

UFR Sciences & Techniques Côte Basque
Université de Pau et des Pays de l'Adour

Licence Biologie des Organismes
Année 2014/2015

**Etude rétrospective de l'antibiorésistance de souches
d'Aeromonas spp. et de *Yersinia ruckeri* isolées de
poissons entre 1985 et 2015 et
investigation de stratégies de sélection génétique de
poissons résistants à *Vibrio harveyi***

DELAUNAY Anne



Stage effectué du 9 Mars au 10 Juillet 2015
Au laboratoire Anses de Ploufragan-Plouzané,
Unités Pathologies Virales des Poissons et Mycoplasmodologie-Bactériologie
Sous la direction scientifique de Mr MORIN et Mme BARON

*"Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas
engager la responsabilité de l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil"*

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier Monsieur Quentin MIRGON, Responsable de la cellule logistique et maintenance, et Madame Monique ELOIT, Directrice générale adjointe, de l'OIE¹ pour m'avoir aidée à trouver ce stage.

Monsieur Gilles SALVAT, Directeur de l'Anses Ploufragan-Plouzané, pour m'avoir accueillie dans son établissement.

Je remercie également Madame Isabelle KEMPF, responsable de l'unité Mycoplasmologie Bactériologie, de m'avoir accueillie au sein de son unité.

Thierry MORIN, Responsable de l'unité Pathologies Virales des Poissons (PVP) et Sandrine BARON, chef de projet scientifique au sein de l'unité Mycoplasmologie Bactériologie (MB), mes maîtres de stage, pour m'avoir tant appris et conseillée.

Tous les membres des unités pour leur accueil, leur aide et leurs conseils, particulièrement Laurane PALLANDRE et Emeline LARVOR, ainsi que les partenaires du projet Antibio-Fish,

Merci.

¹ Organisation Mondiale de la Santé Animale.

Avant-propos

Présentation de l'environnement du stage

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses)² est un établissement public administratif placé sous la tutelle des ministères chargés de l'agriculture, de la consommation, de l'environnement, de la santé et du travail. L'Anses a pour mission de contribuer à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Elle participe également à la protection de la santé et du bien-être des animaux, à la protection de la santé des végétaux (évaluation des produits de traitement des cultures) et à l'évaluation des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des aliments. Agence de référence pour l'évaluation des risques dans ces domaines, l'Anses fournit aux autorités compétentes l'information et l'appui nécessaires à la gestion des risques. Elle assure des missions de laboratoire de référence aux niveaux national, européen et international. Elle exerce un rôle de veille, d'épidémiosurveillance et d'alerte sur les risques émergents et les crises sanitaires. Elle autorise la mise sur le marché des médicaments vétérinaires et assure la pharmacovigilance associée. Elle définit, conduit et soutient des études et des programmes de recherche scientifiques et techniques dans son champ d'expertise et met en place des observatoires sur les produits et procédés. Elle s'appuie largement sur la communauté scientifique française et internationale, au moyen de partenariats et de conventions de recherche avec les institutions scientifiques, d'appels à candidatures et d'appels à projets de recherche. Elle conduit des actions de formation et d'information. Grâce à son large champ de compétences, l'Anses appréhende l'ensemble des expositions auxquelles l'homme est soumis à chacun des âges et à chacun des moments de sa vie – travail, domicile, déplacements, loisirs... Enfin, l'Agence apporte une attention particulière au dialogue avec la société civile ainsi qu'au respect de ses principes fondateurs : excellence, indépendance et transparence.

L'Anses en chiffres



- 1350 agents
- 800 experts extérieurs mobilisés dans les collectifs d'experts
 - Budget annuel : 140 millions d'euros
- Plus de 8000 avis émis depuis l'origine (1999)
- 51 mandats de laboratoire national de référence
- 8 mandats de laboratoire de référence de l'Union européenne
- 20 mandats internationaux de référence
 - 250 publications scientifiques par an
 - Plus de 100 doctorants et post-docs

L'unité « Pathologies Virales des Poissons » (PVP) où j'ai réalisé la première partie de mon stage est localisée sur le Technopôle Brest-Iroise à Plouzané (Finistère) où elle dispose, en complément de ses laboratoires de virologie cellulaire, de biologie moléculaire et d'immunologie, d'installations expérimentales rénovées et agréées lui permettant de réaliser des contaminations en conditions contrôlées avec des agents biologiques ou chimiques de poissons d'eau douce ou d'eau de mer. Laboratoire national de référence (LNR) pour les maladies réglementées des

²L'Anses reprend, depuis le 1^{er} juillet 2010, l'ensemble des missions antérieurement dévolues à l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) et à l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset).

poissons depuis de nombreuses années, particulièrement les pathologies virales, l'unité PVP assure à ce titre un certain nombre de missions d'appui scientifique et technique, notamment des activités analytiques en virologie, sérologie (accréditation COFRAC n°1-2251 selon le référentiel ISO 17025) et biologie moléculaire. L'unité développe également des activités de recherche portant sur deux axes thématiques principaux : les virus piscicoles et l'immuno-écotoxicologie. Composée de 8 permanents, l'unité est rattachée au Laboratoire de Ploufragan-Plouzané.

L'unité « Mycoplasmodologie-Bactériologie » (MB) qui m'a accueillie pour la seconde période de mon stage, fait partie du Zoopôle de Ploufragan (Côte d'Armor). Elle participe à des activités de Recherche (mises au point et validation de méthodes de détection des mycoplasmes et bactéries chez les porcs et volailles, étude des mécanismes moléculaires de l'antibiorésistance, développement de techniques d'épidémio-surveillance de cette résistance chez les bactéries pathogènes, sentinelles et zoonotiques des porcs, volailles et poissons et de leur environnement, analyse des conditions et des facteurs de sélection, de persistance et de diffusion de la résistance aux antibiotiques) et d'Appui Scientifique et Technique (aide aux diagnostics, fournit de réactifs ou de techniques, évalue les dossiers de demande d'AMM des vaccins destinés à prévenir les maladies respiratoires du porc et de la volaille, co-responsable de l'animation du Resapath³ et des plans de surveillance des bactéries sentinelles et zoonotiques du porc et de la volaille, dans le cadre du LNR Antibiorésistance).

³ Réseau de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes isolées de l'animal. Créé en 1982, il couvre la plupart des germes bactériens responsables d'infections chez les bovins, caprins, ovins, porcs, volailles et carnivores domestiques : <https://www.anses.fr/fr/content/le-r%C3%A9seau-r%C3%A9sapath>

Liste des abréviations

Ac. Nal :	Acide Nalidixique
Aero. :	<i>Aeromonas</i>
AM :	Ampicilline
AMC :	Amoxicilline + Acide clavulanique
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
AMNV :	Agence Nationale du Médicament Vétérinaire
AMX :	Amoxicilline
ATB :	Antibiotiques
BPI :	Banque Publique d'Investissement
C :	Chloramphénicol
CAO :	Chroma Agar Orientation
CIP :	Ciprofloxacine
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
COMETH :	Comité d'éthique
Da :	Dalton
DO :	Doxycycline
D.O. :	Densité optique
DL ₅₀ :	Dose léthale 50%
ENVA :	Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
EUCAST :	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FFC :	Florfénicol
FLU :	Fluméquine
FUR :	Furane
GDS :	Groupe de Défense Sanitaire
IP :	Intra-péritonéale
L :	Lincomycine
Lin. :	Lincosamides (famille)
LNR :	Laboratoire National de Référence
MALDI-TOF :	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight
MH:	Mueller Hinton
OA :	Acide Oxolinique
OT :	Oxytétracycline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
Péni. :	Pénicillines (famille)
Phéni. :	Phénicolés (famille)
PI :	Post-infection
Quino. :	Quinolones
SSS :	Sulfamides (antibiotique)
Sulfami. :	Sulfamides (famille)
SXT :	Mélange Triméthoprim-sulfaméthoxazole ou sulfadiazine
TE :	Tétracycline
Tétra. :	Tétracyclines (famille)
TSA :	Trypticase Soja Agar
TSB :	Trypticase Soja Bouillon
UEBEAC :	Unité Epidémiologie et Bien-Etre en Aviculture et Cuniculture
UEBEP :	Unité Epidémiologie et Bien-Etre Porcins
UFC :	Unités formant colonie
UMB :	Unité Mycoplasmaologie-Bactériologie
UPEC :	Université Paris Est Créteil
UPVP :	Unité Pathologies Virales des Poissons
UV :	Ultraviolet
Y. r. :	<i>Yersinia ruckeri</i>

Table des matières

Liste des abréviations :	4
1. Introduction	7
2. Partie Bibliographie	9
2.1. Présentation des bactéries étudiées : <i>Aeromonas</i> , <i>Yersinia</i> et <i>Vibrio</i>	9
2.2. Modes d'action des antibiotiques et mécanismes de résistance associés	10
2.3. Antibiorésistance.....	12
2.4. Mécanismes de transfert de gènes.	12
3. Matériels et Méthodes.....	13
3.1. Partie 1. Etat des lieux de la résistance de souches d' <i>Aeromonas spp</i> et de <i>Yersinia ruckeri</i> . 13	
3.1.1. Inventaire / bilan des souches disponibles et sélection des isolats d'intérêt :	13
3.1.2. Analyse des commémoratifs des isolats sélectionnés :	13
3.1.3. Etude de la résistance / sensibilité aux antibiotiques :	14
3.1.4. Elaboration d'un questionnaire destiné aux vétérinaires aquacoles :	14
3.1.5. Essais de repiquage et identification des souches par MALDI-TOF:	14
3.2. Partie 2. Mise en place d'une épreuve infectieuse à <i>Vibrio harveyi</i> chez le bar.....	15
3.2.1. Poissons :	15
3.2.2. Eau.	16
3.2.3. <i>Vibrio harveyi</i> :	16
3.2.4. Infections expérimentales :	16
3.2.5. Mise en place d'une PCR spécifique de l'espèce <i>Vibrio harveyi</i> :	17
4. Résultats-Discussion.....	18
4.1. Partie 1. Etat des lieux de la résistance des souches <i>Aeromonas</i> et <i>Yersinia spp</i>	18
4.1.1. Etude des données issues des commémoratifs	18
4.1.2. Repiquage et ré-identification par MALDI-TOF	23
4.2. Partie 2. Mise en place d'une épreuve infectieuse à <i>Vibrio harveyi</i> chez le bar.....	24
4.2.1. Pré-tests <i>Vibrio harveyi</i> /bars	24
4.2.2. PCR spécifique à <i>Vibrio harveyi</i> :	24
5. Conclusion	25
Bibliographie.....	26
Annexes.....	28
Résumé	34
Mots-clés	34

RE-SIST, sélectionné au quinzième appel à projets du Fonds Unique Interministériel, est labellisé par le Pôle de compétitivité Aquimer et co-labellisé par les Pôles Qualiméditerranée, Agrimip Innovation, Mer Bretagne et Mer Méditerranée. Il est financé par l'Etat, BPI France, Les Régions Bretagne, Languedoc-Roussillon et Aquitaine ainsi que les Conseils Généraux des Landes et des Pyrénées Atlantiques.

RE-SIST

Amélioration par sélection de la résistance des poissons d'élevage aux agents pathogènes

- **Partenaires industriels:**









- **Partenaires scientifiques:**





- **Projet labellisé par:**






- **Projet financé par:**









1. Introduction

La lutte contre les pathologies constitue une priorité pour le développement durable de l'aquaculture. Parmi les principaux pathogènes d'importance chez les poissons d'élevage, plusieurs bactéries sont à l'origine de mortalités sévères. Les trois genres les plus fréquemment rencontrés sont *Aeromonas*, *Yersinia* et *Vibrio*, qui sont respectivement responsables de la furunculose, de la maladie de la bouche rouge (ou yersiniose) et de vibrioses. Ces pathogènes, du fait d'une diffusion facilitée dans le milieu aquatique et d'un spectre d'espèces hôtes large, ont une répartition mondiale, causant de lourdes pertes aux élevages (mortalité, morbidité, retards de croissance, ...) et générant des pertes économiques importantes (1, 2).

L'utilisation d'antibiotiques en prophylaxie ou en prévention dans les élevages piscicoles contribue à l'apparition de bactéries résistantes, ce qui limite l'efficacité des traitements et réduit progressivement le panel de molécules utilisables. Les phénomènes d'antibiorésistance observés ces dernières années sont une source de préoccupation majeure pour la santé publique et animale.

Si les traitements utilisés pour lutter contre *Yersinia ruckeri* ne semblent pas poser de problème en termes d'efficacité, il n'en est pas de même pour *Aeromonas* qui apparaît plus difficile à traiter en pisciculture, notamment du fait de phénomènes d'émergence de souches résistantes.

Contrairement aux élevages porcins et aviaires, il n'existe pas à l'heure actuelle, de plans actifs de surveillance de la résistance aux antibiotiques pour la filière piscicole, et ce malgré le fait que cette filière atypique représente une source de diffusion potentiellement importante par l'intermédiaire de l'eau mais aussi par la consommation de poissons. Les seules données disponibles sont parcellaires et concernent les résultats d'antibiogrammes réalisés à partir des isolats d'origine clinique reçus par le Resapath. Il est donc impossible, à ce jour, d'établir un état des lieux pertinent de l'antibiorésistance en filière piscicole, tout comme il n'est pas possible d'établir des tendances d'évolution de par l'absence de points de référence.

Dans ce contexte général, les objectifs de ce stage ont consisté à participer :

- à la **réalisation d'un état des lieux de l'évolution de la résistance aux antibiotiques ces 30 dernières années**, données nécessaires pour disposer de points de référence pour la mise en place d'une surveillance active ;
- à l'évaluation du **potentiel** d'approches innovantes permettant de réduire l'utilisation d'antibiotiques, et plus particulièrement **des stratégies de sélection génétique de poissons plus résistants à certaines pathologies**.

Le premier objectif s'intègre dans le cadre du plan pluriannuel Ecoantibio (2012-2017) mis en place par le Ministère en charge de l'Agriculture, plan qui vise à promouvoir un usage prudent et raisonné des antibiotiques en médecine vétérinaire, avec des objectifs qualitatifs (antibiotiques d'importance critique) et quantitatifs (réduire de 25% en 5 ans)(3). Le projet **ANTIBIO-FISH**, projet collaboratif associant les unités Pathologies Virales des Poissons (PVP), Mycoplasma Bactériologie (MB), Epidémiologie et Bien Etre Porcins (EBEP), Epidémiologie et Bien Etre en Aviculture et Cuniculture (EBEAC) du Laboratoire Anses de Ploufragan-Plouzané, Labocéa⁴, Oniris⁵, GDS Bretagne, l'Institut Technique de l'Aviculture section piscicole ainsi qu'un cabinet vétérinaire spécialisé en aquaculture, est soutenu financièrement par le plan EcoAntibio. Il a pour objets i) d'établir, au niveau régional, une souchothèque commune de référence de souches de *Yersinia ruckeri* (Y.r.) et *Aeromonas spp.* (Aero.) isolées de poissons dans la région Grand-Ouest des années 80 à aujourd'hui, ii) d'apporter des éléments d'identification mais également de comparaison entre Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et antibiogramme, dans le but d'avoir une souchothèque caractérisée et des méthodologies d'évaluation de l'antibiorésistance plus fines, iii) de réaliser un état de l'évolution temporelle, sur près de 30 ans, de l'antibiorésistance de ces deux genres bactériens et iv) d'obtenir des données sur la prévalence de gènes de résistance dans les isolats collectés, afin de mieux appréhender les potentiels de transfert génétique, donc le rôle de réservoir et de vecteurs de gènes de résistance du poisson d'élevage.

Le second objectif est en lien avec un nombre croissant de publications scientifiques qui démontrent sans ambiguïté l'existence, chez les poissons, d'une variabilité génétique sélectionnable de la résistance à un large spectre d'agents pathogènes. La constitution de lignées commerciales de poissons présentant une résistance accrue à certains agents infectieux particulièrement présents et problématiques en élevages permettrait i) de réduire significativement les coûts de production et le recours aux traitements thérapeutiques, ii) d'améliorer le bien-être des animaux et iii) d'accentuer l'avance technologique des entreprises françaises face aux investissements étrangers concurrents. Les nouvelles lignées ainsi créées pourraient être valorisées par la vente de juvéniles à l'export mais également directement par la filière nationale. Le projet **Re-Sist**, labellisé par le Pôle de compétitivité Aquimer et co-labellisé par les Pôles Qualiméditerranée, Agrimip Innovation, Mer Bretagne et Mer Méditerranée, est financé par l'Etat, BPI France, les Régions Bretagne, Languedoc-Roussillon et Aquitaine ainsi que les Conseils Généraux des Landes et des Pyrénées Atlantiques. Un de ses objectifs est d'évaluer l'apport d'épreuves infectieuses réalisées en conditions contrôlées dans le cadre de la sélection de poissons marins présentant une résistance améliorée à des pathologies majeures. La procédure testée consiste à déterminer les possibilités de sélection de candidats non soumis à l'épreuve infectieuse et conservés dans le noyau de sélection sur la valeur génétique familiale de leurs frères-sœurs collatéraux contaminés expérimentalement.

Dans le cadre de ce stage, mes travaux ont porté sur :

⁴Laboceia : regroupement des laboratoires départementaux d'analyse du Finistère et des Côtes-d'Armor.

⁵Oniris : L'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique

- la réalisation de l'état des lieux de l'évolution de l'antibiorésistance pour les bactéries *Aeromonas spp.* et *Yersinia ruckeri*, en me basant sur les commémoratifs des analyses faites au sein de l'unité Anses durant les 30 dernières années, données complétées par l'apport de deux partenaires du projet : Laboceia et Oniris.
- la mise au point des conditions d'infections expérimentales optimales dans le cadre de la préparation d'une épreuve infectieuse à des fins de sélection sur le couple bar commun (*Dicentrarchus labrax*) / *Vibrio harveyi*.

2. Partie Bibliographie

2.1. Présentation des bactéries étudiées : *Aeromonas*, *Yersinia* et *Vibrio*

Ces trois genres regroupent des bactéries à Gram négatif munies de flagelles leur permettant de se mouvoir dans leur environnement, à l'exception du genre *Yersinia* qui est immobile. Parmi les *Aeromonas* responsables de cas pathologiques chez les poissons, l'espèce *salmonicida* est probablement la plus fréquemment rencontrée dans le monde. La maladie peut schématiquement prendre deux formes en fonction de l'espèce de poissons touchée : une septicémie hémorragique systémique (appelée furunculose et caractérisée par la présence de lésions de type furoncles au niveau des tissus musculaires) chez les salmonidés (truites fario et arc en ciel, saumons atlantiques et pacifiques), accompagnée d'une léthargie, d'une décoloration de la robe, d'une inappétence ; et des ulcérations chez les poissons marins et les cyprinidés (2).

Yersinia ruckeri, identifiée pour la première fois aux Etats Unis en 1956, est apparue dans les années 1980 en Europe. Elle touche principalement les salmonidés en élevages continentaux ou marins, mais peut être retrouvée dans d'autres familles comme par exemple les Ictaluridés (4). Elle provoque chez son hôte une hémorragie sous-cutanée donnant lieu à un rougissement de la bouche, du crâne, de la base des nageoires ou encore des yeux qui présentent une exophtalmie (5).

Parmi la grande variété d'espèces appartenant au genre *Vibrio*, deux se démarquent ces dernières années en pathologie piscicole, *V. anguillarum* et *V. harveyi*. Ce genre touche les salmonidés et un certain nombre d'espèces marines (bars, soles, turbots, ...), avec des symptômes proches de ceux provoqués par *Aeromonas salmonicida* (hémorragie, lésions nécrotiques au niveau de la peau, anémie, décoloration, ...) (6).

2.2. Modes d'action des antibiotiques et mécanismes de résistance associés

Pénicillines

Découverte par Alexander Fleming en 1929, la pénicilline est issue du champignon *Penicillium notatum*, et fait partie de la famille des bêta-lactamines. Elle ne fut cependant purifiée qu'à partir des années 40. Les bêta-lactamines agissent sur le peptidoglycane en inhibant les transpeptidases et les carboxypeptidases, responsables des liaisons peptidiques du peptidoglycane. Cette inhibition provoque un déséquilibre entre la synthèse et le réarrangement du peptidoglycane, en avantageant les autolysines, ce qui a un effet bactéricide. Cependant, pour qu'elles soient efficaces, les bêta-lactamines doivent atteindre leurs cibles. Pour cela elles peuvent circuler par voie lipophile ou à travers des porines, qui sont leur chemin préférentiel.

Les différences de perméabilité (tailles des porines, ralentissement par la membrane, charge électrique ou hydrophilie des antibiotiques) jouent un rôle dans la résistance phénotypique des espèces bactériennes. De plus, la présence de bêta-lactamase dans l'espace périplasmique peut endiguer l'action des antibiotiques. Enfin, l'affinité des bêta-lactamines avec les enzymes cibles peut, elle aussi, être un facteur de résistance. Une bactérie peut devenir résistante lorsque qu'une mutation modifie l'affinité entre les antibiotiques et les enzymes cibles ou lorsqu'un facteur lié à la membrane est modifié (perméabilité ou apparition de systèmes d'efflux). L'amoxicilline, antibiotique hydrolysable, ne sera actif que si sa vitesse de pénétration est supérieure à celle de l'hydrolyse par l'enzyme (7).

Quinolones

Les antibiotiques de cette famille agissent sur l'ADN des bactéries (8),(9). En effet, les molécules se fixent sur des enzymes telles que la DNA gyrase ou la topoisomérase IV, empêchant ainsi la synthèse et/ou la réparation de l'ADN en clivant les domaines de ces enzymes. Cependant, il semblerait que la résistance observée de certaines souches soit elle aussi liée à ces clivages. La mutation Ser-83-Trp de la gyrase A (sous-unité de la DNA gyrase) serait la mutation responsable de la résistance d'*Escherichia coli* des bactéries aux quinolones. (10),(11),(12). Un autre gène, *qnrS2*, issu quant à lui d'*Aeromonas punctata* a été identifié comme responsable de l'augmentation de la valeur de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) après transfert sur *E. coli* (13).

Phénicolés

Les antibiotiques de la famille des phénicolés agissent sur la synthèse des protéines en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome. En effet, ces antibiotiques empêchent la liaison entre le complexe amino-acyl-ARNt et son site de fixation. La réaction de transpeptidation n'a alors pas lieu. La résistance envers le chloramphénicol peut être due à la production par la bactérie d'une enzyme, la chloramphénicol-acétyltransférase (14). Cette enzyme étant codée par un gène

plasmidique, il est possible qu'il y ait une dissémination génétique intra et interspécifique. Un autre mécanisme est envisageable, mais plus rare : un changement de perméabilité de la membrane qui empêcherait l'antibiotique d'agir. De plus, il a été montré que certaines bactéries présentaient des résistances au chloramphénicol par des mutations de gènes impliqués dans le métabolisme, les réponses face aux stress, la régulation génique, les pompes d'efflux, ou la synthèse de protéines (15).

Tétracyclines

Les tétracyclines, comme les phénicolés, sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines qui agissent sur le ribosome. Ils se fixent sur la sous-unité 30S, empêchant ainsi la fixation des ARNt sur le ribosome, et donc l'interaction entre le codon et l'anticodon. Des gènes de résistance ont déjà été identifiés et nommés *tetA* à *tetE* (16). Il a été décrit deux principaux types de résistance : des mécanismes d'efflux, majoritaires, qui permettent de rejeter l'antibiotique aussi vite qu'il ne pénètre dans la bactérie ; une fixation inhibée de l'antibiotique sur le ribosome via une protéine bactérienne (17). Cette résistance aux tétracyclines est inquiétante car les gènes plasmidiques impliqués sont transmissibles, avec une dissémination facilitée, particulièrement par conjugaison (18),(19),(20),(21).

Sulfamides

Les sulfamides sont peu utilisés seuls, car leur effet est alors bactériostatique⁶. Au contraire, en combinaison avec le triméthoprim, le mélange devient bactéricide. Ces deux composés agissent sur le métabolisme de l'acide folique de la bactérie, molécule indispensable pour la synthèse d'acides nucléiques, mais à des niveaux différents.

La résistance aux sulfamides est associée au changement d'un acide aminé, qui va modifier la conformation de la ptéridine synthétase. Ce changement ne permet plus aux sulfamides de se lier avec cette enzyme, qui a alors plus d'affinité avec son substrat d'origine. Elle peut aussi être due à une hyperproduction d'acide para-aminobenzoïque, ou à une modification de la structure de la dihydrofolate synthétase (mutation chromosomique). Par transfert plasmidique, la bactérie peut obtenir la capacité de modifier la perméabilité de sa membrane, ou elle peut synthétiser une enzyme sur laquelle se fixera l'antibiotique, l'empêchant ainsi d'inhiber l'enzyme fonctionnelle. La résistance au triméthoprim est quant à elle apparemment issue d'un transfert de gènes qui se trouvent sur les plasmides. Souvent, ces gènes sont liés à d'autres gènes de résistance, donnant des bactéries multi-résistantes (22).

⁶ Un antibiotique a un effet bactériostatique lorsqu'il inhibe la multiplication des bactéries sans impliquer leur mort. A l'inverse, un effet bactéricide indique la mort des bactéries.

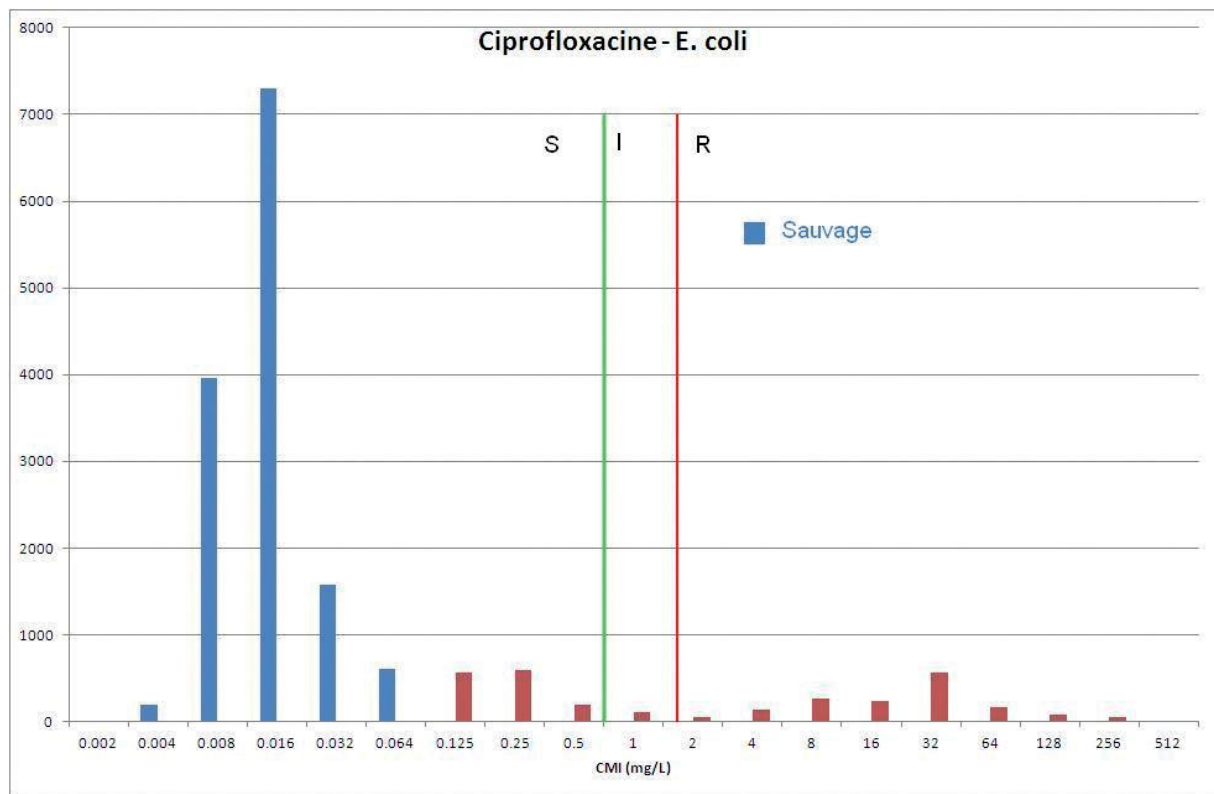


Figure 1. Distribution du nombre de souches testées en fonction des valeurs des concentrations minimales inhibitrices de ciprofloxacine vis-à-vis d' *Escherichia coli* (n= 16702, 55 sources de données) et de *Salmonella sp* (n=1733, 3sources de données) - Seuil épidémiologique = 0,064 mg/L, Concentration critique basse = < 0,5 mg/L (ligne verte),haute = > 1 mg/L (ligne rouge). Extraction de la base de données EUCAST <http://mic.eucast.org>, 17-04-2012

(d'après Sanders et Laurentie, 2012) (23)

2.3. Antibiorésistance

La notion d'antibiorésistance est aussi vieille que la découverte de la pénicilline, dans les années 1940. Les premiers à proposer le concept de valeur seuil (*breakpoint*) ont été Ericsson et Sherris, au début des années 70. Cette valeur permettait de différencier les souches sensibles des souches résistantes. Cependant, il n'y avait à cette époque aucune modalité de détermination de cette valeur. Lorsque les phénomènes d'antibiorésistance devinrent trop importants, un système de surveillance a été mis en place, et il a donc fallu que les valeurs des seuils critiques soient harmonisés. L'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) a pour mission depuis 2002 d'établir les concentrations critiques de tous les nouveaux médicaments pour l'homme.

La concentration seuil épidémiologique est définie pour chaque couple espèce bactérienne/antibiotique et permet de distinguer les souches « sauvages » (Wild-Type, WT) des « non-sauvages » (Non Wild-Type). Les trois catégories possibles (Sensible S, Intermédiaire I ou Résistants R) sont quant à elles délimitées par la concentration minimale basse, *c*, et la concentration minimale haute, *C* (Figure 1) (23, 24).

2.4. Mécanismes de transfert de gènes

Le transfert de gènes est un élément clé dans l'acquisition et la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Trois grands mécanismes de transfert ont été décrits : la transformation, la transduction et la conjugaison.

La **transformation** résulte de l'absorption d'ADN dans l'environnement par la bactérie. Cependant, toutes les bactéries n'en sont pas capables, et celles qui le sont ne le peuvent qu'à un certain stade de leur croissance. C'est en effet lorsqu'elles produisent une protéine spécifique : le facteur de compétence. L'absorption des bactéries à Gram – et à Gram + diffère : les Gram + absorbent de l'ADN simple brin tandis que les Gram - absorbent de l'ADN double brin. Le processus nécessite une recombinaison homologue, qui aboutit à une substitution de l'ADN receveur par l'ADN donneur.

La **transduction** est un transfert de gènes nécessitant l'action d'un bactériophage tempéré, c'est-à-dire qu'il n'induit pas la lyse de la bactérie immédiatement, mais va insérer son génome dans celui de la bactérie, appelée alors lysogène, qui le répliquera. Il pourra ensuite devenir virulent et induire la lyse de la cellule. Lors de l'infection par un phage, l'ADN d'une bactérie peut accidentellement être emporté et transféré ainsi à une autre bactérie. Si le phage est spécifique d'une espèce bactérienne, le transfert ne se fera qu'au sein de cette espèce. En revanche, si le phage affecte plusieurs espèces, il peut alors y avoir un transfert horizontal interspécifique. Si une bactérie infectée transmet les gènes acquis par l'intermédiaire du phage à ses descendants (transfert vertical), la transduction est dite complète ou généralisée.

Enfin, la **conjugaison** consiste à un transfert de gènes unidirectionnel, parfois total, entre deux bactéries. La première bactérie, qui possède un facteur de sexualité ou de fertilité (F) dite donneuse (mâle) va entrer en contact avec la bactérie réceptrice (femelle) à l'aide de pilis. Ce mode de transfert est similaire au transfert plasmidique. Plus que les deux premiers, c'est ce dernier mécanisme de transfert qui joue un rôle important dans les phénomènes d'antibiorésistance.



Figure 2. Inventaire des souches disponibles.

ANIMAUX PRODUITS		A EXAMINER	ANALYSES EFFECTUEES	RESULTATS	Code tarif	MONTANT
7160 7161 7162 7163 7164			EXAMEN - AUTOPSIE	Lésions ulcéro-inflammatoires nombreuses sur le museau et sur les flancs. Pas de lésion interne.		
E 1213 E 1214			BACTERIOSCOPIE - RECHERCHE	PARASITAIRE : Présence de myxobactéries sur le pourtour des lésions cutanées. Absence de parasites cutanés ou branchiaux.		
RA RA			BACTERIOLOGIE	Bactériémie non négligeable à germes divers apparentés sérologiquement à <i>Yersinia</i> . Une identification plus approfondie montre qu'il s'agit de germes différents et probablement d'infection secondaire.		
1/5			Conclusion	Des bains antibactériens sont proposés en un premier temps contre les myxobactéries. Un traitement fluméquine est ensuite proposé pour prévenir un risque de septicémie à <i>Yersinia ruckeri</i> .		
500ml 200ml						
ass 400ml 1						
400ml 400ml						

Ministère de l'Agriculture
Direction de la Qualité - Services Vétérinaires

LABORATOIRE NATIONAL DE PATHOLOGIE
DES ANIMAUX AQUATIQUES

IPHEMER Centre de Brest
QUADRE
B. P. 337 - 29273 BREST CEDEX

RECEVUE DE PAIEMENT (1) n° 119
et RESULTATS D'ANALYSES E 1213-1214
Demandes le 7/06/85 par :
Monsieur D. CONSTANT
Ecole Supérieure
CARRÉE
DUC/LEMER

Tél : (98) 45.80.55

Brest, le 9 juillet 1985

Figure 3. Carnet d'analyses bactériologiques et commémoratif.

3. Matériels et Méthodes

3.1. Partie 1. Etat des lieux de la résistance de souches d'*Aeromonas spp* et de *Yersinia ruckeri*.

3.1.1. Inventaire / bilan des souches disponibles et sélection des isolats d'intérêt

Un inventaire des souches bactériennes (tous genres confondus) issues de diagnostics liés à des cas pathologiques observés sur le terrain a été réalisé à partir du listing informatique recensant les souches conservées sous forme lyophilisées depuis 1982 au sein de l'UPVP. La vérification a porté sur i) la correspondance entre le listing et les isolats effectivement stockés et ii) le dénombrement de la quantité de tubes disponibles par souches (Figure 2). A partir de cette base, les souches retenues pour la suite des opérations devaient répondre aux critères suivants :

- Identifiées comme *Yersinia ruckeri* ou *Aeromonas spp*. par approche biochimique (API 20E);
- Isolées dans la région Grand Ouest (Pays de la Loire inclus)
- Isolées de toutes espèces de poissons (eau douce/ de mer), sachant que la majorité des isolats vient de salmonidés.

Laboce, partenaire du projet, a réalisé dans le même temps et sur les mêmes critères un inventaire des souches en sa possession.

3.1.2. Analyse des commémoratifs des isolats sélectionnés

Un tableau de synthèse a été établi afin de recueillir, pour chacune des souches sélectionnées, les informations disponibles dans les commémoratifs. Au sein de l'UPVP, les archives sont sous format papier, classées par année. Un numéro d'ordre (n° ANSES) a été attribué à chacun des échantillons reçus pour analyse et permet, à partir du listing de souches sélectionnées pour notre étude, de retrouver l'ensemble des données associées (demande d'analyse, contexte (espèce, signes cliniques éventuels,...), diagnostics effectués et résultats, bulletin analytique, ...(Figure 3).

Le tableau de synthèse regroupe les catégories suivantes :

- l'année d'isolement,
- le nom du demandeur (vétérinaire, pisciculteur, ...),
- la date de prélèvement,
- l'espèce du poisson,
- la nature de l'organe à partir duquel a été effectué le prélèvement (généralement rein antérieur mais pas seulement),
- l'origine géographique du poisson,
- la taille et le poids des poissons,
- s'il y a lieu, une description des symptômes,
- l'espèce bactérienne isolée,
- le n° interne à l'ANSES (ou à LABOCEA),
- la méthode d'identification utilisée (généralement identification basée sur tests biochimiques API 20E adaptés pour la caractérisation des enterobactéries et autres bacilles à gram négatif),
- l'antibiogramme, si celui-ci a été réalisé,
- des éventuels commentaires d'intérêt (traitement antibiotique appliqué, ...),
- le numéro de référence interne du demandeur d'analyse.

Tableau 1. Familles d'antibiotiques

FAMILLES	Antibiotiques
Pénicillines	Amoxicilline (AMX) + Ampicilline (AM) + Amoxicilline et acide clavulanique (AMC)
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine (CIP) + Fluméquine (FLU) + Acide oxolinique (OA) + Acide nalidixique (A. Nal *)
Phénicoles	Chloramphénicol (C) + Florfénicol (FFC)
Cyclines	Oxytétracycline (OT) + Docycyline (DO) + Tétracycline (TE)
Lincosamides	Lincomycine (L)
Sulfamides	Sulfamide (SSS) + Triméthoprim-sulfaméthoxazole ou Triméthoprim-sulfadiazine (SXT)
Nitrofuranes	Furanes (FUR)

*l'Acide nalidixique est très peu utilisé

-

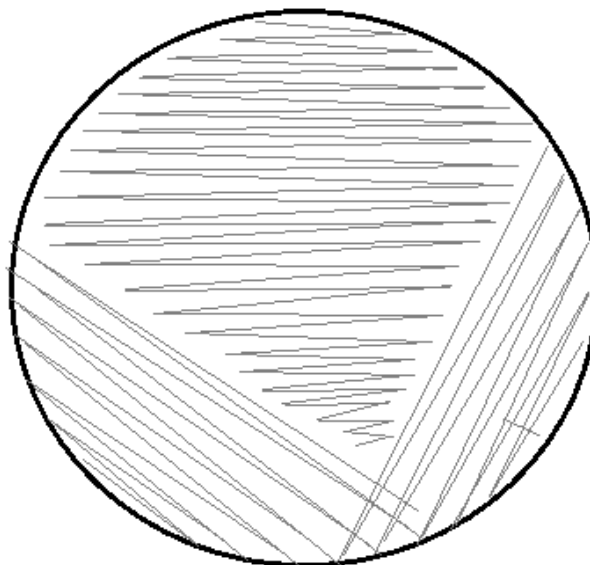


Figure 4. Isolement par épuisement sur boîte de Pétri.

Ce tableau a été renseigné pour toutes les souches de l'Anses et de LABOCEA. L'ensemble de ces souches a été renommé selon le modèle suivant : GENRE (Y pour *Yersinia* et A pour *Aeromonas*)-ANNEE D'ISOLEMENT (par exemple 85 pour 1985) – NUMERO CHRONOLOGIQUE. Ce numéro, commun à tous les partenaires du projet, permettra d'uniformiser les numérotations de chacune des structures et de faciliter la mutualisation des souches.

3.1.3. Etude de la résistance / sensibilité aux antibiotiques

Les résultats d'antibiogramme répertoriés dans le tableau ont été analysés afin de déterminer les grandes tendances de résistance des deux genres en fonction des antibiotiques testés. Pour plus de lisibilité, les différents antibiotiques rencontrés ont été regroupés par familles (Tableau 1) et un code couleur a été utilisé pour détailler l'antibiorésistance : les souches sensibles (S) ont été colorés **en vert**, les résistantes (R) **en rouge** et les intermédiaires (I) **en orange**. Les pourcentages de souches résistantes et sensibles pour chacun des genres ont été calculés pour l'ensemble de la période considérée mais également en découpant les données sur des périodes plus courtes, afin de mieux appréhender les tendances associées à des événements survenus dans les filières (vaccination, nouvel antibiotique, ...).

3.1.4. Elaboration d'un questionnaire destiné aux vétérinaires aquacoles

Pour pouvoir interpréter les profils d'évolution des résistances aux différents antibiotiques obtenus, une analyse des pratiques du terrain est nécessaire.

Afin de compléter les données d'une enquête sur les prescriptions vétérinaires en piscicultures sur la période 2001-2005 réalisée par l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (AMNV), un questionnaire a été élaboré à destination des praticiens. Ce questionnaire est présenté en annexe 1. Il a été adressé à certains vétérinaires aquacoles. Les retours feront l'objet d'une analyse et d'une synthèse.

3.1.5. Essais de repiquage et identification des souches par MALDI-TOF

En parallèle de cette étude documentaire de l'évolution de l'antibiorésistance, des essais ont été effectués pour remettre en culture les souches bactériennes lyophilisées de l'UPVP.

Pour cela, un volume de 1 mL de bouillon Trypticase soja (TSB) a été ajouté à l'aide d'une pipette dans le microtube contenant la souche lyophilisée, puis le mélange a été brièvement vortexé. Cette solution a ensuite été étalée sur deux boîtes de Pétri contenant une gélose Mueller-Hinton (MH). Sur la première boîte, 100 µL de la solution remise en suspension et des billes d'étalement en verre ont ainsi été déposés sur la surface de la gélose, puis le tout a été secoué et retourné, afin d'éviter que les billes ne restent collées sur la gélose. Sur la seconde, la solution bactérienne a été déposée et étalée en stries à l'aide d'une oese de 10µL, comme présenté sur la Figure 4. Chaque boîte réalisée et flacon d'origine ont été incubés à 22°C s'il s'agissait d'*Aeromonas* et à 37°C s'il s'agissait de *Yersinia*.

Le même protocole a été réalisé le lendemain à partir des flacons, sur les mêmes souches, pour confirmer les précédentes.

Lorsque les souches se sont développées, une colonie a été piquée et ré-isolée sur milieu MH à l'aide d'une oese. La boîte a été incubée à 22°C pour les souches d'*Aeromonas*, à 37°C pour les souches de *Yersinia*, pendant 24 à 48 heures.

Lorsque les nouvelles boîtes ont présenté suffisamment de colonies, les souches ont été conservées. A l'aide d'une oese de 10µL, la moitié de la boîte a été raclée, puis les colonies ainsi récupérées ont été déposées dans un cryotube contenant 1mL de mélange d'eau peptonée tamponnée et de glycérol à 20%.

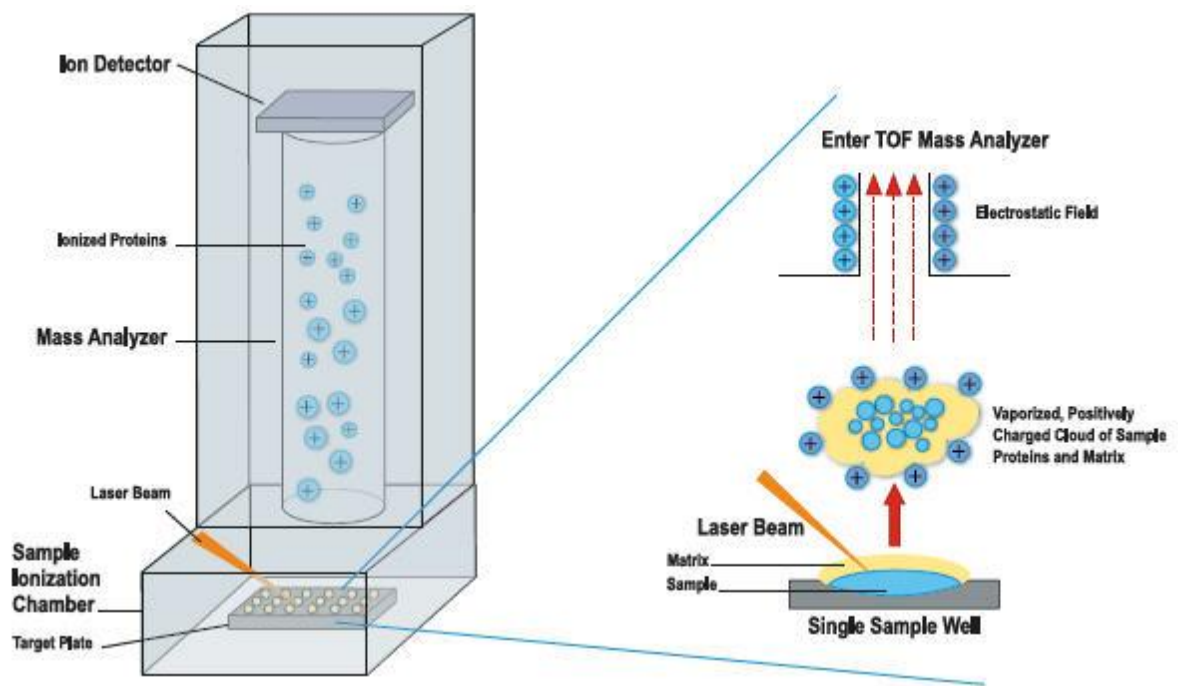


Figure 5. Principe du MALDI-TOF



Figure 6. Bacs de 50L pour les infections expérimentales.

De même, un doublon a été réalisé avec l'autre moitié de la boîte. Une fois conservées, les souches ont été gardées au congélateur, à une température de -18°C.

Après la phase d'essai, l'ensemble des souches disponibles a été repiqué en procédant selon le protocole décrit ci-dessus.

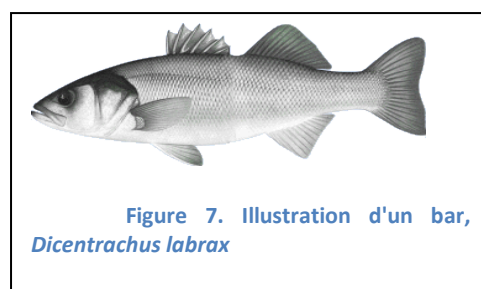
Les doublons ont été envoyés à Labocéa pour vérifier l'identification initiale (API20E) par MALDI-TOF, technique basée sur l'analyse du profil protéique (Figure 5).

Le spectromètre de masse MALDI-TOF utilise un laser comme source d'ionisation assisté par une matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation) et un analyseur temps de vol (Time Of Flight). Cette technique permet d'ioniser des molécules de grandes tailles, sensibles à la chaleur et peu volatiles sans les dégrader. Après avoir mélangé la souche à identifier à la matrice et l'avoir fait sécher, le mélange cristallisé a été déposé sur des plaques. La matrice, grâce à sa grande réactivité pour l'absorption de la lumière UV, protège les molécules protéiniques de la dégradation. L'effet du laser est double : il vaporise la matrice, libérant les peptides (désorption) puis la matrice transfère ses protons à l'analyte, produisant une ionisation des protéines. Des détecteurs situés dans un tube sous vide permettent de calculer le temps de « vol » de ces protéines. Plus la molécule est grande, plus elle mettra de temps à atteindre le détecteur. Suivant ce temps, et donc suivant la masse, un classement est obtenu ainsi qu'un spectre de masse ([2 000 : 20 000] Da) qui est comparé avec ceux de la base de données, contenant environ 4000 souches de référence. L'appareil propose dix possibilités, avec chacune une valeur. Si la valeur est 3, il s'agit d'une correspondance parfaite (impossible à obtenir en pratique), si la valeur se situe entre 2 et 3, l'espèce est confirmée, entre 1,8 et 2, le genre est confirmé, en dessous de cette valeur en revanche, le genre reste incertain.

3.2. Partie 2. Mise en place d'une épreuve infectieuse à *Vibrio harveyi* chez le bar

3.2.1. Poissons

Les bars (*Dicentrarchus labrax* ; poids moyen de 10g ; non-vaccinés) ont été fournis à l'Anses par AquaNord Ichthus. Ils ont été réceptionnés le 1^{er} avril 2015 et acclimatés environ quinze jours jusqu'à utilisation pour les pré-tests. Le stock a été conservé dans deux bassins de 400L, avec un débit de 120L/h en moyenne. Les animaux ont été nourris à minima deux fois par jour avec des granulés adaptés.



Les pré-tests ont été réalisés en bacs de 50L (10 poissons/bars) (Figure 6).

Des couvercles ont été positionnés sur les bacs afin de maîtriser le cycle jour/nuit et favoriser le bien-être des animaux. Un débit de 20L/h en moyenne a été mis en place.

Les poissons ont subi, durant la phase d'acclimatation, une analyse virale (n=10 poissons) et bactérienne (n=18) à large spectre afin de vérifier leur statut sanitaire.

Tableau 2. Récapitulatif des souches de *Vibrio harveyi*

	Nom	Origine
Souche 1	58149 Aq14,23	isolée élevage
Souche 2	58687 Aq14,22	isolée élevage
Souche 3	58161 Aq14,24	isolée élevage
Souche 4	58173 Aq14,25	isolée élevage
Souche 5	94473 1811603 ADN 553 P2	Vaccinale
Souche 6	10BD 1174609 Rate 94469	Vaccinale



Figure 8. Bars anesthésiés à l'Eugénol.



Figure 9. Injection par voie intra péritonéale.

3.2.2. Eau

Au sein de l'Unité PVP, les salles d'expérimentation sont alimentées en eau de mer traitées en entrée de circuit par une filtration sur sable (environ 50 µm). Des échangeurs permettent de réguler la température de l'eau. Pour les phases de contaminations expérimentales, les bars ont été maintenus dans une eau de mer régulée entre 20 et 22°C, en circuit ouvert. Les effluents contaminés ont été recueillis dans une cuve de 10m³ où ils ont subi une chloration adaptée préalablement à leur rejet.

3.2.3. *Vibrio harveyi*

Un total de six souches bactériennes fournies par le vétérinaire (Dr Alain LE BRETON) en charge de la société AquaNord Ichthus a été testé dont deux souches vaccinales (Tableau 2)

Les souches ont été multipliées sur géloses trypticase soja (TSA).

Les suspensions bactériennes pour l'inoculation ont été préparées à partir de culture en gélose et/ou en bouillon trypticase soja de 24 heures (phase exponentielle de croissance). Pour chaque souche, un volume (1 à 3mL) de tampon phosphate stérile (PBS 1X) a été déposé à la surface de la gélose puis celle-ci a été grattée, afin de décoller les bactéries, à l'aide d'un râteau en verre stérile. Cette solution a ensuite été récupérée et le volume ajusté si nécessaire avec du PBS 1X. Pour les cultures en bouillon, un volume de la suspension obtenue a été directement utilisé.

La D.O. (Densité Optique) (600 nm) des inocula a été déterminée afin d'évaluer la quantité approximative de bactéries présentes. Une correspondance a été établie entre une DO d'environ 1 et la quantité de bactéries présentes en UFC/mL. Pour ce faire, certaines suspensions bactériennes dont la DO a été ajustée à 1 ont été diluées en série au 1/10^{ème} et 100 µL des dilutions -7 et -8 ont été étalés sur boîtes (en triplicat) puis les colonies ont été dénombrées. Sur cette base, il a été établi qu'une DO de valeur 1 correspondait à une quantité d'environ 7.10⁸ UFC/mL.

3.2.4. Infections expérimentales :

L'Unité PVP est agréée pour la réalisation d'expériences sur les animaux vertébrés vivants sous le numéro C 29-212-3 (Arrêté de la Préfecture du Finistère n° 2009-0751 du 20 mai 2009). La démarche expérimentale suivie a été validée par le Comité d'Ethique COMETH associant l'ANSES, l'ENVA et l'UPEC (Avis n°29/01/13-05 du 29 janvier 2013).

Les poissons ont été anesthésiés avec une dose de 10 ppm d'Eugénol (2 mL d'une solution à 10% dans 10 L d'eau)(Figure 8). Les infections expérimentales ont été réalisées par injection par voie intra-péritonéale (IP) (Figure 9) de 100 µL de suspension bactériennes de D.O. calibrée. Un groupe contrôle inoculé avec du PBS ou du bouillon TSA stérile a été systématiquement réalisé pour chaque série d'expérimentation.

Test de virulence :

Le premier test effectué a consisté à s'assurer que les six souches reçues étaient bien pathogènes. Pour ce faire, 10 poissons par souche ont reçu par voie IP une dose bactérienne forte (D.O. comprise entre 0.466 et 0.931).

La mortalité a été enregistrée durant les 48 heures post-infection (pi).

Détermination de la DL₅₀ :

Dans un second temps, la Dose Léthale 50% (DL₅₀), dose pour laquelle 50% des individus meurent, a été déterminée pour l'une des souches vaccinales (souche 5). A partir d'une suspension à une DO initiale de 1, des dilutions au 1/2, 1/5^{ème}, 1/10^{ème},

1/20^{ème} et 1/50^{ème} ont été préparées puis injectées à 10 poissons par dilutions. De plus, 10 autres poissons ont été infectés par une suspension de la même souche mais cultivée en bouillon, elle aussi à une dilution de 1/2.

L'apparition d'éventuels signes cliniques et les cinétiques de mortalité ont été suivies sur une période de 6 jours pi. Les taux de mortalité pour chaque dose bactérienne ont été déterminés.

Sur la base de ces taux de mortalité, un nouveau test a été réalisé en resserrant l'intervalle des concentrations. Soixante-dix nouveaux poissons ont été répartis à raison de 10 individus par bac. Toujours à partir d'une suspension à une DO initiale de 1, des dilutions au 1/2, 1/3, 1/4 et 1/5 ont été préparées puis injectées. Les dilutions au 1/3 et au 1/4 ont été réalisées en duplicate. Un bac de 10 poissons a été injecté avec du TSB (témoins). La mortalité a été suivie durant les 11 jours pi.

Vérification de la reproductibilité :

La dose s'approchant de la DL₅₀ ainsi que les deux doses au-dessus et au-dessous ont également été testées à plusieurs reprises dans le temps afin de s'assurer de l'absence de perte de virulence associée aux passages en culture *in vitro* et/ou à la croissance des poissons.

Dans certains cas, des ré-isolements de souches ont été effectués sur milieu TSA à partir du rein antérieur des poissons morts, pour confirmer la présence de colonies bactériennes de type *Vibrio*.

3.2.5. Mise en place d'une PCR spécifique de l'espèce *Vibrio harveyi* :

Les extractions ont été réalisées comme décrites dans la publication de Pang et al. (2006) (25). Pour les PCR (Polymerase Chain Reaction), des ajustements ont été fait. Le mix réactionnel est indiqué dans le tableau suivant :

Tableau 3. Volumes utilisés pour la première PCR

Réactif (Concentration)	Volume pour une réaction (µL)
Echantillon d'ADN (100ng)	1
Buffer II (10x)	5
MgCL ₂ (25mmol/L)	3
dNTPs (10mmol/L)	0,5
Taq Gold (5µ/µL)	0,5
toxRF1 20µM	2
toxRR1 20µM	2
eau distillée qsp 50	36

Après 8 minutes à 95°C, les conditions d'amplification étaient de 40 cycles à 94°C, 55°C puis 72°C pendant 45 secondes pour chaque étape. Enfin, 10 minutes supplémentaires à 72°C.

Vingt µL de chaque produit de PCR et 2 µL de tampon de charge ont été déposés sur gel d'électrophorèse à 1%. Les puits 1 à 4 contenaient les extraits purs des souches 1, 2, 4 et 5. Les puits 9 à 12 contenaient les dilutions au 1/10^{ème} de ces mêmes souches.

Un témoin négatif où l'échantillon d'ADN a été remplacé par de l'eau ultrapure stérile et des ADN extraits de souches d'autres espèces de *Vibrio* ou d'autres genres bactériens ont été intégrés aux analyses.

4. Résultats-Discussion

4.1. Partie 1. Etat des lieux de la résistance des souches *Aeromonas* et *Yersinia spp.*

4.1.1. Etude des données issues des commémoratifs

Le tri réalisé a permis de constituer un soucier de 392 isolats. Le tableau commun établi, il a été possible d'avoir un état des lieux de l'antibiorésistance des souches de *Yersinia* et d'*Aeromonas*. Avec un total de 98 souches de *Yersinia* testées pour leur sensibilité aux antibiotiques et 196 souches d'*Aeromonas*, une première approche de l'antibiorésistance a été réalisée.

Pour mieux comprendre l'évolution du comportement de ces genres bactériens face aux antibiotiques, les données ont été regroupées en périodes de cinq ans, et un tableau de pourcentages de sensibles (S), résistants (R) et intermédiaires (I) a été établi. Ces périodes vont de 1985 à 2015, cependant, les données collectées n'ont pas permis de nous renseigner sur la période 2000-2005.

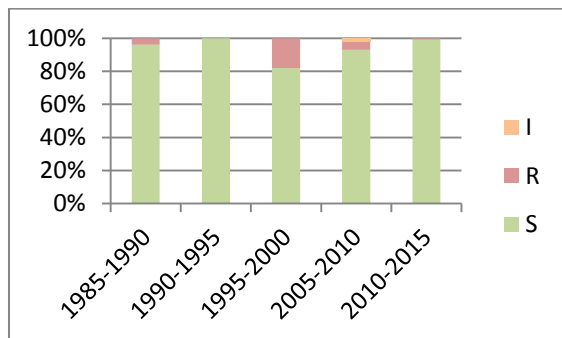


Figure 10. Histogrammes des pourcentages de souches sensibles (S), résistantes (R) et intermédiaires (I) par périodes pour *Yersinia*.

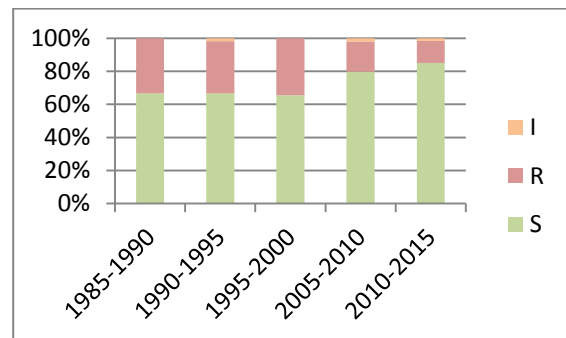


Figure 11. Histogrammes des pourcentages de souches sensibles (S), résistantes (R) et intermédiaires (I) par périodes pour *Aeromonas*.

On remarque tout d'abord la différence de comportement entre ces deux genres bactériens. En effet, le genre *Aeromonas* présente globalement un niveau de résistance aux antibiotiques testés plus important que *Yersinia ruckeri*, avec un minimum de 13% de souches résistantes (période 2010-2015).

On note pour ces deux genres bactériens que le plus fort taux de souches résistantes a été observé durant la période 1995-2000. Après cette période, et bien que les années 2000-2005 ne soient pas renseignées, ce taux de résistance diminue (-16,3% pour *Aeromonas* et -13,0% pour *Yersinia*). Cela est probablement dû aux changements de pratiques en laboratoires. En effet, à la fin des années 90, et plus précisément en 1997, plusieurs antibiotiques ont été interdits et/ou remplacés par d'autres. Par exemple, le chloramphénicol (C), du fait de sa toxicité, a été remplacé par le florfénicol (FFC). Un changement d'antibiotique implique un changement de molécule, ce qui a probablement permis de gagner en efficacité thérapeutique du fait de l'absence, chez les bactéries ciblées, de mécanismes adaptés de résistance. Il est par contre probable qu'après une période plus ou moins longue d'utilisation et en fonction de mode d'action de ces nouvelles molécules, des résistances finissent par apparaître au sein de la population bactérienne.

Un tableau représentant les pourcentages de résistance aux différents antibiotiques cités dans les commémoratifs a ensuite été construit, en précisant le nombre de souches testées pour chacun d'entre eux afin d'obtenir les graphiques suivants.

Certains antibiotiques tels que l'Ampicilline (AM, n=2 pour *Y. r.*, n=15 pour *Aero.*), l'Acide Nalidixique (Ac. Nal., n=3 pour *Y.r.*, n=1 pour *Aero.*), la Ciprofloxacine (CIP, n=3 pour *Y.r.*, n=10 pour *Aero.*), la Doxycycline (DO, n=2 pour *Y.r.*, n=16 pour *Aero.*), la Lincomycine (L, n=2 pour *Y.r.*, n=17 pour *Aero.*), les sulfamides (SSS, n=2 pour *Y.r.*, n=11 pour *Aero.*) et les furanes (Fur., n=14 pour *Y.r.*, n=12 pour *Aero.*), qui n'ont été que rarement utilisés (AM, Ac. Nal., DO), qui ne couvraient pas suffisamment de périodes (CIP, Fur.) ou dont l'inefficacité face aux bactéries Gram négatif est aujourd'hui reconnue (26) n'ont pas été discutés par la suite.

De manière générale et sur toutes les périodes confondues, il semble que *Yersinia* présente une assez bonne sensibilité aux antibiotiques testées (maximum 10,5% de résistants (AMX)), à l'inverse d'*Aeromonas* qui montre des niveaux de résistance plus élevés pouvant aller jusqu'à 68,75%, et vis-à-vis de plus d'antibiotiques. De ce fait, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux résultats obtenus pour *Aeromonas* par la suite.

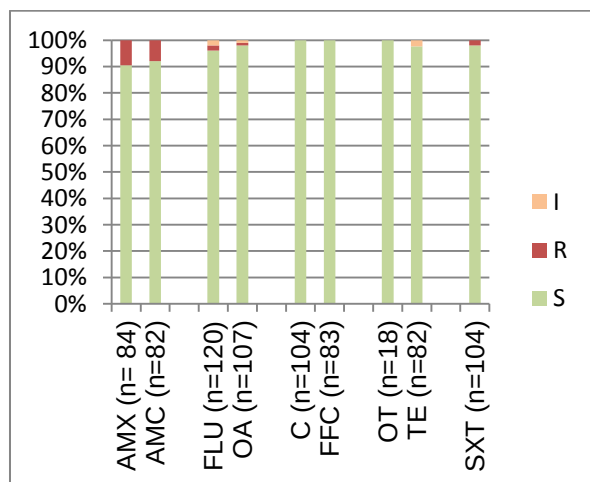


Figure 12. Pourcentages de souches sensibles (S), résistantes (R) et intermédiaires (I) pour chaque antibiotique testé pour *Yersinia*

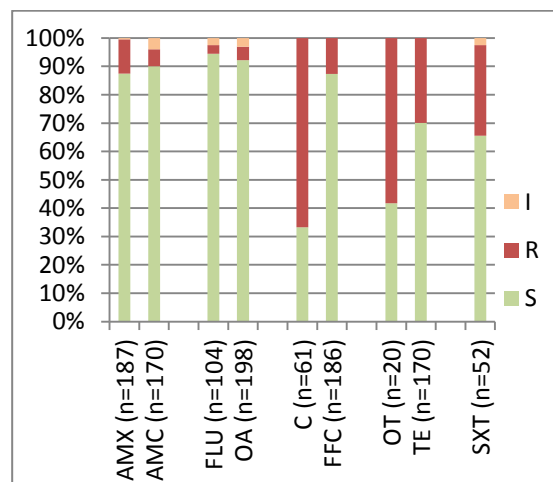


Figure 13. Pourcentage de souches sensibles (S), résistantes (R) et intermédiaires (I) pour chaque antibiotique testé pour *Aeromonas*.

La Figure 13 met en évidence que les pénicillines et les quinolones ne présentent pas de grands taux de résistance. Le florfenicol montre lui aussi peu de résistants (13%) contrairement au chloramphénicol, de la même famille (phénicolés), utilisé avant 1997 et qui était associé un taux de résistants de près de 69%. Les deux autres familles d'antibiotiques, à savoir les tétracyclines et les sulfamides sont quant à elles confrontées à un phénomène de résistance significatif avec une moyenne de 40,7% de résistants pour les tétracyclines et 33% pour les sulfamides.

Ces tableaux et graphiques ne renseignant pas suffisamment sur l'évolution de la résistance de ces deux genres aux antibiotiques choisis, une seconde série de tableaux et graphiques plus détaillés a permis d'approfondir l'interprétation des résultats pour *Aeromonas*.

➤ Pénicillines

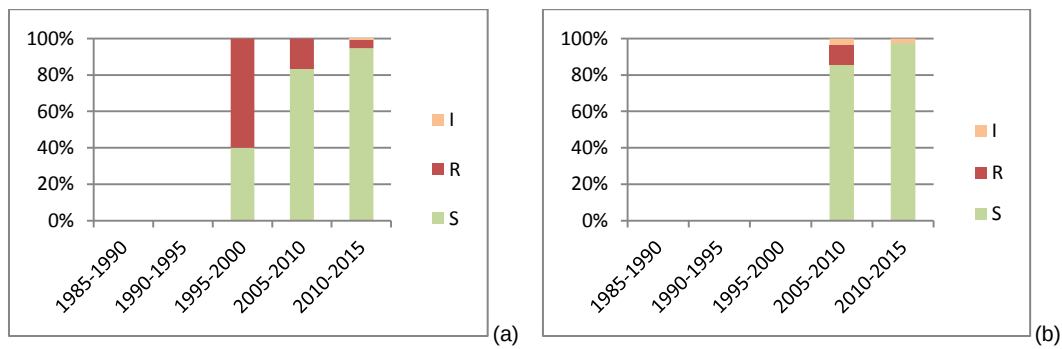


Figure 14. Evolution de l'antibiorésistance d'*Aeromonas* envers (a) l'amoxicilline (AMX) et (b) l'amoxicilline+ acide clavulanique (AMC).

Le taux de souches résistantes semble nettement diminuer de périodes en périodes. Dans les années 1995-2000, il y a, pour l'amoxicilline, 60% de résistants. En 2005-2010, ce taux de souches résistantes est réduit à 16,7%. Une telle diminution du taux de résistance pourrait être expliquée par les changements de pratiques en 1997. Enfin, ces dernières années, les résistants ne représentent plus que 4,6% des souches. La combinaison amoxicilline+ acide clavulanique semble être efficace sur toutes les souches ces dernières années, bien qu'il y ait quelques souches de statut intermédiaire (2,6%).

En effet, l'acide clavulanique est un inhibiteur des bêta-lactamases et c'est probablement cela qui explique la baisse du nombre de résistants (première utilisation du mélange amoxicilline+ acide clavulanique en 2006 sur les souches échantillonnées).

➤ Quinolones

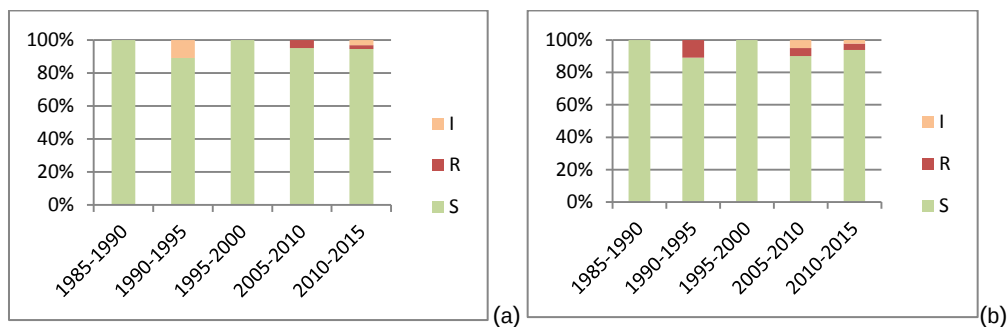


Figure 15. Evolution de l'antibiorésistance d'*Aeromonas* envers (a) la fluméquine (FLU) et (b) l'acide oxolinique (OA).

Les quinolones semblent être la famille d'antibiotiques qui fait face au taux de résistants le plus faible. En effet, le taux moyen de résistants, toutes périodes confondues, est d'environ 2,6 %. Les quinolones sont d'ailleurs de plus en plus utilisées du fait de leur bonne efficacité. La faible résistance observée ici peut être due soit à une accumulation de mutations qui empêcherait, par exemple, l'antibiotique de se fixer à leurs enzymes cibles, soit à un possible transfert de gènes de résistance via d'autres bactéries. *Aeromonas* étant une bactérie à Gram négatif, le transfert de gènes peut se faire par conjugaison. Bien que le transfert d'ADN

chromosomique ne se réalise qu'entre des bactéries de même espèce par transfert vertical, un transfert de gènes interspécifique peut se faire par l'intermédiaire des plasmides. Sur cette base, il pourrait être intéressant de surveiller l'existence d'un transfert latéral de gènes de résistance entre *E. coli* et *Aeromonas*.

➤ Phénicolés

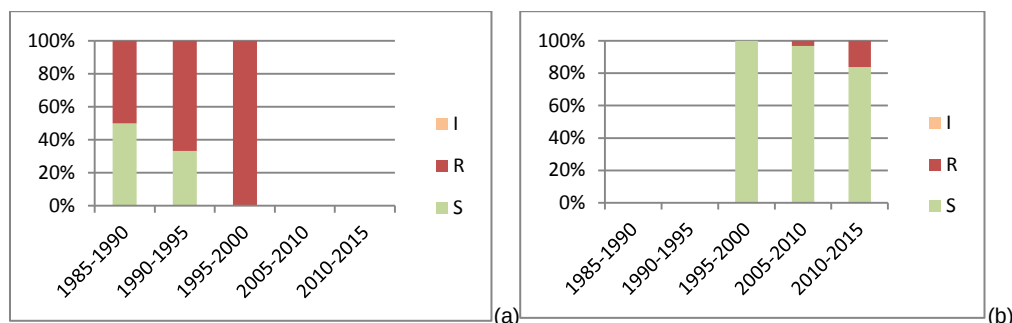


Figure 16. Evolution de l'antibiorésistance d'*Aeromonas* envers (a) le chloramphénicol (C) et (b) le florfenicol (FFC)

De 1985 à 2000, le taux de résistants au chloramphénicol n'a cessé d'augmenter : 50% durant notre première période, puis 66,7% et enfin une résistance totale dans les années 1995-2000. La résistance avait donc doublée en l'espace de 15 ans. Cependant, le chloramphénicol, qui présentait une toxicité, a été interdit et c'est depuis le florfenicol qui le remplace. Ici également, le passage d'un antibiotique à un autre, de la même famille provoque une perte, ici totale, de la résistance : 100% souches sensibles au FFC sur la période 1995-2000 tandis qu'il y avait 100% de résistants au C sur la même période. Toutefois, il semblerait qu'une résistance resurgisse ces dernières années. En effet, une première augmentation de 3,3% de résistants en 2005-2010 a été suivie par une seconde, plus marquée, élevant le taux de résistants à 16,2% sur la période 2010-2015.

Ainsi, le mécanisme de résistance le plus répandu, à savoir la présence de chloramphénicol-acétyltransférase, s'est révélé inutile suite à la mise à l'écart du chloramphénicol, remplacé par le florfenicol. Cependant, un accroissement observé de la résistance face au florfenicol suggère une adaptation rapide des bactéries. Ce phénomène a déjà été observée sur les volailles (27) et les bovins (28). Cette résistance est due notamment à la présence d'un gène *flo*, dont le produit est similaire à une protéine CmlA (*Pseudomonas aeruginosa*), qui confère une résistance par l'action d'un système d'efflux.

➤ Tétracyclines

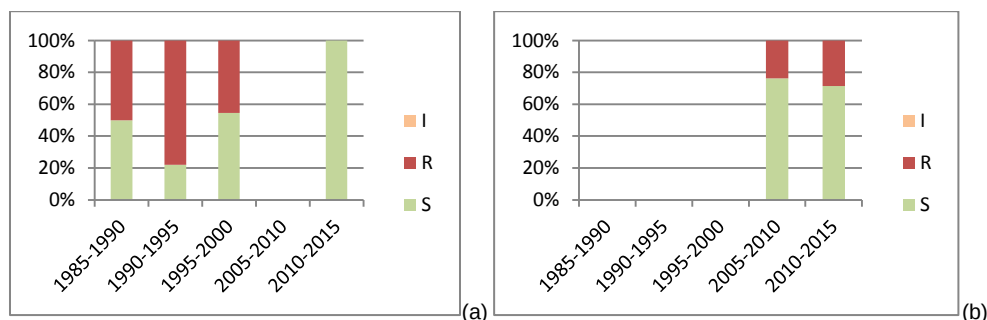


Figure 17. Evolution de l'antibiorésistance d'*Aeromonas* face à (a) l'oxytétracycline (OT) et (b) la tétracycline (TE).

Durant la première période, le taux de résistants était égal au taux de sensibles (50%). Les cinq années suivantes, ce taux de résistants a augmenté pour atteindre un maximum de 78%. Cependant, la période 1995-2000 voit chuter ce taux, qui reste néanmoins important (45,5%). Le résultat indiqué pour la période 2010-2015 pour l'oxytétracycline a été obtenu par l'analyse d'une unique souche, et n'est donc pas représentatif. Alors que les souches issues du Laboratoire de Plouzané ont été testées à l'oxytétracycline, Labocéa utilisait de la tétracycline. Cette dernière présente des taux de résistants relativement importants (plus de 25%) et en légère hausse ces dernières années (+5% entre les deux périodes).

Ces résistances sont probablement dues à l'expression des gènes de résistance à la tétracycline connus et présentés en partie 2. De plus, on observe là encore que les changements de pratiques autour de 1997 ont eu un impact sur les taux de souches résistantes.

➤ Sulfamides

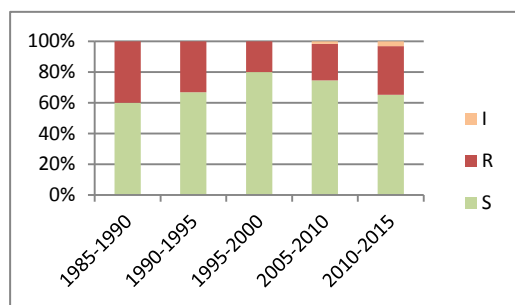


Figure 18. Evolution de l'antibiorésistance d'*Aeromonas* face au mélange triméthoprim-sulfadiazine/sulfaméthoxazole (SXT)

Le taux de résistance d'*Aeromonas* face à ces antibiotiques a diminué de 10% par période des années 1985 à 2000, où il atteint son minimum (20%). Les deux périodes suivantes montrent cependant une ré-augmentation, qui atteint aujourd'hui une valeur de 31,8% de souches résistantes. Cependant, il est à noter que ce graphique expose deux antibiotiques, où le mélange est différent. Dans la première partie (périodes 1985 à 2000), il s'agit du mélange triméthoprim-sulfaméthoxazole. Par la suite, il s'agit du mélange triméthoprim-sulfadiazine. Ces deux mélanges ont été testés dans plusieurs publications, et ces dernières ne présentent pas de différences significatives entre leurs utilisations (29-31). Là encore, les mécanismes de résistance sont nombreux et variés (modification de la perméabilité de la membrane, modification de l'affinité enzyme/antibiotique, hyperproduction d'enzyme...).

Tableau 4. Pourcentage de souches remises en culture à partir de la souchothèque initiale.

	1985-1990	1990-1995	1995-2000
<i>Yersinia</i>	19/19 (100%)	12/12 (100%)	3/3 (100%)
<i>Aeromonas</i>	10/10 (100%)	10/11 (90,9%)	23/27 (85,2%)

Ainsi, on suppose que, de façon générale, les résistances observées sont dues à des accumulations de mutations ou des transferts de gènes, par l'intermédiaire des plasmides. En effet, il semble que la conjugaison soit le moyen le plus probable qui pourrait expliquer ses transferts de gènes. Nécessitant une bactérie donneuse et une bactérie réceptrice, la conjugaison se fait essentiellement entre des bactéries de même genre. Elle peut permettre de transférer des plasmides, ce qui apporte à la bactérie des gènes supplémentaires, car il s'agit d'un mécanisme d'addition et non de substitution. Ces plasmides sont les acteurs les plus importants dans l'apparition et le développement de l'antibiorésistance.

Que ce soit par accumulation de mutations ou par transferts de gènes, l'antibiorésistance peut avoir plusieurs formes. Alors que les antibiotiques peuvent agir sur la paroi, le peptidoglycane (β -lactamines), la membrane, le ribosome (phénicolés, tétracyclines), l'ARN polymérase, l'ADN (quinolones) ou la synthèse de l'acide folique (sulfamides, triméthoprime), les bactéries ont, elles aussi plusieurs mécanismes de résistance. Tout d'abord, limiter la pénétration de l'antibiotique en jouant sur la perméabilité de la membrane, détruire l'antibiotique (production d'enzymes contre celui-ci) ou réduire son action (changement de conformations, production d'enzymes supplémentaires).

4.1.2. Repiquage et ré-identification par MALDI-TOF

L'ensemble des souches remises en culture puis conservées a été consigné dans le tableau de l'annexe 2. L'ensemencement n°1 correspond à la première tentative, et si elle n'a pas été concluante, l'ensemencement n°2 a été réalisé. Si aucun des deux essais n'a permis la remise en culture des souches, celles-ci ont été éliminées de l'échantillonnage initial réalisé. Le pourcentage de souches remises en culture est présentée dans le Tableau 4.

Pour trois des échantillons, la nature de la souche était incertaine entre *Yersinia* et *Aeromonas*. En effet les commémoratifs indiquaient la présence des deux genres dans un même échantillon (souche n°bactério 11812) ou ne précisait pas clairement le genre de tel ou tel échantillon (souches n°bactério 8632 et 8636). Pour ces trois souches, le protocole a été légèrement ajusté en étant réalisé à deux températures (37°C et 22°C) et sur deux milieux (Mueller Hinton (MH) et Chrome Agar d'orientation (CAO)).

Lors des remises en culture, certaines souches se sont révélées contaminées. Lorsqu'il s'agissait de deux sortes de colonies (morphologies différentes, Annexe 3), elles ont toutes deux été repiquées, et leurs numéros permettaient de les différencier. Pour beaucoup d'*Aeromonas*, les souches étaient contaminées par des moisissures, qui en revanche n'ont pas été repiquées.

Au final, un total de 77 souches (29 *Yersinia ruckeri*, 43 *Aeromonas* et 5 indéterminées, issues des échantillons « *Yersinia* et *Aeromonas* ») a été envoyé à LABOCEA pour réidentification par MaldiTof.

Tableau 6. Récapitulatif des manipulations bars/*Vibrio harveyi*

Date expérimentation	Souche	Détails contamination	Mortalité	Commentaires
14/04/2015	1 à 6	10 poissons/souche T° de 20°C	S.1: 1 mort après 5h S.2: 1 mort après 5h S.6: 2 morts après 5h. Mortalité totale à J1	Toutes les DO comprises entre 0,466 et 0,931. Pas de mortalité dans le bac témoin
22/04/2015	5	10 poissons/ condition 6 doses: 1/2 gélose, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/2 liquide T° de 20°C	1/2 gélose: 8 morts à J1, 1 mort à J3, 1 mort à J4 (100% de mortalité) 1/2 liquide: 8 morts à J1, 1 mort à J2 (90% de mortalité) 1/5 : 1 mort à J1, 2 morts à J3 (30% de mortalité)	DO pure: 1,209 Euthanasie des autres poissons par Eugénol
30/04/2015	5	10 poissons/condition 6 doses : 1/2, 2 x 1/3, 2x 1/4, 1/5	1/2: 6 morts à J1, 2 à J2, 2 à J3 (100% mortalité) 1/3 ₁ : 5 morts à J1, 2 à J2, 1 à J3 (80%) 1/3 ₂ : 3 morts à J1, 6 à J2, 1 à J3 (100%) 1/4 ₁ : 3 morts à J1, 3 à J2, 1 à J4 (70%) 1/4 ₂ : 3 morts à J1, 4 à J2, 1 à J3 (80%) 1/5: 3 morts à J2, 1 à J3 (40%)	Toutes les doses sont obtenues à partir d'une culture en bouillon (DO pure=1,383). Pas de mortalité dans le bac témoin. Euthanasie des autres poissons par Eugénol.
12/05/2015	5	50 poissons/condition 2 doses: 1/4 et 1/5 en duplicat	1/4: 18 morts à J1, 6 à J, 4 à J3, 3 à J4, 2 à J6, 1 à J9 (68%) 1/4: 19 morts à J1, 7 à J2, 9 à J3, 3 à J4, 2 à J5 (80%) 1/5: 1 mort à J1, 4 à J2, 5 à J3, 4 à J4, 2 à J5, 4 à J6 (40%) 1/5: 5 à J1, 9 à J2, 8 à J3, 2 à J5, 2 à J6, (52%) Témoin: 1 mort à J6, 1 autre à J7 (4%)	DO pure: 1,202 (2,7.10e9 UFC/mL) DO culture au 1/5 = 0,356 (3,1.10e8 UFC/mL) DO culture au 1/4 = 0,537 (1.10e9 UFC/mL). Euthanasie des autres poissons par Eugénol



Figure 19. Photographie de l'électrophorèse de la première PCR réalisée

Tableau 5. Répartition des souches utilisées dans les différents puits.

Puit 1	vide
Puit 2	<i>V. cholerae</i> non-o1/non-o139
Puit 3	<i>V. cholerae</i> 9421
Puit 4	<i>A. hydrophilia</i> pur
Puit 5	<i>A. hydrophilia</i> 1/10 ^e
Puit 6	<i>V. scophtalmi</i> pur
Puit 7	<i>V. scophtalmi</i> 1/10 ^e
Puit 8	témoin négatif PCR (milieu stérile)
Puit 9	témoin positif PCR (<i>V.harveyi</i> n°5 pur)
Puit 10	marqueur de taille

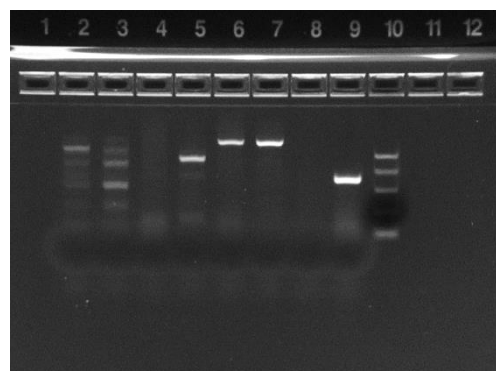


Figure 20. Photographie de l'électrophorèse de la deuxième PCR

Si l'identification des espèces de *Yersinia* par MALDI-TOF ne pose pas de problème, il n'en est pas de même avec *Aeromonas*, genre pour lequel des séquençages d'isolats seront probablement nécessaires pour assoir l'identification. Dans le cas où il serait impossible d'établir avec certitude l'espèce de l'une des souches, par manque de profils dans la base de données et/ou trop grande diversité des espèces et sous-espèces, des approches moléculaires telles que des Polymerase Chain Reaction (PCR), pourront être mises en place.

4.2. Partie 2. Mise en place d'une épreuve infectieuse à *Vibrio harveyi* chez le bar.

4.2.1. Pré-tests *Vibrio harveyi* /bars

L'injection pour vérifier la virulence de *Vibrio harveyi* sur des bars s'est déroulée dans la matinée et les premiers résultats sont apparus dans l'après-midi même. En effet, au bout de seulement quelques heures (environ 5h), six poissons étaient morts : un contaminé par la souche 1, un autre contaminé par la souche 2 et deux autres contaminés par la souche 6. Le lendemain matin, la totalité des poissons infectés étaient morts (Tableau 6, ligne 1). Ces résultats ont permis de conclure que les 6 souches reçues étaient toutes bien virulentes.

Détermination de la DL_{50} :

Un premier test *in vivo* a été effectué en utilisant la souche vaccinale n°5 avec l'objectif d'approcher la DL_{50} . Les résultats obtenus ont permis de positionner cette DL_{50} à des niveaux de dilution de la suspension mère initiale (DO de 1,209) de l'ordre de $1/2$ à $1/5^{\text{ème}}$ (90 et 30% de mortalité respectivement) (Tableau 6, ligne 2). Un second test a été effectué afin d'affiner ces résultats en réalisant des dilutions plus rapprochées ($1/3$, $1/4$, $1/5^{\text{ème}}$) d'une suspension mère (DO de 1,383). Des taux de mortalité de 75 et 40 % ont été respectivement obtenus pour les dilutions $1/4$ et $1/5^{\text{ème}}$, positionnant la DL_{50} dans cet intervalle de dilution (ligne 3).

Enfin, un nouveau test a été réalisé afin de consolider les résultats pour les dilutions au $1/5^{\text{ème}}$ et au $1/4$ sur un plus grand effectif de poissons (deux bacs de 50). Les détails des DO et les résultats sont consignés dans la ligne 4. La dilution au $1/5^{\text{ème}}$, qui correspond à une DO de 0,356 et à une quantité approximative de $3,01 \times 10^7$ UFC injectées a donné un taux de mortalité moyen, sur les deux bacs testés, de 46%.

4.2.2. PCR spécifique à *Vibrio harveyi*

Bien que les isolats reçus pour les tests aient été identifiés préalablement par Maldi Tof, une PCR spécifique de l'espèce *V. harveyi* a été mise en place et utilisée pour tester des extraits d'ADN purs et des dilutions au $1/10^{\text{ème}}$ des 6 souches utilisées. Des amplicons à la taille attendue ont été obtenus, confirmant l'identification des isolats (Figure 19). La robustesse de cette PCR a également été évaluée en testant des souches de *Vibrio* d'autres espèces (Tableau 5).

A l'issue de cette PCR, seul l'ADN de la souche de *Vibrio harveyi* a été amplifié à la taille attendue (382pb). Cependant, de nombreuses amplifications parasites de tailles diverses sont également observées pour les autres souches (Figure 20)

5. Conclusion

Pour le projet **AntibioFish**, l'analyse des commémoratifs et les données fournies par Labocéa ont permis d'obtenir une première idée de l'évolution de l'antibiorésistance de souches de *Yersinia ruckeri* et d'*Aeromonas spp.*. *Yersinia ruckeri* ne semble pas présenter de grands phénomènes de résistance. Cependant, il reste l'un des pathogènes les plus répandus en pisciculture et cette absence de résistance est probablement due à l'utilisation d'auto-vaccins. Le genre *Aeromonas* présente quant à lui des phénomènes de résistance grandissants. En effet, cette première analyse montre que le taux de résistants croît pour l'ensemble des antibiotiques testés. De plus, tous nos résultats semblent montrer un changement durant la période 1995-2000 ou la période suivante ; cela est très probablement dû aux changements de pratiques qui ont eu lieu autour de l'année 1997.

Il sera réalisé par la suite du projet la détermination de CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices) à l'aide de plaques sensititre® ce qui permettra d'obtenir un bilan complet des résistances (Figure 21). De plus, il serait intéressant, pour mieux comprendre et interpréter ces résultats, d'obtenir plus d'informations sur la période 2000-2005, ainsi que sur les pratiques vétérinaires (telles que les auto-vaccins, changement de médicament, composition...). Le questionnaire constitué dans le cadre de ce stage (Annexe 1), lorsqu'il aura été renseigné par quelques vétérinaires, apportera des éléments de réponse qui nous aideront à interpréter plus en détails les évolutions constatées. Pour le futur, il serait également intéressant de réaliser cette étude dans d'autres régions de France, et d'instaurer un plan de surveillance de l'antibiorésistance dans la filière piscicole, pour ces deux pathogènes mais également pour d'autres (flavobactériose, lactococcose...)

Le projet **Re-sist** va se poursuivre dans les mois à venir. Ce stage a contribué à la détermination de la DL50 chez le bar pour une souche vaccinale de *Vibrio harveyi*. Des doses équivalentes des autres souches ont été injectées récemment à des bars afin de déterminer si cette DL50 est équivalente pour l'ensemble des isolats reçus au laboratoire.

Une épreuve infectieuse en conditions contrôlées sur un effectif de 2000 poissons apparentés (frères et sœurs) issus de populations commerciales permettra de réaliser un suivi de la mortalité quotidienne et de déterminer, en réalisant un génotypage des individus et une assignation de parenté, l'héritabilité de la résistance à la vibriose chez le bar. Si cette héritabilité est d'un niveau intéressant, une sélection plus poussée avec la recherche de marqueurs génétiques type Quantitative Trait Loci (QTL) pourra être engagée. Ce type d'approche permettra à terme de réduire l'utilisation d'antibiotiques, et limiter alors la pression de sélection qui est aujourd'hui en partie responsable de l'augmentation du nombre de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques.

Bibliographie

1. **Won KM, Park SI.** 2008. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea. *Aquaculture* **285**:8-13.
2. **Austin B.** 2015. *Aeromonas* Fish Pathogens. *In* J. Graf (ed.), *Aeromonas*.
3. **Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt,** posting date. EcoAntibio : lutte contre l'antibiorésistance. [Online.]from <http://agriculture.gouv.fr/plan-ecoantibio-2017>
4. **Danley ML, Goodwin AE, Killian HS.** 1999. Epizootics in farm-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), caused by the enteric redmouth bacterium *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* **22**:451-456.
5. **Calvez S, Gantelet H, Blanc G, Douet DG, Daniel P.** 2014. *Yersinia ruckeri* Biotypes 1 and 2 in France: presence and antibiotic susceptibility. *Dis Aquat Organ* **109**:117-126.
6. **Austin B.** 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet Microbiol* **140**:310-317.
7. **Ansary A, Radu S.** 1992. Conjugal transfer of antibiotic resistances and plasmids from *Campylobacter jejuni* clinical isolates. *FEMS Microbiology Letters* **91**:125-128.
8. **Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X.** 2009. Quinolones: action and resistance updated. *Curr Top Med Chem* **9**:981-998.
9. **Smith JT.** 1986. [Mechanism of action of quinolones]. *Infection* **14 Suppl 1**:S3-15.
10. **Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S.** 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:1271-1272.
11. **Willmott CJ, Maxwell A.** 1993. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:126-127.
12. **Cullen ME, Wyke AW, Kuroda R, Fisher LM.** 1989. Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from *Escherichia coli* that confers clinical resistance to 4-quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **33**:886-894.
13. **Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P.** 2008. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis* **14**:231-237.
14. **Shaw WV, Bentley DW, Sands L.** 1970. Mechanism of Chloramphenicol Resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **104**:1095-1105.
15. **Fernandez M, Conde S, de la Torre J, Molina-Santiago C, Ramos JL, Duque E.** 2012. Mechanisms of resistance to chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:1001-1009.
16. **Han JE, Kim JH, Choresca CH, Jr., Shin SP, Jun JW, Chai JY, Park SC.** 2012. Prevalence of tet gene and complete genome sequencing of tet gene-encoded plasmid (pAHH01) isolated from *Aeromonas* species in South Korea. *J Appl Microbiol* **112**:631-638.
17. **Chopra I, Roberts M.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**:232-260 ; second page, table of contents.
18. **Rhodes G, Huys G, Swings J, McGann P, Hiney M, Smith P, Pickup RW.** 2000. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in

- dissemination of the tetracycline resistance determinant tet A. *Appl Environ Microbiol* **66**:3883-3890.
19. **Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Larsen JL.** 2001. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl Environ Microbiol* **67**:5675-5682.
 20. **L'Abée-Lund TM, Sorum H.** 2002. A global non-conjugative Tet C plasmid, pRAS3, from *Aeromonas salmonicida*. *Plasmid* **47**:172-181.
 21. **Balassiano IT, Bastos MDCDF, Madureira DJ, Da Silva IG, De Freitas-Almeida ÂC, De Oliveira SS.** 2007. The involvement of tetA and tetE tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **102**:861-866.
 22. **Murray BE.** 1991. New aspects of antimicrobial resistance and the resulting therapeutic dilemmas. *J Infect Dis* **163**:1184-1194.
 23. **Sanders PP, Laurentie M.** 2012. Definitions of antimicrobial resistance in veterinary medicine: Epidemiological or prognostic. *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France* **165**:261-269.
 24. **Silley P.** 2012. Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: What do these terms really mean? *OIE Revue Scientifique et Technique* **31**:33-41.
 25. **Pang L, Zhang XH, Zhong Y, Chen J, Li Y, Austin B.** 2006. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the toxR gene. *Lett Appl Microbiol* **43**:249-255.
 26. **Courvalain P, Leclercq R.** 2012. *Antibiogramme*. Editions Eska.
 27. **Keyes K, Hudson C, Maurer JJ, Thayer S, White DG, Lee MD.** 2000. Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:421-424.
 28. **White DG, Hudson C, Maurer JJ, Ayers S, Zhao S, Lee MD, Bolton L, Foley T, Sherwood J.** 2000. Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. *J Clin Microbiol* **38**:4593-4598.
 29. **Soheilian M, Sadoughi MM, Ghajarnia M, Dehghan MH, Yazdani S, Behboudi H, Anisian A, Peyman GA.** 2005. Prospective randomized trial of trimethoprim/sulfamethoxazole versus pyrimethamine and sulfadiazine in the treatment of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology* **112**:1876-1882.
 30. **Torre D, Casari S, Speranza F, Donisi A, Gregis G, Poggio A, Ranieri S, Orani A, Angarano G, Chiodo F, Fiori G, Carosi G.** 1998. Randomized trial of trimethoprim-sulfamethoxazole versus pyrimethamine-sulfadiazine for therapy of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. Italian Collaborative Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:1346-1349.
 31. **Varde AB, Shetty HG, Jadav SK, Sheth SM, Acharya VN, Satoskar RS.** 1981. Comparison of trimethoprim in combination with sulfadiazine or sulfamethoxazole in the treatment of urinary tract infections. *J Postgrad Med* **27**:154-158.

Annexes

Annexe 1. Questionnaire destiné aux vétérinaires

PROJET ANTIBIOFISH

Caractérisation phénotypique et génotypique de la sensibilité aux antibiotiques de souches d'*Aeromonas* spp. et de *Yersinia ruckeri* isolées de poissons (cas pathologiques) entre 1985 et 2014

Le projet AntibioFish est un projet collaboratif financé dans le cadre du projet EcoAntbio. Il fait intervenir l'Anses (Unité Mycoplasmodologie-Bactériologie – S. Baron ; Unité Pathologies Virales des Poissons – T. Morin), Oniris (UMR BioEpAR - S. Calvez), Laboceia (B. Thuillier).

Aucun outil de surveillance véritablement opérationnel n'est disponible pour établir un état des lieux pertinent de l'antibiorésistance en filière piscicole, et il n'y a pas de possibilité d'établir des tendances d'évolution du fait de l'absence de point de référence. Il reste donc complexe, à ce jour, d'évaluer l'impact des changements de pratiques zootechniques et prophylaxiques dans cette filière ou d'être en mesure de détecter une « émergence » de souches résistantes.

Le projet Antibiofish a pour objectif d'évaluer de manière critique les évolutions de résistance à des antibiotiques pour 2 genres bactériens pathogènes majeurs : *Aeromonas* spp. et *Yersinia ruckeri*. Les commémoratifs de souches isolées par les partenaires sur la période 1985 à 2014 dans la région Grand-Ouest vont être repris et analysés, et les profils d'antibiorésistance (antibiogramme + CMI) de souches isolées établis.

Afin de mettre en relation les résultats obtenus avec les évolutions des pratiques zootechniques et prophylaxiques sur ces 30 dernières années, nous aurions besoin de votre expertise terrain et vous serions reconnaissants de nous retourner le questionnaire ci-dessous.

Nom Vétérinaire :

Période d'activité :

1) Quels sont les principes actifs les plus utilisés en pisciculture ?

Merci d'indiquer les molécules que vous avez les plus prescrites (avant 1997, après 1997) en donnant les noms commerciaux des principales spécialités (et si possible un ordre de grandeur des quantités : code +++/++/+ ou kg / an).

			AVANT 1997		APRES 1997	
Famille / Principe actif		Nom commercial des produits les + utilisés	Ordre (importance / prescription)	Quantité(ordre de grandeur ou kg / an)	Ordre (importance / prescription)	Quantité(ordre de grandeur ou kg / an)
Pénicillines	Amoxicillines (AMX)					
	Ampicillines (AM)					
Quinolones	Fluméquine (FLU)					
	Ciprofloxacine (CIP)					
	Acide Oxolinique (OA)					
Phénicolés	Chloramphénicol(C)					
	Florfénicol (FLO)					
Tétracyclines	Oxytétracycline (OT)					
	Doxycycline (DO)					
Lincosamides	Lincomycine (L)					
Sulfamides	Triméthoprim- sulfamethoxydazole (SXT)					
Furanes	FUR					
Autres						
Autres						

2) Indépendamment des maladies traitées, y-a-t-il des différences dans les prescriptions entre les poissons d'eau douce et ceux d'eau de mer ? (doses ? molécules ?)

Si oui, lesquelles ?

3) Quelles sont d'après vous les 3 principales maladies pour lesquelles vous avez prescrit ces différents antibiotiques (numérotez-les de 1 à 3) ?

Merci de préciser, pour chaque famille d'antibiotiques, la substance active principalement utilisée ; exemple : la fluméquine pour les quinolones).

	Pénicilline		Quinolones			Phénicolés		Tétracyclines		Lincosamides	Sulfamides		Furanes	Autre:	Autre:	ATB le plus fréquemment utilisé
	AMX	AM	CIP	FLU	OA	C	FLO	OT	DO	L	SSS	SXT	FUR			
Yersiniose																
Furonculose																
Flavobactériose																
Flexibactériose																
Entérite non spécifique (maladie du haricot)																
Lactococcose																
Maladie de la fraise																
Rénibactériose																
Vibriose																
Autre:																
Autre:																

4) Avez-vous eu recours à des traitements antibiotiques préventifs ?

Si oui, pour éviter quel type de pathogène ? Avec quelle molécule ? Est-ce que ce type de traitement est toujours pratiqué (si non, jusqu'à quelle période environ l'a-t-il été) ?

5) Nous avons l'impression que l'acide nalidixique était / est utilisé très ponctuellement. Est-ce exact ? si oui, pour quelle maladie/quel contexte pathologique ?

6) Y-a-t-il des grandes tendances dans l'évolution des pratiques en antibiothérapie (nouvelles molécules, émergence de résistances ?, ...).

7) Quels sont les principaux agents contre lesquels vous avez prescrit une vaccination sur la période 2004-2014 ?

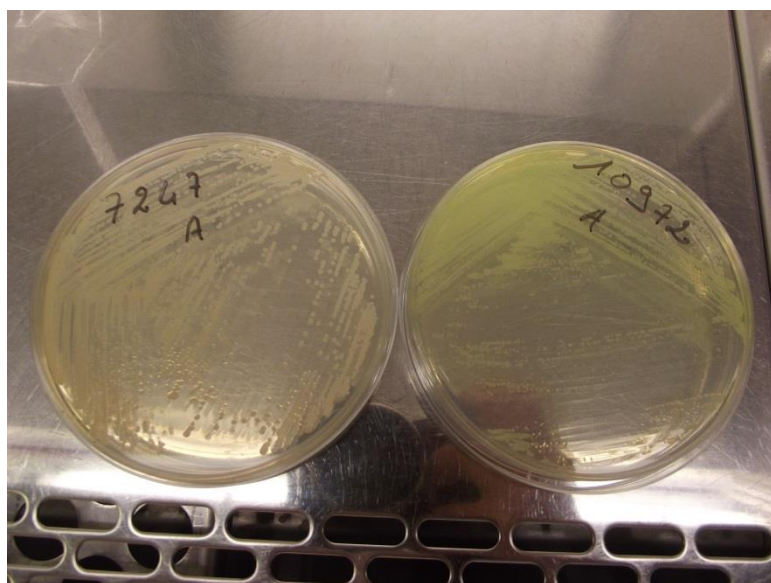
Questionnaire à renvoyer à Anne DELAUNAY (anne.delaunay@anses.fr) et Thierry MORIN (thierry.morin@anses.fr)

Merci pour votre participation.

Annexe 2. Souches de Plouzané conservées

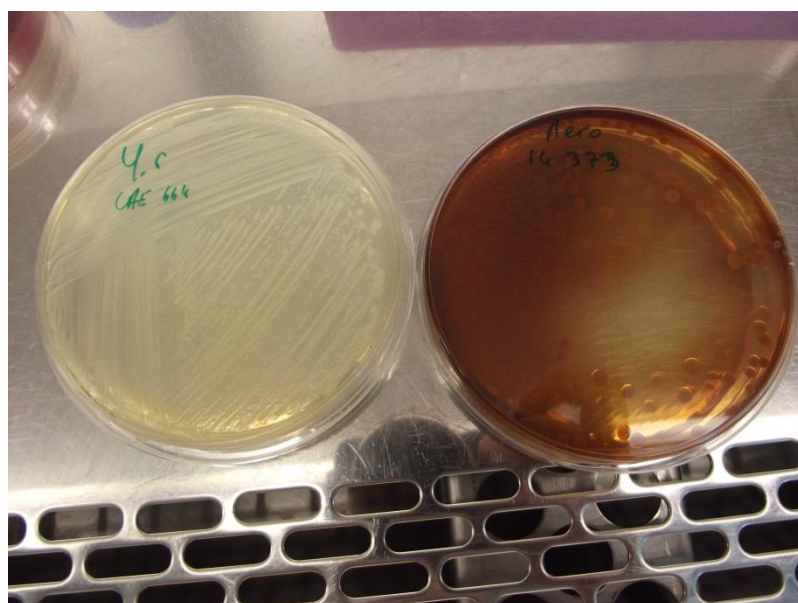
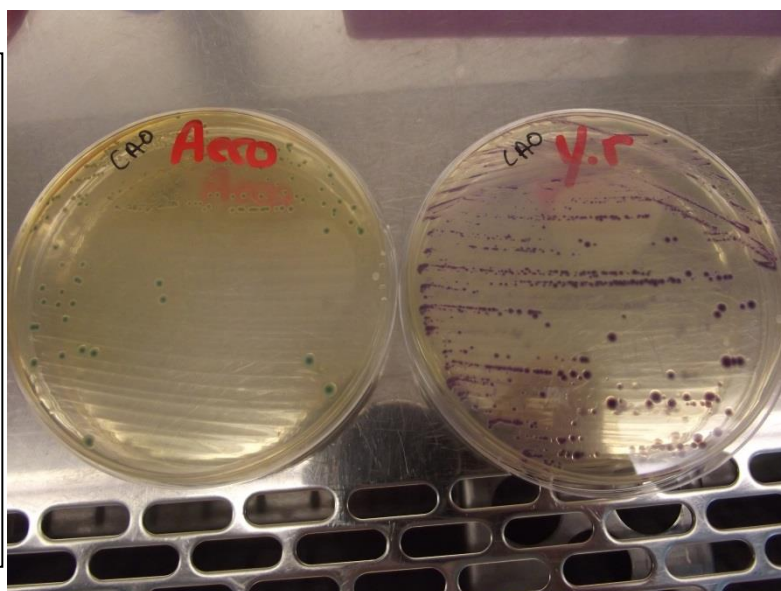
N° Anse	N° bactéri	Bactéri	Conservation en doub	Ensemencement						
1181	7030	Y	OK	2		3685	11685	A	OK	2
1214	7161	Y	OK	2		4250	11800	AS	OK	1
1220	7177	Y	OK	1		4260	11803	AS	OK	1
1225	7202	Y	OK	1			11812-1		OK	2
1228	7224	Y	OK	1		4269	11812-2	Y et A	OK	2
							11812-3		OK	2
1233	7246-1		OK	1		4270	11813	AS	OK	1
	7246-2	A	OK	1		4275	11814	Y	OK	1
	7247		OK	1			12249		OK	1
1235	7254	Y	OK	1		6310	12251.1	AS	OK	1
1247	7333	Y	OK	1			12251.3		OK	1
	7341		OK	1		7055	12313	AS	OK	2
1249	7347	Y	OK	1		7057	12319	AS	OK	2
	7350	Y	OK	1			12319.1	AS	Ø	
1250	7355	Y	OK	1		7092	12331-1	AS	OK	1
	7356		OK	1			12331-2		OK	2
1252	7369	Y	OK	1		7098	12333	AS	OK	2
1254	7375	Y	OK	2		7185	12354	AH	OK	2
1317	7599.1	A	OK	1		7225	12371	Y	OK	1
	7599.2	A	OK	2		7249	12382	AS	OK	2
1385	7929	Y	OK	1			12383.1	AH	OK	2
1501	8339	Y	OK	1		7250	12383.2-1	AH	OK	1
1520	8410	Y	OK	1			12383.2-2		OK	1
1549	8560.1	A	OK	1		7256	12385	AS	Ø	
	8560.2	A	OK	1			12386		OK	2
1554	8582	A	OK	2			12400.1-1	AH	OK	2
	8582.1	A	OK	2		7310	12400.1-2		OK	2
1567	8632	Y et A	OK	2			12400.2	AH	OK	2
	8636		OK	2		8035	12418	A	OK	2
1646	8893	AH	OK	2		8167	12454	AS	Ø	
2254	10696	AH	OK	2		8205	12478	Y	OK	1
2283	10780	Y	OK	1			12480		OK	1
	10781		OK	2			12482.2-1		OK	1
2388	10972	AS	OK	1			12482.2-2		OK	1
2408	10995	A	OK	1		8206	12482.3	AS	OK	1
2489	11043	AS	OK	2			12483.1		Ø	
2513	11051	Y	OK	1			12483.2		OK	1
	11107		OK	2			12483.3		OK	1
2562	11109-1	Y	OK	1						
	11109-2		OK	1						
3565	11634	Y	OK	1						
	11635	AS	Ø			Légende:				
3574	11639	Y	OK	1						
	11654	AS	OK	2		7246-1	Contamination détectée			
	11677	A supposé	OK	2		Ø	Pas de conservation			

Annexe 3. Différentes morphologies observées lors de la remise en culture.



Deux morphologies d'*Aeromonas* supposées sur milieu MH.

Différenciation morphologique d'*Aeromonas* et de *Yersinia ruckeri* sur milieu CAO. *Aeromonas* présente des colonies vertes tandis que *Yersinia ruckeri* présente des colonies violettes. Ces boîtes ont permis de tester si une différenciation à l'œil nu était possible entre ces deux genres bactériens.



Différenciation morphologique d'*Aeromonas* et de *Yersinia ruckeri* sur milieu MH. La couleur ambrée présente sur la boîte de droite est caractéristique d'*Aeromonas salmonicida*.

Tableau 7. Calendrier de stage

Semaine	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Bibliographie	→		→	→	→		→				→		→		→			
Collecte des données		→	→	→														
Analyse des données			→	→	→	→	→				→	→	→					
Manipulation				→		→				→	→	→	→	→	→	→	→	
Expérimentation					→	→	→	→	→									
Rédaction		→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→

→ Antibio-Fish

→ Re-Sist

Tableau 8. Tableaux des tâches

Intervenant	Idée originale	Bibliographie	Mise en place du protocole	Collecte des données	Rédaction
Principal	SB, TM	AD	SB, EL	AD	AD
Secondaire		SB, TM	AD, TM	SB, EL, BT, SC	TM, SB

Intervenant	Idée originale	Bibliographie	Mise en place du protocole	Collecte des données	Rédaction
Principal	TM	LP	LP	LP	AD
Secondaire		TM	AD, TM	AD	LP

AD: Anne Delaunay, stagiaire

TM: Thierry Morin, responsable d'unité, Maître de stage (UPVP)

SB: Sandrine Baron, Chef de projet scientifique, Maître de stage (UMB)

EL: Emeline Larvor, Technicienne (UMB)

LP: Laurane Pallandre (UPVP)

BT: Benoit Thuillier, Docteur vétérinaire (Labocéa)

SC: Ségolène Calvez, Enseignant chercheur à l'école vétérinaire de Nantes

Résumé

A l'échelle humaine ou animale, les phénomènes d'antibiorésistance, apparus suite à une utilisation trop fréquente des antibiotiques, représentent une préoccupation sanitaire majeure. A l'heure actuelle, aucune surveillance n'est réalisée dans la filière piscicole contrairement à d'autres filières terrestres. Dans le cadre du projet AntibioFish, des souches de *Yersinia ruckeri* et d'*Aeromonas spp.*, isolées de poissons d'élevages localisés dans le Grand-Ouest (Bretagne et Pays de la Loire) de la France entre les années 1980 et aujourd'hui, ont été étudiées. Par l'analyse de commémoratifs, ce rapport rend compte d'une première idée de l'évolution de l'antibiorésistance de ces deux genres bactériens. Alors que *Yersinia* ne semble pas présenter de résistance inquiétante, il n'en est pas de même avec *Aeromonas*, dont les profils sont plus variés et les niveaux de résistance au regard des antibiotiques testés en augmentation. L'absence de résistance observée pour *Yersinia* est probablement due aux pratiques actuelles, telles que le recours à des auto-vaccins qui limite l'utilisation abusive d'antibiotiques et permet de préserver la sensibilité des souches. Pour *Aeromonas* en revanche, la résistance observée peut être due à de nombreux gènes de résistance, transmissibles pour la plupart, ou à des accumulations de mutations.

D'autre part, ce rapport rend compte de pré-tests infectieux par des souches de *Vibrio harveyi* sur des bars, ceux-ci étant réalisés dans le cadre du projet FUI Resist qui a pour but d'évaluer des méthodes de sélection de poissons plus résistants à des pathogènes. Ici, de jeunes bars ont été infectés par voie intra-péritonéale avec différentes doses de bactéries afin de déterminer les meilleures conditions pour de futurs tests sur des lots d'apparentés issus de populations commerciales. Il a ainsi été possible de fixer une DL50 équivalente à environ $3,1 \cdot 10^7$ ufc/poisson.

Mots-clés

Antibiotiques, Poissons, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas spp.*, *Vibrio harveyi*, Antibiorésistance, Maldi-Tof, Sélection génétique, PCR, Plan EcoAntibio