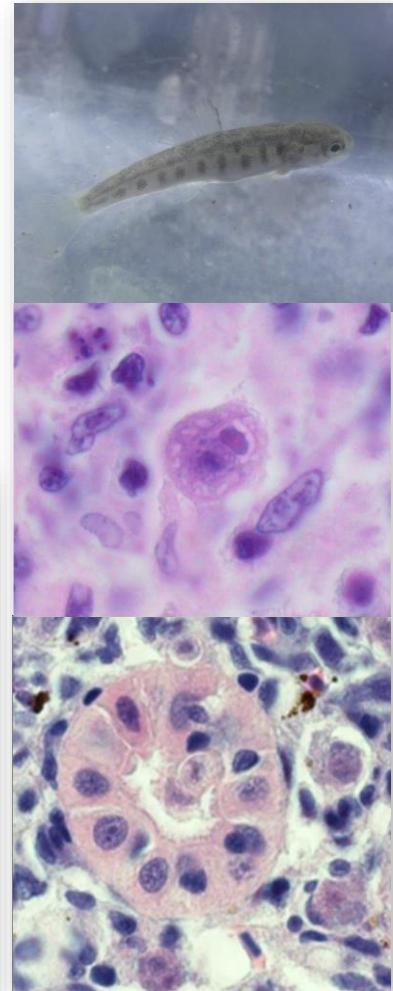


Etude du degré d'infestation
des alevins de truite fario par la
Maladie Rénale Proliférative
(MRP) dans les tronçons aval
des principaux affluents du
lac d'Annecy



CHASSERIEAU C. ^(a) & SCHMIDT-POSTHAUS H. ^(b)

Janvier 2019

(a) FDAAPPMA - Fédération de pêche de Haute-Savoie, Saint-Martin-Bellevue, 74370 FILLIERE

(b) Centre for Fish and Wildlife Health, Department of Infectious Diseases and Pathobiology, University of Berne, Laenggassstrasse 122, P.O. Box 8466, 3001 Berne, Switzerland

Rapport FDP74.19/01

Partenaires techniques et financiers de l'étude :



Nota bene : Plusieurs parties de ce rapport sont en anglais car issues de la prestation d'analyses faite auprès de l'Université de Bern.

Ce rapport doit être référencé comme suit :

CHASSERIEAU C. & SCHMIDT-POSTHAUS H. (2019). Etude du degré d'infestation des alevins de truite fario par la Maladie Rénale Proliférative (MRP) dans les tronçons aval des principaux affluents du lac d'Annecy, rapport FDP74.19/01, 18 p + annexe.

Sommaire

1	INTRODUCTION ET CONTEXTE DE L'ETUDE	1
2	MATERIEL ET METHODE	4
2.1	SITES D'ETUDE	4
2.2	ECHANTILLONNAGES ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS.....	5
2.3	HISTOPATHOLOGY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY	6
2.4	QPCR FOR DETECTION OF T. BRYOSALMONAE DNA IN KIDNEY TISSUE.....	6
2.5	CONVENTIONAL PCR	7
2.6	ACQUISITION DES DONNEES DE TEMPERATURE ET DEBIT.....	7
2.6.1	<i>Récolte des données de température.....</i>	<i>7</i>
2.6.2	<i>Compilation des données de débit</i>	<i>8</i>
3	RESULTATS	9
3.1	CONDITIONS D'ECHANTILLONNAGE	9
3.2	CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS.....	9
3.3	ANALYSES HISTOLOGIQUES ET GENETIQUES (<i>PRESTATION UNIVERSITE DE BERN</i>).....	10
3.4	MISE EN RELATION DES RESULTATS PATHOLOGIQUES AVEC LES VARIABLES DE TEMPERATURE ET DEBIT.....	12
4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	15
5	BIBLIOGRAPHIE	16
6	ANNEXES	18

Liste des Figures

FIGURE 1 : NOMBRE MAXIMAL D'HEURES ET NOMBRE DE SEQUENCES OU LA TEMPERATURE A ETE SUPERIEURE A 15°C AU COURS DE L'ETE 2009 POUR LES 4 AFFLUENTS PRINCIPAUX DU LAC D'ANNECY (SOURCE : CHASSERIEAU & CAUDRON, 2010).	4
FIGURE 2 : TEMPERATURES MOYENNES JOURNALIERES ENTRE 2008 ET 2015 CONFRONTEES AUX DEBITS MOYENS JOURNALIERS 2008 - 2009 DE L'EAU MORTE A DOUSSARD. (SOURCE DES DONNEES THERMIQUES : AFB).	4
FIGURE 3 : LINEAIRE PROSPECTE EN CUMULE LORS DES 6 ECHANTILLONNAGES D'ALEVINS DE TRUITE FARIO REALISES SUR CHACUN DES 4 AFFLUENTS DU LAC CIBLES DANS CETTE ETUDE.	5
FIGURE 4 : LOCALISATION DES STATIONS MISES EN PLACE POUR CARACTERISER LE PARAMETRE THERMIQUE SUR L'AVAL DES 4 AFFLUENTS DU LAC CIBLES DANS CETTE ETUDE.	8
FIGURE 5 : LONGUEUR TOTALE MOYENNE DES ALEVINS ECHANTILLONNES PAR COURS D'EAU POUR LES 6 CAMPAGNES DE PRELEVEMENT.....	10
FIGURE 6 : A) STRUCTURE NORMALE DE REIN D'UNE TRUITE FARIO ECHANTILLONNEE LE 31 AOÛT DANS LE LAUDON ; B) POUR LE MEME POISSON, QUELQUES TUBULES NOUVELLEMENT FORMES (NEOGENESE DE TUBULES), CARACTERISES PAR L'AUGMENTATION DE BASOPHILES QUI ONT DE GROS NOYAUX ET UNE PETITE QUANTITE DE CYTOPLASME BASOPHOLIQUE ; C) TRUITE FARIO ECHANTILLONNEE LE 20 SEPTEMBRE DANS LE LAUDON PRESENTANT DES ZONES EPARSEES DE PROLIFERATIONS INTERSTITIELLES, DE PETITES ZONES DE NECROSE ET UNE INFILTRATION MINIMALE AVEC ESSENTIELLEMENT DES MACROPHAGES (CERCLE NOIR) ; D) GROSSISSEMENT DE LA LESION MONTREE EN C), LES PETITES ZONES DE NECROSE SONT CARACTERISEES PAR DES DEBRIS CELLULAIRES ET NUCLEAIRES ET DES MATIERES GRANULAIRES EOSINOPHILES (FLECHES).	10
FIGURE 7 : DUREE EN HEURES DE LA SEQUENCE MAXIMALE DURANT LAQUELLE LA TEMPERATURE RESTE SUPERIEURE OU EGALE A 15°C, SYNONYME D'UN RISQUE DE DEVELOPPEMENT DE LA MRP (MALADIE RENALE PROLIFERATIVE) SUR LES 4 COURS D'EAU ETUDIES ET POUR LES ANNEES 2009, 2017 ET 2018.	12
FIGURE 8 : DEBIT MOYEN ANNUEL (QMA) ET DEBIT MOYEN D'ETIAGE (CALCULE SUR LES MOIS DE JUIN / JUILLET / AOÛT / SEPTEMBRE / OCTOBRE) POUR CHACUN DES 4 COURS D'EAU ETUDIES ET POUR LES ANNEES 2009, 2017 ET 2018 POUR LESQUELLES ON DISPOSE DES DONNEES DE TEMPERATURE.	12
FIGURE 9 : TEMPERATURE HORAIRE CONFRONTEE AU DEBIT HORAIRE ET AU POURCENTAGE BIMENSUEL DE PATHOLOGIE RENALE POUR LES 3 COURS D'EAU ECHANTILLONNES SUR L'ENSEMBLE DE LA PERIODE ESTIVALE 2017.	14

Liste des Tableaux

TABLEAU 1 : RESULTATS DES PECHEES D'INVENTAIRE DE 2009 SUR LES SECTEURS A TRUITE LACUSTRE DES AFFLUENTS CIBLES PAR LA PRESENTE ETUDE ET CONFRONTES AUX QUANTITES D'ALEVINS PRELEVEES.....	6
TABLEAU 2 : DESCRIPTIF DES STATIONS HYDROLOGIQUES GERES PAR LA DREAL DONT LES DONNEES ONT ETE UTILISEES DANS LE CADRE DE CETTE ETUDE.....	8
TABLEAU 3 : DEFINITION DES CONDITIONS D'ECHANTILLONNAGE POUR CHACUNE DES 6 CAMPAGNES DANS CHACUN DES 4 COURS D'EAU.	9
TABLEAU 4 : PREVALENCE DES INFECTIONS A T. BRYOSALMONAE (CAS DE MRP) ET DES POISSONS PRESENTANT UNE PATHOLOGIE RENALE.....	11

1 Introduction et contexte de l'étude

La MRP (maladie rénale proliférative ou « Proliferative Kidney Disease »), est une maladie émergente touchant surtout les salmonidés sauvages et d'élevage en Europe (OKAMURA *et al.*, 2011). Cette maladie infectieuse touche préférentiellement les truites (*Salmo trutta* et *Oncorhynchus mykiss*), l'ombre commun (*Thymallus thymallus*) et le saumon atlantique (*Salmo salar*). Elle provoque, chez les sujets atteints, une importante hypertrophie des reins et éventuellement du foie et de la rate qui peut entraîner dans les populations des taux de mortalité importants notamment chez les juvéniles.

L'agent infectieux est un parasite nommé *Tetracapsula bryosalmonae* (HEDRICK *et al.*, 1993 ; CANNING *et al.*, 2000 ; OKAMURA *et al.*, 2001) qui utilise comme hôte intermédiaire des bryozoaires (ANDERSON *et al.*, 1999 ; LONGSHAW *et al.*, 1999 ; OKAMURA *et al.*, 2001) avant d'infecter son hôte final, c'est-à-dire un vertébré qui appartient généralement à la famille des salmonidés (FEIST & BUCKE, 1993 ; HEDRICK *et al.*, 1993). *T. bryosalmonae* infecte les salmonidés en traversant leur peau et leurs branchies (FEIST *et al.*, 2001 ; LONGSHAW *et al.*, 2002) ou uniquement leurs branchies (MORRIS *et al.*, 2000 ; GRABNER & EL-MATBOULI, 2010) puis se dissémine systématiquement dans leur corps. Le développement de la maladie se fait dans les reins, organe cible du parasite chez les poissons : des stades extrasporogéniques de l'interstitium rénal se multiplient et se différencient en stades sporogéniques dans la lumière des tubules rénaux (KENT & HEDRICK, 1985). Les spores sont ensuite excrétées par le système urinaire (KENT & HEDRICK, 1985 ; MORRIS *et al.*, 2002 ; HEDRICK *et al.*, 2004 ; BETTGE *et al.*, 2009 ; STREPPARAVA *et al.*, 2018). Lorsque des juvéniles de salmonidés sont affectés, des néphrites prolifératives et granulomateuses ainsi que des vascularites nécrosantes avec formation de thrombus ont été décrites (HEDRICK *et al.*, 1993 ; EL-MATBOULI & HOFFMANN, 1994 ; BETTGE *et al.*, 2009). Les individus survivants présentent des lésions chroniques avec des fibroses interstitielles et des tubulo-néphroses, suivies par une régénération totale de la morphologie rénale (SCHMIDT-POSTHAUS *et al.* 2012, 2013).

La température de l'eau joue un rôle important dans le cycle de développement de ce parasite qui se propage dans le milieu naturel lorsque celle-ci atteint 9°C (GAY *et al.*, 2001) et provoque des mortalités chez les juvéniles de salmonidés qu'à partir d'une durée de 2 semaines consécutives à un minimum de 15°C (DE KINKELIN & GAY, 2000). Des études récentes mettent clairement en évidence que la mortalité est température dépendante (BETTGE *et al.*, 2009 a, b). Ces liens entre le taux d'infection, la mortalité et la température de l'eau suggèrent que la MRP est une maladie qui sera favorisée par le changement climatique (HARI *et al.*, 2006).

Aussi, la prise en compte de l'infection des juvéniles par ce parasite dans l'étude des populations de truites apparaît nécessaire au vu de la mise en évidence de sites infectés en Grande Bretagne (FEIST *et al.*, 2002) et en Suisse (WAHLI *et al.*, 2002) où la MRP est considérée sur certains secteurs comme responsable du déclin des populations de truite commune (BURKHARDT-HOLM *et al.*, 2002). Plus récemment des infections importantes de populations d'omble et de saumon atlantique ont été découvertes en Islande (KRISTMUNDSSON *et al.*, 2010). En Autriche, LAHNSTEINER *et al.* (2010) ont montré que des déficiences immunitaires au niveau rénal entraînaient des mortalités importantes de juvéniles de truite dans les rivières des pré-alpines. Localement, sur les secteurs aval de deux affluents du Léman (le Redon et le Foron de Sciez), une étude récente (SCHMIDT-POSTHAUS, 2013 ; VATLAND & CAUDRON, 2015) a mis en évidence de très fortes mortalités estivales d'alevins de truite fario (entre 50 % et 80 %) induites par la MRP.

Entre 2009 et 2015, la fédération départementale pour la pêche et la protection du milieu aquatique, en partenariat avec deux de ces AAPPMA (Annecy Rivières et Annecy Lac Pêche), a réalisé une étude sur les populations de truites sédentaires et migrantes sur le bassin versant du lac d'Annecy et sur l'efficacité des pratiques de gestion. Cette dernière se composait de 3 volets :

- 2009 : Etat des populations de truites sur les affluents du lac
- 2014 : Bilan génétique des populations sédentaires et migrantes
- 2009 à 2016 : Evaluation des pratiques de gestion

Le premier volet, comportant 61 pêches d'étude, a mis en évidence la forte production en juvéniles des secteurs aval des affluents du lac (CHASSERIEAU & CAUDRON, 2010) ; il a été estimé une production estivale de 100 000 individus en 2009 sur les secteurs soumis aux remontées des géniteurs lacustres. En parallèle le suivi annuel de la température de l'eau entre 2008 et 2009 a montré le réchauffement estival de certaines portions de cours d'eau, en particulier les secteurs aval du Laudon, de l'Ire, du Ruisseau de la Planche et du Nant de Bluffy et le secteur intermédiaire de la Bornette.

Ces mêmes constats en période estivale (fortes densités d'alevins et thermie élevée) ont été faits en 2011 et 2012 sur deux affluents lémaniques : le Redon et le Foron (VATLAND & CAUDRON, 2015).

La gestion piscicole en 2009 sur le bassin versant du lac était :

- patrimoniale sur les secteurs amont des affluents (en amont du dernier ouvrage infranchissable par la truite de lac)
- et de restauration, basée sur l'alevinage sur les portions aval des affluents. Ces déversements d'alevins dans ces parties de cours d'eau avaient pour objectif d'alimenter le stock de truite du lac d'Annecy.

Aussi entre 2009 et 2014, tous les alevins produits à la pisciculture de La Puya destinés à être introduits dans les portions aval des affluents du lac ont subi un fluoromarquage des pièces osseuses à l'Alizarine Red S, et ceci au stade résorption de vésicule. Au cours des saisons de pêche 2011 à 2016, des pêcheurs volontaires ont gardé leurs captures et ont ainsi permis de constituer un échantillonnage annuel en adultes de truite du lac d'Annecy (N annuel moyen = 30 individus). Pour chaque individu capturé, la tête (pour en extraire les otolithes) et quelques écailles étaient conservées pour analyse. Ces parties permettent de définir pour la première, l'origine (naturelle ou issue de pisciculture) de chaque individu (en observant le marquage ou non) et pour les secondes, l'âge des individus qui permet de valider l'appartenance à une cohorte marquée.

L'évaluation des pratiques de gestion a été faite sur 98 individus parmi les 177 constituant un échantillon complet (soit tête + écailles). Les 79 autres individus n'appartenaient pas aux cohortes marquées ; ces individus correspondent pour la plupart à ceux capturés entre 2011 et 2013.

Parmi les 98 individus de truite de lac capturés par les pêcheurs amateurs, seuls deux individus provenaient de pisciculture. Il a donc été conclu que les pratiques de gestion en place n'étaient pas efficaces (l'alevinage participant à 2 % des captures).

Plusieurs hypothèses sur l'inefficacité des pratiques de gestion peuvent être énoncées dont la principale, est la mortalité des alevins en période estivale dans les portions aval des affluents du lac compte tenu des conditions de température.

L'objectif de cette étude est de rechercher la présence du parasite responsable de la MRP (*Tetracapsula bryosalmonae*) dans les juvéniles de truites 0+ sur les portions aval des affluents dont le profil thermique est propice au développement de cette maladie. L'échantillonnage couvre la période estivale pour définir si le degré d'infestation des individus de truite évolue avec l'avancement de la saison.

De plus, dans un souci d'appréhender l'avenir et les conséquences sur le fonctionnement des populations piscicoles du changement climatique et de l'accroissement démographique, ce bilan « sanitaire » des populations de truite fario des affluents du lac d'Annecy permettra d'anticiper sur la gestion à mettre en place et surtout pourra servir de levier pour préserver la ressource quantitative dans ces rivières.

2 Matériel et Méthode

2.1 Sites d'étude

Les affluents du lac d'Annecy qui produisent le plus de juvéniles de truite fario et où les remontées de géniteurs de truite de lac sont les plus observées sont par ordre d'importance : L'Eau Morte, le Laudon, la Bornette et l'Ire. Pour les portions aval des 3 derniers cours d'eau, un risque fort du développement de la MRP a été mis en évidence à partir des conditions thermiques enregistrées en 2009 (Figure 1 ; CHASSERIEAU & CAUDRON, 2010). L'Eau Morte a quant à elle un profil thermique estival plus tempéré sur la partie aval à Doussard (Figure 2). Cependant en amont de sa confluence avec le Montmin (dans la traversée du marais de Giez), la température de l'eau montre un réchauffement en début d'été qui n'a pu être quantifié que partiellement à l'étiage sévère du mois d'août 2009.

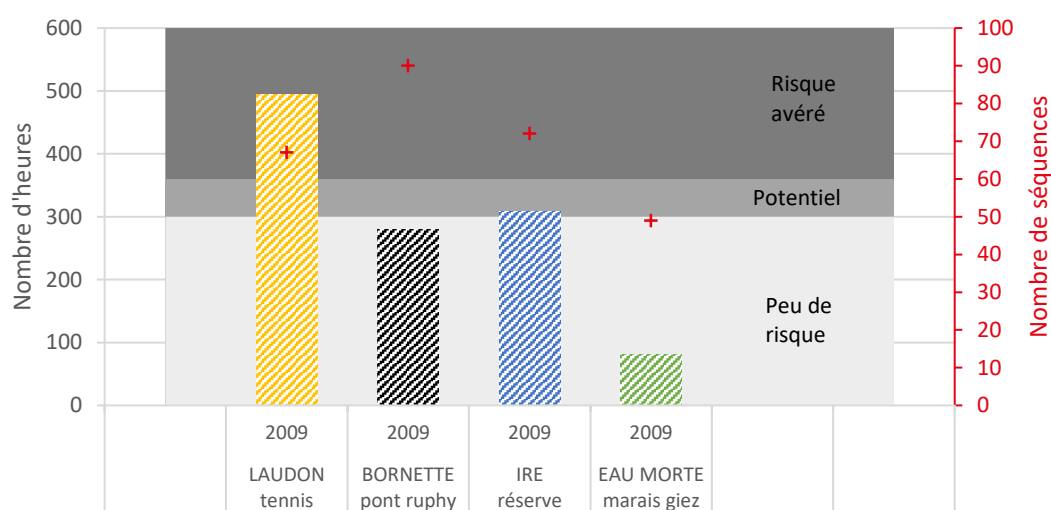


Figure 1 : Nombre maximal d'heures et nombre de séquences où la température a été supérieure à 15°C au cours de l'été 2009 pour les 4 affluents principaux du lac d'Annecy (Source : CHASSERIEAU & CAUDRON, 2010).

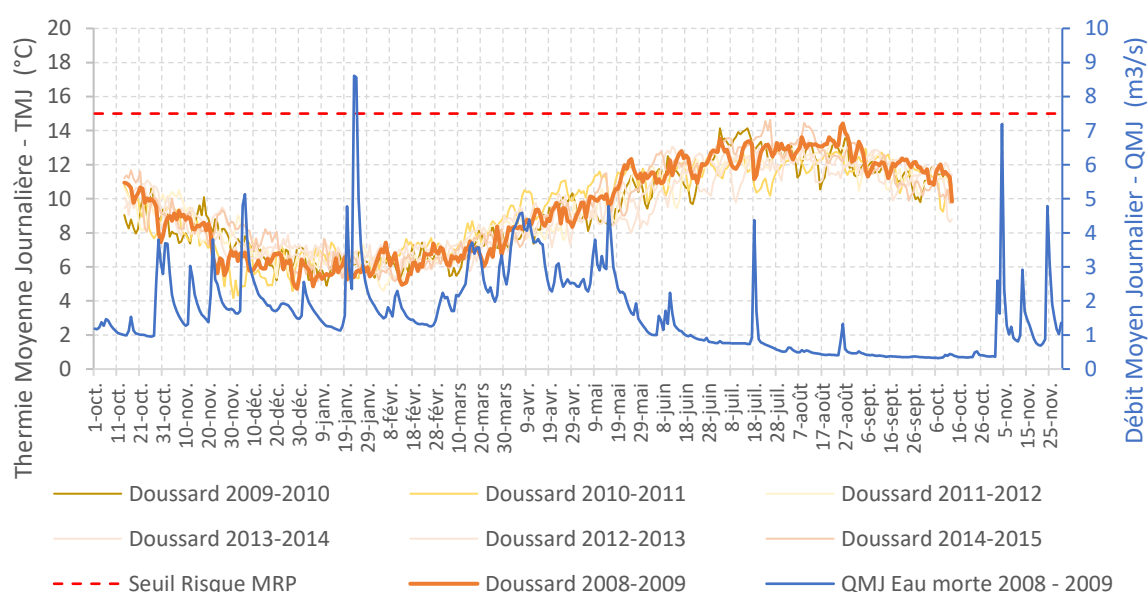


Figure 2 : Températures moyennes journalières entre 2008 et 2015 confrontées aux débits moyens journaliers 2008 - 2009 de l'Eau Morte à Doussard. (Source des données thermiques : AFB).

2.2 Echantillonnages et stockage des échantillons

Il est admis en statistique que la normalité d'un échantillon est atteinte pour une taille de 30 individus. Aussi en biologie, ce chiffre est adopté de manière usuelle. Pour cette étude, un échantillon a été constitué de 25 alevins de truite fario prélevés par tronçon de cours d'eau pour une date d'échantillonnage. Cette taille d'échantillon avait déjà été adoptée pour une étude similaire sur les affluents du Léman en 2011 et 2012 (SCHMIDT-POSTHAUS, 2013).

L'un des objectifs étant d'évaluer s'il existe une progression estivale dans le développement de la maladie dans la cohorte d'alevins, il a été effectué un échantillonnage tous les 15 jours sur le Laudon, la Bornette et l'Ire. Six dates d'échantillonnage ont eu lieu en 2017 : 23 juin, 6 et 20 juillet, 11 et 30 août et le 20 septembre. Pour l'Eau Morte, un seul échantillonnage (compte tenu du faible risque du développement de la maladie identifié via la thermie) a été réalisé le 11 août au moment de l'étiage sévère pour observer la présence éventuelle du parasite dans les alevins.

Au total, 475 individus ont été prélevés par pêche électrique par deux opérateurs (matériel utilisé : groupe électrogène portatif de marque *Hans Grass*) sur des linéaires de quelques centaines de mètre (**Figure 3**). Une fois collectés, les individus ont été anesthésiés à l'eugénol 10 %, puis mesurés et pesés avant d'être euthanasiés par surdose d'anesthésique. Ils ont ensuite été ouverts et conservés dans le formol à 4 % tamponné, pH 6.9 pour stabiliser les tissus en vue des analyses histologiques (recherche d'infection par la MRP). Il est préconisé 1 volume de poissons pour 9 volumes de formol pour une fixation optimale.

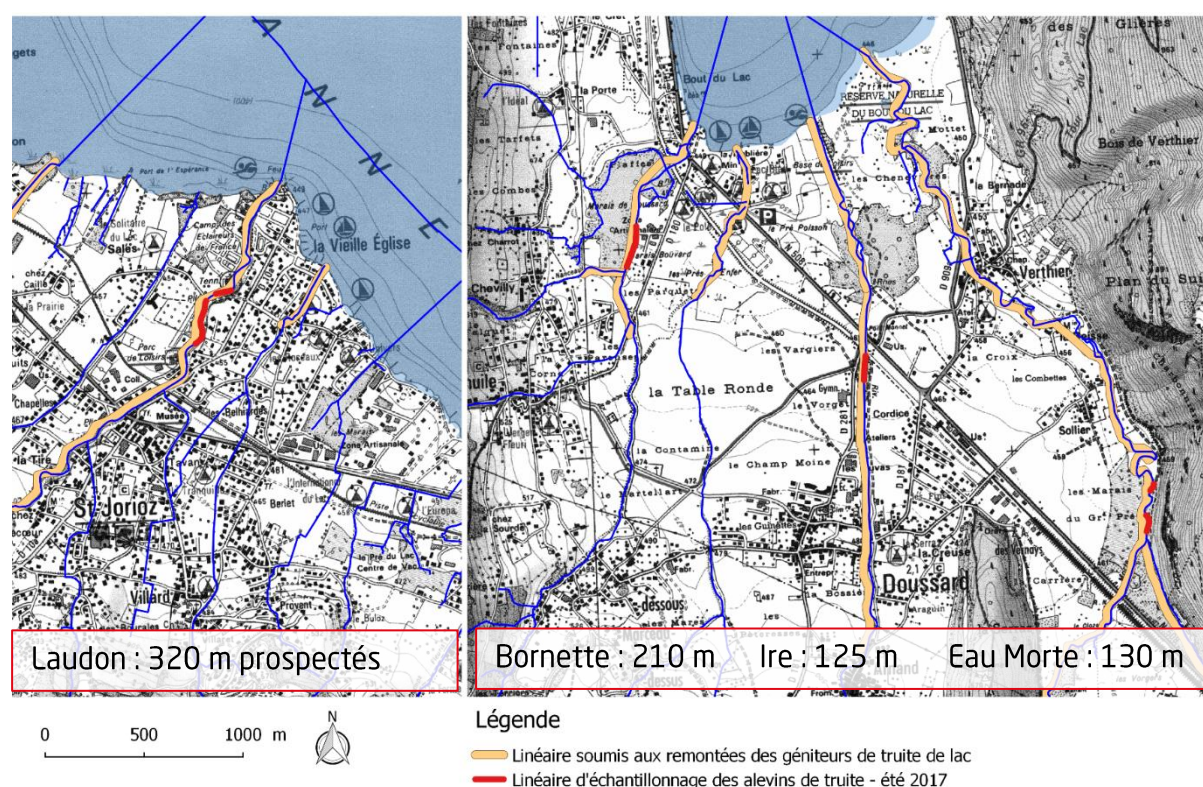


Figure 3: Linéaire prospecté en cumul lors des 6 échantillonnages d'alevins de truite fario réalisés sur chacun des 4 affluents du lac ciblés dans cette étude.

Le **Tableau 1** quantifie la part d'individus prélevés par cours d'eau par rapport à la quantité d'alevins estimée lors du diagnostic en 2009. Ces quantités sont négligeables sur le Laudon, la Bornette et l'Eau Morte (entre 0.03 % et 1.7 %) et légèrement plus élevée pour l'Ire (environ 8 %).

Tableau 1 : Résultats des pêches d'inventaire de 2009 sur les secteurs à truite lacustre des affluents ciblés par la présente étude et confrontés aux quantités d'alevins prélevées.

Cours d'Eau	Station	X LB2E	Y LB2E	Densité totale de TRF estimée (ind./100m²)	Biomasse totale de TRF estimée (Kg/ha)	Densité de 0+ estimée (Ind./100m²)	Evaluation du recrutement naturel par zone				Quantité d'alevins prélevée pour la MRP	Proportion des prélèvements par rapport à l'existant
							Limite des zones	Densité estimée de 0+ (ind/100 m²) sur les stations pêchées	Surface en eau estimée de la zone (m²)	Nombre total de 0+ estimé par zone		
Laudon	LcA 05	897805	2100686	65 [63-67]	46	56,3	Zone Migrateur	57,5	16200	9900	150	1,52%
	LcA 57	897472	2100068	71 [69-73]	35	61,6						
	LcA 22	896655	2099412	96 [94-98]	100	65,9						
Bornette	LcA 21	901299	2095425	54 [53-55]	30	48,4	Zone Migrateur	142,7	6300	9000	150	1,67%
	LcA 27	901050	2094670	294 [291-297]	98	269,9						
Ire	LcA 10	902262	2094782	19 [18-20]	27	2,3	Zone Migrateur	9,5	19600	1900	150	7,89%
	LcA 18	902285	2093250	62 [60-64]	118	23,1						
Eau Morte	LcA 08	902672	2095204	91 [89-93]	29	79,6	Zone Migrateur	124,4	61400	76700	25	0,03%
	LcA 06	903519	2094291	19 [17-21]	30	13,7						
	LcA 25	903521	2093398	202 [192-212]	72	194,5						
	LcA 23	903232	2092598									
	LcA 81	903770	2092060	150 [148-152]	65	121,3						
	LcA 24	904267	2091520	373 [364-382]	139	354,1						

2.3 Histopathology and immunohistochemistry

Length of every fish sent fixed in 10% buffered formalin was recorded, in some animals the head was missing. These fish are marked in the supplementary table (**Annexe 1**) and the length was recorded without head. Kidney samples of all animals were routinely paraffin-embedded and 4 µm sections were prepared for histological examination using a haematoxylin-eosin (H&E) stain or for immunohistochemistry (IHC) using a monoclonal anti-Tetracapsuloides bryosalmonae (PKX) antibody (AquaMAb-P01, Aquatic Diagnostics Ltd., Stirling, UK) according to ADAMS *et al.* (1992). Suspicious cases were examined by qPCR and conventional PCR. In renal histopathology the following criteria were judged (according to the presumed temporal development): proliferation of interstitial tissue, vascular degeneration and inflammation with mainly macrophages and lymphocytes, thrombi, interstitial necrosis, interstitial haemorrhage, interstitial inflammation with mainly macrophages, interstitial fibrosis, tubulonephrosis and tubuloneogenesis. Histopathological changes of the kidney were graded according to common pathological grading systems as 0 (no) to 6 (severe). Presence of *T. bryosalmonae* was examined on whole histological kidney sections and infection intensity was classified as 0 (no parasites present on whole slide), 1 (single parasites), 2 (mild infection rate), 3 (mild to moderate infection rate), 4 (moderate infection rate), 5 (moderate to severe infection rate) or 6 (severe infection rate) at a magnification of 200 to 400x.

2.4 qPCR for detection of *T. bryosalmonae* DNA in kidney tissue

Fish suspicious for *T. bryosalmonae* by histology were examined by qPCR. Two 20 µm sections of paraffin embedded material were deparaffinized. Lysis and extraction of total DNA was performed using DNeasy tissue Kit (Quiagen, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's protocol. Samples were incubated with proteinase K at 56°C and 450 rpm overnight. The yield was determined by spectrophotometry using the NanoDrop photometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA). qPCR was carried out using the *T. bryosalmonae* specific TaqMan method according to BETTGE *et al.* (2009 a). Briefly, each reaction was carried out in a final volume of 20 µl containing 1X TaqMan

universal Master Mix (Applied Biosystems, Switzerland), 0.5 µM of each primer (PKDtaqf1: 5'-GCCGAGATTTGTTGCATTTAAAAAG- 3' and PKDtaqr1: 5'-GCACATGCAGTGTCCAATCG- 3'), 0.2 µM of the probe PKD (5'-CAAAATTGTGGAACCGTCCGACTACGA-3') labelled with FAM-TAMRA, 1X of internal control Exo IPC Mix, 1X of IC DNA (TaqMan Univ. MMix w Exog IntPostC, Applied Biosystems), and 2 µl of template DNA. All reactions were carried out in duplicate. A positive control sample obtained from the kidney of clinically infected brown trout from other studies and a negative control using water were included in the PCR procedure. A 297 bp gene sequence of the small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) was detected. Samples with a Ct value of 35 or lower were classified as positive. To confirm the specificity of the qPCR, the qPCR was repeated without dissociation stage, the PCR products were purified with NucleoSpin® (Machery-Nagel, Oensingen, Switzerland), loaded on a 1 % agarose gel, and sequenced. The evaluation was determined using NCBI/Blast and EMBL-EBI pairwise sequence alignment.

2.5 Conventional PCR

Samples with renal pathology were re-examined by conventional PCR. PCR was performed according to the protocol by MORRIS *et al.* (2002). Primer pair PKX3F (CTAAGTACATACTTCGGTAGA) and PKX4R CCGTTACAACCTTGTTAGGAA) described by KENT *et al.* (1998) was used. A positive control sample obtained from kidney of clinically infected brown trout and a negative control were included in the PCR procedure.

2.6 Acquisition des données de température et débit

La propagation et l'issue de l'infection de la Maladie Rénale Proliférative (MRP) peuvent être influencées par la température de l'eau. Plusieurs auteurs (WAHLI *et al.* 2008, BETTGE *et al.* 2009 a, OKAMURA *et al.* 2011) ont mis en évidence une aggravation de la maladie et une élévation de la mortalité piscicole avec des températures supérieures à 15°C.

Ainsi, la mise en relation les résultats de pathologie des poissons de chaque affluent avec la thermie de l'eau (intimement liée à l'hydrologie) est indispensable pour appréhender d'éventuels seuils de déclenchement de la MRP.

2.6.1 Récolte des données de température

Des thermogrammes ont été mis en place dans les tronçons aval des 4 affluents étudiés, sur des points de stations historiques (**Figure 4**). Ils enregistrent la température de l'eau au pas de temps horaire sur un cycle annuel complet. Toutes les modalités de pose des enregistreurs, de validation et de traitement des données thermiques sont décrites dans le manuel d'utilisation de la Macro Excel d'Aide au Calcul de variables thermiques appliquées aux Milieux Aquatiques Salmonicoles (MACMASalmo V1.0, DUMOUTIER *et al.*, 2010).

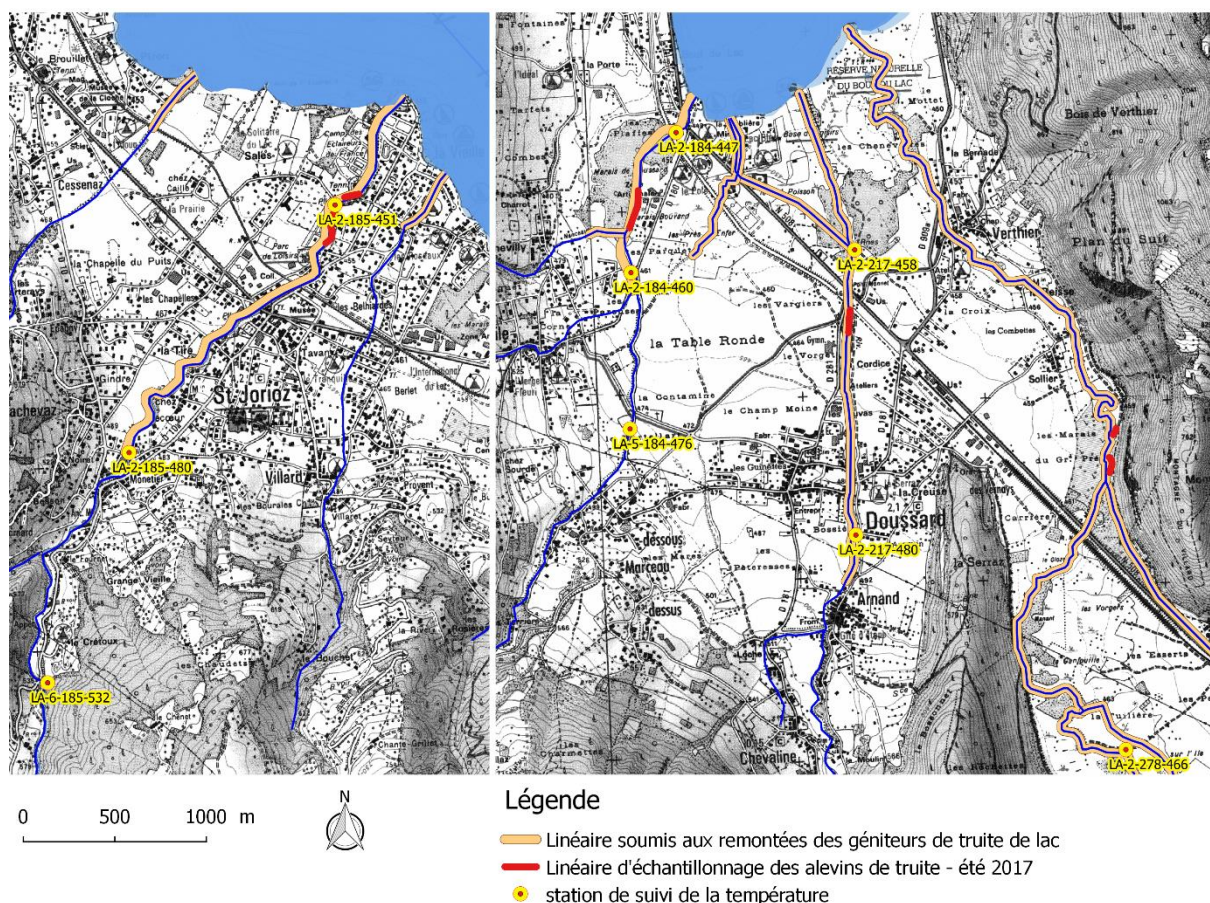


Figure 4 : Localisation des stations mises en place pour caractériser le paramètre thermique sur l'aval des 4 affluents du lac ciblés dans cette étude.

2.6.2 Compilation des données de débit

La fédération n'a pas fait l'acquisition de données hydrologiques en propre. Elle utilise celles acquises par la DREAL aux stations listées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Descriptif des stations hydrologiques gérées par la DREAL dont les données ont été utilisées dans le cadre de cette étude.

Code DREAL de la station	Libellé de la station	Coordonnées (Lambert 93)		Altitude (m)	Bassin versant topo-graphique (km ²)	Débits Données disponibles
		X	Y			
V1235210	L'Ire à Doussard	950479	6525493	463	27,1	1972 - 2019
V1235420	La Bornette à Lathuile	949263	6525751	452	11,6	1987 - 2019
V1235610	L'Eau Morte à Doussard	950993	6526034	452	92,5	1975 - 2019
V1237410	Le Laudon à Saint-Jorioz	945609	6531075	457	29,2	1977 - 2019

3 Résultats

3.1 Conditions d'échantillonnage

Les échantillonnages ont eu lieu durant la période d'étiage estivale 2017, entre le 23 juin et le 20 septembre. Le pas de temps entre deux campagnes est compris entre 13 et 22 jours. Les conditions de température et de débit lors de chaque date d'échantillonnage pour chaque cours d'eau sont récapitulées dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Définition des conditions d'échantillonnage pour chacune des 6 campagnes dans chacun des 4 cours d'eau.

DATE d'échantillonnage	LAUDON			BORNETTE			IRE			EAU MORTE		
	Temp. horaire (°C)	Durée de la séquence >15°C avant échantil. (h)	Débit horaire (m³/s)	Temp. horaire (°C)	Durée de la séquence >15°C avant échantil. (h)	Débit horaire (m³/s)	Temp. horaire (°C)	Durée de la séquence >15°C avant échantil. (h)	Débit horaire (m³/s)	Temp. horaire (°C)	Durée de la séquence >15°C avant échantil. (h)	Débit horaire (m³/s)
23/06/2017	20,8	288	0,07	19,2	99	0,05	19,2	99	0,18			
06/07/2017	17,9	27	0,08	17,5	3	0,06	17,5	25	0,19			
20/07/2017	19,8	216	0,04	18,8	76	0,03	18,2	75	0,13			
11/08/2017	12,1	240	0,17	12,6	26	0,24	11,5	27	1,13	11,3	1	3,69
31/08/2017	18,2	194	0,27	17,3	52	0,12	17,2	147	0,25			
20/09/2017	9,9	3	0,36	10,5	6	0,14	9,3	3	0,47			

Les alevins de truite fario se cantonnent essentiellement dans les radiers. Aussi suivant la morphologie des secteurs de cours d'eau ciblés dans cette étude, les linéaires prospectés pour obtenir 25 individus ont été plus ou moins importants (entre 125 m dans l'Ire et 320 m dans le Laudon ; **Figure 3**).

3.2 Caractéristiques des échantillons

Chaque échantillon présente des caractéristiques biométriques homogènes au sein d'un cours d'eau mais on observe des différences de croissance entre les cours d'eau. La **Figure 5** met en évidence que les alevins de truite de l'Ire sont en moyenne plus petits que ceux de la Bornette qui sont eux même plus petits que ceux du Laudon. Cependant, seule la différence de longueur totale entre les alevins de la Bornette et du Laudon est significative (Test de Fisher ; $p < 0.05$) sauf pour les deux campagnes du mois d'août. Les alevins de l'Eau Morte pour la campagne du 11 août ont une longueur totale significativement inférieure à celle de ceux du Laudon (Test de Fisher ; $p < 0.01$) mais non différente significativement de celle des alevins de la Bornette et de l'Ire (Test de Fisher ; $p > 0.05$).

Ces différences biométriques s'expliquent pour une partie par la température de l'eau. En effet, les données de température permettent d'estimer la date de mi-émergence des alevins qui se situe entre le 2 mai pour le Laudon et la Bornette et le 8 mai pour l'Ire (pour l'Eau Morte, la date de mi-émergence est estimée au 17 avril). La variable « moyenne des 30 jours consécutifs les plus chauds » est également déterminante pour caractériser le régime thermique d'un cours d'eau et permet d'évaluer les conditions de développement de la faune piscicole. Dans l'Ire, elle est plus fraîche et se chiffre 15,8°C tandis qu'elle s'élève à 17,1°C et 18,1°C dans la Bornette et le Laudon respectivement. Ainsi les alevins de l'Ire sortent légèrement plus tardivement que les autres et grandissent légèrement moins vite du fait d'une eau plus fraîche.

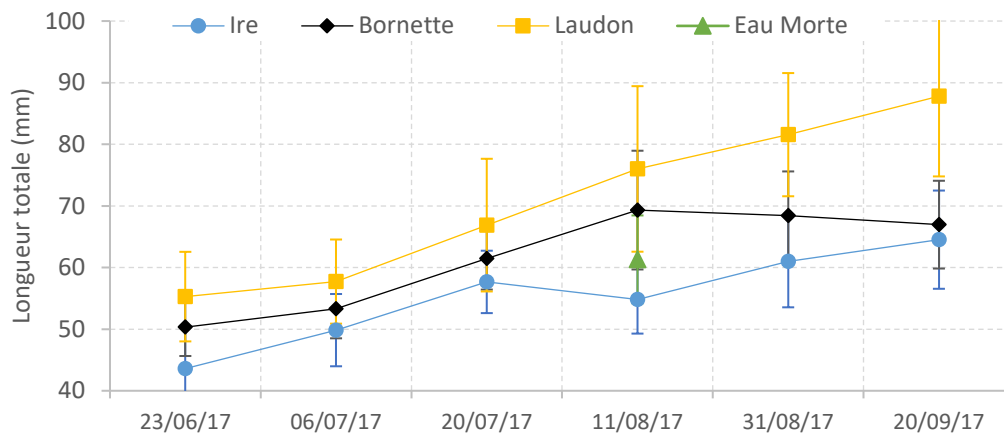


Figure 5 : Longueur totale moyenne des alevins échantillonnés par cours d'eau pour les 6 campagnes de prélèvement.

3.3 Analyses histologiques et génétiques (*prestation Université de Bern*)

None of the samples revealed to be positive for parasitic structures by histology nor could genetic material be detected by qPCR, conventional PCR and sequencing. Single animals showed histological changes in the kidney tissue (Figure 6 c, d), like increased tubuloneogenesis (characterized by increased basophilia, large nuclei, small amount of basophilic cytoplasm (Figure 6 b), small areas of necrosis and minimal infiltration with mainly macrophages (Figure 6 c).

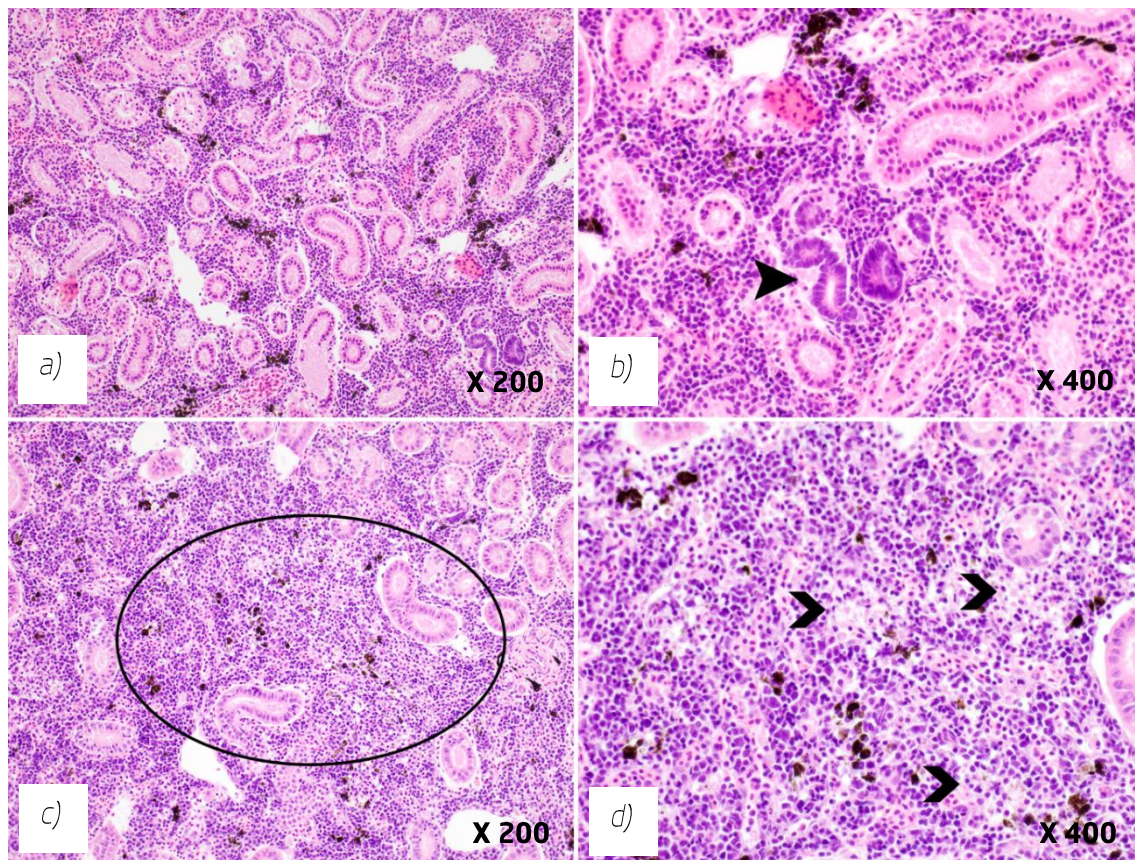


Figure 6 : a) Structure normale de rein d'une truite fario échantillonnée le 31 août dans le Laudon ; b) Pour le même poisson, quelques tubules nouvellement formés (néogénèse de tubules), caractérisés par l'augmentation de basophiles qui ont de gros noyaux et une petite quantité de cytoplasme basophilique ; c) Truite fario échantillonnée le 20 septembre dans le Laudon présentant des zones éparées de proliférations interstitielles, de petites zones de nécrose et une infiltration minimale avec essentiellement des macrophages (cercle noir) ; d) grossissement de la lésion montrée en c), les petites zones de nécrose sont caractérisées par des débris cellulaires et nucléaires et des matières granulaires éosinophiles (flèches).

All animals showing histological changes, even minimal, were examined by qPCR. In some of these animals, a signal could be detected late in the qPCR procedure. However, during the following sequencing, no *T. bryosalmonae* DNA could be confirmed. To confirm this result, selected samples were re-examined by conventional PCR. However, no signal could be detected in this method. Samples showing histological changes were afterwards re-examined by immunohistochemistry. With this method, in four animals (Laudon 11/08 and 10/09; Bornette 20/09) single parasites could be detected in the kidney. Therefore, in the Laudon and the Bornette, prevalence ranged from 4 to 8 % at the two sampling points (Tableau 4).

*Tableau 4 : Prévalence des infections à *T. bryosalmonae* (cas de MRP) et des poissons présentant une pathologie rénale.*

River	Date	Brown trout examined (n)	PKD Prevalence (%)	Pathology (%)
Ire	23/06/2017	25	0	4
	06/07/2017	25	0	0
	20/07/2017	27	0	0
	11/08/2017	25	0	4
	30/08/2017	26	0	4
	20/09/2017	25	0	0
Laudon	23/06/2017	25	0	0
	06/07/2017	25	0	4
	20/07/2017	26	0	0
	11/08/2017	25	4	12
	31/08/2017	25	0	0
	20/09/2017	25	8	24
Bornette	23/06/2017	25	0	0
	06/07/2017	24	0	0
	20/07/2017	25	0	0
	11/08/2017	25	0	0
	31/08/2017	25	0	0
	20/09/2017	25	4	8
Eau Morte	11/08/2017	25	0	0

In the Ire, kidney lesions could be determined over the whole examination period, but only in one animal per sampling, in June and August. In the Laudon, an increasing trend is visible, with the highest prevalence of pathology in the last sampling with 24 % (6 animals) showing small areas of interstitial necrosis and infiltration with macrophages. Here, also single parasites could be detected by immunohistochemistry in one animal on the 11th August and in two animals on the 20th September. In the Bornette, only in the last sampling pathology was visible. In this sampling, also one animal was positive by immunohistochemistry (Tableau 4).

3.4 Mise en relation des résultats pathologiques avec les variables de température et débit.

Les conditions environnementales des cours d'eau sont très variables d'une année à l'autre. La **Figure 7** met en évidence que les plages de températures supérieures à 15°C (variable MRP) étaient faibles en 2017, l'année de l'échantillonnage alors qu'elles étaient déjà plus élevées en 2009 et considérablement plus importantes en 2018, année de sécheresse. Le pourcentage de pathologie observé en 2017 est faible pour les 3 cours d'eau (Laudon, Bornette et Ire). Il est cependant plus élevé pour le Laudon que pour la Bornette et l'Ire. Ce constat est à mettre en relation avec le risque du développement de la MRP estimé à partir de la thermie ; risque qui était avéré en 2017 pour le Laudon mais pas pour les deux autres cours d'eau (**Figure 7**).

Cette variable thermique du risque de développement de la MRP est confrontée avec le débit moyen d'été (débit moyen calculé sur les mois de juin à octobre) de chaque cours d'eau (**Figure 8**). Les deux variables montrent une tendance inversée ; c'est-à-dire que lorsque le débit moyen d'été est le plus élevé pour un cours d'eau donné, le nombre d'heures supérieures ou égales à 15°C est le plus faible. Cependant lorsqu'on regarde les débits moyens annuels, celui de 2018 est systématiquement supérieur à celui des deux autres années (2009 et 2017) qui sont quant à eux comparables. En effet, les débits moyens mensuels de janvier à avril 2018 sont les plus élevés, synonymes de fortes précipitations hivernales et printanières (voir **Annexe 2**).

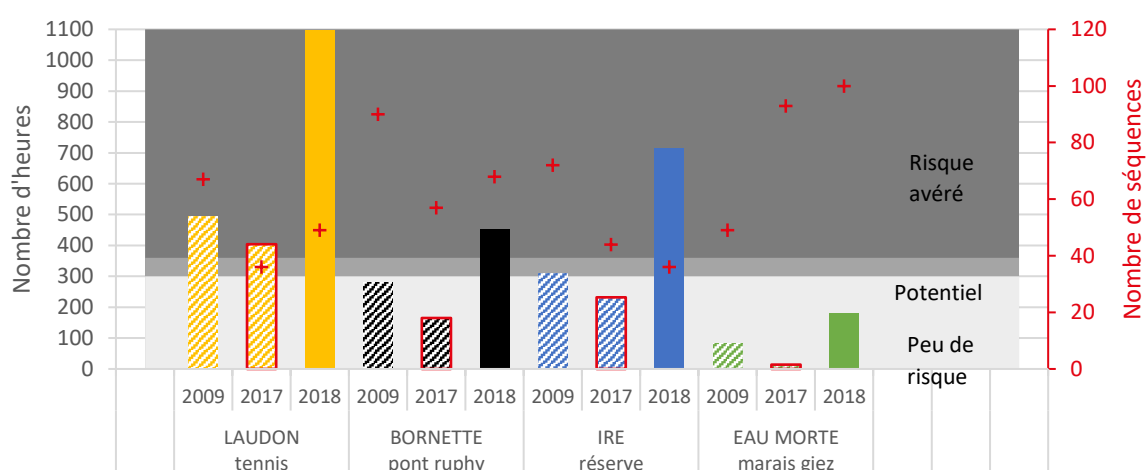


Figure 7 : Durée en heures de la séquence maximale durant laquelle la température reste supérieure ou égale à 15°C, synonyme d'un risque de développement de la MRP (Maladie Rénale Proliférative) sur les 4 cours d'eau étudiés et pour les années 2009, 2017 et 2018.

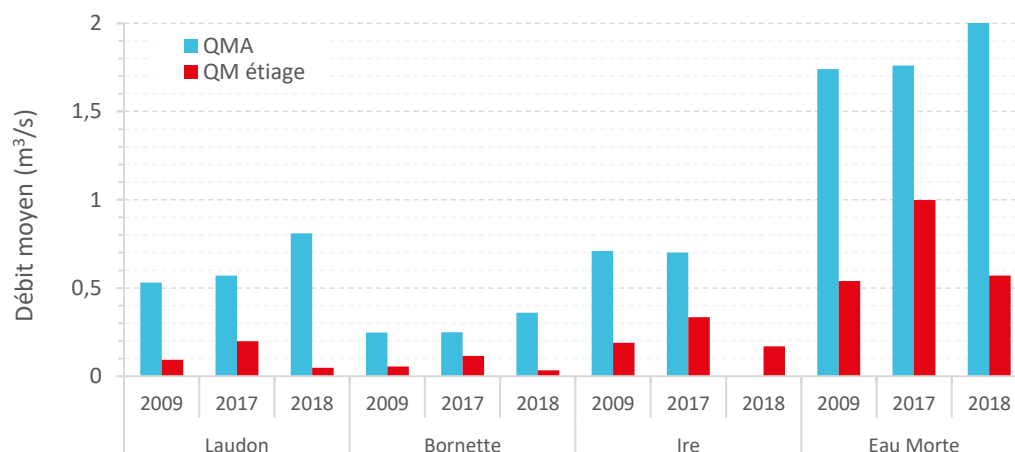
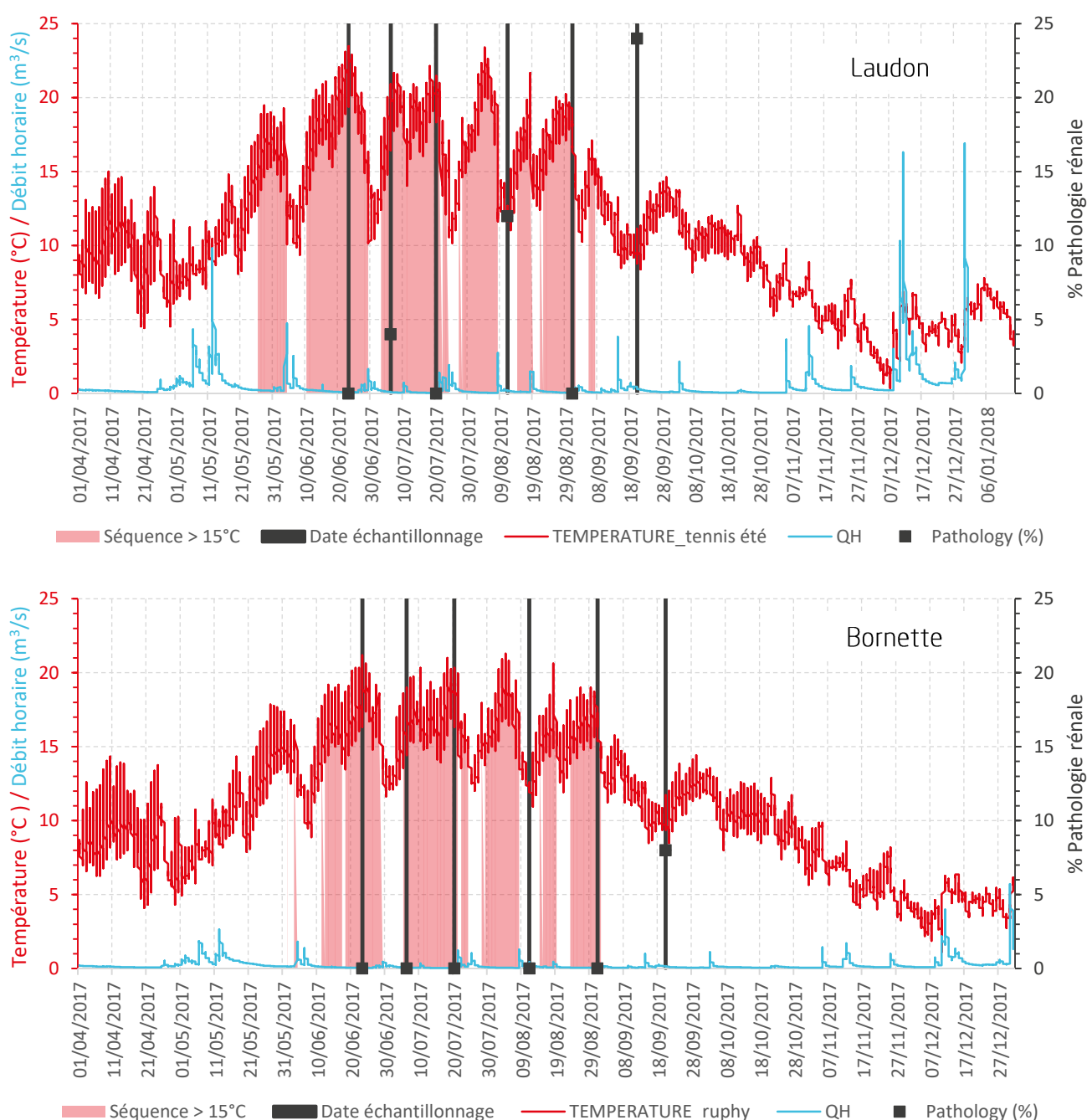


Figure 8 : Débit moyen annuel (QMA) et débit moyen d'été (calculé sur les mois de juin / juillet / août / septembre / octobre) pour chacun des 4 cours d'eau étudiés et pour les années 2009, 2017 et 2018 pour lesquelles on dispose des données de température.

Lorsqu'on met en relation le taux de pathologie rénale et les conditions environnementales, il ne ressort pas de corrélation évidente. Dans le Laudon et l'Ire, d'une date d'échantillonnage à l'autre le pourcentage de pathologie observé varie et retombe régulièrement à 0 alors que les conditions de température et de débit restent drastiques entre juin et août (Figure 9). Dans la Bornette, aucune pathologie n'est observée dans les prélèvements estivaux mais 8 % sont détectés en septembre alors que les conditions environnementales sont redevenues plus clémentes pour les juvéniles de truite.

L'hypothèse d'une augmentation du taux de pathologie rénale au fur et à mesure de la saison estivale n'est pas véritablement vérifiée. On observe tout de même les plus forts pourcentages de pathologie dans les échantillons du 20/09 du Laudon et de la Bornette, respectivement 24 % et 8 % (Figure 9). A cette date, même si les conditions de température étaient redevenues favorables (< 15°C) pour la survie des alevins, le stress subi tout au long de l'été a pu se faire ressentir sur les organismes et impliquer davantage d'infections. Il faut toutefois apporter un bémol à ce résultat puisque les pathologies rénales observées en 2017 ne concernent qu'un faible nombre d'individus.



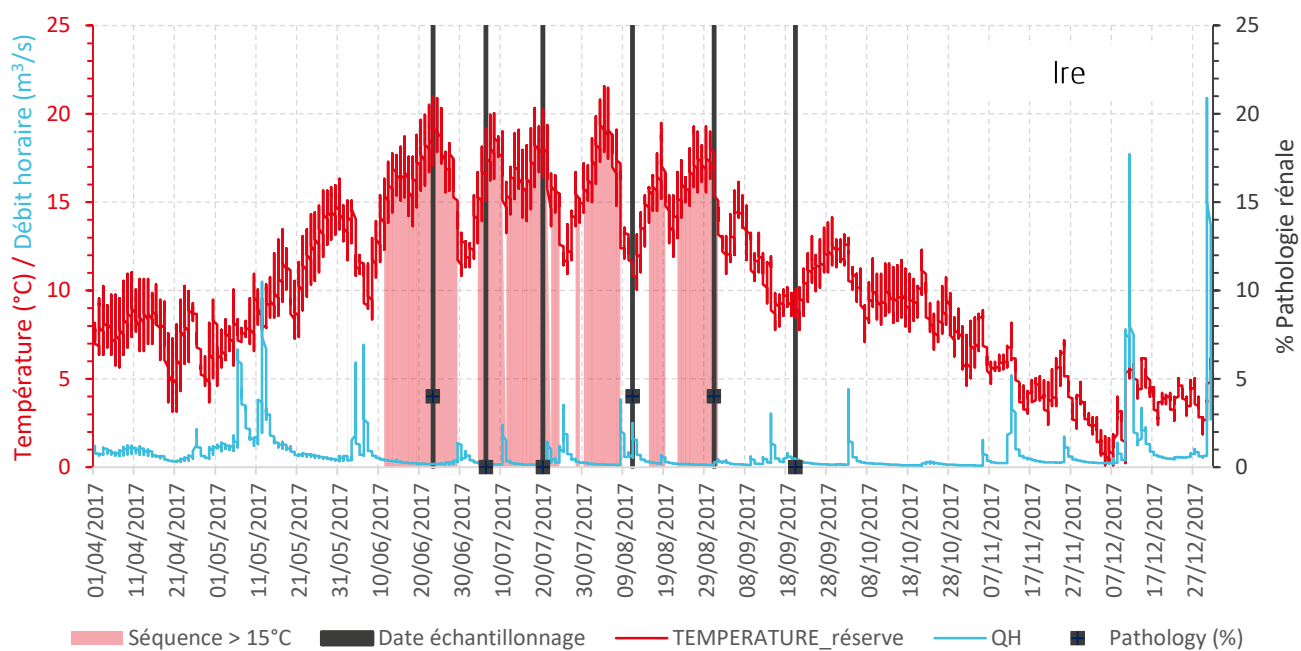


Figure 9: Température horaire confrontée au débit horaire et au pourcentage bimensuel de pathologie rénale pour les 3 cours d'eau échantillonnés sur l'ensemble de la période estivale 2017.

4 Conclusion

Une pathologie rénale légère a été observée pour plusieurs individus dans 3 affluents du lac ciblés dans cette étude (le Laudon, la Bornette et l'Ire). Le seul échantillon récolté dans l'Eau Morte n'a pas montré d'infection rénale. Les lésions observées sur les individus atteints sont du même type que celles décrites dans le cadre de la MRP. Cependant, seul un faible pourcentage d'individus se révèle être positif au *T. bryosalmonae* par la méthode d'immunohistochimie. L'analyse qPCR a permis de confirmer qu'il n'y avait pas de traces d'ADN *T. bryosalmonae*. Ces résultats négatifs peuvent s'expliquer par un biais technique. Il est reconnu que le formol dégrade l'ADN des échantillons fixés (KOSHIBA *et al.* 1993) et cette dégradation s'accroît avec le temps. Par conséquent, la probabilité de détecter de l'ADN par PCR dans des échantillons fixés au formol depuis plus de 24h décroît exponentiellement avec le temps (KOSHIBA *et al.* 1993). Comme la période de fixation des échantillons dans le formol a été assez longue pour cette étude, il est fort probable que l'ADN ait été détruit durant la période de stockage et que la PCR se soit révélée sans succès. Il faut donc ne pas exclure que la réelle prévalence d'infections à *T. bryosalmonae* soit plus élevée que celle détectée dans la présente analyse.

La confrontation des pourcentages de pathologie rénale et des conditions environnementales (température et débit) ne montre pas de relation étroite. On dénombre cependant une quantité d'individus infectés plus importante à la l'issue de l'été 2017 (en septembre) dans le Laudon et la Bornette mais ce nombre reste globalement faible (maximum observé dans le Laudon : 24 %).

Il est à noter que le taux global de pathologie pour les juvéniles de truite du Laudon est le plus élevé au regard de celui des autres cours d'eau et ce, en lien avec les conditions thermiques et hydrologiques plus drastiques.

La présence de la MRP est avérée dans le Laudon, la Bornette et l'Ire. Cependant, comme la pathologie n'était que très légère au cours de l'été 2017, l'infection était probablement cliniquement insignifiante. Aussi, cette maladie peut impliquer une mortalité sur les juvéniles de truite mais elle n'explique pas à elle seule l'insatisfaction des pêcheurs qui se plaignent de la diminution du stock d'individus de truite de lac dans le lac d'Annecy.

5 Bibliographie

- ALABASTER, J.S. & LLYOD, R. (1980). Water quality criteria for fresh water fish, *Butter Worths Ed*, London, 297p.
- ADAMS A, RICHARDS RH, DE MATEO M (1992) Development of monoclonal antibodies to PKX', the causative agent of proliferative kidney disease. *J Fish Dis* 15:515-521
- ANDERSON CL, CANNING EU, OKAMURA B (1999) 18S rDNA sequences indicate that PKX organism parasitizes bryozoa. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 19: 94-97
- BETTGE K, WAHLI T, SEGNER H, SCHMIDT-POSTHAUS H (2009 a) Proliferative kidney disease in rainbow trout: time- and temperature-related renal pathology and parasite distribution. *Dis Aquat Org* 83 (1): 67-76
- BETTGE K., SEGNER H., BURKI R., SCHMIDT-POSTHAUS H. & WAHLI T. (2009 b). Proliferative kidney disease (PKD) of rainbow trout: temperature- and time related changes of *Tetracapsuloides bryosalmonae* DNA in the kidney. *Parasitology* 136, 615-625.
- BURKHARDT-HOLM P., PETER A., SEGNER H. (2002). Decline of fish catch in Switzerland. Project fishnet: a balance between analysis and synthesis. *Aquatic Sciences* 64, 36-54.
- CANNING EU, CURRY A, FEIST SW, LONGSHAW M, OKAMURA B (2000) A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX Organism). *J Eucaryot Microbiol* 47: 456-468
- CHASSERIEAU C. & CAUDRON A. (2010). Etude des populations de truites sédentaires et migrantes sur le bassin du lac d'Annecy et évaluation des pratiques de gestion. Volet 1 : Etat des populations sur les affluents. FDPPMA 74, 58p.
- DE KINKELIN P., GAY M. (2000). La tetracapsulose a *Tetracapsula bryosalmonae*: une bonne cible pour des études épidémiologiques en ichthyopathologie. *Epidémiologie et santé animale* 38, 7-18.
- DUMOUTIER, Q., VIGIER, L., CAUDRON, A. (2010). Macro Excel d'Aide au Calcul de variables thermiques appliquées aux Milieux Aquatiques Salmonicoles. Rapport, 29p.
- EL-MATBOULI M, HOFFMAN RW (1994) Proliferative kidney disease (PKD) as an important myxosporean infection in salmonid fish. In: *Parasitic Diseases of Fish*. (Eds A.W. Pike & J.W. Lewis), pp. 3-15. Samara Publishing Limited, Tresaith, Wales
- FEIST SW, BUCKE D (1993) Proliferative kidney disease in wild salmonids. *Fish Res* 17: 51-58
- FEIST SW, LONGSHAW M, CANNING EU, OKAMURA B (2001) Induction of proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* via the bryozoan *Fredericella sultana* infected with *Tetracapsula bryosalmonae*. *Dis Aquat Org* 45: 61-68.
- FEIST S.W., PEELER E.J., GARDINER R., SMITH E., LONGSHAW M. (2002). Proliferative kidney disease and renal myxosporidiosis in juvenile salmonids from rivers in England and Wales. *Journal of Fish Diseases* 25, 451-458.
- GAY M., OKAMURA B., DE KINKELIN P. (2001). Evidence that infectious stages of *Tetracapsula bryosalmonae* for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* are present throughout the year. *Diseases of Aquatic Organisms* 46, 31-40.
- GRABNER DS, EL-MATBOULI M (2010) *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) portal of entry into the fish host. *Dis Aquat Org* 90: 197-206.
- HARI R., LIVINGSTONE D., SIBER R., BURKHARDT-HOLM P., GÜTTINGER H. (2006). Consequences of climatic change for water temperature and brown trout populations in Alpine rivers and streams. *Global Change Biology* 12, 10-26.

- HEDRICK RP, MACCONNELL E, DE KINKELIN P (1993) Proliferative kidney disease of salmonid fish. *Ann Rev Fish Dis* 3: 277-290.
- HEDRICK RP, BAXA DV, DE KINKELIN P, OKAMURA B (2004) Malacosporean-like spores in the urine of rainbow trout react with antibody and DNA probes to *Tetracapsuloides bryosalmonae*. *Parasitol Res* 92: 81-88.
- KENT ML, HEDRICK RP (1985) Development of the PKX myxosporean in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Dis Aquat Org* 1: 169-182.
- KENT ML, KHATTRA J, HERVIO DML, DEVLIN RH (1998) Ribosomal DNA sequence analysis of isolates of the PKX myxosporean and their relationship to members of the genus *Sphaerospora*. *J Aquat Anim Health* 10:12-21.
- KOSHIBA M, OGAWA K, HAMAZAKI S, SUGIYAMA T, OGAWA O, KITAJIMA T (1993) The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular-weight DNA from fixed and embedded tissues. *Pathol Res Pract* 189(1):66-72.
- KRISTMUNDSSON A., ANTONSSON T., ARNASON F. (2010). First record of Proliferative Kidney Disease in Iceland. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 30, 35.
- LAHNSTEINER F., HAUNSCHMID R., MANSOUR N. (2010). Immune deficiency causes annual late summer brown trout (*Salmo trutta*) mortality in Austrian prealpine river systems. *Aquatic Science* 71, 463-472.
- LONGSHAW M, FEIST SW, CANNING EU, OKAMURA B (1999) First identification of PKX in bryozoans from the United Kingdom – Molecular evidence. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 19: 146-148.
- LONGSHAW M, LE DEUFF RM, HARRIS A.F, FEIST SW (2002) Development of proliferative kidney disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following short-term exposure to *Tetracapsula bryosalmonae* infected bryozoans. *J Fish Dis* 25: 443-449.
- MORRIS DJ, ADAMS A, FEIST SW, MCGEORGE J, RICHARDS RH (2000) Immunohistochemical and PCR studies of wild fish for *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX), the causative organism of proliferative kidney disease. *J Fish Dis* 23: 129-135.
- MORRIS DC, MORRIS DJ, ADAMS A (2002) Development of improved PCR to prevent false positives and false negatives in the detection of *Tetracapsula bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease. *J Fish Dis* 25: 483-490.
- OKAMURA B, ANDERSON CL, LONGSHAW M, FEIST SW, CANNING EU (2001) Patterns of occurrence and 18S rDNA sequence variation of PKX (*Tetracapsula bryosalmonae*), the causative agent of salmonid proliferative kidney disease. *J Parasitol* 87: 379-385.
- OKAMURA B, HARTIKAINEN H, SCHMIDT-POSTHAUS H, WAHLI T (2011) Life cycle complexity, environmental change and the emerging status of salmonid proliferative kidney disease. *Freshwater Biol* 56 (4): 735-753.
- SCHMIDT-POSTHAUS H. (2013). Investigation for Proliferative Kidney Disease and associated Renal Pathology in Brown Trout from the Rivers Redon and Foron, 16 p. <http://www.pechehautesavoie.com/wp-content/uploads/2012/01/Recherche-infection-MRP-Redon-Foron-EN.pdf>.
- SCHMIDT-POSTHAUS H, BETTGE K, FORSTER U, SEGNER H, WAHLI T (2012) Kidney pathology and parasite intensity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* surviving Proliferative Kidney Disease: time course and influence of temperature. *Dis Aquat Org* 97(3): 207-218.
- SCHMIDT-POSTHAUS H, STEINER P, MULLER B, CASANOVA-NAKAYAMA A 394 (2013) Complex interaction between proliferative kidney disease, water temperature and concurrent nematode infection in brown trout. *Dis Aquat Org* 104: 23-34.
- STREPPARAVA N, SEGNER H, ROS A, HARTIKAINEN H, SCHMIDT-POSTHAUS H, WAHLI T (2018) Temperature-Related Parasite Infection Dynamics: the Case of Proliferative Kidney Disease of Brown Trout. *Parasitol* 145(3):281-291.

- WAHLI T., KNUESEL R., BERNET D. SEGNER H. PUGOVKIN D., BURKHARDT-HOLM P. ESCHER M., SCHMIDT-POSTHAUS H. (2002). Proliferative kidney diseases in Switzerland: current state of knowledge. *Journal of Fish Diseases* 25, 491-500.
- T. WAHLI, D. BERNET, H. SEGNER, H. SCHMIDT-POSTHAUS (2008) Role of altitude and water temperature as regulating factors for the geographical distribution of *Tetracapsuloides bryosalmonae* infected fish in Switzerland. *J Fish Biol* 73: 2184-2197.

6 Annexes

ANNEXE 1 : RESULTATS BRUTS DES ANALYSES EFFECTUEES A L'UNIVERSITE DE BERN PAR DATE D'ECHANTILLONNAGE ET PAR COURS D'EAU.	19
ANNEXE 2 : DEBITS MOYENS MENSUELS DES 4 COURS D'EAU ETUDIES POUR LES 3 ANNEES (2009, 2017 ET 2018) OU LES DONNEES DE TEMPERATURE DE L'EAU ONT ETE ACQUISES.	21

Annexe 1 : Résultats bruts des analyses effectuées à l’Université de Bern par date d’échantillonnage et par cours d’eau.

	length (cm)	HE_ PKD	Patho- logy	Histo. Comments	Immuno histo chemistry	PCR	length (cm)	HE_ PKD	Patho- logy	Histo. Comments	Immuno histo chemistry	PCR	length (cm)	HE_ PKD	Patho- logy	Histo. Comments	Immuno histo chemistry	PCR	length (cm)	HE_ PKD	Patho- logy	Histo. Comments	Immuno histo chemistry	PCR	length (cm)	HE_ PKD	Patho- logy	Histo. Comments	Immuno histo chemistry	PCR									
Laudon	6,5	0	0				5,5	no kidney on slide				negative	6,2	0	0				9,4	0	0				6,4	0	0				9,1	0	0						
	5	0	0				6,1	no kidney on slide				negative	5	0	0				8,2	0	0				8,6	0	0				7,6	0	0						
	5,3	0	0				6,9	0	0				6,1	0	0				9	0	0				8,3	0	0				10,2	0	0						
	6,6	0	0				4,8	0	0				5,2	0	0				6,7	0	0				7,5	0	0				7	0	0						
	5,6	0	0				5,7	0	2	small areas of necrosis, infiltration with mainly macrophages	negative	negative	6,4	0	0				5,6	0	0				8,7	0	0				9,7	0	0						
	6,1	0	0				5,9	0	0				6,7	0	0				6,8	0	0				6,7	0	0				7,8	0	0						
	4,9	0	0				6	0	0				5,8	0	0				5,8	0	0				9,3	0	0			1	small areas of necrosis, infiltration with mainly macrophages	positive	negative						
	6,9	0	0				5,2	0	0				7,6	0	0				9,7	0	2	small areas of necrosis, infiltration with mainly macrophages	positive	negative	8,2	0	0				9,2	0	0						
	5,3	0	0				6,1	0	0				5,3	0	0				8,6	0	0				8,5	0	0			2	small areas of necrosis, infiltration with mainly macrophages	positive	negative						
	5,8	0	0				6,4	0	0				7,5	0	0				8	0	0				10,4	0	0				8,6	0	0						
	4,3	0	0				5,9	0	0				5,5	0	0				7	0	0				7,2	0	0				7,3	0	0						
	4,9	0	0				5,5	0	0				7	0	0				8,1	0	0				6,7	0	0				7,2	0	0						
	4,3	0	0				6,6	0	0				7,8	0	0				7,2	0	0				9,3	0	0				11,1	0	0						
	5,6	0	0				6,1	0	0				5,9	0	0				7,2	0	1	small areas of necrosis, infiltration with mainly macrophages	negative	negative	9,2	0	0				7,5	0	0						
	4,4	0	0				6	0	0				8,6	0	0				5,3	0	0				8,4	0	0				8,6	0	0						
	5	0	0				5,1	0	0				6,8	0	0				5,6	0	0				8,6	0	0				10,3	0	0						
	6,2	0	0				4,5	0	0				5	0	0				7,1	0	0				7,5	0	0				7,6	0	0						
	4,9	0	0				6,2	0	0				6	0	0				5,6	0	0				7,7	0	0				6,9	0	1	small areas of necrosis, infiltration with mainly macrophages	negative	negative			
	5,6	0	0				7,2	0	0				6,1	0	0				6,4	0	0				7,5	0	0				5,1	0	0						
	5,2	0	0				6,5	0	0				7,1	0	0				6,3	0	0				8,6	0	0				5,2	0	1	small areas of necrosis, infiltration with mainly macrophages	negative	negative			
	4,9	0	0				5,4	0	0				6,3	0	0				7,1	0	0				7,8	0	0				6	0	0						
	5,4	0	0				7,1	0	0				5,3	0	0				9,4	0	0				7,2	0	0				6,1	0	0						
	5,6	0	0				5,5	0	0				8,3	0	0				8,6	0	0				7,2	0	0				8,2	0	3	small areas of necrosis, infiltration with mainly macrophages and eosinophilic granular cells, fibrosis	negative	negative			
	5,2	0	0				5,6	0	0				5,9	0	0				9,1	0	1	small areas of necrosis, infiltration with mainly macrophages	negative	negative	7,7	0	0				6,3	0	0						
	5,2	0	0				4,8	0	0				6,4	0	0				6	0	0				6,9	0	0				7,8	0	1	small areas of necrosis, infiltration with mainly macrophages	negative	negative			
								4,9	0	0																													
Echantillonnage du 23.06.2017						Echantillonnage du 06.07.2017						Echantillonnage du 20.07.2017						Echantillonnage du 11.08.2017						Echantillonnage du 30.08.2017						Echantillonnage du 20.09.2017									
Bornette	length (cm)	HE_ PKD	Patho- logy	Histo. Comments	Immuno histo chemistry	PCR	length (cm)	HE_ PKD	Patho- logy	Histo. Comments	Immuno histo chemistry	PCR	length (cm)	HE_ PKD	Patho- logy	Histo. Comments	Immuno histo chemistry	PCR	length (cm)	HE_ PKD	Patho- logy	Histo. Comments	Immuno histo chemistry	PCR	length (cm)	HE_ PKD	Patho- logy	Histo. Comments	Immuno histo chemistry	PCR	length (cm)	HE_ PKD	Patho- logy	Histo. Comments	Immuno histo chemistry	PCR			
	5,5	0	0				5,9	0	0				6	0	0				6,3	0	0				7,1	0	0				6,4	0	0						
	5,1	0	0				5,4	0	0				5,3	0	0				8	0	0				6,2	0	0				6,4	0	1	increased tubuloneogenesis	negative	negative			
	4,8	0	0				6,4	0	0				6,2	0	0				6,9	0	0				7,8	0	0				6,6	0	0						
	5,2	0	0				5,3	0	0				5,5	0	0				5,7	0	0				6,1	0	0				7,2	0	0						
	5,1	0	0				5,6	0	0				5,2	0	0				6,8	0	0				8	0	0				7,8	0	0						
	5,2	0	0				4,8	0	0				6,3	0	0				6,6	0	0				8	0	0				6,3	0	0						
	5,4	0	0				6,1	0	0				5,6	0	0				7,1	0	0				7,3	0	0				6,6	0	0						
	4,1	0	0				5,3	0	0				5,7	0	0				6,7	0	0				7,7	0	0				5,8	0	0						
	5	0	0				6	0	0				5,5	0	0				5,4	0	0				6,6	0	0				7,1	0	0						
	4,8	0	0				5,2	0	0				6	0	0				5,5	0	0				6,9	0	0				6,7	0	0						
	5,4	0	0				5,7	0	0				5,8	0	0				7,1	0	0				7,4	0	0				6,6	0	0						
	5,5	0	0				5	0	0				5,5	0	0				6,5	0	0				7,1	0	0				6,7	0	0						
	5,1	0	0				5,1	0	0				5,3	0	0				6,5	0	0				7,2	0	0				7,1	0	0						
	4,1	0	0				5,6	0	0				5,5	0	0																								

[illegible]

NB: Les cases grisées correspondent à des individus dont la mesure de la longueur totale a été effectuée sans la tête. Le prélèvement de la tête a servi dans le cadre d'une autre étude.

Annexe 2 : Débits moyens mensuels des 4 cours d'eau étudiés pour les 3 années (2009, 2017 et 2018) où les données de température de l'eau ont été acquises.

