



anses



7^{ème} journées de la recherche filière piscicole JRFP - Paris – Juillet 2022

Evaluation de l'effet probiotique de souches de *Pseudoalteromonas* chez le bar Européen infecté expérimentalement avec *Vibrio harveyi*

Rahmani Alexandra¹, Parizadeh Leila², Baud Marine¹, François Yoannah¹, Fleury Yannick²,
Danion Morgane¹, Morin Thierry¹

¹ ANSES, Unité Virologie, immunologie et écotoxicologie des poissons, Plouzané

² Laboratoire de Biotechnologie et chimie marine, Quimper

CONNAÎTRE, ÉVALUER, PROTÉGER



1 - Sélection de candidats probiotiques

Identification de souches de *Pseudoalteromonas* d'intérêt



Crassostrea gigas

Hémolymphe



Pseudoalteromonas
souches *hCg*

Descriac et al., 2013



Ostrea edulis

Pseudoalteromonas
souches *hOe*

Cuny et al., 2021 ; Offret et al., 2022

Identification de souches de *Pseudoalteromonas* d'intérêt



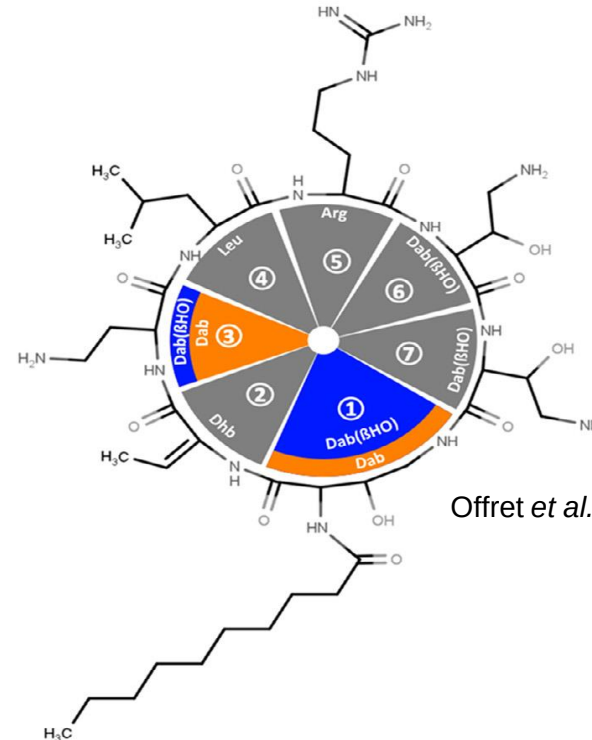
Pseudoalteromonas
souches *hCg*
Descriac et al., 2013



Pseudoalteromonas
souches *hOe*
Cuny et al., 2021 ; Offret et al., 2022



Production de BLIS *Bacteriocin-Like Inhibitory Substances*



Offret et al., 2022

Identification de souches de *Pseudoalteromonas* d'intérêt

Offret et al., 2022

		Pathogène				
Producing strains	Alterin concentration ($\mu\text{g/mL}$ for 10^9 CFU/mL)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Vibrio harveyi</i> QRM4	<i>Vibrio pectenicida</i> CIP 105190	<i>Vibrio tasmaniensis</i> LGP32	<i>Vibrio tapetis</i> CECT 4600
hCg-6	112.4	6.25	1.58	1.58	1.58	> 50
hCg-42	276.3	6.25	1.58	1.58	1.58	> 50
hOe-66	365.6	25	3.13	3.13	3.13	> 50
hOe-124	557.2	25	3.13	6.25	6.25	> 50
hOe-125	492.7	25	3.13	6.25	3.13	> 50
Polymyxin B	/	1.5	50	100	3	> 100
		-	--	---	---	/

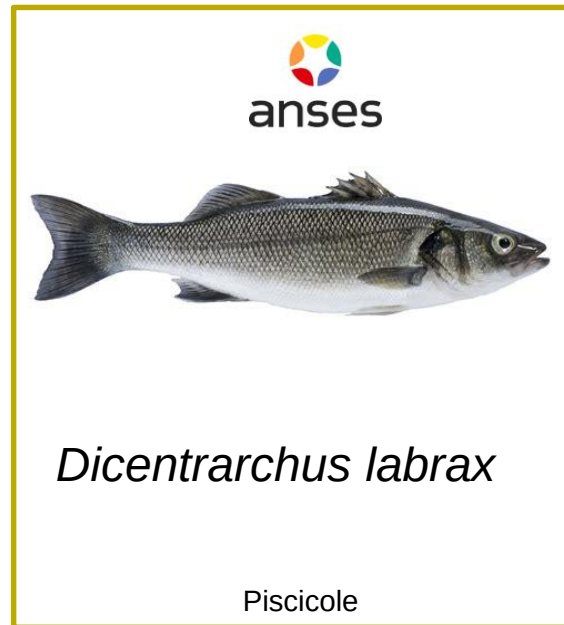



Concentrations d'altérines produites
souche dépendante

Efficacité d'inhibition
pathogène dépendante

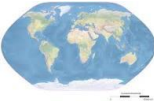
PaqMan : des bactéries marines issues d'organismes aquatiques comme nouveaux probiotiques naturels pour une production aquacole durable

2 modèles d'importance économique majeure



PaqMan : des bactéries marines issues d'organismes aquatiques comme nouveaux probiotiques naturels pour une production aquacole durable

Qqs chiffres / Bar commun

- 191 000 tonnes 
- 82 000 tonnes 
- Stade larvaire fragile (35-40 % survie)
- Susceptibilité à de multiples pathogènes (*Vibrio*, VER, ...)



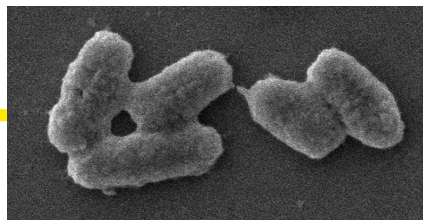
Dicentrarchus labrax

Piscicole

PaqMan : des bactéries marines issues d'organismes aquatiques comme nouveaux probiotiques naturels pour une production aquacole durable



Dicentrarchus labrax



Pseudoalteromonas

Survie larvaire

**Amélioration du
statut sanitaire ?**

Croissance

PaqMan : des bactéries marines issues d'organismes aquatiques comme nouveaux probiotiques naturels pour une production aquacole durable

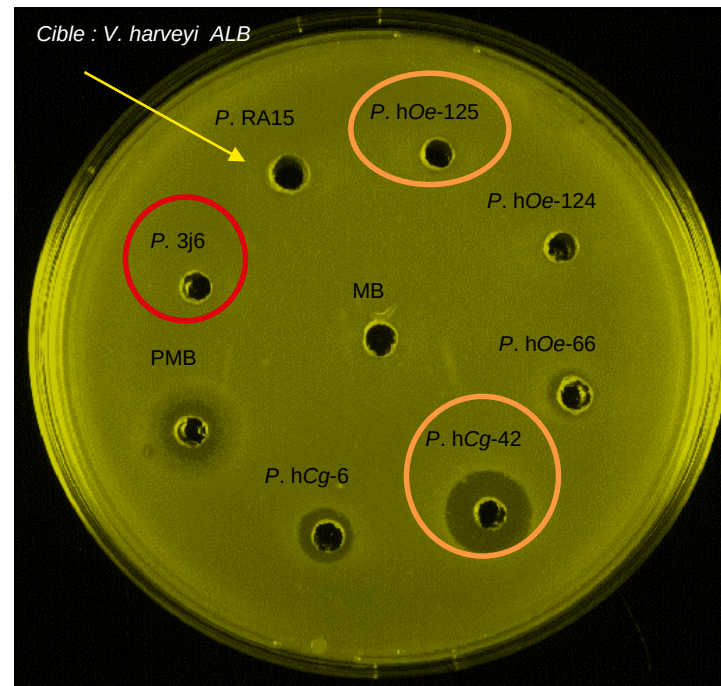
Sélection des souches probiotiques

hCg-42

hOe-125

1 souche antibiofilm (altérocline) : 3J6

1 souche T- (pas de production de composés antimicrobien ou antibiofilm) : RA15



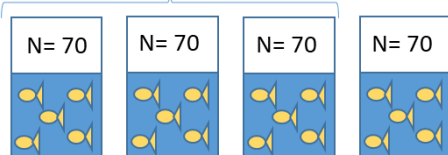
2 — Mesure de l'efficacité des candidats chez le bar européen contre *V. harveyi*

Triplicat pour suivi mortalité post-infection

Imprégnation
8 semaines

Procédure 1 : effet des probiotiques sur le bar européen / infection à *V. harveyi*

Souche 3J6
Dose pour les imprégnations
 10^6 UFC/ml

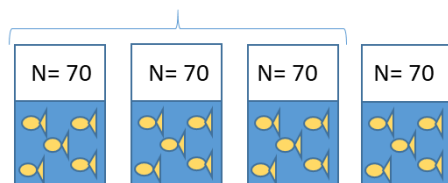


Bacs de 50L



Infection à *V. harveyi*
2 semaines

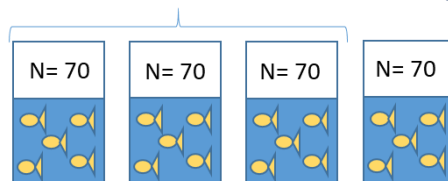
Souches h-Cg42 et h-Oe125
Dose pour les imprégnations
 10^6 UFC/ml/souche



Imprégnation / Prélèvement tous les 15 j
3 poissons / bac
Organes / Prise de sang

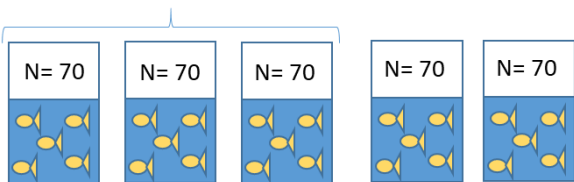
Suivi quotidien de mortalité sur 3 bacs
Sur le 4^{ème} bac : prélèvement à J24H, J7 et J15
Organes / Prise de sang
Analyse bactériologique du pathogène

Groupe Pseudo RA15
(sans effet probiotique;
 10^6 UFC/ml)



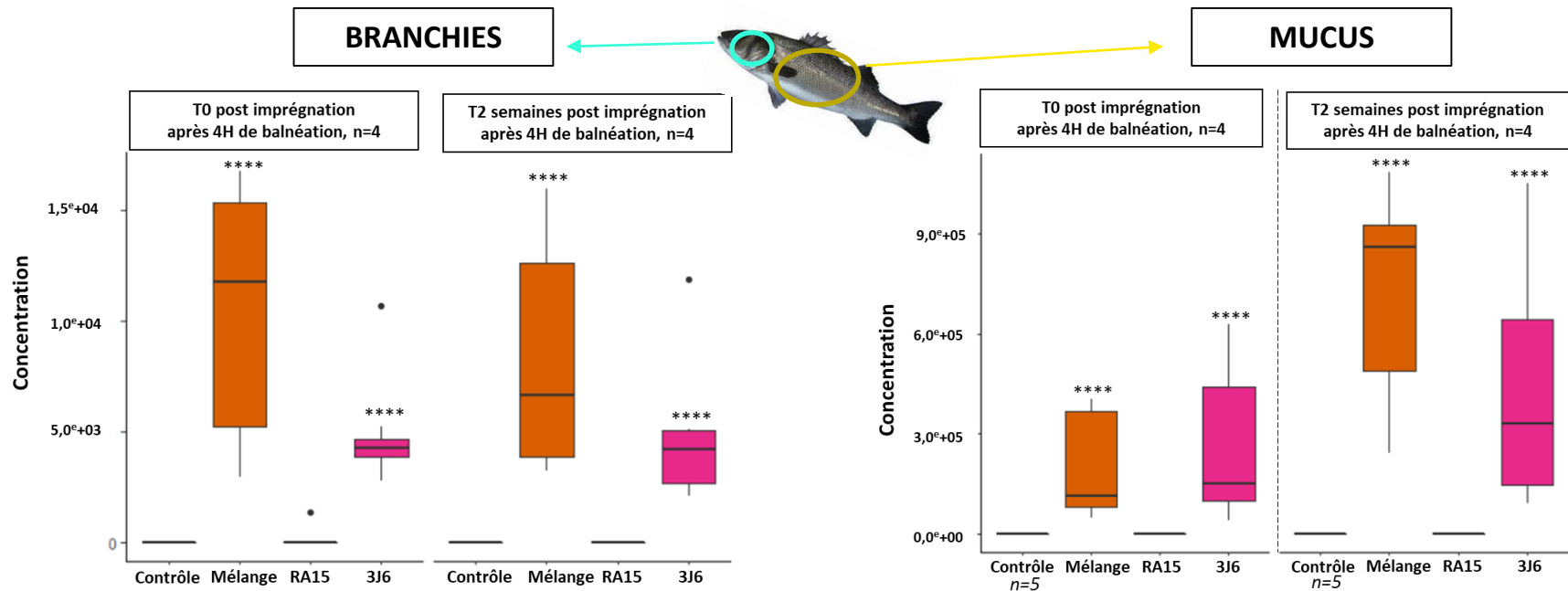
1 des bacs contrôle ne recevra pas le pathogène

Groupe contrôle
(sans probiotique)



+ 100 bars pré tests pour
déterminer la DL50 de la souche

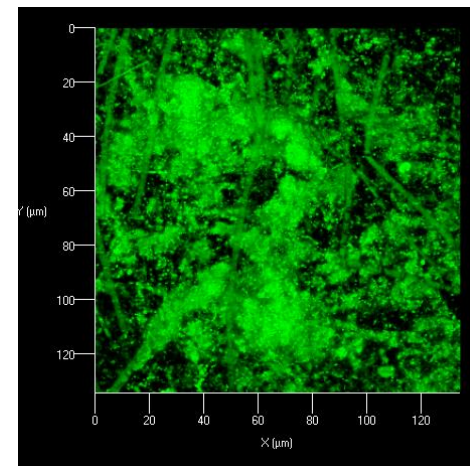
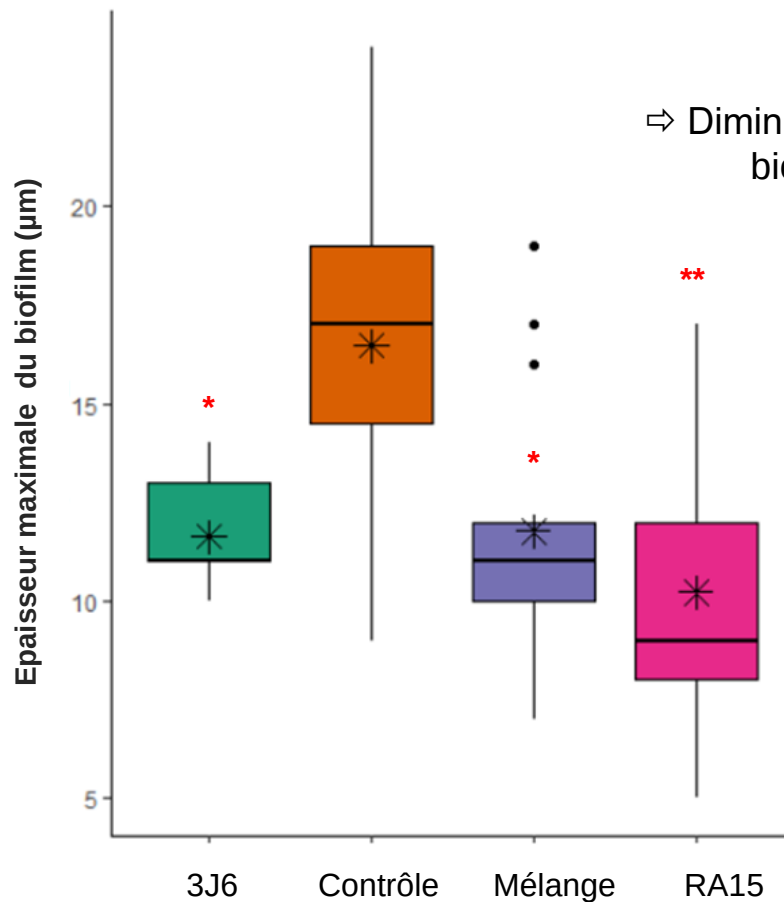
Validation de l'imprégnation – BRANCHIES et MUCUS



⇒ hCg-42, hOe-125 et 3J6 détectables après 4 h de balnéation dans ces 2 tissus au contact direct de l'environnement aquatique

Production de biofilm après 8 semaines – microscopie confocale

8 semaines d'imprégnation



Obj x63

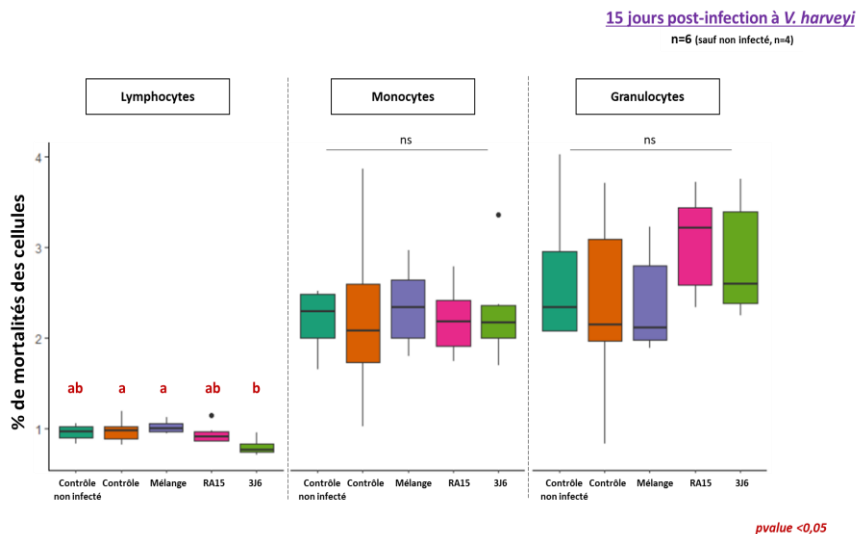
Paramètres immunologiques



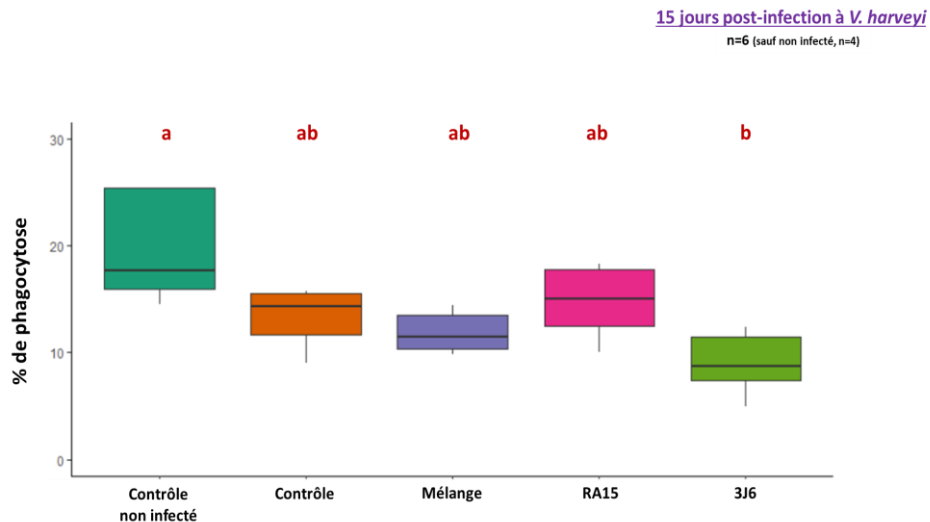
⇒ Pas de modification
significative entre conditions à 15
jours post-infection (légère baisse
avec la souche 3J6)



Mortalité cellulaire : mesure à l'Iodure de Propidium



Phagocytose : adsorption de billes fluorescentes

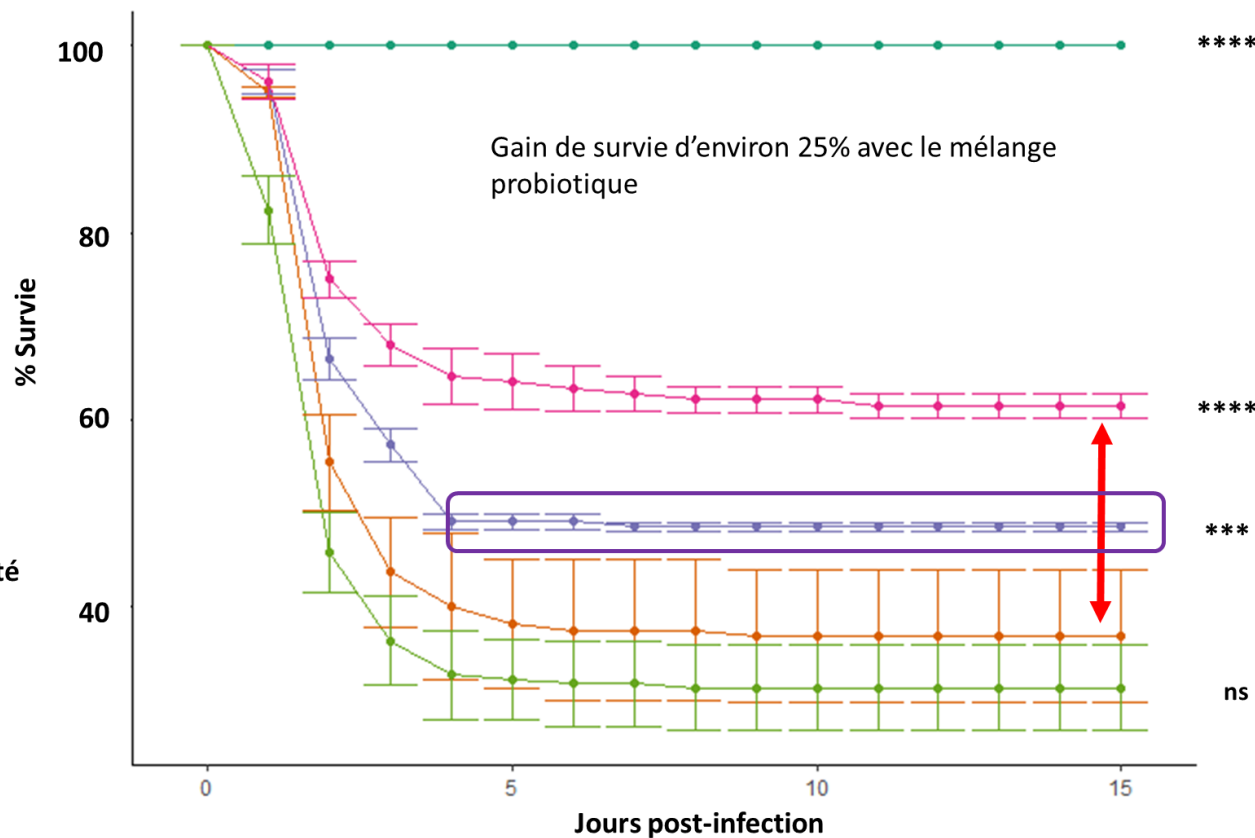


Survie suite à l'injection de *Vibrio harveyi* ALB

*** $p\text{value} < 10^{-3}$
**** $p\text{value} < 10^{-4}$
ns Non significatif
Par rapport au groupe contrôle infecté

Conditions

- Contrôle non infecté
- Contrôle infecté
- RA15
- hCg42+hOe125
- 3J6



3— Perspectives



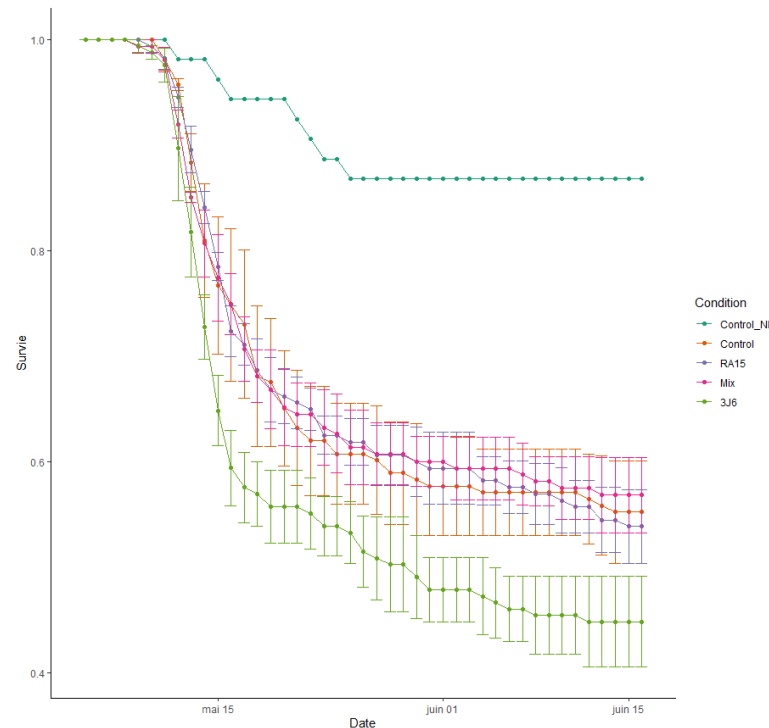
En cours



- Analyse comparée de l'expression de certains gènes du système immunitaire (rates)
- Quantification des altérines dans l'eau de mer post-baignées et dans le surnageant des suspensions probiotiques
- Efficacité potentielle antivirale (VER)

En cours

- Analyse comparée de l'expression de certains gènes du système immunitaire (rates)
- Quantification des altérines dans l'eau de mer post-baignées et dans le surnageant des suspensions probiotiques
- Efficacité potentielle antivirale (VER)



En cours

- Analyse comparée de l'expression de certains gènes du système immunitaire (rates)
- Quantification des altérines dans l'eau de mer post-baignades et dans le surnageant des suspensions probiotiques
- Efficacité potentielle antivirale (VER)

A venir

- Investigation du potentiel de la souche RA15
- Efficacité antibactérienne dans un autre modèle (Daurade)
- Modification / rôle du microbiote

Conclusions

- ✓ **Gain de survie de 25% avec le mélange de probiotiques**
= gain économique très significatif pour les professionnels

Gains de survie et de croissance en éclosion ?

Mécanismes d'action ?



Merci pour votre attention

Contact : alexandra.rahmani@anses.fr