). Les géloses ont ensuite été incubées à la température de la pièce pour une période de 24 à 48 heures.

Il est à noter que les souches sélectionnées qui étaient préalablement repiquées sur gélose au sang, transforment le milieu en une couleur verte, translucide, après 96 heures d'incubation à la température de la pièce.

#### 5.4.3. Identification d'*Aeromonas hydrophila*

Des tests plus appropriés que ces deux milieux de culture sont nécessaires afin d'assurer la présence du véritable agent d'infection.

Seules les colonies jaunes sur milieu Rimler-Shotts ont été sélectionnées pour les tests d'API-20E et biochimiques différentiels (glucose, salicine, arabinose et esculine).

#### 5.4.3.1. Identification au genre

Le test d'identification API-20E permet d'identifier le genre *Aeromonas* (Gorden *et al*, 1979; Seidler *et al*, 1980; Leblanc, 1982; Hird *et al*, 1983).

Leblanc (1982) a vérifié la fiabilité de ce système sur des souches d'*A. hydrophila* isolées de truites. Dans l'ensemble le test décrit bien le patron biochimique sauf pour l'ADH qui indique constamment une réaction négative au lieu de positive, et l'arabinose qui est soit négative soit positive alors qu'elle devrait seulement indiquer une réaction positive. Ces différences découlent du fait que ce test est conçu de prime abord pour les souches d'origine humaine et que la température d'incubation de ce test est de 37°C, alors que la température optimale de croissance de ces bactéries se situent entre 25 et 30°C (Leblanc, 1982). La connaissance de ces réactions est utile à l'identification juste d'*Aeromonas hydrophila*. Le patron biochimique d'*A. hydrophila* sur système API-20E est décrit au tableau V.

#### 5.4.3.2. Identification à l'espèce

Deux nomenclatures sont suggérées afin d'identifier *Aeromonas* à l'espèce, celle de Schubert (1974) et celle de Popoff et Véron (1976). La nomenclature de Popoff et Véron est la plus appropriée pour les *Aeromonas* motiles (Boulanger, 1977).

Elle consiste en 4 tests biochimiques différentiels soient: 1- la production de gaz à partir de glucose 2- la fermentation de salicine 3- la fermentation de l'arabinose 4- l'hydrolyse de l'esculine.

Les trois premiers tests sont faits à partir d'une base de phénol rouge à laquelle est ajoutée une certaine quantité (5%) de sucrose, de salicine et d'arabinose respectivement. Pour l'hydrolyse de l'esculine, le milieu d'agar bile-esculine a été utilisé (Difco).

Le système API-20E jumelé à la nomenclature de Popoff et Véron constitue un outil fiable et complet pour l'identification d'*A. hydrophila*. Les souches peuvent être conservées au besoin dans un milieu glycérolé stérile puis entreposées à -20°C pendant plusieurs mois. La resuspension de ces souches conservées dans le glycérol se fait par un simple frottement de la surface gelée à l'aide d'un fil de platine stérile.

#### 5.4.4. Détermination de la toxicité et de la pathogénicité d'*Aeromonas hydrophila*

##### 5.4.4.1. Préparation des doses infectantes

Le contenu d'une ampoule a été resuspendu dans 5 ml de bouillon BHI (Brain hearth infusion, Difco). Après une incubation de 6 heures à la température de la pièce, une anse de cette culture a été étalée sur gélose au sang. Après une croissance de 18 heures sur la gélose, deux colonies ont été prélevées et inoculées dans un bouillon de 5 ml de BHI, puis ce dernier a été incubé en agitation à la température de la pièce pendant une période de 8 heures. De cette préculture, un volume de 0,1 ml a été inoculé dans 10 ml de BHI. Cette préparation a ensuite été incubée en agitation pendant une période de 18 heures puis centrifugée à 6000xg pendant 20 minutes. Le culot a été resuspendu dans une solution saline et ajusté à une densité optique de 1,0 à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (spectrophonic-20, FISHER). Cette suspension contient environ  $6 \times 10^8$  bactéries/ml tel que vérifié par comptage sur gélose au sang.

Cinq dilutions de cette suspension ont ensuite été effectuées par facteurs de 10 dans des solutions salines stériles pour fins d'infection des sujets biologiques.

Tableau V. Patron biochimique d' *Aeromonas hydrophila* avec le système API-20E.

Tests	Réactions
Amygdaline ( AMY )	+
Arabinose ( ARA )	+
Arginine dihydrolase ( ADH )	+
Citrate ( CIT )	+
Gélatine ( GEL )	+
Glucose ( GLU )	+
Indole ( IND )	+
Inositol ( INO )	-
Lysine décarboxylase ( LDC )	-
Mannitol ( MAN )	+
Mélobiose ( MEL )	-
ONPG	+
Oxydase ( OXY )	+
Ornithine décarboxylase ( ODC )	-
Rhamnose ( RHA )	-
Sorbitol ( SOR )	-
Sucrose ( SAC )	+
Sulfure d'hydrogène ( H <sub>2</sub> S )	-
Tryptophane déaminase ( TDA )	+
Uréase ( URE )	-
Voges-Proskauer ( VP )	+

(Leblanc, 1982).

#### 5.4.4.2. Infection par voie intra-musculaire

La voie intra-musculaire d'infection a été préférée à la voie intra-péritonéale qui surestime le nombre de bactéries requis pour provoquer la mort et de préférence aussi aux infections par bains dont l'imprécision est grande (Lalonde, 1981).

Les sujets adultes (poids corporel  $\approx$  20 g) ont été infectés par une injection de 0,1 ml de suspension bactérienne et les juvéniles (poids corporel  $\approx$  1 g) par 0,05 ml, à l'aide d'une seringue de type tuberculine stérile (Fisher). L'endroit a été tamponné avant et après avec de l'alcool 70%. Pour chacune des dilutions, dix spécimens ont été infectés, pour un total de 50 animaux car 5 dilutions ont été effectuées. L'injection a été suivie d'une observation aux 24 heures pendant 96 heures. Le groupe témoin était composé de 10 animaux, chacun recevant une injection de 0,1 et 0,05 ml de solution saline stérile pour les grenouilles adultes et juvéniles respectivement.

#### 5.5. Traitement statistique

Les données ont tout d'abord été confrontées aux exigences de normalité déterminée par les coefficients d'asymétrie (*Skewness*) et d'aplatissement (*Kurtosis*) (Zar, 1974; Hazen, 1979; Scherrer, 1984). La relation potentielle entre les paramètres physico-chimiques et les densités d'*A. hydrophila* de même que les relations entre les paramètres physico-chimiques eux-mêmes ont été vérifiées par des analyses de régression simple en raison de l'absence de lien statistique entre les paramètres démontrée par des études antérieures (Hazen *et al.*; 1978; Hazen, 1979). L'analyse factorielle de variance (Fanova) a été employée pour analyser la variation de la densité d'*A. hydrophila* pour les différents sites et saisons échantillonnés (Zar, 1974; Hazen, 1979).

Le calcul de la DL50 (dose létale 50%) a été effectué par la méthode de Reed et Muench (1938).

## 6. Résultats

### 6.1. État de la qualité de l'eau du lac Saint-Pierre

#### 6.1.1. Qualité physico-chimique et matières en suspension

Les relevés des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension pour chacun des sept sites étudiés couvrent les périodes printanière, estivale et automnale (Tableaux VI, VII et VIII).

##### 6.1.1.1. Variations intersites

Les valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension de l'échantillonnage printanier montrent des différences intersites significatives tel que démontré par l'analyse factorielle de variance (Fanova), à cette période de l'année. Seuls le pH et la salinité ne présentent aucune distinction entre les sites (Tableaux VI et IX).

Pour l'échantillonnage estival, les valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques, excluant la température, le pH et la salinité, montrent aussi des différences intersites significatives évidentes particulièrement pour l'oxygène; il en est de même pour les matières en suspension (Tableaux VII et IX).

Les valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques relevés à l'automne montrent toutes, à l'exception de la salinité, des différences intersites significatives (Tableaux VIII et IX).

Les sites ont ensuite été regroupés par rives (rives Nord et Sud) afin de voir si ces différences significatives se maintenaient. L'analyse factorielle de variance (Fanova) montre une différence significative pour l'oxygène seulement au printemps, les sites choisis pour la rive nord étant en général plus oxygénés (Tableau X). Quant aux autres paramètres les résultats ne reflètent que des tendances qui se manifestent à des périodes différentes de l'année, notamment la température qui est plus élevée de 2°C sur la rive Sud au printemps et à l'automne, les matières en suspension qui sont plus importantes sur la rive Nord au printemps, mais plus importante sur la rive Sud à l'automne, et une plus grande conductivité notée sur la rive Sud en été (Tableau XI).

Le regroupement des sites par rive voilent donc les différences significatives révélés précédemment. On doit conclure au caractère très spécifique des sites.

#### 6.1.1.2. Variations saisonnières

Les concentrations minimales, maximales et moyennes des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension pour les trois périodes de l'année se retrouvent au tableau XII. L'analyse factorielle de variance (Fanova appliquée sur les moyennes) indique une différence significative entre les saisons uniquement pour la température et les matières en suspension (Tableau XIII): soit sans surprise une température qui augmente légèrement à l'été pour ensuite diminuer de façon importante à l'automne, et des matières en suspension qui affichent une diminution au cours de l'été pour ensuite augmenter à l'automne (Tableau XIII).

Tableau VI. Valeurs moyennes ( $\pm$ : écart type) des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension pour les différents sites situés autour du lac Saint-Pierre au printemps (25,29 et 30 mai, 1989).

Paramètres	Sites						
	1	2	3	4	5	6	7
température (°C)	16.05 (0.03)	17.00 (0.08)	16.68 (0.02)	15.63 (0.09)	20.72 (0.20)	17.53 (0.24)	16.32 (0.00)
pH	6.97 (0.02)	6.72 (0.01)	6.79 (0.01)	6.62 (0.05)	6.51 (0.05)	7.01 (0.09)	6.58 (0.09)
O <sub>2</sub> (mg/l)	7.34 (0.04)	6.77 (0.05)	8.98 (0.02)	7.90 (0.05)	5.93 (0.34)	4.72 (0.13)	5.44 (0.23)
salinité (o/oo)	0 (0)						
conductivité (µmhos/cm)	0.697 (0.001)	0.391 (0.001)	0.224 (0.009)	0.219 (0.004)	0.454 (0.000)	0.583 (0.003)	0.451 (0.000)
potentiel redox (mVolt)	0.045 (0.004)	0.136 (0.012)	0.167 (0.002)	0.206 (0.003)	0.250 (0.200)	0.157 (0.009)	0.140 (0.009)
matières en suspension (mg/l)	16.75 (0.55)	2450 (1.80)	17.00 (2.20)	6.00 (1.41)	5.00 (0.41)	11.00 (1.41)	225 (0.74)

Tableau VII. Valeurs moyennes ( $\pm$  écart type) des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension pour les différents sites situés autour du lac Saint-Pierre en été (18-19-20- et 24 juillet, 1989).

Paramètres	Sites						
	1	2	3	4	5	6	
température (°C)	22.50 (0.04)	21.48 (0.07)	24.41 (0.34)	22.90 (0.38)	23.20 (0.81)	21.60 (0.22)	-
pH	7.23 (0.02)	6.67 (0.07)	6.57 (0.02)	6.93 (0.08)	6.40 (0.22)	7.02 (0.12)	-
O <sub>2</sub> (mg/l)	6.91 (0.17)	5.91 (0.01)	9.17 (0.49)	7.43 (0.46)	1.47 (0.28)	6.31 (0.18)	-
salinité (o/oo)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-
conductivité (µmhos/cm)	0.163 (0.001)	0.444 (0.009)	0.166 (0.008)	0.548 (0.003)	0.559 (0.025)	0.554 (0.003)	-
potentiel redox (mVolt)	0.148 (0.004)	0.046 (0.013)	0.169 (0.006)	0.108 (0.019)	0.067 (0.015)	0.238 (0.006)	-
matières en suspension (mg/l)	8.00 (2.16)	19.00 (2.16)	6.00 (1.41)	1.50 (0.41)	6.84 (0.13)	8.50 (1.22)	-

Tableau VIII. Valeurs moyennes ( $\pm$  écart type) des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension pour les différents sites situés autour du lac Saint-Pierre à l'automne (6 et 7 octobre, 1989).

Paramètres	Sites						
	1	2	3	4	5	6	7
température (°C)	9.00 (0.20)	6.84 (0.02)	7.40 (0.38)	8.90 (0.12)	-	10.93 (0.92)	-
pH	7.74 (0.38)	6.82 (0.03)	6.20 (0.33)	6.38 (0.08)	-	7.12 (0.16)	-
O <sub>2</sub> (mg/l)	12.74 (0.71)	8.66 (0.16)	8.60 (0.14)	6.50 (0.60)	-	8.19 (0.97)	-
salinité (o/oo)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	-
conductivité (µmhos/cm)	0.111 (0.017)	1.083 (0.023)	1.820 (0.090)	0.464 (0.000)	-	0.799 (0.007)	-
potentiel redox (mVolt)	0.209 (0.021)	0.100 (0.011)	0.275 (0.028)	0.245 (0.017)	-	0.273 (0.012)	-
matières en suspension (mg/l)	10.00 (1.41)	10.00 (0.00)	15.00 (2.94)	10.00 (0.41)	-	20.00 (3.56)	-

Tableau IX. Résultats de l'analyse factorielle de variance (Fanova) pour la comparaison intersite des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension.

Paramètres	Statistiques	Saisons		
		Printemps <sup>a</sup>	Été <sup>b</sup>	Automne <sup>c</sup>
température (°C)	F	7.14 *	2.3	9.26*
	dI	6; 28	5; 24	4; 10
	P	<0.0005	>0.05	<0.0025
pH	F	0.043	1.43	7.14 *
	dI	6; 28	5; 24	4; 10
	P	>0.05	>0.05	<0.01
O <sub>2</sub> (mg/l)	F	2.94 *	13.57*	57.00*
	dI	6; 28	5; 24	4; 10
	P	>0.05	<0.0005	<0.0005
conductivité (µmhos/cm)	F	489.66*	1302.74 *	1757.50*
	dI	6; 28	5; 24	4; 10
	P	<0.0005	<0.0005	<0.0005
potentiel redox (mVolt)	F	56.35*	13.48*	63.44 *
	dI	6; 28	5; 24	4; 10
	P	<0.0005	<0.0005	<0.0005
matières en suspension (mg/l)	F	6.73*	14.88*	0.78*
	dI	6; 7	5; 6	4; 5
	P	<0.0005	<0.0005	>0.05

Légende:

F: Distribution Fisher

dI: degré de liberté

P: probabilité

\* : Distribution Fisher Significative

<sup>a</sup> : sites 1-2-3-4-6-7 et 8

<sup>b</sup> : sites 1-2-3-4-6 et 7

<sup>c</sup> : sites 1-2-3-4 et 7

Tableau X. Résultats de l'analyse factorielle de variance (Fanova) pour la comparaison interrive des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension.

Paramètres	Statistiques	Saisons		
		Printemps <sup>a</sup>	Été <sup>b</sup>	Automne <sup>c</sup>
température (°C)	F	5.00	0.024	4.29
	dl	1,5	1,4	1,3
	P	>0.05	>0.05	>0.05
pH	F	0.39	0.840	0.158
	dl	1,5	1,4	1,3
	P	>0.05	>0.05	>0.05
O <sub>2</sub> (mg/l)	F	15.910*	3.450	0.069
	dl	1,5	1,4	1,3
	P	<0.0025	>0.05	>0.05
conductivité (µmhos/cm)	F	2.360	2.180	0.003
	dl	1,5	1,4	1,3
	P	>0.05	>0.05	>0.05
potentiel redox (mVolt)	F	0.873	0.710	0.482
	dl	1,5	1,4	1,3
	P	>0.05	>0.05	>0.05
matières en suspension (mg/l)	F	4.057	0.080	6.740
	dl	1,5	1,4	1,3
	P	>0.05	>0.05	>0.05

Légende:

F: Distribution Fisher

dl: degré de liberté

P: Probabilité

\*: Distribution Fisher Significative

<sup>a</sup> : sites 1-2-3-4-5-6 et 7

<sup>b</sup> : sites 1-2-3-4-5 et 6

<sup>c</sup> : sites 1-2-3-4 et 6

Tableau XI. Valeurs moyennes ( $\pm$  écart type) des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension pour les rives Nord et Sud du lac Saint-Pierre pour les périodes printanière, estivale et automnale.

Paramètres	Printemps Rives		Été Rives		Automne Rives	
	Nord <sup>1</sup>	Sud <sup>2</sup>	Nord <sup>1</sup>	Sud <sup>3</sup>	Nord <sup>1</sup>	Sud <sup>4</sup>
température (°C)	16.34 (0.53)	18.19 (1.86)	22.80 (1.07)	22.40 (0.80)	8.03 (0.95)	10.09 -
pH	6.78 (0.13)	6.70 (0.22)	6.85 (0.26)	6.78 (0.27)	6.79 (0.60)	7.12 -
O <sub>2</sub> (mg/l)	7.75 (0.82)	5.36 (0.50)	7.36 (1.18)	3.89 (2.42)	9.13 (2.26)	8.19 -
salinité (o/oo)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 -
conductivité (µmhos/cm)	0.383 (0.194)	0.496 (0.062)	0.330 (0.170)	0.557 (0.003)	0.870 (0.650)	0.799 -
potentiel redox (mVolt)	0.139 (0.059)	0.182 (0.048)	0.121 (0.054)	0.153 (0.086)	0.207 (0.066)	0.273 -
matières en suspension (mg/l)	16.00 (6.59)	6.08 (3.65)	8.63 (6.44)	7.67 (0.83)	11.25 (2.17)	20.00 -

1: sites 1,2,3 et 4

2: sites 5, 6 et 7

3: sites 5 et 6

4: site 6

Tableau XII. Valeurs ( $\pm$  écart-type) minimale, maximale et moyenne des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension retrouvées au lac Saint-Pierre lors des échantillonnages printanier, estival et automnal pour l'ensemble des sites.

Paramètres	Saisons	Valeurs		
		Minimum	Maximum	Moyenne
température (°C)	printemps	15.63	20.72	17.13 (1.57)
	été	21.48	24.41	22.70 (0.99)
	automne	6.84	10.93	8.64 (1.43)
pH	printemps	6.51	7.01	6.74 (0.18)
	été	6.40	7.23	6.80 (0.55)
	automne	6.20	7.74	6.85 (0.28)
O <sub>2</sub> (mg/l)	printemps	4.72	8.98	6.73 (1.37)
	été	1.47	9.17	6.20 (2.06)
	automne	6.50	12.74	8.94 (2.36)
salinité (o/oo)	printemps	0	0	0 (0)
	été	0	0	0 (0)
	automne	0	0	0 (0)
conductivité (µmhos/cm)	printemps	0.219	0.697	0.431 (0.162)
	été	0.163	0.559	0.406 (0.582)
	automne	0.111	1.820	0.855 (0.175)
potentiel redox (mVolt)	printemps	0.045	0.250	0.157 (0.059)
	été	0.046	0.238	0.129 (0.065)
	automne	0.100	0.275	0.220 (0.065)
matières en suspension (mg/l)	printemps	2.25	24.50	11.79 (7.41)
	été	1.50	19.00	8.31 (4.00)
	automne	10.00	20.00	13.00 (5.30)

Tableau XIII. Résultats de l'analyse factorielle de variance (Fanova) pour la comparaison intersaison des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension.

Paramètres	Statistiques	
température (°C)	F	75.7*
	dl	2;15
	P	<0.0005
pH	F	224
	dl	2;15
	P	>0.05
O <sub>2</sub> (mg/l)	F	1.76
	dl	2;15
	P	>0.05
conductivité (µmhos/cm)	F	2.62
	dl	2;15
	P	>0.05
potentiel redox (mVolt)	F	1.72
	dl	2;15
	P	>0.05
matières en suspension (mg/l)	F	36.57*
	dl	2;15
	P	<0.0005

Légende:

F: Distribution Fisher

dl: degré de liberté

P: probabilité

\* : Distribution Fisher Significative

## 6.1.2. Qualité bactériologique: Densité d' *Aeromonas hydrophila*

### 6.1.2.1. Variations intersites de la densité d' *Aeromonas hydrophila*

Les relevés de densité d' *Aeromonas hydrophila* pour chacun des sites sélectionnés couvrent trois périodes de l'année, soient le printemps, l'été et l'automne (Tableau XIV). Les périodes d'échantillonnage sont les mêmes que celles indiquées précédemment pour l'étude de la qualité physico-chimique de l'eau.

Au printemps, les densités d' *A. hydrophila* montrent des différences intersites notables mais non significatives en raison (Tableau XV) de la grande hétérogénéité des données. Les sites 1 et 2 sur la rive Nord et 6 sur la rive Sud affichaient les densités d' *A. hydrophila* les plus importantes (Tableau XIV), soient  $111 \pm 16$ ,  $273 \pm 40$  et  $126 \pm 10$  UFC/ml respectivement.

En général, la période estivale montre des densités d' *A. hydrophila* plus faibles que celles retrouvées au printemps. Les sites 2, 5 et 6 sont les sites pour lesquels les densités ont été les plus élevées pour cette période (Tableau XIV), soient  $40 \pm 3$ ,  $46 \pm 4$  et  $76 \pm 11$  UFC/ml respectivement.

C'est à l'automne que l'on retrouve les densités les plus faibles d' *A. hydrophila*. Les sites 2 et 4 représentent les sites où les concentrations de la bactérie sont les plus élevées (Tableau XIV), soient  $45 \pm 9$  et  $43 \pm 5$  UFC/ml respectivement. Les sites 5 et 7 n'ont pu être échantillonnés pour les raisons citées précédemment. L'analyse factorielle de variance (Fanova) indique des différences intersites significatives des densités d' *A. hydrophila* seulement pour cette période automnale (Tableau XV).

### 6.1.2.2. Corrélation entre les paramètres physico-chimiques, matières en suspension et les densités d' *Aeromonas hydrophila*.

La régression linéaire indique qu'au printemps, la densité d' *A. hydrophila* est liée positivement à la quantité de matières en suspension dans le milieu ( $r^2$  statistiquement significatif). Une légère relation avec la température est tout de même notée à cette période (Tableau XVI).

Aux périodes estivale et automnale la variation des données recueillies pour chacun des paramètres n'est pas assez grande pour permettre de dégager une relation significative entre la densité d' *A. hydrophila* et les paramètres étudiés.

De légères tendances sont toutefois notées. En été la conductivité montre un certain lien positif avec la densité bactérienne. À l'automne la relation demeure importante, mais devient négative à cette période (Tableau XVI). Trois paramètres montrent une faible relation négative avec la densité bactérienne pour la période automnale, soient: la conductivité, le potentiel redox et les matières en suspension (Tableau XVI). La température affiche une relation positive au printemps et à l'automne, alors qu'elle devient négative à l'été. Le potentiel redox est le seul paramètre à maintenir une relation négative avec la densité bactérienne pour les trois périodes de l'année. Quant aux matières en suspension, elles maintiennent une relation positive au printemps très forte et qui est par contre très faible à l'été. À l'automne la relation s'avère négative quoique le  $r^2$  ne soit pas significatif (Tableau XVI).

Tableau XIV. Concentrations moyennes ( $\pm$  écart-type) d'*Aeromonas hydrophila* (UFC/ml) retrouvées à chacun des sites situés autour du lac Saint-Pierre lors des échantillonnages printanier, estival et automnal (chaque valeur représente la moyenne de trois relevés; Annexe.2)

Sites	Printemps	Été	Automne
1	111 (16)	7 (2)	22 (4)
2	273 (40)	40 (3)	45 (9)
3	31 (7)	24 (4)	3 (1)
4	28 (4)	18 (5)	43 (5)
5	31 (5)	46 (4)	-
6	126 (10)	76 (11)	17 (1)
7	4 (2)	-	-

Tableau XV. Résultats de l'analyse factorielle de variance (Fanova) pour la comparaison intersite de la densité d' *Aeromonas hydrophila*.

Saisons	Statistiques	
Printemps	F	1.556
	dl	6; 6
	P	>0.05
Été	F	3.12
	dl	5; 5
	P	>0.05
Automne	F	7.11*
	dl	4; 4
	P	<0.05

Légende:

- F: Distribution Fisher
- dl: degré de liberté
- P: probabilité
- \*: Distribution Fisher Significative

Tableau XVI. Relation ( $r^2$  ; régression linéaire) entre la densité d' *Aeromonas hydrophila* et les différents paramètres physico-chimiques et matières en suspension au lac Saint-Pierre pour les trois périodes de l'année.

Paramètres	Printemps $r^2$	Été $r^2$	Automne $r^2$
température (°C)	0.37(+)	0.24(-)	0.11(+)
pH	0.00	0.14(-)	0.03(-)
oxygène dissous (mg/l)	0.01(+)	0.11(-)	0.01(+)
conductivité ( $\mu$ mhos/cm)	0.09(+)	0.47(+)	0.35(-)
potentiel redox (mVolt)	0.10(-)	0.01(-)	0.33(-)
matières en suspension (mg/l)	0.76(+)*	0.10(+)	0.34(-)

\* :  $r^2$  significatif  
probabilité (P): < 0.05

## 6.2. Présence de la maladie des pattes rouges au lac Saint-Pierre au printemps

Plusieurs grenouilles sur le terrain ont présenté les signes cliniques de la maladie des pattes rouges c'est à dire des rougeurs au niveau des pattes arrière et sur le bas ventre ou des rougeurs prononcées au niveau des extrémités (Tableau XVII).

Ces grenouilles ont été ramenées au laboratoire afin que soit observée l'évolution de la maladie. Après une période de 48 heures, les signes de la maladie sont très évidents. Les rougeurs sont prononcées, il y a perte de sang au niveau des extrémités et de la bouche, et l'animal adopte une position d'affaissement. Il y a ensuite une certaine récupération de l'animal puis un rétablissement complet après 48 heures. Le lavage des contenants à l'alcool 70% est probablement en partie responsable de cette récupération. L'un des sujets est cependant mort de septicémie après une période de 24 heures. Cette grenouille présentait des signes plus avancés de la maladie par rapport aux autres sujets *in* que l'animal était déjà très léthargique et présentait des rougeurs très prononcées au niveau des cuisses de même que des zones d'ulcérations à ce niveau. C'est à partir de cette grenouille, car cette dernière est assurément atteinte de la maladie des pattes rouges, que fut isolé *Aeromonas hydrophila* tel que décrit précédemment dans la section 5.4 du protocole expérimental. Les 9 souches isolées de l'animal malade ont très bien répondu au patron biochimique d'*Aeromonas hydrophila* suggéré avec le système API-20E. Seule l'amygdaline a présenté une différence avec le patron, 5 des 9 souches ont répondu négativement alors qu'elles devraient répondre positivement. Le témoin utilisé, soit la souche ichtyenne TF2 d'*Aeromonas hydrophila* (École de Médecine Vétérinaire de Saint-Hyacinthe) a elle aussi répondu négativement. Leblanc (1982) rapporte effectivement, un faible pourcentage de souches positives pour le test de l'amygdaline pour les *Aeromonas* motiles. Le système API-20E s'avère donc satisfaisant pour l'identification des souches

d'*Aeromonas* chez les grenouilles. Pour ce qui est des 4 tests biochimiques différentiels, toutes les souches ont parfaitement répondues.

Les sites 2, 3 et 6 représentent les sites où des cas de maladie des pattes rouges ont été observés soient un, 6 et un cas respectivement au printemps (Tableau XVII). Pour les périodes estivale et automnale aucun cas de maladie des pattes rouges n'a été observé. Les grenouilles étaient saines, très alertes et ne présentaient aucun signe clinique de la maladie.

Les sites 2 et 3 représentent les sites où les plus grands nombres de grenouilles ont été enregistrés soient 16 observées et 12 capturées respectivement pour la période du printemps (Tableau XVII).

Les densités de grenouilles les plus importantes ont été enregistrées au cours de l'été pour les sites 1, 2 et 3 soit plus de 50 grenouilles observées pour les deux premiers sites et plus de 100 grenouilles observées pour le site 3. À l'automne aucune grenouille n'a été observée; la saison étant relativement avancée (octobre), elles étaient probablement retournées vers leurs sites d'hibernation.

Il est à noter que le Tableau XVII n'est basé que sur des captures d'animaux présentant des signes de la maladie et de l'observation des animaux sains, l'information fournie ne peut qu'être très partielle.

### 6.3. Dose létale 50 des souches d' *Aeromonas hydrophila* (DL50)

#### 6.3.1. Sélection des souches amphibiennes

Un test préliminaire de toxicité a été effectué afin d'identifier la souche la plus virulente parmi les 11 souches d' *Aeromonas hydrophila* isolées. Neuf des onze souches (S.1 à S.9) sont issues d'un seul et même animal atteint de la maladie des pattes rouges, capturé au site 6 (Commune de Baie-du-Fèbvre) et qui a succombé à la suite d'une septicémie. Les deux autres souches ont été isolées à partir du milieu aquatique, la souche S.10 provenant du site 3 (Louiseville) et la souche S.11 du site 6 (Commune de Baie-du-Fèbvre) (Tableau XVIII).

L'évaluation du degré de toxicité était fonction des paramètres suivants:

- l'état général de la grenouille *i.e* alerte, léthargique ou affaissée.
- présence de rougeurs au niveau des cuisses ou du bas ventre,
- écoulement de sang par la bouche (hémoptysie) ou par les extrémités,
- temps ad-mortem.

Afin de cerner la souche la plus toxique issue de l'unique spécimen atteint véritablement de la maladie des pattes rouges, un total de 18 animaux ont été injectés, soit 2 animaux par souches. De même 4 animaux ont été utilisés pour l'injection des deux souches d'origine aquatique.

Plus le temps entre l'injection et la mort de l'animal était court plus la souche était considérée comme virulente. La souche S.5 s'est avérée la plus virulente provoquant chez les grenouilles l'apparition rapide des rougeurs au niveau des cuisses et des extrémités des membres et des écoulements sanguins . Onze heures après l'injection, un des animaux

était déjà mort. Cette souche provenait du sang prélevé dans le coeur de la grenouille (Site 6) atteinte de la maladie des pattes rouges (Tableau XVIII).

### 6.3.2. Comparaison de souches ichtyenne et amphibienne

La souche ichtyenne LL<sub>1</sub> (isolée de truite arc-en-ciel et fournie gracieusement par l'École de Médecine Vétérinaire de Saint-Hyacinthe) est plus virulente que la souche amphibienne envers les grenouilles et ce, tant chez les adultes que chez les juvéniles (Tableau XIX). Pour les adultes, la différence est au moins de l'ordre de 10<sup>3</sup> bactéries/ml.

De plus, envers chacune des deux souches d'*A. hydrophila*, il existe sans contredit une différence de résistance entre les grenouilles adultes et les juvéniles. Ces derniers affichent une plus grande résistance tant à la souche amphibienne qu'à la souche ichtyenne (Tableau XIX).

Une différence a aussi été notée à l'intérieur même des juvéniles. Effectivement, les juvéniles capturés au mois de juillet, donc à peine sortis de la métamorphose, n'ont démontré aucune mortalité ni aucun signe clinique de la maladie suite à l'injection d'une concentration de 10<sup>7</sup> bactéries/ml de la souche S.5, alors que les juvéniles capturés en octobre, bien que n'ayant montré aucune mortalité, présentaient des signes cliniques évidents de la maladie, soit un état de léthargie et d'affaissement et des rougeurs aux pattes arrière et ce, pour une même concentration de cette souche.

Tableau XVII. Fréquence printanière de la maladie des pattes rouges pour l'ensemble des sites situés autour du lac Saint-Pierre.

sites	Abondance des grenouilles dans le milieu <sup>1</sup>	Nombre de grenouilles atteintes
1	+	-
2	++	1
3	++	6
4	+	-
5	+	-
6	+	1
7	+	-

<sup>1</sup> Légende: + : moins de 10 grenouilles sur le site.  
 ++ : entre 10 et 20 grenouilles sur le site.

Tableau XVIII. Symptômes engendrés chez *Rana pipiens* par l'injection de différentes souches d' *Aeromonas hydrophila* (dose injectée:  $10^7$  bactéries/ml ).

identification de la souche	origine de la souche <sup>a</sup>	Symptômes	Stade
S.1	peau de la cuisse	1	adultes
S.2	peau de la cuisse	3	adultes
S.3	muscle de la cuisse	1	adultes
S.4	muscle de la cuisse <sup>b</sup>	4	adultes
S.5	sang de la région cardiaque	4 2	adultes juvéniles
S.6	peau de la cuisse	4	adultes
S.7	muscle de la cuisse	3	adultes
S.8	muscle de la cuisse <sup>b</sup>	3	adultes
S.9	eau où baignait l'animal malade	3	adultes
S.10	milieu aquatique (site 3)	3	adultes
S.11	milieu aquatique (site 7)	3	adultes

a: échantillons de peau, de muscle et de sang provenant d'un seul animal malade

b: échantillons prélevés à partir d'une région ulcérée

c: catégories de symptômes

1: aucune mortalité; aucun symptôme: l'animal demeure alerte.

2: aucune mortalité; affaissement et léthargie de l'animal.

3: mortalité en plus de 24 hres; rougeurs aux pattes arrière et aux cuisses.

4: mortalité en moins de 24 hres; rougeurs aux pattes arrière et aux cuisses,  
perte de sang aux extrémités.

Tableau XIX. Comparaison de la DL50 de la souche ichtyenne (LL.1) et de la souche amphibienne (S.5) d' *Aeromonas hydrophila* chez la grenouille léopard (*Rana pipiens*).

Souche	Grenouille	DL50 (bactéries/ml)
LL.1	-adultes	$10^{4.47}$
	-juvéniles	$10^{6.29}$
S.5	-adultes	$>10^{7a}$
	-juvéniles	$>10^{7b}$

a: provoque 25% de mortalité (DL25:  $10^7$ )

b: provoque 0% de mortalité

\* La méthode de calcul des doses léthales est fournie à l'annexe.1.

## 7. Discussion

### 7.1. État de la qualité de l'eau au lac Saint-Pierre

#### 7.1.1. Physico-chimie et matières en suspension

Dans l'ensemble, les relevés physico-chimiques et les matières en suspension sont représentatifs des régions tempérées et en accord avec les études antérieures et actuelles (SPEQ, 1974 ; Désilets et Langlois, 1989).

Les relevés des paramètres physico-chimiques et des matières en suspension ont permis de donner une indication concernant la qualité de l'eau au moment de l'échantillonnage biologique, qualité qui constitue un élément important pour la croissance bactérienne.

Presque tous les paramètres montrent une différence intersite pour chacune des saisons. Les variations saisonnières (moyenne générale de l'ensemble des sites) de la valeur d'un paramètre peuvent influencer la concentration d'*Aeromonas hydrophila*. La température et les matières en suspension par exemple, ont montré des variations saisonnières significatives. Le pH et la salinité sont deux facteurs qui ne montrent aucun patron particulier en raison de leur très faible variabilité au cours des saisons. Les autres paramètres quoique variables n'affichent pas de saisonnalité particulière.

Cependant les paramètres physico-chimiques et les matières en suspension n'ont montré aucune corrélation entre eux tel que vérifié par le coefficient de corrélation de Spearman, ce qui concorde avec les résultats obtenus par Désilets et Langlois (1989) lors d'une étude effectuée au lac Saint-Pierre.

Le ralentissement des courants dans le lac Saint-Pierre favorise grandement la sédimentation des matières en suspension et des toxiques (Mondoux, 1989). Le site 6 (Commune de Baie-du-Fèbvre) constitue une zone préférentielle de sédimentation en raison de la diminution de la vitesse du courant à cet endroit. Cependant, à l'automne les concentrations de matières en suspension sont importantes. Elles se retrouvent particulièrement à la couche supérieure des eaux à cause du brassage automnal (Comba et Kaiser, 1989), car les eaux sont plus denses à cette période en raison du refroidissement et ainsi freinent la sédimentation de ces matières en suspension (Wetzel, 1983). C'est pourquoi les concentrations de matières en suspension sont plus élevées à l'automne qu'à l'été. Ceci est dû à une diminution de la densité des eaux durant la période estivale issue d'un réchauffement du milieu.

Ces matières en suspension doivent être prises en considération en regard de leur capacité d'agglomérer les toxiques comme le mercure, les composés organochlorés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Nadeau et Desjardins, 1989), le G-chlordane (pesticide utilisé pour l'élimination des termites et insectes du sol) (Metcalf et Charlton, 1989) et les métaux lourds (Galvez et Yong, 1989) présents dans l'eau et de les entraîner au fond lorsque le courant diminue. De plus, en trop grande quantité, elles nuisent principalement à la qualité de l'eau pour les communautés biologiques. Ces matières en suspension proviennent principalement de l'érosion des terres agricoles, des rejets industriels et municipaux et des activités de dragage. Les sites 1 (Pointe-du-lac) et 2 (Yamachiche) présentent des concentrations élevées de matières en suspension et correspondent à des zones où l'eau est considérée comme étant moyennement mauvaise (Mondoux, 1989).

Ce type de pollution ne peut donc pas être ignoré sachant qu'il pourrait entraîner des changements significatifs des concentrations d'*Aeromonas hydrophila*. Effectivement, des études antérieures ont démontré qu'un milieu pollué peut provoquer une augmentation de la prolifération bactérienne et de la résistance aux antibiotiques (Seidler *et al*, 1980; Shotts, 1984).

## 7.2. Relation entre *Aeromonas hydrophila* et les paramètres du milieu aquatique

Très peu de corrélations ont été détectées entre les concentrations d'*A. hydrophila* et les paramètres mesurés que ce soit dans les comparaisons intersites ou les comparaisons intersaisons, ce qui vient corroborer les résultats d'autres auteurs (Hazen *et al*, 1978; Hazen, 1979).

Bien que statistiquement les densités d'*A. hydrophila* ne soient pas différentes d'une saison à l'autre, la distribution saisonnière de la bactérie tel que mise en évidence par Hazen (1979), *i.e.* une concentration plus élevée au printemps et une baisse à l'été suivie d'une légère hausse à l'automne, se retrouve dans nos valeurs moyennes, particulièrement pour les sites 1, 2 et 4. Ces variations peuvent être expliquées par quatre facteurs prépondérants qui agissent sur la croissance de ces bactéries, soient les éléments nutritifs, la température, le pH et l'oxygène dissous (Pelczar et Chan, 1982). Lorsque ces conditions physiques et les éléments nutritifs interagissent de façon favorable, la croissance de la bactérie est optimale.

La concentration la plus élevée d'*A. hydrophila* soit de 273(+40) UFC/ml (site 2) a été détectée au printemps. Lors de la fonte des neiges et du brassage des eaux, les sédiments auxquels sont liés des éléments nutritifs et des métaux deviennent disponibles

pour la population bactérienne, suite à leur lessivage des sols (Désilets et Langlois, 1989). Jumelés à un réchauffement des eaux de surface, ces deux facteurs contribuent grandement à favoriser la croissance d'*A. hydrophila*. Lors de l'échantillonnage printanier, les températures variaient entre 16.0° et 20.7° ce qui était très favorable au développement de ces bactéries puisque la croissance optimale se situe entre 15° et 20°C (Rouf et Rigney, 1971).

À cette période, les sites 1, 2 et 6 montraient des densités de la bactérie plus élevées que celles des autres sites. Les masses d'eau situées près des sites 1 (Pointe-du-lac) et 2 (Louiseville) sont caractérisées par leur coloration brune donc riches en matières en suspension. Ces dernières contiennent entre 10 et 15% de matières organiques, ce qui constituent un apport supplémentaire d'éléments nutritifs nécessaire à la prolifération de ces bactéries.

Cette relation entre les matières en suspension et les densités d'*A. hydrophila* est de plus appuyée d'un point de vue statistique pour la période du printemps. Il existe probablement un lien entre la croissance bactérienne et les matières en suspension, puisque ces dernières constituent un apport nutritif favorisant cette croissance.

L'étude de Hazen (1979) montre qu'*Aeromonas hydrophila* ne semble pas se conformer au patron généralement observé des bactéries dans les sédiments. Habituellement, les bactéries hétérotrophes augmentent au niveau de l'interface sédiments-eau. Contrairement à cela, *A. hydrophila* présente des densités bactériennes très faibles de l'ordre de moins de 1 UFC/ml, et ce à 1 cm et plus de la surface des sédiments. Cette étude permet donc d'exclure que la corrélation retrouvée au printemps ne soit due qu'à une remise en circulation des particules sédimentables lors du brassage des eaux à cette période.

Par contre, Hazen (1979) a trouvé une association entre *A. hydrophila* et des plantes aquatiques en décomposition (*Myriophyllum spicatum*) ce qui semble suggérer plutôt un rôle important dans les processus de dégradation.

Les eaux vertes du site 6 (Commune de Baie-du-Fèbvre) étant pauvres en éléments nutritifs (Mondoux, 1989), un autre facteur vient donc répondre à ce besoin en matières nutritives. Effectivement, ces eaux reçoivent des matières organiques d'origine piscicole en raison de la présence de filets de pêche commerciaux à proximité provoquant la lacération des poissons, qui se retrouvent ensuite près des rives. Cette matière organique d'origine piscicole paraît donc constituer un attrait particulier pour ces bactéries.

Pour la période de l'été, une baisse considérable des densités d'*Aeromonas hydrophila* est noté pour les sites 1, 2 et 6. Ceci s'expliquerait par la stratification estivale de l'eau; à cette période les eaux de surface deviennent moins denses en raison de la hausse de température, ce qui amène une diminution de la viscosité de l'eau et conséquemment une augmentation de la vitesse de sédimentation. Les éléments nutritifs deviennent moins disponibles dans les eaux peu profondes étant donné leur tendance à migrer vers les sédiments, c'est pourquoi une baisse de matières en suspension est notée. De plus, ces éléments étant très recherchés par les plantes aquatiques, les concentrations à l'été y sont donc plus basses; il en est de même pour les matières en suspension (Désilets et Langlois, 1989). La température de l'eau pour cette période atteint 21.5 à 24.4°C, ce qui est légèrement au-dessus de la température optimale de croissance de cette bactérie (Rouf et Rigney, 1971).

Les densités d'*A. hydrophila* pour les sites 1, 2 et 6, respectivement 111(+16), 273(+40) et 126(+10) UFC /ml lors de l'échantillonnage printanier, subiront une baisse évidente à l'été, 7(+2), 40(+3) et 76(+11) UFC/ml, en raison de la température trop élevée et de la diminution de l'apport en éléments nutritifs.

À l'automne, une légère hausse de la densité bactérienne est notée pour certains sites (sites 1 et 4). Le brassage et les pluies remettent en circulation les éléments nutritifs; le refroidissement des eaux de surface fait en sorte que ces éléments redeviennent disponibles à cause de l'augmentation du lessivage à la couche supérieure des eaux (Combe et Kaiser, 1989 ; Désilets et Langlois, 1989).

Malgré que les nutriments soient disponibles durant la période automnale, la température, variant de 6.8 à 10.9°C, étant défavorable à la croissance de la bactérie (Rouf et Rigney, 1971) explique cette relation négative d'*Aeromonas hydrophila* avec les matières en suspension. Même si ces dernières augmentent, les bactéries ne pourront les utiliser en raison de la limitation de croissance que leur impose la température.

En général le lac Saint-Pierre présente, et ce pour toute les saisons, des concentrations très élevées en nutriments et en métaux qui découleraient d'un effet de rive selon l'étude de Désilets et Langlois (1989), dû au fait que ces sites correspondent à des zones d'herbier peu profondes. À cause de cela, les eaux du lac présentent un milieu extrêmement favorable à la prolifération d'*Aeromonas hydrophila* en présence de conditions préférentielles. Les sites étudiés étant représentatifs des milieux fréquentés par la faune amphibiennne *et* des zones d'herbier peu profondes, présentent des concentrations en matières en suspension élevées puisque ces dernières peuvent s'y déposer avec facilité. Donc les eaux où baignent les grenouilles constituent un milieu idéal pour la croissance de la

bactérie et représentent donc un danger potentiel pour ce type de faune. Le rôle des polluants comme les pesticides et les métaux ne doit pas être négligé, car ces derniers peuvent intoxiquer partiellement les animaux et les rendre plus sensibles aux infections bactériennes. Une étude démontre ce même phénomène initié par les pesticides chez les souris (Jolicoeur et al., 1988).

La température montre une relation positive avec la densité bactérienne pour le printemps et l'automne, et négative pour l'été. Cette corrélation négative découle du fait qu'à une certaine température la croissance de la bactérie diminue. C'est à la période estivale que se retrouvent ces températures élevées qui sont moins favorables au développement des *Aeromonas* psychrophiles responsables du déclenchement de la maladie des pattes rouges (Rouf et Rigney, 1971; Carr et al., 1976). Le déclin des densités d'*Aeromonas hydrophila* en partie dû à l'augmentation de température provient du fait que l'on dépasse la température optimale de la croissance bactérienne.

La prédation par le zooplancton et la compétition avec les algues et d'autres bactéries pour les éléments nutritifs disponibles sont aussi deux facteurs importants qui ne sont pas à exclure quant à la régulation de la densité d'*Aeromonas hydrophila* (Hazen, 1979).

Les matières en suspension représentent le seul paramètre à avoir montré une relation positive significative pour la période du printemps. Tel que mentionné précédemment en raison du brassage printanier, à la fonte des neiges et à l'effet de rive de la période printanière, les matières en suspension deviennent plus disponibles à cette période.

Jusqu'à maintenant la littérature, de même que notre étude n'a pas révélé de lien significatif entre l'oxygène dissous et la densité d'*A. hydrophila* au lac Saint-Pierre. Cette bactérie étant anaérobie facultative peut donc croître en absence d'oxygène tel que l'a démontré l'étude de Hazen (1979), c'est pourquoi aucune relation n'a été trouvée entre l'oxygène et la densité d'*A. hydrophila* (Pelczar et Chan, 1982). Malgré tout, notre étude montre une relation négative tout au long des saisons comme dans les travaux de Seidler et coll. (1980).

En raison de la tolérance de la bactérie envers des pH variant de 4 à 9, le pH n'a pu être considéré comme un facteur limitant pour la croissance d'*A. hydrophila*. Lors de l'étude, le pH est pratiquement neutre au cours des trois saisons, donc une variabilité considérée comme négligeable dans ce cas-ci. De plus, la valeur de pH à laquelle la croissance est optimale n'a pas encore été déterminée (Hazen, 1979). L'étude de Hazen (1979) semble suggérer que la relation négative observée tout au long des saisons s'expliquerait par le fait que l'augmentation de la densité bactérienne pourrait être responsable de la diminution du pH et produire la relation négative observée (Hazen, 1979). De plus, le pH ne semble pas jouer un rôle significatif sur la distribution bactérienne tel que l'a démontré l'étude de Hazen et coll. (1978).

Le potentiel redox maintient aussi une relation négative tout au long des saisons. Cette relation serait causée par la formation d'agents actifs de réduction par les bactéries ce qui entraînerait une diminution du potentiel redox (Hazen, 1979). Les bactéries seraient dans ce cas responsables de la diminution du potentiel redox. Une diminution du pH et du potentiel redox seraient donc engendrées par une augmentation de la concentration de la densité d'*Aeromonas hydrophila* (Hazen, 1979). Les concentrations bactériennes agiraient sur ces deux paramètres.

Quant à la conductivité, elle ne maintient aucune relation avec la densité bactérienne contrairement à l'étude de Hazen et coll. (1978). Par contre, Hazen (1979) lors d'une autre étude a aussi montré cette absence de corrélation.

L'obtention d'une croissance optimale ne dépend pas d'un seul facteur mais d'une interaction avec un ensemble de paramètres présents. Les conditions environnementales du milieu aquatique sont donc responsables du succès de la croissance optimale d'*A. hydrophila*. La pollution est l'une de ces conditions rendant ces bactéries plus résistantes, donc plus aptes à coloniser une plus grande variété de conditions environnementales du milieu aquatique (Seidler et al., 1980).

Suite aux résultats obtenus, et tel que le mentionnent les études de Hazen et coll (1978) et Hazen (1979), *Aeromonas hydrophila* ne maintient aucune relation temporelle avec les paramètres physico-chimiques de même que les matières en suspension. L'étude de Seidler et coll. (1980) vient appuyer cette absence de corrélation entre les paramètres et les densités bactériennes à travers le temps. Seules des corrélations spatiales, à un moment de la saison, avec les matières en suspension ont pu être mise en évidence.

### 7.3. Épidémiologie de la maladie des pattes rouges

L'étude de Hird et coll. (1981) montre que l'isolement d'*A. hydrophila* chez les grenouilles et les têtards est très fréquente pendant les mois printaniers et coïncide avec les densités bactériennes élevées à cette période dans le milieu aquatique. Effectivement, les cas de maladie des pattes rouges lors de la présente étude ont été relevés uniquement en période printanière, période où les concentrations maximales d'*A. hydrophila* ont été retrouvées.

Hazen (1979) rapporte une relation entre l'incidence de la maladie et la densité d'*A. hydrophila* chez le poisson qui ne semble pas directe. La condition corporelle (ou facteur K) serait un des facteurs déterminants quant au développement possible de la maladie des pattes rouges. Au printemps, en plus de devoir s'alimenter afin de compenser la privation encourue à l'hibernation, les grenouilles voient leur énergie centralisée et utilisée pour la reproduction. Elles présentent alors un indice de condition plus faible qu'à l'été où l'énergie sera plutôt utilisée pour la croissance corporelle de l'animal. La croissance nécessite une quantité d'énergie toute aussi grande que celle exigée pour la reproduction, mais beaucoup plus étalée dans le temps (Bruneau, 1975; Leclair et Castanet, 1987).

La combinaison d'un indice de condition faible, d'un système immunitaire affaibli au sortir de l'hibernation (Banas *et al.*, 1988) à une augmentation de la densité d'*A. hydrophila* dans l'environnement aquatique et d'une variation de la température observée particulièrement à la période printanière, vient augmenter la prédisposition de la grenouille aux infections. Le déclenchement de la maladie des pattes rouges chez les grenouilles causée par le pathogène s'en trouve ainsi facilité. La variation thermique engendre chez les animaux un stress, qui d'une part induit un affaiblissement de la santé et accroît les risques d'infections bactériennes (Carr *et al.*, 1976), et d'autre part provoque une prolifération d'*A. hydrophila* dans le milieu (Hazen, 1979). Les sites 2 (Yamachiche), 3 (Louiseville) et 6 (Commune de Baie-du-Février) où les cas de maladie des pattes rouges ont été le plus fréquemment répertoriés par rapport aux autres sites, suggèrent une relation avec les densités d'*Aeromonas hydrophila*, pour ce qui est des sites 2 et 6 particulièrement. L'absence de relation directe peut tenir à des différences inter-populationnelles du degré d'affaiblissement du système immunitaire.

## 7.4. Différence de virulence entre les souches ichtyenne et amphibiennne

### d' *Aeromonas hydrophila*

#### 7.4.1. Différence entre les souches amphibiennes

Les souches d' *A. hydrophila* issues du milieu aquatique ont démontré une différence en terme de virulence par rapport à certaines souches issues d'un animal moribond. De Figueiredo et Plumb (1977) ont noté que chez les poissons, les souches ichtyennes étaient plus virulentes que celles retrouvées dans l'eau, bien qu'elles soient biochimiquement semblables (Hazen et al, 1978). Par contre lors de notre étude, ces souches étaient suffisamment virulentes pour provoquer la mortalité chez les grenouilles.

La totalité des souches amphibiennes, isolées de la grenouille moribonde ou du milieu aquatique, ont été classifiées comme étant de faible virulence soit par l'évaluation des symptômes (S.1 à S.11 à l'exclusion de S.5), soit par détermination de la DL50 (S.5). Les souches aquatiques ont été considérées comme moins virulentes par rapport aux souches S.4, S.5 et S.6 qui ont provoquées une mort très rapide des animaux. Il est possible d'envisager que la maladie des pattes rouges décelée chez nos spécimens soit provoquée par une souche d'origine ichtyenne, car elle pourrait posséder des facteurs de virulence différents pour la grenouille et de ce fait s'avérer plus virulente pour ces animaux. Les souches amphibiennes sont surement plus adaptées à la grenouille que les souches ichtyenne, donc il est possible que l'animal soit plus apte à combattre l'infection ou que la bactérie d'origine amphibiennne s'est atténuée par mutation pouvant ainsi se maintenir dans les amphibiens sans nécessairement les tuer. Des souches plus virulentes pourraient aussi être extraites en d'autres sites ou autres temps.

#### 7.4.2. Poissons et grenouilles adultes

Selon les critères de classification de Lalonde (1981), la souche amphibienne (S.5) est considérée comme non virulente comparativement à la souche LL<sub>1</sub> originant de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) et classifiée comme souche dite "très virulente". Effectivement, la souche S.5 exige une concentration beaucoup plus grande de bactéries (D.L.50:  $>10^7$ ) pour induire chez les grenouilles une mortalité comparable à celle provoquée par la souche LL<sub>1</sub> (D.L.50:  $10^{4.47}$ ). Par contre elle a la capacité d'induire la maladie et doit donc de ce fait être considérée comme virulente.

Les D.L.50 de la souche LL<sub>1</sub> chez les truites arc-en-ciel (Lalonde, 1981) et les grenouilles léopards adultes sont pratiquement identiques, ce qui suggère que les deux groupes animaux possèdent une susceptibilité similaire aux *A. hydrophila*. Ces deux espèces présentent donc une même sensibilité à l'infection bactérienne, qui serait en partie due à des similarités au niveau du métabolisme physiologique et des structures anatomiques ayant la possibilité d'influencer la capacité infectieuse d'un pathogène (Pelczar et Chan, 1982).

Bien que les souches amphibiennes isolées soient considérées comme de faible virulence, elles possèdent la capacité de provoquer les signes cliniques de la maladie des pattes rouges, i.e. rougeurs au niveau des cuisses et du bas ventre, saignements aux extrémités et affaiblissement de l'animal. Il semble par contre, que l'infection ait été arrêtée permettant ainsi aux grenouilles de reprendre de la vigueur. Le degré de virulence de ces souches étant plus faible, l'animal a pu contrer l'infection bactérienne en 48 heures. Effectivement, l'étude de Lalonde démontre que la souche ichthyenne comparable, en regard de la virulence (TF2), à la souche amphibienne S.5, n'est plus réisolable après 48 heures,

alors que la souche LL<sub>1</sub> augmente entre 24 et 48 heures.

Une gradation de virulence à l'intérieur même du groupe de souches amphibiennes dites de faible virulence a été notée. Deux hypothèses sont suggérées afin de tenter d'expliquer cette variation. Soit qu'une variation de virulence existerait chez les souches issues d'un même animal, ce qui semble peu probable, mais une étude sérotypique de ces souches serait utile afin vérifier ce point. Soit qu'il existe une variation de la réponse immunitaire à l'intérieur du groupe d'animaux due à des facteurs inconnus. Les mécanismes de défense chez les grenouilles face à *Aeromonas hydrophila* étant encore inconnus, des études immunologiques s'avèreraient nécessaires afin d'élucider cette variation.

La souche S.5 étant une souche de faible virulence éprouve certaines difficultés d'adaptation aux conditions internes de l'hôte et/ou une plus faible résistance à certains mécanismes de défense, contrairement à une souche virulente qui peut alors persister dans l'animal comme le rapporte Lalonde (1981) chez la truite. Si la grenouille n'est pas soumise à un stress physiologique, le système de défense n'en est que plus fort et donc plus apte à combattre l'infection bactérienne. De nombreuses grenouilles présentant les signes classiques de la maladie des pattes rouges ont été ramenés en laboratoire. Ces animaux ont affiché un rétablissement complet après une période de 48 heures. Ce rétablissement serait peut-être dû à l'absence de stress physiologique et/ou encore à l'utilisation d'un agent bactéricide puissant soit l'alcool 70% associé(s) à la présence d'une souche de faible virulence.

Les travaux de Lalonde (1981) chez la truite suggèrent qu'une souche virulente présente dans le tractus digestif de la truite ne provoque qu'un faible taux de mortalité en absence de stress physiologique. Le même phénomène pourrait être envisagé chez les

amphibiens.

Les mécanismes d'adaptation d'*A. hydrophila* étant encore peu connus, il est difficile de trouver le pourquoi de l'inadaptabilité de la bactérie à persister chez l'animal.

#### 7.4.3. Grenouilles adultes et grenouilles juvéniles

Les résultats des DL50 ont montré que la résistance des grenouilles adultes envers les *Aeromonas hydrophila*, tant de souche ichtyenne que de souche amphibienne, est beaucoup plus faible que celle des juvéniles n'ayant pas traversé leur premier hiver. L'hibernation est actuellement la réponse la plus plausible qui permet d'expliquer ce phénomène. La flore intestinale des grenouilles hibernantes est significativement différente de celle des grenouilles non hibernantes (Banas *et al.*, 1988). Les basses températures engendrent une diminution de la concentration d'*A. hydrophila* dans l'environnement aquatique tout en exerçant une pression sélective sur les populations bactériennes en favorisant, chez les grenouilles hibernantes, la croissance des bactéries psychrophiles tel *A. hydrophila* (Banas *et al.*, 1988). La nutrition de ces bactéries dépendrait des mucines présentes dans la région intestinale. Ces mucines sont des gels complexes hydratés composés de groupes variables de glycoprotéines hydrophiles formant un film confluent dans le tube intestinal (McNabb et Tomasi, 1981). Les mucines associées aux débris composés de cellules bactériennes mortes et de cellules de la mue constituent une source de nutriments pour les bactéries intestinales durant l'hibernation. Les bactéries intestinales possèdent aussi la capacité de métaboliser la mucine même à 4°C, ce qui indique que la flore des hibernants possèdent la capacité de croître même sous cette condition.

Banas et coll. (1988) rapportent que des études ont prouvé que des bactéries ruminales, cécales et coloniques (chez les mammifères et les oiseaux) pouvaient utiliser les mucines par leur capacité à dégrader des complexes polysaccharides retrouvés chez les végétaux et des polysaccharides de mucines. Le même patron pourrait exister chez les grenouilles tel que le laisse présager les études in vitro effectuées en laboratoire (Banas *et al* ,1988).

Banas et coll. (1988) suggèrent l'existence d'un hypofonctionnement du système immunitaire chez les grenouilles hibernantes, résultant soit du phénomène d'hibernation lui-même soit de la basse température. Cet hypofonctionnement a pour conséquence d'exposer les animaux aux infections bactériennes sans qu'ils ne possèdent les moyens de défense adéquats.

Jusqu'à maintenant, aucune production d'anticorps n'a pu être décelée chez la grenouille suite à l'introduction d'un puissant immunogène, le BSA ( bovine serum albumine ) même par la technique d'ELISA ( enzyme-linked immuno-absorbent ) un test qui pourtant, est d'une très grande sensibilité de détection des anticorps. Par contre aucune étude n'a encore été effectuée chez les amphibiens, dans le contexte où l'antigène serait représenté par une suspension bactérienne tel *Aeromonas hydrophila*

Robichaud (1983) rapporte que chez les téléostéens, une réponse immunitaire est bien développée que ce soit au niveau d'une réponse non-spécifique (phagocytose) que spécifique (immunité humorale et cellulaire). Des études ont démontrées qu'une augmentation de la synthèse des anticorps est observée suite à l'injection d'*Aeromonas hydrophila* inactivé. La même réponse pourrait être envisagée chez la grenouille car, comme le poisson, c'est un animal à sang froid et elle montre de plus le même degré de résistance à la bactérie que la truite. Le fait que le BSA n'ait engendré aucune réponse chez la grenouille

pourrait s'expliquer par la forme soluble de cet antigène contrairement à la bactérie qui est un antigène particulaire.

La métamorphose semble aussi être impliquée dans la résistance retrouvée chez les juvéniles. Effectivement, lors de notre étude les juvéniles fraîchement métamorphosés (juillet) ont montré une plus grande résistance à la bactérie que les juvéniles prélevés à l'automne (octobre). Ce phénomène semble lié à l'apparition de nouveaux antigènes spécifiques d'adultes qui viennent créer un état d'histo-incompatibilité (incapacité d'accepter des greffes entre individus et incapacité de reconnaître les antigènes) chez l'animal déjà immunocompétent depuis le stade larvaire. La larve reconnaît donc les antigènes adultes et les alloantigènes (*i.e.* antigène provenant de la même espèce mais d'un autre individu) comme étrangers. Le problème qui pourrait en résulter est la formation d'une maladie auto-immune lors de la métamorphose conduisant à une mort certaine, mais les grenouilles ne semblent aucunement confrontées à ce phénomène, et le mécanisme demeure encore inconnu. La métamorphose chez les anoures constitue une période privilégiée pour l'induction de la tolérance aux antigènes mineurs et majeurs d'histo-compatibilité. Ce mécanisme semble associé à une diminution du nombre de cellules thymiques (cellules T) et être affecté en partie par une suppression allo-immune active due à des lymphocytes de l'animal qui métamorphose (Roitt *et al.*, 1985).

Bien que les raisons demeurent encore aujourd'hui inconnues, le fait que la maladie des pattes rouges soit principalement retrouvée chez les têtards et les grenouilles adultes, alors qu'elle est quasi inexistante chez les grenouilles juvéniles (Hird *et al.*, 1981), vient démontrer l'importance de la métamorphose sur la résistance de l'animal face aux invasions bactériennes.

La métamorphose jumelée à l'hibernation sont les deux principales responsables de la différence observée entre les juvéniles et les adultes. La métamorphose semble fournir tous les éléments nécessaires à l'obtention d'une bonne immunité alors que l'hibernation vient affaiblir le système immunitaire.

Il existe tout de même un système de protection chez les grenouilles adultes contre les invasions bactériennes. Cette protection serait assurée d'une part par l'existence d'anticorps préformés chez la grenouille avant l'entrée en hibernation et ayant la capacité d'opsoniser (processus favorisant la phagocytose) et d'autre part par le complément responsable de la lyse de l'antigène. De plus, il semble que les macrophages de la grenouille hibernante conservent une certaine capacité de phagocytose. Ces trois éléments confèrent donc à la grenouille hibernante une certaine protection contre les infections systémiques (Banas *et al* , 1988).

## 7. Conclusion

La présente étude a montré que la concentration maximale d'*Aeromonas hydrophila* se retrouve au printemps ce qui vient corroborer les résultats de plusieurs auteurs. Tous les cas de maladie des pattes rouges au lac Saint-Pierre ayant été répertoriés au printemps, l'hypothèse d'une relation entre la concentration bactérienne et la maladie s'en trouve renforcée.

Concernant les relations entre les paramètres physico-chimiques et *A. hydrophila*, seule la matière en suspension a présenté un lien significatif, et ce uniquement pour la période du printemps. Ceci s'expliquerait par le fait qu' étant en plus grande concentration les bactéries nécessitent une plus grande quantité d'éléments nutritifs pour leur croissance puisqu'elles se retrouvent à cette période en présence de températures favorables à leur croissance optimale.

En regard à leur aptitude à coloniser à l'intérieur d'une grande variété de conditions environnementales, il est normal de retrouver peu de relation entre *Aeromonas hydrophila* et les paramètres physico-chimiques.

La pollution organique présente au lac Saint-Pierre pourrait éventuellement jouer un rôle dans l'augmentation de la densité d'*Aeromonas hydrophila* et devra donc faire l'objet d'études plus approfondies en raison de leur influence sur la prolifération et la résistance des souches bactériennes.

Des études éventuelles de sérotypie de la bactérie de la grenouille léopard et du milieu aquatique du lac Saint-Pierre pourront être envisagées afin de déterminer avec exactitude d'une part, si les souches amphibiennes sont réellement moins virulentes que

les souches ichtyennes et d'autres part d'évaluer la virulence des souches aquatiques présentes dans le milieu (lac Saint-Pierre). De même que des études effectuées sur le sérum afin d'évaluer le pouvoir bactéricide chez les grenouilles.

En outre, il serait intéressant d'envisager une étude comparative de la réaction immunitaire entre les grenouilles adultes et les grenouilles juvéniles afin de mieux comprendre la plus grande résistance face aux infections bactériennes retrouvée chez les juvéniles. De même qu'une étude sur les mécanismes de défense de la grenouille vis-à-vis d'*Aeromonas hydrophila*, et sur les facteurs pouvant influencer la réponse immunitaire chez les amphibiens.

L'écologie d'*Aeromonas hydrophila* demeure encore aujourd'hui pratiquement inconnue. Des études devront donc être entreprises quant à savoir ce qui régit la croissance de cette bactérie dans les milieux aquatiques.

## 8. Bibliographie

- Agger, W. A; McCormick, J. D; Gurwith, M. J. 1985. Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila* -associated diarrhea. J. Clin. Microbiol; 21: 909-913.
- Anonyme, 1973. Where have all the frog gone ? Modern Med. 41: 20-24.
- Banas, J. A; Loesche, W. J et Nace, G. W. 1988. Possible mechanisms responsible for the reduced intestinal flora in hibernating leopard frogs (*Rana pipiens*). Appl. Environ. Microbiol. 54 (9): 2311-2317.
- Barnhart, H. M; Pancorbo, O. C; Dreesen, D. W. et Shotts, Jr. E. B. 1989. Recovery of *Aeromonas hydrophila* from carcasses and processing water in a broiler processing operation. J. Food. Protection; 52(9): 646-649.
- Beauregard, N. et R. Leclair Jr. 1988. Multivariate analysis of the summer habitat structure of *Rana pipiens* Schreber, in lac St-Pierre (Quebec, Canada). In: Management of amphibians, reptiles, and small mammals in North America. U. S. D. A. Forest Service, Gen. Tech. Rep., RM-166:129-143.
- Benoit, J ; Bourgeois, J-C ; Desjardins, S et Picard, J-P. 1988. Plan de conservation et de mise en valeur des habitats et de la faune de la région du lac Saint-Pierre. Ministère du Loisir, de la Chasse et de la Pêche du Québec, Dir. régionale de Montréal et de Trois-Rivières. 126 p.
- Boulanger, Y. 1977. Facteurs d'agression produits par *Aeromonas hydrophila* isolés de poisson. Mémoire de maîtrise. Dép. Pathologie et microbiologie vétérinaires. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal. 84 p.
- Boyer, C. I; Blacker, K et Delaney, L. E. 1971. *Aeromonas hydrophila* infection in the mexican axolotl, *Siredon mexicanum*. Lab. Animal. Sc; 21: 372-375.

- Bradford, D. F. 1989. Mortality factors and population extinctions in a high-elevation frog, *Rana muscosa*. Abstract, Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol., 69<sup>ième</sup> réunion annuelle, San Francisco, p: 67.
- Brock, D. T.; Smith, W. D et Madigan, T. M. 1984. Biology of microorganisms. 4<sup>ième</sup> édition. Englewood Cliffs, N. J: Prentice Hall. U. S. A. 847 p.
- Bruneau, M. 1975. Bio-écologie des ouaouarons *Rana catesbeiana* (Shaw), têtards et adultes, dans la région de la station de biologie de Saint-Hyppolyte (comté de Terrebonne, Qué). Mémoire de Maîtrise Dép. des Sciences Biologiques. Université de Montréal.
- Bullock, G. L; Conroy, D. A et Sniesko, S. F. 1971. Bacterial diseases of fishes. In disease of fishes, Book 2 (A) (Sniesko et Axelrod ed.) p: 21-41. Jersey City, N. J: T. F. H. Publ.
- Brinton, C. C, Jr. 1977. The piliation phase syndrome and the uses of purified pili in disease control. In Proceeding of the 13th joint conference of cholera. U. S. Dept of Health, Education and Welfare, Washington. p: 34-70.
- Carr, A. H; Amborski, R. L; Culley, D. D. Jr et Amborski, G. F. 1976. Aerobic bacteria in the intestinal tracts of bullfrogs (*Rana pipiens*) maintained at low temperatures. Herpetologica. 32: 185-189.
- Chakraborty, T; Montenegro, M. A; Sanyal, S. C; Helmuth, R et Bulling, E. 1984. Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin. Infect. Immun. 46: 435-41.
- Charpentier, G. 1988. Protocoles expérimentaux de microbiologie expérimentale. Dép. Chimie-Biologie. Université du Québec à Trois-Rivières. 141 p.
- Chester, F. D. 1901. Manual of determinative bacteriology. 235 p.

- Collins, M. T.; Gratzed, J. B.; Shott, E. B.; Dave, D. L.; Campbell, L. M et Senn, D. R. 1975. Nitri-  
fication in an aquatic recirculation system. J. Fish. Res. Board. Can. 32: 2025-2031.
- Colt, J; Orwick, K et Brooks, D. 1984 (a). Effects of gaz-supersaturated water on *Rana*  
*catessbeiana* tadpoles. Aquaculture. 38: 127-136.
- Colt, J; Orwick, K et Brooks, D. 1984 (b). Gaz bubble disease in the african clawed frog,  
*Xenopus laevis*. J. Herpetol. 18: 131-137.
- Comba, M. E et Kaiser. K. L. E. 1989. Processes influencing the seasonal transport of trace  
organic hydrocarbons in the St-Lawrence River. Lakes research branch, Natio-  
nal Water Research Institute; Symposium on the St-Lawrence: a river to be  
claimed. Montreal, November 1989.
- Cumberbatch, M ; Gurwith, M. J; Langston, C; Bradley Sack, R et Brunton, J. L. 1979. Cyto-  
toxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila* relationship of toxigenic  
isolates to diarrheal disease, Infect Immu 23 (13): 829-837.
- Dahle, H. K et Nordstoga, K. 1968. Identification of aeromonads in furred animals. Acta.  
Vet. Scand. 9: 65-70.
- Davis, W. A; Kane, J; Garagusi, V. F. 1978. Human *Aeromonas* infection: a review of  
the litterature and a case report of Endocarditis. Medecine. Baltimore. 57: 267  
-277.
- De Figueiredo, J et Plumb, J. A. 1977. Virulence of different isolated of *Aeromonas*  
*hydrophila* in channel catfish. Aquaculture 11: 349-354.
- De Meuron, P. A et Peduzzi, R. 1979. Zentrabl. Veterinaermed. B 26, 153-167. In Popoff,  
M et Lallier, R. 1984. Biochemical et serological characteristics of *Aeromonas*.  
Methods in microbiology. Academic Press. London. vol 16:127-145.
- Désilets, L et Langlois, C. 1989. Variabilité spatiale et saisonnière de la qualité  
de l'eau du fleuve Saint-Laurent. Environnement Canada, Centre Saint-Laurent,  
Directions des eaux intérieures. Montréal, Québec. 86 p.

- Dobrescu, L. 1978. Enterotoxigenic *Aeromonas hydrophila* from a case of piglet diarrhea. Zentralbl. veterinaermed. reihe B 25: 713-718. In Khardori, N et Fainstein, V. 1988. *Aeromonas* et *Plesiomonas* as ethiological agents. Ann. Rev. Microbiol. 42: 395-419.
- Don Hunsaker II, D et Potter, F. E. Jr. 1960. "Red leg" in a natural population of amphibians. Herpetologica, 16 : 285-286.
- Emerson, H et Norris, C. 1905. "Red leg"—an infectious disease of frogs. J. Exp. Med. 7: 52-58.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1974. Manual of Methods For Chemicals Analysis of Water and Wastes. United States. 16 p.
- Eurell, T. E; Lewis, D. H et Grumbles, L. C. 1978. Comparison of selected diagnostic tests for detection of motiles *Aeromonas* septicemia in fish. Amer. J. Vet. Res. 39: 1384-1386.
- Ewing, W. H; Hugh, R et Jonhson, J. G. 1960. Studies on the *Aeromonas* group; "DHEW, Center for disease control, Atlanta. In Shotts, E. B. Jr. 1984. *Aeromonas*. In Hoft, G. L., Frye, F. L. et Jacobson, E. R. (ed). Disease of amphibians and reptiles. Plenum Press, New York, p: 49-55.
- Ewing, W. H; Hugh, R et Jonhson, J. G. 1961. Studies on the *Aeromonas* group. U. S. Department of health, education and welfare, Communicable disease center, Atlanta, Georgia. In Popoff, M et Lallier, R. 1984. Biochemical et serological characteristics of *Aeromonas*. Methods in microbiology. Academic Press. London. vol 16:127-145.
- Ewing, W. H et Hugh, R. 1974. *Aeromonas*. In Manual of clinical microbiology. Amer. Soc. Microbiol., 230-237.
- Franz, L. R. 1966. Red leg in a natural population of Maryland amphibians. Bull. Maryland herpetological society. 2 (2): 7.

- Frye, F. L. 1985. An unusual epizootic of anuran aeromoniasis. J. Amer. Vet. 187 : 1223-1224.
- Galvez, R et Yong, R. N. 1989. Considérations sur l'état de la contamination par des métaux lourds dans les sédiments au fond du fleuve. Centre de recherche géotechnique, Univ. McGill. Symposium on the St-Lawrence: a river to be claimed. Montreal, November 1989.
- Gibbs, E. L. 1973. *Rana pipiens* : Health and disease- How little we know. Amer. Zool. 13: 93-96.
- Gibbs, E. L; Gibbs, T. J et Van Dick, P. C. 1966. *Rana pipiens* . Health and disease. Lab. Anim. Care. 16 (2): 142-160.
- Glorioso, J. C; Amborski, R. L; Amborski, G. F et Culley, D. D. 1974. Microbial studies on septicemic bullfrogs (*Rana catesbeiana* ). Am. J. Vet. Res. 35 (9): 1241-1244.
- Gorden, R. W; Hazen, T. C; Esch, G. W et Fliermans, C. B. 1979. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from the american alligator, *Alligator mississippiensis* . J. Wild. Dis. 15: 239-243.
- Gurwith, M; Bourque, C; Cameron, E ; Forest, G et Green, M. 1977. Cholera-like diarrhea in Canada. Arch Intern Med. 137:1461-1464.
- Hawker, E. L et Linton, H. A. 1971. Microorganisms, function, form and environment. Acad. Press. Baltimore, New-York. 727 p.
- Hazen, T. C. 1979. Ecology of *Aeromonas hydrophila* in a south Carolina, USA, cooling reservoir. Microbial Ecology 5: 179-195.
- Hazen, T. C; Fliermans, C. B; Hirsch, R. P et Esch, G. W. 1978. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. Appl. Environ. Microbiol. 36: 731-738.

- Hazen, T. C; Esch, G. W; Dimock, R. V et Mansfield, A. 1982. Chemotaxis of *Aeromonas hydrophila* to the surface mucus of fish. *Curr. Microbiol.* 7: 371-375.
- Hird, D. W; Diesh, S. L; McKinnell, R. G; Gorham, E; Martin, F. B; Kurtz, S. W et Dubrovlny, C. 1981. *Aeromonas hydrophila* in wild caught frogs and tadpoles (*Rana pipiens*) in Minnesota. *U. S. A. Lab. Anim. Sc.* 31: 166-169.
- Hird, D. W; Diesh, S. L; McKinnell, R. G; Gorham, E; Martin; Meadows, C. A et Gasiorowski, M. 1983. Enterobacteriaceae and *Aeromonas hydrophila* in Minnesota frogs and tadpoles (*Rana pipiens*). *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (6): 1423-1425.
- Holmberg, S. D, Schell, W. L, Fanning, G. R; Wachsmuth, I. K; Hickman-Brenner, F. W *et al.* 1986. *Aeromonas* intestinal infection in the united states. *Ann. Intern. Med.* 105: 683-689.
- Horsley, R. W. 1977. A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for its analysis. *J. Fish. Biol.* 10: 529-553.
- Jiwa, S. F. H. 1983. Enterotoxigenicity, hemagglutination and cell-surface hydrophobicity in *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* and *Aeromonas salmonicida*. *Vet. Microbiol.* 8: 17-34.
- Jolicoeur, P; Fournier, M et Krystiniak, K. 1988. Suppression of microbicidal activity of peritoneal exudate by sublethal dieldrin exposure of outbred and inbred mice. *Pest. Biochem. and Physiol.* 31: 203-212.
- Kaplan, H. M. 1953. The care and diseases of the frog. *Proc. Animal Care Panel.* p: 74-92.
- Ketover, B. P; Young, L. S et Armstrong, D. 1973. Septicemia due to *Aeromonas hydrophila*: Clinical and immunologic aspects. *J. Inf. Dis.* 127: 284-290.
- Khadori, N et Fainstein, V. 1988. *Aeromonas* and *Fliesiomonas* as etiological agents. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 395-419.

- Kjems, E. 1955. Acta pathol. Microbiol Scand. 36: 531-536. In Popoff, M et Lallier, R. 1984. Biochemical et serological characteristics of *Aeromonas*. In Methods in microbiology. Academic Press. London. vol 16:127-145.
- Kluger, M.J. 1977. Fever in the frog *Hyla cinerea*. J. Thermobiol. 2: 79-82.
- Kulp, W. L et Borden, D. G. 1942. Further studies on *Frøteus hydrophillus*, the etiological agent in "red leg" disease of frogs. J. Bact. 44: 673-685.
- Lalonde, G. 1981. Pathogénicité des *Aeromonas hydrophila* pour la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). Mémoire de maîtrise. Dép. Pathologie et microbiologie vétérinaires. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal 50 p.
- Larsen, J. L et Jensen, N. J. 1977. An *Aeromonas* species implicated in ulcer-disease of the cod (*Gadus morhua*) Nord. Veterinaarmed. 29: 199-211.
- Leblanc, D. 1982. La caractérisation antigénique et l'évaluation du système API-20E pour l'identification des *Aeromonas* mobiles. Mémoire de maîtrise. Dép. Pathologie et microbiologie vétérinaires. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal. 62 p.
- Leclair, R. Jr. 1985. Les amphibiens du Québec: Biologie des espèces et problématique de conservation des habitats. Ministère du loisir, de la chasse et de la pêche. Bibliothèque Nationale du Québec. 121 p.
- Leclair, R. Jr et Castanet, J. 1987. A skeletochronological assessment of age and growth in the frog *Rana pipiens* Schreber (Amphibia, Anura) from south-western Quebec. Copeia, 2: 361-369.
- Lee, D. S. et Franz, L. R. 1973. Red leg in a subterranean population of pickerel frogs. Bull. Maryland Herpetol. Soc. 9 (4):111.
- Lehman, K. B et Neumann, R. G. 1931. Determinative bacteriology. R. S. Breed. G. E. Stechert (ed.). New York, 474 p.

- LeMinor, L et Véron, M. 1982. Bactériologie médicale. Flammarion médecine sciences. France. 773 p.
- Lewis, W. M et Bender, M. 1961. Free-living ability of warm water fish pathogen of the genus *Aeromonas* and factors contributing to its infection of the golden shiner. Prog. Fish. Cult. 23: 124-126.
- Lindbert, A. A; Nord, C. E; Hellgen, M et Sjöberg, L. 1973. Identification of gram-negative aerobic fermenters in a clinical bacteriological laboratory, Med. Microbiol. Imm. 159: 201-210.
- McCarthy, D. H. 1975 (a). *Aeromonas proteolytica* - a halophilic aeromonad? Can. J. Microbiol. 21: 902-904.
- McCarthy, D. H. 1975 (b). The bacteriology and taxonomy of *Aeromonas liquefaciens*. Technical Report Series. no 2, Fish Diseases Laboratory, Ministry of Agriculture, Weymouth, Dorset, GB. 107 p.
- McInnes, J. I; Trust, T. J et Crosa, J. H. 1979. Desoxyribonucleic acid relationship among members of the genus *Aeromonas*. Can. J. Microbiol. 25, 578-586.
- McNabb, P. C et Tomasi, T. B. 1981. Host defense mechanisms at mucosal surfaces. Ann. Rev. Microbiol. 35: 477-496.
- Mead, A. R. 1969. *Aeromonas liquefaciens* in the leukoderma syndrome of *Achatina fulica* Malacol. Int. J. Malacol. 9:43.
- Metcalf, J. L. et Charlton, M. N. 1989. Freshwater mussels as biomonitors for organic industrial contaminants and pesticides in the St-Lawrence river. Rivers Research Branch and Lakes Research Branch, National Water Research-Institute. Symposium on the St-Lawrence: a river to be claimed. Montreal, November 1989.
- Miles, E. M et Miles, A. A. 1951. J. Gen Microbiol. 5; 298-306. In Popoff, M et Lallier, R. 1984. Biochemical et serological characteristics of *Aeromonas*. Methods in microbiology. Academic Press. London. vol 16: 127-145.

- Mittal, K. R; Lalonde, G; Leblanc, D; Olivier, G et Lallier, R. 1980. *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout: relation between virulence and surfaces characteristics. Can. J. Microbiol. 26: 1501-1503.
- Mondoux. 1989. Le Saint-Laurent: usages et environnement. Plan d'action Saint-Laurent. Escala, supplément no 30, août 1989.
- Nadeau et Desjardins. Revue des substances toxique dans le fleuve Saint-Laurent. Symposium on the St-Lawrence a river to beclaimed Montreal; November 1989
- Neilson, A. H. 1978. The occurrence of aeromonads in activated sludge: Isolation of *Aeromonas sobria* and its possible confusion with *Escherichia coli*. J. Appl. Bact. 44: 259-264.
- Nowotny, A. 1969. Molecular aspects of endotoxic reaction. Bact. Rev. 33:72-98.
- Nyman, S. 1986. Mass mortality in larval *Rana sylvatica* attributable to the bacterium *Aeromonas hydrophila*. J. Herpet. 20 : 196-201.
- Oudar, J; Richard, Y et Domenech, E. 1974. Isolement d'une souche d'*Aeromonas* chez le lièvre. Bull. Acad. Vet. Fr. 127: 391-396.
- Paquin, D. 1982. L'exploitation de trois espèces d'anoures dans la région du lac Saint-Pierre. Rapport technique (inédit), Min du Loisir, de la Chasse et de la Pêche. Québec, 64 p.
- Pelczar, M. J. et Chan, E.C.S. 1982. Éléments de microbiologie. Édition HRW Itée. Montréal. 515 p.
- Phillips, J. A; Bernhart, H. E et Rosenthal, S. G. 1974. *Aeromonas hydrophila* infections. Pediatrics 53: 110-112.

- Pierce, R. L.; Daley, C. A.; Gates, C. E.; Wohlgemuth, K.; Brookings, V. M. *et al.* 1973. *Aeromonas hydrophila* septicemia in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 162: 469.
- Popoff, M. 1984. Genus III. *Aeromonas* Kluver Van Niel 1936. In Bergey's Manual of determinative (Buchanan & Gibbons ed). 9th ed. p: 545-548. Baltimore: Williams et Wilkins compagny.
- Popoff, M et Véron, M. 1976. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila* - *Aeromonas punctata* group. J. Gen. Microbiol. 94: 11-22.
- Popoff, M et Lallier, R. 1984. Biochemical et serological characteristics of *Aeromonas*. In Methods in microbiology. Academic Press. London. vol 16: 127-145.
- Punzo, F. 1975. Ulcerative stomatitis in the peruvian boa constrictor, *Boa constrictor ortinii*. J. Herpetol. 9: 360-361.
- Reed, L. J et Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 27: 493-497.
- Rigney, M. M; Zilinski, J. W et Rouf, M. A. 1978. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* in red leg disease in frog. Curr. Microbiol. 1: 175-179
- Rippey, S. R et Cabelli, V. J. 1980. Occurence of *Aeromonas hydrophila* in limnetic environments: Relationship of the organism to trophic state. Microbiol. Ecol. 6: 45-54.
- Rippey, S. R et Cabelli, V. J. 1989. Use of the thermotolerant *Aeromonas* group for the trophic state classification of freshwaters. Wat. Res. 23 (9). p: 1107-1114.
- Robichaud, N. 1983. Réponse immunitaire contre *Aeromonas hydrophila* : Essai de vaccination chez la souris et la truite arc-en-ciel. Mémoire de maîtrise. Dept. Pathologie et microbiologie vétérinaires. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal. 103 p.

- Roitt, I; Brostoss, J; Male, D. 1985. Immunologie fondamentale et appliquée Edition MESDI Médecine et science PARIS.
- Rouf, M. A. et Rigney, M. M. 1971. Growth temperatures and temperature characteristics of *Aeromonas*. Appl. Environ. Microbiol. 22: 503-506.
- Russel, F. H. 1898 An epidemic septicemic disease among frogs due to the *Bacillus hydrophylus fuscus*. J. Amer. Med. Ass. 20:1442-1449.
- Scherrer, B. 1984. Biostatistique. Gaétan Morin Éditeur, Chicoutimi, Québec, Canada. 850pp.
- Schubert, R. H. W. 1974. Genus II. *Aeromonas*. Kluwyer Van Niel 1936. In Bergey's Manual of determinative (Buchanan & Gibbons ed). 9th ed. p: 345-348. Baltimore: Williams et Wilkins compagny.
- Seidler, R. J; Allen, D. A; Lockman, H; Colwell, R. R; Joseph, S. W et Daily, O. P. 1980. Isolation, enumeration and characterisation of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. Appl. Environ. Microbiol. 39 (5): 1010-1018.
- Service de Protection de l'environnement ( S. P. E. Q.). 1974. Études du fleuve Saint-Laurent: tronçon Varennes- Montmagny. Qualité physico-chimique et bactériologique. 164 p.
- Shaw, D. H et Hodder, H. J. 1978. Lipopolysaccharides of the motile aeromonads, one oligosaccharide analysis as an aid to taxonomic classification. Can. J. Microbiol. 24: 864-868.
- Shotts, E. B. Jr. 1984. *Aeromonas*. In Hoft, G.L., Frye, F.L. et Jacobson, E.R. ( ed ) . Disease of amphibians and reptiles. Plenum Press, New York, 784 p.
- Shotts, E. B. Jr; Gaines, J. L; Martin, C and Prestwood, A. K. 1972. *Aeromonas* induced dead amog fish, reptiles in eutrophis inland lake. J. Amer. Vet. Med. Ass. 161: 603-607.

- Shotts, E. B. Jr et Rimler, R. 1973. Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. Amer. Soc. Microbiol. Appl. Microbiol. 26 oct 1973: 550-553.
- Smith, A. L. 1976. Microbiology and pathology. St-Louis: C. V. Mosby. U. S. A. Eleventh edition. 687 p.
- Smith, J. A. 1980. *Aeromonas hydrophila*: Analysis of 11 cases. Can. Med. Assoc. J. 122: 1270-1272.
- Snieszco, S. F. 1974. Effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. J. Fishes. Biol. 6 :197-208.
- Tannock, G. W et Dwayne, C. S. 1974. Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. Infect. Immun. 9: 591-598.
- Trust, T. J. 1975. Facultative anaerobic bacteria in the digestive tract of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) maintained in fresh water under defined culture conditions. Appl. Microbiol. 29: 663-668.
- Trust, T. J et Sparrow, R. A. H. 1974. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. Can. J. Microbiol. 20: 1219-1228.
- Van Der Waaij, D; Cohen, B. J et Nace, G. W. 1974. Colonization patterns of aerobic gram negative bacteria in the cloaca of *Rana pipiens*. Lab. Anim. Sciences. 24: 307-317.
- Von Graevenitz, A. et Zinterhofer, L. 1970. The detection of *Aeromonas hydrophila* in stool specimens. HLS. 7: 124-127.
- Wetzel. R. 1983. Limnology. 2<sup>e</sup> ed, Philadelphia, Saunders. 110pp.
- Wohlegemuth, D; Pierce, R. L et Kirkbride, C. A. 1972. Bovine abortion association with *Aeromonas hydrophila*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 160: 1001-1002.

Zar, J. H. 1974. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, Inc, Englewood Cliffs, W. J. 593 p.

9. Annexes.

Annexe.1.

Calcul de la D.L.50 par la méthode de Reed et Muench (1938)

Calcul de la D.L.50 pour la souche ichtyenne LL<sub>1</sub> chez les grenouilles adultes

Dilution	Morts	Survies	Cumulatif		% de Mortalité
			morts	survies	
10 <sup>7</sup>	10	0	29	0	100
10 <sup>6</sup>	7	3	19	3	86.36
10 <sup>5</sup>	7	3	12	6	66.67
10 <sup>4</sup>	5	5	5	11	31.25
10 <sup>3</sup>	0	10	0	21	0.00

Calcul détaillé:

A maximum :66.67 (10<sup>5</sup>)

B minimum :31.25 (10<sup>4</sup>)

M :50.00

AMM' = ABB'

$$1^\circ \frac{B'X'}{BB'} = \frac{AM'}{AB'} = \frac{66.67 - 50.00}{66.67 - 31.25} = \frac{16.67}{35.42} = 0.47$$

$$2^\circ 4.00 + 0.47 = 4.47$$

$$3^\circ 10^{4.47} \text{ bactéries/ml}$$

Calcul de la D.L.50 pour la souche ichtyenne LL<sub>1</sub> chez les grenouilles juvéniles

Dilution	Morts	Survies	Cumulatif morts	Cumulatif survies	% de Mortalité
10 <sup>7</sup>	7	3	7	3	70.00
10 <sup>6</sup>	0	10	0	13	0.00
10 <sup>5</sup>	0	10	0	23	0.00
10 <sup>4</sup>	0	10	0	33	0.00
10 <sup>3</sup>	0	10	0	43	0.00

Calcul détaillé:

A maximum : 70.00 (10<sup>7</sup>)

B minimum : 0.00 (10<sup>6</sup>)

M : 50.00

$$AMM' = ABB'$$

$$1^{\circ} \frac{B'X'}{BB'} = \frac{AM'}{AB'} = \frac{70.00 - 50.00}{70.00 - 0.00} = \frac{20.00}{70.00} = 0.29$$

$$2^{\circ} 6.00 + 0.29 = 6.29$$

$$3^{\circ} 10^{6.29} \text{ bactéries/ml}$$

Calcul de la D.L.50 pour la souche amphibienne S.5 chez les grenouilles adultes.

---

Dilution	Morts	Survies	Cumulatif		% de Mortalité
			morts	survies	
$10^7$	1	9	3	9	25.00
$10^6$	1	9	2	18	10.00
$10^5$	1	9	1	27	3.57
$10^4$	0	10	0	37	0.00
$10^3$	0	10	0	47	0.00

---

-Une dose de  $6 \times 10^7$  bactéries/ml entraîne une mortalité de 25 %.

## Annexe.2.

## Évaluation des densités bactériennes

Valeurs en UFC/ml ( $\pm$  écart-type) qui ont servi à l'évaluation des densités bactériennes par site et par saison.

Périodes	Sites	Triplicats			moyenne
		1	2	3	
printemps					
	1	98 (14) <sup>a</sup>	101 (29)	134 (32)	111 (16)
	2	280 (55)	318 (45)	221 (40)	273 (40)
	3	34 (11)	38 (19)	21 (9)	31 (7)
	4	33 (20)	25 (12)	26 (13)	28 (4)
	5	36 (31)	25 (12)	32 (8)	31 (5)
	6	122 (44)	116 (19)	140 (36)	126 (10)
	7	7 (7)	3 (4)	2 (3)	4 (2)
été					
	1	10 (8)	6 (5)	5 (4)	7 (2)
	2	37 (5)	44 (18)	39 (7)	40 (3)
	3	28 (8)	19 (9)	25 (4)	24 (4)
	4	16 (5)	13 (12)	25 (10)	18 (5)
	5	42 (9)	44 (17)	52 (11)	46 (4)
	6	62 (23)	77 (5)	89 (28)	76 (11)

a: chacune de ses valeurs est issue de la moyenne de trois dilutions (1:10, 1: 50 et 1: 100) de l'échantillon d'eau.

Périodes	Sites	Tripliquats			moyenne
		1	2	3	
automne					
	1	26 (12)	23 (10)	17 (5)	22 (4)
	2	55 (18)	45 (19)	34 (13)	45 (9)
	3	1 (1)	4 (3)	4 (3)	3 (1)
	4	37 (13)	48 (14)	44 (11)	43 (5)
	6	18 (8)	18 (13)	15 (4)	17 (1)