



Pêches et Océans
Canada

Fisheries and Oceans
Canada

Sciences des écosystèmes
et des océans

Ecosystems and
Oceans Science

Secrétariat canadien des avis scientifiques (SCAS)

Document de recherche 2022/061

Région de la capitale nationale

**Examen des gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) dans la salmoniculture
et données empiriques sur les tendances spatiales et saisonnières dans la baie
de Fundy**

Grace M. Murphy et Shawn M.C. Robinson

Pêches et Océans Canada
Station biologique de St. Andrews
125, promenade Marine Science
St. Andrews (N.-B.) E5B 0E

Avant-propos

La présente série documente les fondements scientifiques des évaluations des ressources et des écosystèmes aquatiques du Canada. Elle traite des problèmes courants selon les échéanciers dictés. Les documents qu'elle contient ne doivent pas être considérés comme des énoncés définitifs sur les sujets traités, mais plutôt comme des rapports d'étape sur les études en cours.

Publié par :

Pêches et Océans Canada
Secrétariat canadien de consultation scientifique
200, rue Kent
Ottawa (Ontario) K1A 0E6

[http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/
csas-sccs@dfo-mpo.gc.ca](http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/csas-sccs@dfo-mpo.gc.ca)



© Sa Majesté le Roi du chef du Canada, représenté par le ministre du
ministère des Pêches et des Océans, 2022

ISSN 2292-4272

ISBN 978-0-660-45375-0 N° cat. Fs70-5/2022-061F-PDF

La présente publication doit être citée comme suit :

Murphy, G.M. et Robinson, S.M. C. 2021. Examen des gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) dans la salmoniculture et données empiriques sur les tendances spatiales et saisonnières dans la baie de Fundy. Secr. can. des avis sci. du MPO, Doc. de rech. Sci. MPO. Sec. Res. Doc. 2022/061. vi + 78 p.

Also available in English :

Murphy, G.M. and Robinson, S.M.C. 2021. Review of antibiotic resistance genes (ARGs) in salmon aquaculture and empirical data on spatial and seasonal trends in the Bay of Fundy. DFO Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc. 2022/061. v + 72 p

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	v
EXAMEN : LA RÉSISTANCE MICROBIENNE AUX ANTIBIOTIQUES EN AQUACULTURE.....	1
INTRODUCTION.....	1
COMPRENDRE LES MALADIES BACTÉRIENNES EN AQUACULTURE.....	6
DÉVELOPPEMENT DE LA RÉSISTANCE.....	11
Pression sélective.....	11
Transfert horizontal - partage du matériel génétique.....	12
Stratégies communes de résistance.....	14
STATU QUO.....	17
ARG TROUVÉS DANS LES MILIEUX D'AQUACULTURE.....	20
Méthodes d'entrée et réservoirs.....	20
Effet sur les communautés bactériennes.....	22
Conséquences pour la santé humaine.....	22
SOLUTIONS DE RECHANGE.....	23
Élimination des antibiotiques de l'environnement.....	23
NÉCESSITÉ DE NOUVELLES APPROCHES.....	24
Thérapie par bactériophages.....	25
Inhibiteurs de la détection du quorum.....	29
Vaccins.....	30
Biocontrôle bactérien et probiotiques.....	35
Immunosuppresseurs.....	38
Prébiotiques.....	44
Argile rouge.....	46
Antibiotiques naturels.....	47
ARTICLE : DONNÉES EMPIRIQUES SUR LES ARG EN AQUACULTURE.....	49
INTRODUCTION.....	49
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	49
Sites d'étude.....	49
Plan d'échantillonnage.....	50
Échantillonnage.....	51
Analyse de l'ATP.....	52
Analyse de l'ADNe.....	52
Analyse des ARG.....	52
RÉSULTATS.....	54
Résultats pour l'ATP.....	54
Résultats pour l'ADNe.....	56
Gènes résistants aux antibiotiques (ARG).....	59
ANALYSE.....	63
Tendances relatives à l'ATP.....	63
Tendances en matière d'ADNe.....	64
Tendances relatives aux ARG.....	65
CONCLUSIONS.....	66

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	67
RÉFÉRENCES CITÉES	68

RÉSUMÉ

Le présent document vise à examiner les renseignements généraux sur la résistance microbienne aux antibiotiques (RMA) dans le secteur de l'aquaculture et à fournir des données empiriques sur la présence de gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) associés aux salmonicultures de l'Atlantique dans la baie de Fundy.

Le déclin continu des stocks de poissons sauvages dans le monde et la demande croissante de poisson associée à la hausse des populations humaines et de la consommation par habitant ont entraîné une augmentation de la production de l'industrie aquacole pour répondre à la demande mondiale. Toutefois, la densité d'individus élevée des piscicultures intensives par rapport à celle qui s'observe dans la nature offre un environnement idéal pour la propagation des bactéries pathogènes, ce qui constitue une menace sanitaire et financière importante pour l'industrie aquacole. Ces maladies sont généralement combattues au moyen d'antibiotiques, mais la résistance des bactéries à ces médicaments, qui pourrait être transférée à des agents pathogènes humains dans certaines régions du monde, est en croissance et de plus en plus courante. Ce phénomène suscite des inquiétudes quant au coût pour la santé humaine et les économies nationales et souligne le besoin de recherche de traitements de rechange. La résistance se développe par la propagation des ARG par sélection naturelle de certains agents pathogènes et par le partage des ARG entre les bactéries par transfert horizontal. Outre les agents pathogènes présents dans l'intestin des poissons, les bactéries qui se trouvent dans l'environnement sont également exposées aux antibiotiques présents dans l'eau et les sédiments à proximité des piscicultures, créant un vecteur supplémentaire de transmission des ARG aux agents pathogènes humains. On a observé chez des agents pathogènes humains des cas de résistance aux antibiotiques liés à l'utilisation d'antibiotiques en aquaculture et en agriculture, et de nombreux pays ont donc imposé une réglementation sur l'utilisation des antibiotiques, avec plus ou moins de succès. Enfin, on a tenté d'utiliser des traitements de rechange pour freiner la propagation des maladies infectieuses en aquaculture, notamment la thérapie par les bactériophages, les inhibiteurs de détection du quorum, les vaccins, les probiotiques, les immunostimulants et la phytothérapie.

Les données empiriques recueillies dans la baie de Fundy montrent que les salmonicultures de l'Atlantique sont des points chauds pour l'activité microbienne et que les populations bactériennes diffèrent dans leur structure communautaire en fonction de leur proximité avec les piscicultures. Les classes de populations bactériennes les plus proches des piscicultures tendent à être anaérobies et sulforéductrices. Nous avons prélevé des échantillons pour les ARG liés aux médicaments à base de florfenicol, de tétracycline et de sulfonamide. La tendance générale était à l'augmentation de l'abondance relative des ARG à proximité des piscicultures, mais le profil n'était pas le même pour tous les ARG. Il semblait également y avoir une diminution de la concentration de certains ARG au cours d'une période allant de 3 à 12 mois.

Les renseignements recueillis lors de l'examen de la documentation et les conclusions de l'étude empirique sur les liens entre la RMA et l'élevage du saumon indiquent qu'un processus de modification/d'amélioration des ARG est présent dans les salmonicultures. Ces résultats concordent avec ceux d'autres études, qui ont été réalisées tant en milieu terrestre qu'aquatique et montrent que la RMA dans les populations bactériennes est associée aux activités anthropiques qui comportent l'utilisation d'antibiotiques. Ces données sont parmi les premières au Canada à examiner la RMA en relation avec l'aquaculture. Elles offrent un aperçu des niveaux d'ARG et de l'environnement, mais l'échelle (spatiale et temporelle) du phénomène et son rôle dans la transmission probable aux humains par l'alimentation sont encore inconnus. Des recherches supplémentaires sont nécessaires sur ce sujet pour mieux définir les échelles de la RMA par rapport à d'autres réservoirs connus (p. ex., les installations de traitement des eaux usées, les activités agricoles), le degré de dispersion spatiale des ARG, les liens avec les

populations sauvages d'organismes qui font partie de la chaîne alimentaire humaine et la probabilité de transmission des ARG aux agents pathogènes touchant la santé humaine ou animale. Une fois ces aspects mieux compris, il sera possible de procéder à une évaluation appropriée des risques liés aux activités aquacoles pour répondre à des questions concernant des sujets comme : les régimes de traitement appropriés, les répercussions probables sur l'environnement, les répercussions du choix du site et le risque global pour la santé humaine.

EXAMEN : LA RÉSISTANCE MICROBIENNE AUX ANTIBIOTIQUES EN AQUACULTURE

INTRODUCTION

Cet examen comporte trois parties. La première partie présente un bref examen de la situation de l'industrie mondiale des produits de la mer et de son rôle comme source alimentaire pour les populations humaines. Bien que ce sujet puisse sembler hors propos dans une étude sur la résistance aux antibiotiques, il constitue le fondement de la courbe de la demande de fruits de mer et est fortement corrélé au nombre d'interactions qui se produisent à toutes les échelles entre les espèces d'élevage et d'autres espèces sauvages dans les écosystèmes environnants, dont les bactéries. La deuxième partie présente une analyse documentaire sur les différents aspects du développement de la résistance aux antibiotiques et les autres approches qui pourraient être utilisées dans le traitement des maladies bactériennes à l'avenir. La troisième partie est une présentation de certaines données empiriques qui ont été recueillies dans le cadre du présent projet pour commencer l'évaluation de la présence/absence de gènes de résistance aux antibiotiques en association avec les salmonicultures de la baie de Fundy. Ces données sont précieuses pour commencer à évaluer l'état actuel des ARG dans les piscicultures canadiennes et pour établir une comparaison avec les données des fermes d'aquaculture d'autres régions tempérées du monde.

Le poisson a été un élément de base majeur dans l'alimentation humaine pendant des millénaires, soit directement en tant que repas, soit indirectement en tant qu'ingrédient dans la nourriture d'autres animaux que les humains élèvent pour se nourrir. Toutefois, les stocks mondiaux de poissons ont rapidement diminué au cours des dernières décennies. Le pourcentage de stocks considérés comme pêchés au maximum a été fixé à 59,9 % dans le monde en 2016, contre 7 % qui sont encore sous-exploités (FAO, 2018b) (figure 1). Au même moment, avec l'augmentation de la population humaine et la mondialisation qui facilite l'importation de produits de toute la planète, la demande de poisson a augmenté, en particulier dans les pays en développement (FAO, 2018b). La Chine continue d'effectuer des récoltes importantes, mais, dans l'ensemble, la pêche mondiale stagne ou décline lentement depuis 1996, après avoir atteint un sommet sur deux décennies (figure 2). Par conséquent, pour répondre à la demande, l'attention des industriels et des gouvernements s'est tournée vers l'aquaculture pour alimenter la demande croissante de poissons destinés à la consommation humaine. L'aquaculture, ou l'élevage d'organismes aquatiques, est l'une des industries qui connaît la croissance la plus rapide de la planète. Elle employait 19,3 millions de personnes en 2016, contre 12,6 millions en 2000 (FAO, 2018b). L'aquaculture représente aujourd'hui près de la moitié du poisson produit à des fins alimentaires et non alimentaires et cette proportion continue à augmenter, mais la plus grande partie de cette nouvelle production provient d'Asie. Toutes sortes d'organismes aquatiques sont élevés, les carpes et autres poissons similaires étant les plus courants, mais les algues et les invertébrés comme les crustacés, les palourdes et les huîtres sont également importants (figure 3). La masse d'animaux et de plantes cultivées pour l'alimentation en 2016 a atteint 110,1 millions de tonnes, pour une valeur estimée à 302 milliards de dollars canadiens (FAO, 2018b). La même année, 37 pays produisaient plus de poissons et de fruits de mer par l'élevage que par la pêche, tandis que 22 autres pays produisaient entre 30 % et 50 % de leurs poissons et fruits de mer par l'aquaculture. Avec la croissance continue de l'industrie aquacole (5,8 % entre 2000 et 2016), l'industrie doit composer avec la logistique associée à la production de masse de poissons, semblable à celle de l'industrie cousine de l'agriculture. Les fortes densités d'organismes cultivés permettent à une multitude de micro-organismes (dont certains sont pathogènes) d'interagir avec eux et de mener à bien leur cycle de vie.

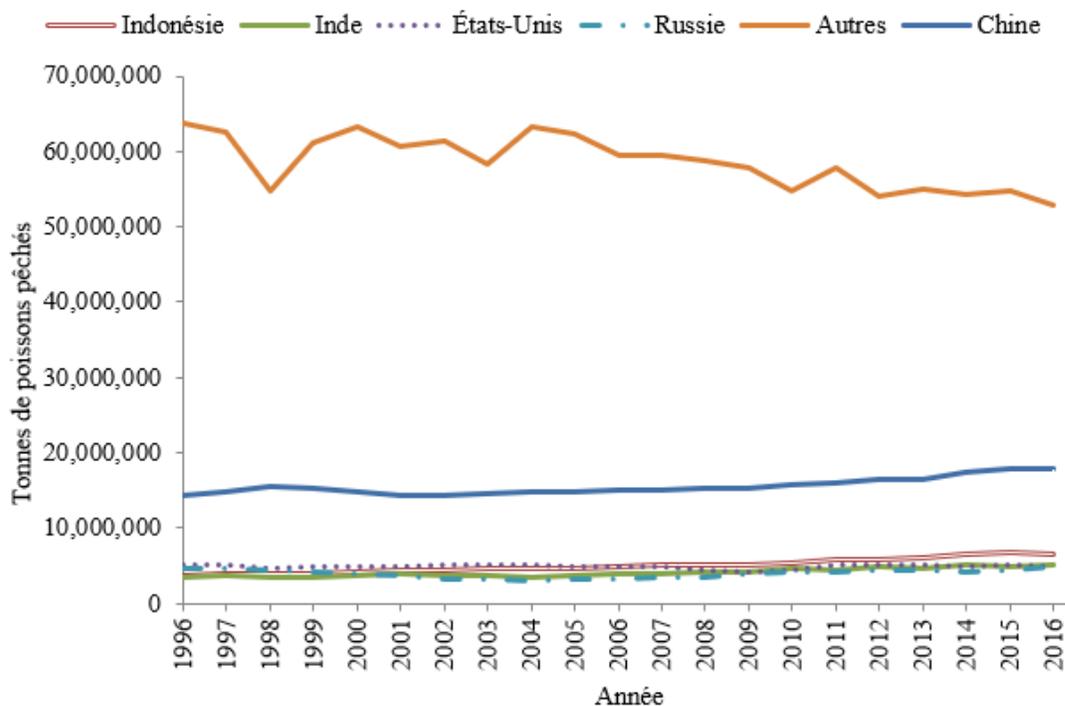


Figure 1. Production globale des pêches entre 1996 et 2015, par pays (tonnes). Les anchois sont exclus des données sur les poissons, car leur productivité dépend de phénomènes comme El Niño et d'autres facteurs environnementaux (FAO, 2018a).

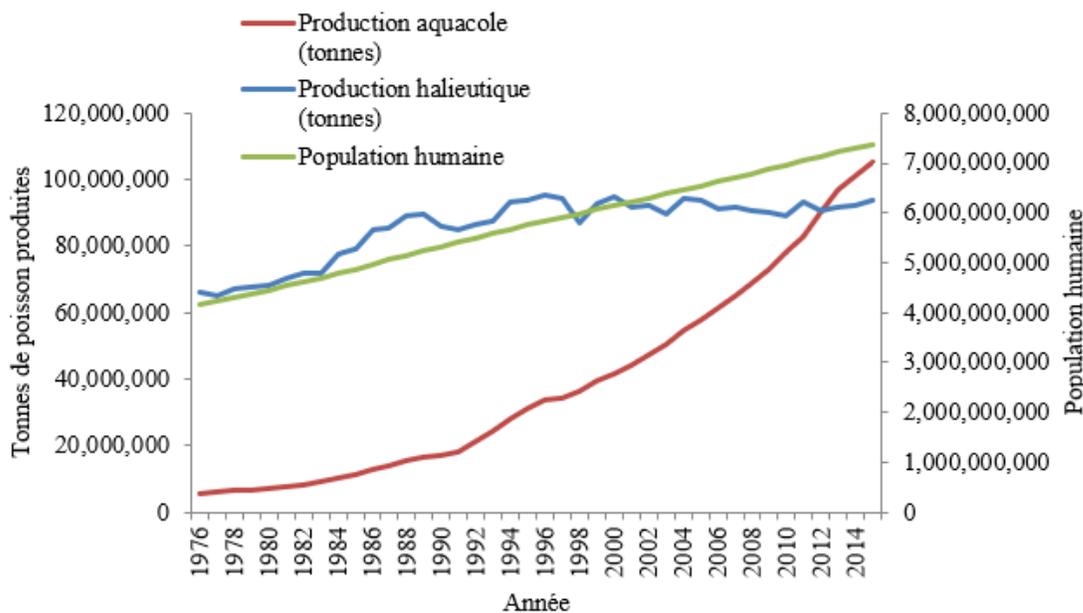


Figure 2. Productivité des pêches et de l'aquaculture en général entre 1976 et 2015 (tonnes) par rapport au nombre de personnes dans le monde. Les anchois et les espèces similaires sont exclus des données sur les poissons, car leur productivité dépend de phénomènes comme El Niño et d'autres facteurs environnementaux (FAO, 2016; ONU, 2017; FAO 2018a, b).

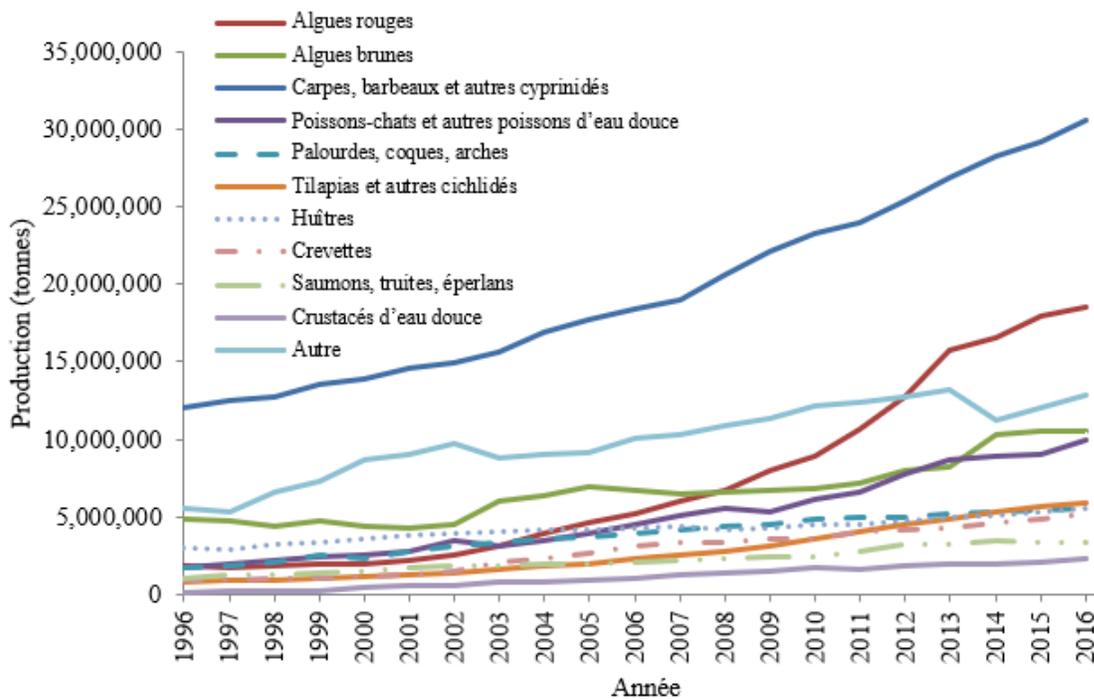


Figure 3. Hausse de la productivité en aquaculture, par groupe de la CSISAPA (Classification statistique internationale standard des animaux et plantes aquatiques), de 1996 à 2016 (tonnes) (FAO, 2018c).

Depuis ses débuts, l'industrie aquacole est confrontée à des épidémies de maladies infectieuses dans les stocks de poissons, qui posent un obstacle pratique et monétaire. Les maladies, qui peuvent être causées par des bactéries, des parasites, des virus et des champignons, entraînent la perte de poissons tout en étant coûteuses et longues à traiter (Dadar *et al.*, 2017). Dans le passé, en raison de la disponibilité d'antibiotiques à large spectre économiques comme les tétracyclines, les amphénicols et les sulfamides, les traitements antibiotiques ont été utilisés pour combattre les éclosions de maladies bactériennes en aquaculture (Watts *et al.*, 2017). Cette solution n'était pas durable, comme on l'espérait, car les bactéries ont pu développer une résistance à de nombreux médicaments utilisés (Watts *et al.*, 2017). La propagation de la résistance aux antibiotiques découle de la propagation de gènes de résistance aux antibiotiques (ARG), c'est-à-dire de gènes qui codent pour une protéine ou une fonction qui confère à un organisme une résistance à un antibiotique ou à une classe d'antibiotiques. Ces gènes produits par la sélection naturelle sont des défenses naturelles des bactéries contre les antibiotiques produits par d'autres bactéries ou contre les substances toxiques comme les métaux lourds ou les xénobiotiques présents dans l'environnement. Ces gènes peuvent également conférer une immunité à un antibiotique produit par l'humain (Kummerer 2009). Les ARG se propagent par transfert vertical, lorsque les bactéries possédant le gène ont une meilleure « valeur adaptative » et sont donc plus susceptibles de survivre et de se diviser, permettant ainsi la multiplication de bactéries semblables (Alonso *et al.*, 2001), ou de donner lieu à un transfert horizontal, qui se produit lorsque des éléments génétiques mobiles, y compris des plasmides, permettent aux bactéries de partager les ARG dans un ensemble de masse appelé résistome (Watts *et al.*, 2017). À mesure que la résistance s'étend, de nombreuses bactéries deviennent résistantes à de multiples antibiotiques, de sorte qu'il n'est plus possible de passer simplement à un autre médicament (Watts *et al.*, 2017). Les ARG peuvent également servir d'indicateurs de polluants environnementaux, lorsque les

antibiotiques peuvent perturber la biodiversité des communautés bactériennes dans l'eau et les sédiments à proximité des piscicultures (Watts *et al.*, 2017).

La plus grande préoccupation concernant les gènes résistants aux antibiotiques dans nos aliments, ou l'environnement dans lequel ils sont produits, est le transfert potentiel des ARG des bactéries naturelles aux agents pathogènes qui touchent soit nos productions (p. ex., le bétail, les plantes, les poissons, les crustacés, etc.) ou la santé humaine. Au Canada, selon le Conseil des académies canadiennes (CAC) « la RMA est à la fois un problème de santé et un problème mondial. Il n'y a pas un seul secteur en faute, aucune partie du monde n'est à l'abri et il n'existe pas de solution unique pour résoudre les problèmes posés par les microbes résistants. Il y a également un décalage entre la cause et l'effet de la RMA : L'UAM [utilisation d'antimicrobiens] à un endroit aujourd'hui peut conduire à des infections résistantes à un autre endroit demain. Les effets négatifs de la RMA sont déjà ressentis au Canada et dans le monde entier; l'inaction d'aujourd'hui fait en sorte qu'à mesure que la résistance augmente, ces effets ne feront que s'aggraver avec le temps. » Le CAC indique que, selon les estimations, 1 décès sur 19 est attribué à la RMA et que celle-ci coûte au Canada 1,4 milliard de dollars par an en frais de santé (Conseil des académies canadiennes, 2019). L'utilisation d'antibiotiques et la RMA qui en résulte dans les systèmes de production alimentaire terrestres et aquatiques font l'objet d'une préoccupation croissante à l'échelle internationale de la part de tous les secteurs industriels (vétérinaires, industrie, gestionnaires de soins de santé) et ont été jugées comme un risque majeur pour l'environnement et les soins de santé (p. ex., Kraemer *et al.*, 2019; Lulijwa *et al.*, 2020). Il est urgent de prendre des mesures coordonnées pour traiter cette question, tant à l'échelle nationale qu'internationale.

La possibilité de cette introduction par l'industrie aquacole a suscité de nombreuses préoccupations à l'échelle internationale, ce qui a donné lieu à un certain nombre d'études sur le sujet (p. ex., Cabello, 2006; Heuer *et al.*, 2009; Cabello *et al.*; 2013; Cabello *et al.*, 2016; Watts *et al.*, 2017; Topp *et al.*, 2018; Lulijwa *et al.*, 2020). Le transfert des ARG d'un élevage à l'humain pourrait se faire selon trois voies : 1) la consommation de produits contaminés inadéquats ou insuffisamment cuits 2) le contact étroit ou direct avec des animaux ou 3) l'environnement (Tiwari *et al.*, 2013). Bien qu'il y ait relativement peu d'études portant plus particulièrement sur le transfert des ARG de contextes aquacoles aux humains, il existe quelques données. Une étude menée au Chili a révélé qu'un gène de résistance à la quinolone à médiation plasmidique provenant d'une bactérie marine était transmis à *E. coli* (Aedo *et al.*, 2014). De même, une étude menée en Chine s'est penchée sur le développement de la résistance aux quinolones. Ils ont constaté qu'en plus des hôpitaux, l'aquaculture était une source possible d'*aac(60) -Ib-cr* et de *qnrB2* dans les milieux aquatiques (Wen *et al.*, 2016). Les entérobactéries, surveillées lors des contrôles de la qualité de l'eau, représentaient des hôtes importants de ces deux gènes, et les bactéries du genre *Aeromonas*, omniprésentes, servaient de vecteurs pour le *qnrS2* avec l'aide de plasmides de type *IncQ*. Une 3^e étude a examiné le développement de la résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones en Asie (Poirel *et al.*, 2012). Celle-ci a montré que la plupart des gènes de résistance à la quinolone à médiation plasmidique provenaient d'espèces bactériennes naturellement présentes dans l'environnement aquatique et suggérait que celles-ci représentaient la principale source du problème.

Le transfert de la résistance aux antibiotiques depuis les exploitations agricoles à l'humain a fait l'objet de beaucoup plus de travaux. Par exemple, une étude a examiné l'utilisation de trois antibiotiques, soit les streptothricines, les glycopeptides et la colistine, la résistance qui s'y est développée et les preuves de transmission et en a dressé un résumé général (Webb *et al.*, 2017). Les auteurs ont trouvé des éléments convaincants que la résistance aux antimicrobiens peut être transférée à l'humain.

Un diagramme schématique qui met en évidence les liens entre l'agriculture et les voies potentielles d'introduction des gènes de résistance aux antibiotiques de l'*E. coli* dans la biosphère vers les bactéries pathogènes de l'humain montre un certain nombre de canaux (Fig. 4a) (Hawkey et Jones, 2009).

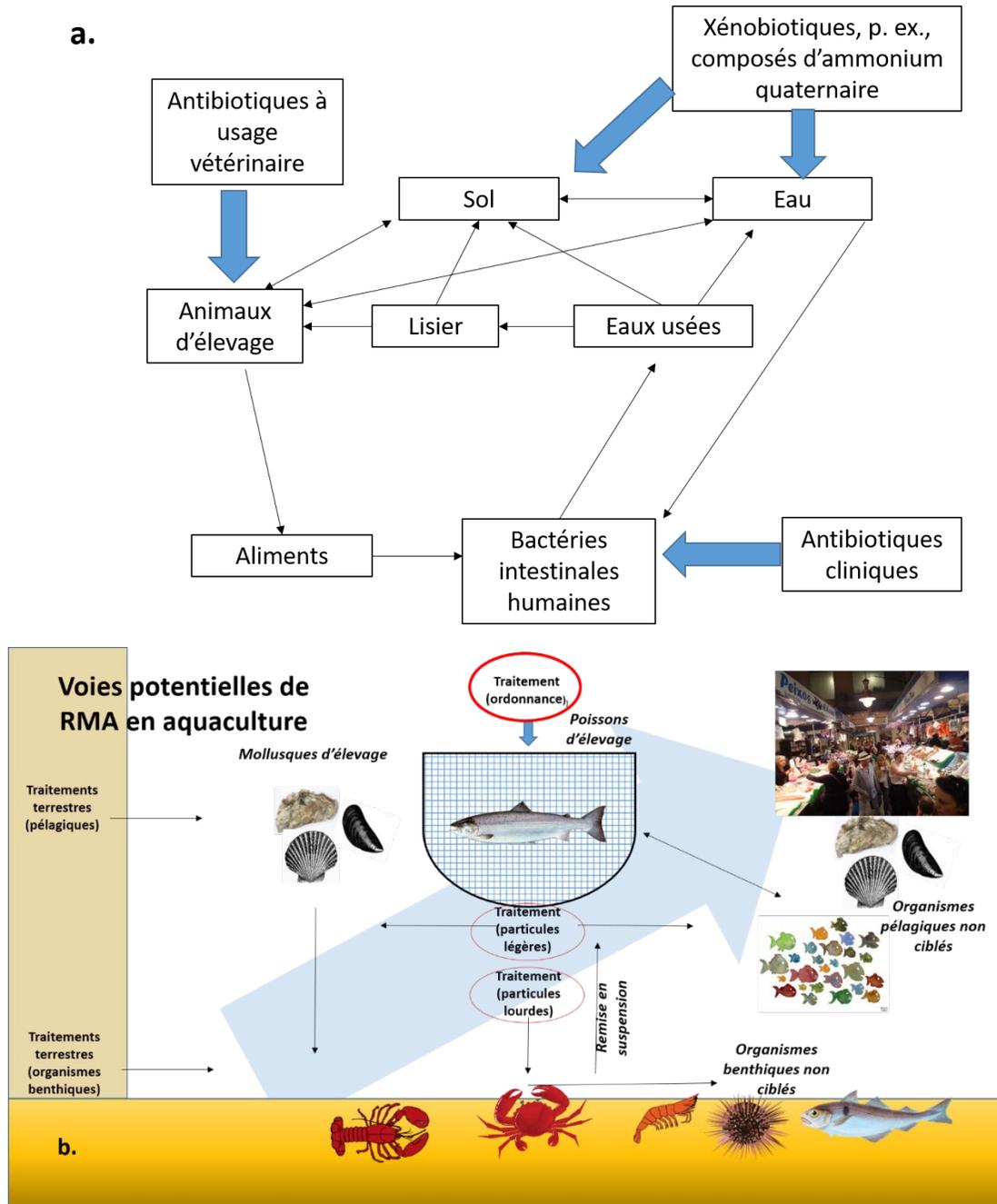


Figure 4 a.) Flux de gènes de résistance aux antibiotiques de l'*E. coli* dans la biosphère. Les flèches larges montrent les pressions sélectives majeures sur les gènes de résistance aux antibiotiques, les flèches fines montrent les directions importantes du flux génétique (redessiné et légèrement modifié à partir de Hawkey et Jones, 2009). 4 b.) Voies des effets du flux potentiel d'antibiotiques et d'ARG dans l'écosystème marin aboutissant finalement dans l'alimentation humaine (en haut à droite).

Les activités d'aquaculture marine peuvent créer un certain nombre d'autres séquences d'effets, car il existe des interactions trophiques multiples qui mènent toutes à la consommation humaine (figure 4b). Les antibiotiques peuvent être introduits depuis l'exploitation elle-même en raison de la lutte prescriptive contre les maladies ou, encore, ils peuvent provenir de sources terrestres par l'intermédiaire des installations de traitement des eaux usées qui se déversent dans le milieu naturel. Ces antibiotiques et les ARG potentiels connexes peuvent ensuite être transférés aux espèces sauvages qui s'associent aux intrants et se retrouvent ensuite dans l'alimentation humaine.

Il est donc possible que les exploitations aquacoles du Canada contribuent à la hausse générale de la RMA. Nous utilisons les mêmes technologies de production de base que celles employées dans d'autres pays et nous utilisons la même série d'antibiotiques, pour la plupart. En définitive, le degré d'amplification des ARG et leur transmission au résistome sont essentiellement liés aux taux et aux probabilités associés à la biologie des bactéries, à l'environnement dans lequel elles vivent et à la fréquence des échanges génétiques qui se produisent. Le calcul de ces risques se fera le plus raisonnablement par modélisation (p. ex., Baker *et al.*, 2016; Rico *et al.*, 2017).

Par conséquent, il faut trouver des solutions de rechange aux antibiotiques dans l'aquaculture pour faire face au problème à venir. On estime que d'ici 2050, les coûts des soins de santé au Canada résultant de l'augmentation de la RMA pourraient atteindre 8 milliards de dollars par an (Conseil des académies canadiennes, 2019). L'utilisation de vaccins pour prévenir la propagation de maladies bactériennes a déjà donné de bons résultats, notamment en Norvège, où l'utilisation d'antibiotiques a été fortement réduite au cours des 20 dernières années (Midtlyng *et al.*, 2011). Des tentatives prometteuses ont également été faites pour utiliser la bactériophagie dans le traitement des maladies bactériennes (Wang *et al.*, 2017b). Les bactériophages, ou virus propres aux bactéries, présentent un potentiel en tant que solution de rechange aux antibiotiques, sans danger pour les consommateurs et respectueuse de l'environnement, en raison de leur spécificité aux bactéries qu'ils ciblent (Wang *et al.*, 2017b). L'utilisation d'espèces bactériennes cultivées, soit comme probiotique pour renforcer la capacité de l'hôte à combattre les infections, soit parce qu'elles supplantent les bactéries pathogènes dans l'intestin de l'hôte, s'est également avérée efficace pour lutter contre les maladies des poissons (Sihag et Sharma, 2012). L'immunostimulation a été utilisée comme un moyen de combattre le stress que les conditions d'élevage font subir au système immunitaire des poissons (Vaseeharan et Thaya, 2013). Les immunostimulants peuvent souvent être fabriqués à partir de plantes communes, et plusieurs d'entre elles possèdent des avantages supplémentaires en tant que promoteurs de croissance (Nya et Austin, 2009b). De même, il a été démontré que certains extraits de plantes contiennent des substances antimicrobiennes (Dorucu *et al.*, 2009) et que l'*argile rouge* sédimentaire s'agrège aux cellules bactériennes de sorte qu'elles puissent être éliminées de l'eau (Jung *et al.*, 2016). Ces mesures ne sont généralement pas destinées à remplacer les antibiotiques, mais à compléter les traitements existants pour offrir les meilleurs plans de traitement intégré possible ainsi que lutter contre la propagation des ARG.

COMPRENDRE LES MALADIES BACTÉRIENNES EN AQUACULTURE

Les bactéries sont de petits organismes procaryotes qui forment des communautés complexes dans presque tous les environnements sur terre, y compris à l'intérieur et à l'extérieur des organismes vivants - chaque animal et chaque plante est la cible de maladies bactériennes (Drexler, 2010). Les bactéries, qui possèdent un seul chromosome circulaire, sont plus simples que les organismes eucaryotes. La réplication s'effectue par fission binaire, dans laquelle la cellule se divise en deux cellules descendantes identiques. Les bactéries pathogènes (ou

responsables de maladies) pénètrent dans le corps d'un organisme plus grand, comme un humain ou un poisson, par les plaies de la peau, les muqueuses ou les ouvertures telles que les yeux, le nez, les branchies ou les organes génitaux (Drexter, 2010). Elles peuvent également être portées par des parasites, consommées dans la nourriture et l'eau et transmises par contact cutané ou par activité sexuelle (Drexter, 2010).

Les bactéries pathogènes possèdent différents modes d'action pour envahir et infecter un hôte (Drexter, 2010). Les symptômes occasionnés par plusieurs agents pathogènes courants des poissons abordés dans le présent article sont présentés ci-dessous dans le tableau 1. Les symptômes commencent à apparaître lorsque les bactéries se multiplient dans l'organisme et commencent à endommager les cellules en sécrétant des composés nocifs ou en entrant en compétition avec les cellules hôtes pour l'espace et les nutriments. D'autres bactéries peuvent supprimer les défenses immunitaires du corps pour se propager plus rapidement, ou sécréter des toxines qui déclencheront une réponse immunitaire tellement massive que l'hôte lui-même en souffrira. L'objectif de toute bactérie infectieuse est de se multiplier le plus largement possible et de se propager à autant de nouveaux hôtes que possible (Drexter, 2010).

Les bactéries sont responsables d'une majorité (54,9 %) des épidémies de maladies en aquaculture (Dadar *et al.*, 2017). Les épidémies constituent un fardeau économique important pour l'industrie en raison des mortalités de poissons (Serrano, 2005) et des coûts associés au traitement (Dadar *et al.*, 2017).

Les pratiques associées à l'aquaculture constituent un terrain propice aux maladies bactériennes en raison des densités relativement élevées de poissons. Une *cage marine* (structure également appelée *cage en filet* ou *enclos marin*) est une grande enceinte placée directement dans l'océan dans une région côtière où on installe des poissons juvéniles (Burrells *et al.*, 2001). Il existe une libre circulation d'eau avec l'océan, et les substances comme les aliments pour poissons, les médicaments et les fèces peuvent passer à travers l'enclos vers le milieu environnant (DePaola *et al.*, 1995). Les poissons dans une cage marine sont entassés et stressés, et ne peuvent pas non plus adopter leurs comportements migratoires naturels (Burrells *et al.*, 2001). Le déplacement des poissons d'une cage à l'autre se fait généralement à l'aide d'un bateau vivier, bateau où les poissons et l'eau sont aspirés avant d'être déplacés vers un autre endroit (Hjeltnes *et al.*, 2017). Les poissons sont également manipulés par le personnel (Burrells *et al.*, 2001). Le stress imposé aux poissons par ces conditions a un effet négatif sur leur système immunitaire (Burrells *et al.*, 2001). Compte tenu des exportations massives des produits de l'aquaculture dans le monde, il existe un risque de propagation de maladies bactériennes d'un endroit à l'autre par les poissons d'élevage, en particulier lorsque les poissons ne présentent pas de symptômes et semblent en bonne santé (Dadar *et al.*, 2017), ce qui est courant (le tableau 1 décrit plusieurs agents pathogènes courants des poissons qui peuvent être présents chez les poissons sans occasionner de symptômes).

Une résistance croissante aux antibiotiques utilisés pour traiter ces maladies a été enregistrée ces dernières années. En conséquence, des études approfondies ont été menées sur les méthodes de traitement et de prévention de rechange, et des propositions ont été faites pour leur mise en œuvre (Dadar *et al.*, 2017). Ces approches sont présentées plus en détail ci-dessous dans la section *Nouvelles approches de la lutte contre les bactéries*, et comprennent la thérapie par les bactériophages, la vaccination et l'immunostimulation. Des lois et des règlements ont également été mis en œuvre par différents pays pour tenter de limiter l'utilisation des antibiotiques et ainsi empêcher la propagation de la résistance aux antibiotiques; ils sont résumés dans le tableau 3 de la section *Statu quo* ci-dessous.

Tableau 1. Agents pathogènes courants trouvés dans les poissons d'élevage, leurs symptômes et le traitement traditionnellement utilisé pour gérer les éclosions.

Nom de la maladie	Type de pathogène	Effets	Traitement	Source
Anémie infectieuse du saumon	Virus	Léthargie, décomposition des nageoires, lésions cutanées (parfois assez profondes pour endommager les tissus musculaires), anémie sévère, nécrose (mort des tissus) du foie et autres lésions aux organes	Aucun traitement n'a été élaboré, mais un vaccin est disponible.	(Falk <i>et al.</i> , 1997; Bouchard <i>et al.</i> , 2001; Brudeseth <i>et al.</i> , 2013)
Nécrose pancréatique infectieuse	Virus	Perte d'appétit, hyperventilation, nage anormale, gonflement abdominal, altération du mucus intestinal, gonflement du foie, nécrose pancréatique	Aucun traitement n'a été mis au point, mais un vaccin est disponible	(Roberts et Pearson 2005; Brudeseth <i>et al.</i> , 2013)
Maladie entérique de la bouche rouge/yersiniose (<i>Yersinia ruckeri</i>)	Bactérie	Perte d'appétit, léthargie, rougeur de la région de la bouche, hémorragie (saignement) sous la peau, dans les yeux, à la base des nageoires, autour de l'anus et dans les organes internes, accumulation de liquide dans les intestins et nécrose éventuelle de la muqueuse intestinale	Le traitement repose sur les antibiotiques. Les médicaments efficaces comprennent l'amoxicilline, l'acide oxolonique, l'oxytétracycline, la sulfadiazine en association avec l'ométhoprimé ou le triméthoprimé, et le florfénicol.	(Furones <i>et al.</i> , 1993; Newaj-Fyzul <i>et al.</i> , 2007; Kumar <i>et al.</i> , 2015)

Nom de la maladie	Type de pathogène	Effets	Traitement	Source
Ulcère d'hiver (<i>Moritella viscosa</i>) (<i>Tenacibaculum sp.</i>)	Bactérie	Lésions cutanées, parfois assez profondes pour endommager le tissu musculaire, dégénérescence musculaire	Florfenicol	(Lunder <i>et al.</i> , 1995)
Piscirickettsiose (<i>Piscirickettsia salmonis</i>)	Bactérie	Lésions et nodules cutanés, léthargie, perte d'appétit, nage anormale, anémie, gonflement abdominal, hémorragie à la base des nageoires, autour de l'anus et des organes internes, et gonflement des organes internes. La mortalité peut survenir sans symptômes dans certains cas.	Florfenicol, acide oxolinique, fluméquine, oxytétracycline.	(Rozas et Enriquez, 2014)
Vibriose/ vibriose de l'eau froide (diverses espèces de <i>Vibrio</i>)	Bactérie	Lésions, anémie, hémorragie aux branchies, aux nageoires et aux intestins, inflammation des intestins, nécrose musculaire, suppression de la réponse immunitaire	Oxytétracycline, sulfamides en association avec ométhoprimine ou triméthoprimine	(Bullock, 1977; Serrano, 2005)
Maladie amibienne des branchies (<i>Neoparamoeba perurans</i>)	Amibe	Lésions et excrétion de mucus aux branchies, kystes, anémie	Les vaccins sont encore en cours d'élaboration.	(Ruane et Jones, 2013)
Furonculose classique et atypique	Bactérie	Lésions, pustules remplies de sang, hémorragies. La	Sulfonamides en association avec	(Gudmundsdottir et Gudmundsdottir,

Nom de la maladie	Type de pathogène	Effets	Traitement	Source
<i>(Aeromonas salmonicida)</i>		mortalité peut survenir sans symptômes dans certains cas.	l'ométhopriprime ou le triméthopriprime.	1997; Serrano, 2005)
Septicémie hémorragique bactérienne (<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Aeromonas sobria</i> , <i>Pseudonomas</i>)	Bactérie	Nage anormale, branchies pâles, ballonnements et lésions cutanées. La mort peut également être observée de manière soudaine et sans symptômes.	Oxytétracycline	(Serrano, 2005; Kayansamruaj <i>et al.</i> , 2017)
Infection à streptocoque (<i>Streptococcus iniae</i>)	Bactérie	Léthargie, abcès, raidissement de la région dorsale, nage anormale et atteinte du système nerveux central conduisant souvent à une mort rapide.	Des vaccins ont été élaborés et mis en œuvre dans de nombreux cas.	(Baiano et Barnes, 2009; Weinstein <i>et al.</i> , 1997)

DÉVELOPPEMENT DE LA RÉSISTANCE

Les bactéries peuvent partager les déterminants de la résistance avec d'autres bactéries sans se diviser, et ce de deux façons principales. Le transfert de matériel génétique d'une bactérie à une autre est appelé *transfert horizontal/latéral*, tandis que le matériel génétique transmis aux cellules filles après la division est appelé *transfert vertical*.

Certaines espèces de bactéries peuvent se diviser assez rapidement et doubler leur nombre plusieurs fois par heure, ce qui signifie que la sélection naturelle agit sur elles beaucoup plus rapidement que sur les autres organismes. C'est pour cette raison que l'on pensait à l'origine que les mutations génétiques bénéfiques, qui conféraient aux bactéries une aptitude supplémentaire et augmentaient leurs probabilités de se répliquer et de se diviser avec succès, étaient le principal vecteur de la propagation de la résistance aux antibiotiques (Alonso *et al.*, 2001). Ce processus correspond au *transfert vertical*, où les gènes sont transmis de génération en génération lorsque les bactéries se divisent. Des recherches ultérieures ont montré qu'un rôle important inattendu était joué par le *transfert horizontal* (Alonso *et al.*, 2001), c'est-à-dire le partage de gènes qui améliorent la valeur adaptative dans différents environnements (Watts *et al.*, 2017). Le transfert horizontal se produit par l'entremise d'*éléments génétiques mobiles*, qui comprennent les plasmides et les transposons dans les cas où les gènes passent d'une cellule à une autre (Bennett, 2008). Les piscicultures constituent un environnement de choix pour ce type d'activité (Watts *et al.*, 2017). Si le pool de matériel génétique partagé a toujours été important, des études ont montré qu'avant l'utilisation généralisée des antibiotiques, les gènes de résistance étaient beaucoup moins courants qu'aujourd'hui (Alonso *et al.*, 2001). Par conséquent, il a été conclu que la pression sélective exercée sur les communautés bactériennes entraîne l'ajout de gènes de résistance au pool génétique partagé (Alonso *et al.*, 2001). Le pool de gènes de résistance aux antibiotiques échangés par une communauté bactérienne est appelé le *résistome* (Watts *et al.*, 2017).

Pression sélective

La résistance aux antibiotiques n'est pas un phénomène nouveau, car les bactéries ont toujours dû trouver des moyens de faire face aux composés nocifs présents dans l'environnement pour survivre (Watts *et al.*, 2017). Au cours de millions d'années, les bactéries ont développé une résistance aux métaux lourds et aux autres composés qu'elles rencontrent dans leur habitat, ainsi qu'aux antibiotiques naturels produits par d'autres bactéries présentes dans les sédiments (Kummerer, 2009). L'exposition à des niveaux sublétaux d'antibiotiques fait que les bactéries porteuses de gènes de résistance survivent et se reproduisent à des niveaux plus élevés que les bactéries dépourvues de ces gènes. Ces facteurs font que la résistance aux antibiotiques est un problème très courant dans les exploitations piscicoles, en particulier lorsque les antibiotiques sont utilisés régulièrement à titre prophylactique. Dans une étude, jusqu'à 90 % des bactéries testées se sont révélées résistantes à au moins un antibiotique (Watts *et al.*, 2017).

Une pression sélective est exercée en permanence sur les communautés bactériennes des piscicultures dès lors que des antibiotiques sont utilisés (Watts *et al.*, 2017). Dans les situations où les poissons d'une grande cage en filet sont traités avec des antibiotiques, le médicament est généralement mélangé à la nourriture et versé directement dans l'eau (Romero *et al.*, 2012). Ainsi, les bactéries vivant dans l'intestin des poissons sont exposées au traitement, et lorsque les aliments ne sont pas consommés ou que les antibiotiques non métabolisés passent dans les fèces des poissons, les bactéries présentes dans l'eau ou dans les sédiments sous la pisciculture sont exposées à une dose non létale du composé (Romero *et al.*, 2012). Il en résulte une pression sélective favorisant les bactéries qui ont des gènes de résistance aux antibiotiques et une augmentation éventuelle des types de bactéries qui ont une résistance au

médicament (Romero *et al.*, 2012). Ce processus commun est un exemple de résistance acquise pour un domaine, où la bactérie devient résistante à un composé auquel elle était auparavant sensible (Romero *et al.*, 2012). La résistance acquise est la forme la plus préoccupante de résistance aux antibiotiques et la plus grande menace pour la santé publique, car elle interfère avec notre capacité à traiter des agents pathogènes qui, avant l'arrivée des antibiotiques, étaient considérés comme beaucoup plus graves (Romero *et al.*, 2012).

De nombreuses structures cellulaires conférant une résistance aux antibiotiques permettent aux bactéries de résister aux dommages que leur causent les métaux présents dans l'environnement, comme les pompes d'efflux, qui sont des protéines présentes dans les membranes des bactéries et qui leur permettent de pomper les composés nocifs hors de la cellule (Watts *et al.*, 2017). Si certains métaux sont des micronutriments importants pour les bactéries, ils peuvent devenir toxiques en fonction de leur concentration et des conditions environnementales (Seiler et Berendonk, 2012). Les métaux lourds comme le mercure, le cadmium, le cuivre et le zinc contribuent à la sélection de gènes de résistance aux antibiotiques lorsqu'ils sont libérés dans l'environnement en association avec des antibiotiques et qu'on leur permet d'atteindre une concentration critique (Seiler et Berendonk, 2012). Les métaux lourds sont présents dans les additifs aux aliments pour animaux et aux engrais ainsi que dans les agents antisalissures (utilisés auparavant sur les filets des compartiments à poissons en eau libre pour empêcher la prolifération biologique sur la structure) et dans les pesticides, ce qui donne une communauté bactérienne exposée simultanément aux antibiotiques et aux métaux lourds (Seiler et Berendonk, 2012). Le couplage des mécanismes de résistance bactérienne aux métaux lourds et aux antibiotiques entraîne une sélection accrue, ou cosélection, à l'égard des gènes de résistance aux antibiotiques (Seiler et Berendonk, 2012).

Transfert horizontal - partage du matériel génétique

Un *élément génétique mobile* fait référence à la méthode par laquelle les cellules se transmettent du matériel génétique entre elles (Watts *et al.*, 2017). Il peut s'agir d'une structure qui permet à l'ADN de se déplacer d'une cellule à l'autre, ou entre différents endroits à l'intérieur de la cellule.

La *conjugaison* désigne la transmission de matériel génétique entre deux organismes qui ont un contact physique. Ce phénomène est également appelé accouplement bactérien. Les éléments génétiques mobiles dans ce cas sont connus sous le nom de *plasmides*, de petits segments circulaires d'ADN pouvant faciliter leur propre transfert d'une cellule à une autre, et de *transposons*, ou un gène ayant la capacité de s'insérer entre les chromosomes et les plasmides (Bennett, 2008). Un plasmide conjugatif peut alors passer à travers la membrane de la cellule donneuse vers la cellule réceptrice, avant que le transposon ne soit transcrit et éventuellement incorporé dans le chromosome (Bennett, 2008).

La *transformation* est le processus par lequel une cellule acquiert de l'ADN qui flotte librement dans l'environnement (Bennett, 2008). Comme dans le cas de la conjugaison, un élément génétique mobile est absorbé par la cellule et les gènes qu'il contient peuvent alors être transcrits et traduits (Bennett, 2008). L'ADN libéré par les bactériophages lytiques (voir ci-dessous la section sur les *bactériophages*) peut être récupéré par une autre cellule; on craint que ce procédé puisse inclure les gènes de résistance aux antibiotiques, qui étaient présents dans la cellule au préalable ou qui ont été insérés par l'entremise du génome viral (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015).

La *transduction* fait référence au cas où un bactériophage insère du matériel génétique dans une cellule, que la cellule intègre ensuite à son génome. Les bactériophages sont abondants

dans la nature, notamment dans les milieux aquatiques, où la transduction est très courante (Kutter et Sulakvelidze, 2004).

Rôle des plasmides

Les plasmides sont de petits segments d'ADN, généralement circulaires, qui se répliquent dans les cellules, indépendamment des chromosomes de l'organisme (Bennett, 2008). Ils ne contiennent aucun gène essentiel à la survie ou à la réplication (Bennett, 2008). Les gènes portés par les plasmides peuvent améliorer l'aptitude d'un organisme dans certaines situations, ce qui fait qu'il est avantageux sur le plan de l'évolution pour une bactérie de capter des plasmides dans le processus connu sous le nom de *transformation* (Bennett, 2008). Un plasmide portant des gènes qui confèrent une résistance aux antibiotiques ou à d'autres substances létales est appelé un *plasmide de résistance* (Bennett, 2008). On pense que les plasmides de résistance sont responsables de la plupart des cas de résistance aux antibiotiques courants qui ont été enregistrés à ce jour (Bennett, 2008).

Un autre élément génétique mobile important dans l'analyse de la résistance aux antibiotiques médiée par les plasmides est l'élément transposable ou *transposon*, qui permet de transférer un gène d'une molécule d'ADN à une autre (Bennett, 2008). Dans les cas où un plasmide a été absorbé par une cellule, un transposon peut provoquer le transfert d'un gène de résistance aux antibiotiques du plasmide au chromosome de la bactérie (Bennett, 2008). Le gène de résistance est alors incorporé dans le génome de la bactérie et sera reproduit lorsque la cellule se divisera (Bennett, 2008).

Rôle des bactériophages

Les phages, ou *bactériophages*, sont des virus presque omniprésents dans l'environnement qui ciblent plus particulièrement les bactéries (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015). Les phages exploitent les bactéries pour se multiplier, parce qu'ils possèdent tout le matériel génétique, mais aucun des mécanismes cellulaires nécessaires à la multiplication. Ils doivent donc détourner les mécanismes cellulaires d'une bactérie pour reproduire leurs génomes et synthétiser les protéines pour de nouveaux phages (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015). Dans le cas des bactériophages *lytiques* ou *virulents*, cela entraîne rapidement la mort de l'hôte, car la membrane cellulaire et la couche de peptidoglycane sont compromises pour libérer les phages propagés dans l'environnement (Oliveira *et al.*, 2012). Pour cette raison, les bactériophages lytiques ont été largement étudiés comme alternative potentielle aux antibiotiques en aquaculture, avec un grand succès (Oliveira *et al.*, 2012). Plus de renseignements sur les bactériophages lytiques et leur potentiel thérapeutique sont présentés ci-dessous, dans la section *Alternatives à l'utilisation d'antibiotiques - Bactériophages*.

Les préoccupations concernant les phages tempérés ou lysogènes sont généralement centrées sur le transfert de gènes étrangers dans les bactéries (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015). Contrairement aux phages virulents, ils ne lysent pas l'hôte pour libérer de nouveaux virus dans l'environnement (Oliveira *et al.*, 2012). Dans des conditions environnementales inadaptées, le virus insère simplement son matériel génétique dans le génome de l'hôte (ou reste dans la cellule sous forme de plasmide) et permet sa reproduction à l'infini, à mesure que la cellule hôte réplique son propre ADN et se divise (Oliveira *et al.*, 2012). Dans cette situation, le génome viral propagé est appelé *prophage*, et il peut entrer dans le cycle lytique lorsque les conditions sont propices (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015) ou être sécrété par la cellule sans la tuer (Oliveira *et al.*, 2012). Pour cette raison, les phages lysogènes sont inutiles comme traitement, mais peuvent être responsables du transfert d'éléments génétiques conférant virulence ou résistance aux antibiotiques aux bactéries (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015). Un prophage en cours d'empaquetage peut inclure des éléments du génome d'un hôte avec le sien, puis les insérer dans une nouvelle bactérie hôte, amenant le récepteur à intégrer ces gènes et à

commencer à les reproduire (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015). En conséquence, la bactérie réceptrice peut acquérir une résistance à plusieurs composés antibiotiques, ou acquérir des facteurs de virulence dangereux, comme la capacité de produire des toxines mortelles (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015). Cette acquisition de facteurs de virulence peut amener une bactérie à acquérir la capacité d'infecter de nouveaux organismes dans un processus connu sous le nom de *conversion phagique* (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015).

Rôle des intégrons

Les intégrons, présents dans certaines molécules d'ADN, représentent une autre méthode utilisée par les bactéries pour collecter des gènes non essentiels, mais potentiellement utiles (Bennett, 2008). Ces éléments contiennent des *cassettes de gènes*, soit de petits morceaux circulaires d'ADN qui ne se répliquent pas et contiennent généralement un gène à la fois (Bennett, 2008). Les cassettes de gènes sont déplacées à l'intérieur d'un intégron, ou d'un intégron à l'autre, et comme dans le cas des transposons, cela peut faciliter l'insertion d'un gène étranger dans le génome d'une bactérie (Bennett, 2008). Alors que les transposons ont tendance à insérer des gènes dans le chromosome au hasard, ou avec une légère préférence pour certains sites, les intégrons codent une enzyme qui permet l'insertion du gène à un site précis (Bennett, 2008).

Stratégies communes de résistance

Les antibiotiques ont un mécanisme d'action soit bactéricide, soit bactériostatique (Burridge *et al.*, 2010). Les antibiotiques bactéricides tuent directement l'organisme ciblé ou le rendent vulnérable à la destruction par la réponse immunitaire de l'hôte, et ils ciblent souvent la synthèse des membranes ou des parois cellulaires, la synthèse des protéines, la réplication de l'ADN ou des enzymes importantes (Romero *et al.*, 2012). Les antibiotiques bactériostatiques empêchent la croissance et la division de l'agent pathogène, qui meurt alors naturellement ou est tué par la réponse immunitaire de l'hôte (Romero *et al.*, 2012). Ils induisent cet effet en interférant avec la production de produits cellulaires ou d'ADN, ou en bloquant certains aspects du métabolisme bactérien (Romero *et al.*, 2012). Le mécanisme d'action d'un antibiotique est important pour déterminer comment un agent pathogène se défend contre lui. Les mécanismes d'action de certains types courants d'antibiotiques et les stratégies utilisées par les bactéries résistantes sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2. Antibiotiques communément utilisés en aquaculture, ainsi que leurs noms commerciaux, leurs mécanismes d'action et les stratégies courantes de résistance à leur rencontre.

Nom de l'antibiotique	Noms commerciaux	Mécanisme d'action	Stratégie de résistance	Réf. :
Quinolones (acide oxolonique, fluméquine)	Oxolinsyre vet, Lioflox, Bandrol, Flox-feed, Flumepren	Cible l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, toutes deux participant à la réplication de l'ADN	La résistance provient d'une mutation ponctuelle touchant le gène de la topoisomérase.	(Burridge <i>et al.</i> , 2010; Romero <i>et al.</i> , 2012; Institut vétérinaire norvégien, 2016a; Lozano

Nom de l'antibiotique	Noms commerciaux	Mécanisme d'action	Stratégie de résistance	Réf. :
				<i>et al.</i> , 2018)
Tétracycline (oxytétracycline)	Tétroxy Aquatique, Oxymarine, Pennox, Oxysentin, Terramycine, Bactitab, Renamycine, Terrivet, Zanil	Cible la synthèse des protéines en se liant de manière réversible au ribosome d'une cellule procaryote	Variées : mutations du ribosome, inactivation du médicament, efflux actif du médicament hors de la cellule ou protection du ribosome par une protéine cytoplasmique.	(Romero <i>et al.</i> , 2012; Sharker <i>et al.</i> , 2014; Kumar et Roy, 2017; Lozano <i>et al.</i> , 2018)
Amphénicols (florfenicol, chloramfénicol)	Aquaflor, Floraqpharmavet, Duflosan, Aquafer	Cible la sous unité ribosomique 50S des bactéries et inhibe l'élongation des protéines.	Comprend des protéines comme les méthyltransférases et hydrolases d'ARN ainsi que des transporteurs de protéines pour éliminer le médicament de la cellule	(Burridge <i>et al.</i> , 2010; Romero <i>et al.</i> , 2012; Institut vétérinaire norvégien, 2016a; Kumar et Roy, 2017; Watts <i>et al.</i> , 2017)
Sulfamides (sulfadiméthoxine-ormétoprime, triméthoprimé, sulfadiazine, sulfaméthoxazole)	Romet-30, Sulfamérazine, Sulfatrim, Cotrim-vet	Inhibe le métabolisme de l'acide folique, généralement administré en association avec le triméthoprimé (tribrissen) pour une inhibition à deux niveaux différents. Cela est réalisé en ciblant l'enzyme dihydroptéroate synthase (DHPS).	L'altération de l'enzyme DHPS réduit la fonctionnalité, mais augmente également la résistance aux sulfamides.	(Burridge <i>et al.</i> , 2010; Skold, 2000; Sharker <i>et al.</i> , 2014; Kumar et Roy, 2017; Lozano <i>et al.</i> , 2018)

Nom de l'antibiotique	Noms commerciaux	Mécanisme d'action	Stratégie de résistance	Réf. :
Amoxicilline	Acimox, Renamox, Ranamox, Amox-feed	Un antibiotique β -lactame qui perturbe la synthèse du peptidoglycane, affaiblissant ainsi la paroi cellulaire d'un agent pathogène à Gram positif ou la couche de peptidoglycane d'un agent pathogène à Gram négatif.	Synthèse de β -lactamases pour cliver le cycle β -lactame et rendre ainsi le médicament inefficace.	(Burrige <i>et al.</i> , 2010; Rasul, <i>et al.</i> , 2017; Wang <i>et al.</i> , 2017b; Lozano <i>et al.</i> , 2018)
Érythromycine	Vetromic, Eritofeed	Interfère avec les ribosomes 70S liés à l'ARNm et dégrade la sous-unité 50S.	Modification du ribosome pour altérer le site cible et empêcher la fixation des antibiotiques.	(Vester et Garrett, 1987; Weisblum, 1995; Cao <i>et al.</i> , 2011)

Agents pathogènes multirésistants

Un phénomène préoccupant enregistré ces dernières années est l'apparition d'*agents pathogènes multirésistants*, ou de bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques (Watts *et al.*, 2017). Jusqu'à 20 % des bactéries présentes dans certaines piscicultures sont résistantes à au moins cinq antibiotiques (Watts *et al.*, 2017). Dans de nombreux cas, ces antibiotiques sont également essentiels pour la médecine humaine (Heuer *et al.*, 2009). Cela peut constituer un obstacle important à la lutte contre les épidémies humaines si les gènes de résistance sont transmis aux agents pathogènes humains (Heuer *et al.*, 2009).

La multirésistance aux médicaments a également été constatée chez les agents pathogènes des poissons. On a constaté que des souches d'*Aeromonas* (tableau 1) étaient résistantes à la fois aux sulfamides, à la streptomycine, à la spectinomycine, au triméthoprime et/ou à la tétracycline (Serrano, 2005). Entre 2007 et 2015, le Centre de santé animale du ministère de l'Agriculture en Colombie-Britannique a récolté des isolats de bactéries pathogènes à partir d'échantillons soumis par des pisciculteurs et les a testés pour déterminer leur résistance aux antibiotiques habituellement utilisés pour les traiter (Centre for Coastal Health, 2016). Deux des maladies incluses dans cette étude sont causées par le *Yersinia ruckeri* et l'*Aeromonas salmonicida*, tous deux isolés de saumons atlantiques d'élevage. La résistance aux antibiotiques chez le *Y. ruckeri* s'est avérée très rare. Par ailleurs, lorsqu'une résistance était enregistrée chez l'*A. salmonicida*, une résistance à plusieurs médicaments a également été trouvée dans la majorité des cas.

STATU QUO

L'utilisation thérapeutique d'antibiotiques fait référence aux cas où les antibiotiques sont administrés aux poissons malades dans le but de traiter directement un pathogène précis qui les infecte (Romero *et al.*, 2012). Le développement de gènes de résistance à ces médicaments et la propagation de ces gènes à des agents pathogènes humains sont préoccupants, car beaucoup de ces mêmes médicaments sont également utilisés en médecine humaine (Heuer *et al.*, 2009). Au Canada, une gamme restreinte d'antibiotiques est disponible pour l'industrie de la pisciculture par l'intermédiaire des vétérinaires : oxytétracycline, florfénicol, érythromycine, ormétoprime et triméthoprime. De 2016 à 2018, l'oxytétracycline a représenté 78 % de l'utilisation en poids, le florfénicol, 20 %, et les autres antibiotiques, environ 2 % ([Données](#)).

L'utilisation préventive ou métaphylactique des antibiotiques consiste à administrer des antibiotiques à des animaux sains pour prévenir une éclosion avant qu'elle ne se déclare (Romero *et al.*, 2012). Cela peut être fait en même temps que le traitement des poissons malades (Romero *et al.*, 2012). L'objectif est d'éviter la perte monétaire résultant de la mortalité des poissons lors d'une épidémie et le coût supplémentaire d'un traitement thérapeutique. Toutefois, il existe un risque accru de développement d'une résistance aux antibiotiques puisque les bactéries sont constamment exposées à de faibles niveaux d'antibiotiques (Romero *et al.*, 2012). Aucune utilisation de ce type n'est réalisée au Canada à l'heure actuelle.

L'utilisation prophylactique d'antibiotiques consiste à administrer des antibiotiques à des animaux en bonne santé pour améliorer leur efficacité alimentaire et leur croissance (Serrano, 2005). Elle a pour effet d'éliminer les microbes, nuisibles ou non, qui vivent dans le tractus intestinal et qui utilisent les nutriments de l'alimentation de l'hôte pour leur propre usage (Serrano, 2005). Sans ces organismes, l'hôte est plus à même d'absorber les nutriments qu'il consomme, ce qui entraîne une croissance et une prise de poids plus rapides (Serrano, 2005). Bien qu'il y ait un intérêt financier à agir ainsi, la présence prolongée d'antibiotiques à petites doses crée un environnement propice au développement de la résistance (Kummerer, 2009). Alors que les pays développés du monde occidental ont généralement interdit ou fortement réglementé l'utilisation des antibiotiques à des fins prophylactiques et préventives, cette pratique est encore courante en Asie (Heuer *et al.*, 2009).

L'utilisation des antibiotiques varie selon les pays (Kummerer, 2009). Pas moins de 90 % de la production aquacole mondiale provient d'Asie, où les réglementations limitant l'utilisation des antibiotiques sont moins courantes et où l'utilisation est souvent sous-déclarée (Heuer *et al.*, 2009). C'est pourquoi le volume réel d'antibiotiques utilisés pour traiter les poissons d'élevage n'est pas connu (Kummerer, 2009). Parmi les principaux producteurs de poissons du monde occidental, le Chili est celui qui utilise le plus d'antibiotiques. Contrairement à la Norvège, au Canada ou au Royaume-Uni, le Chili a connu une tendance à la hausse de l'utilisation d'antibiotiques au cours des dix dernières années (Lozano *et al.*, 2018) (Fig. 5). Il y a également moins de transparence au Chili concernant les effets des antibiotiques administrés sur les humains et les animaux (Lozano *et al.*, 2018). Ces données montrent que le Chili utilisait environ 487 kg (écart-type = 121) d'antibiotiques par tonne de saumon produit. En comparaison, de 2016 à 2019, le Canada en utilisait en moyenne 0,13 kg (écart-type = 0,01) ([Données](#)) et en 2016, la Norvège utilisait 0,000017 kg d'antibiotiques par tonne de saumon produit (Midtlyng *et al.*, 2011).

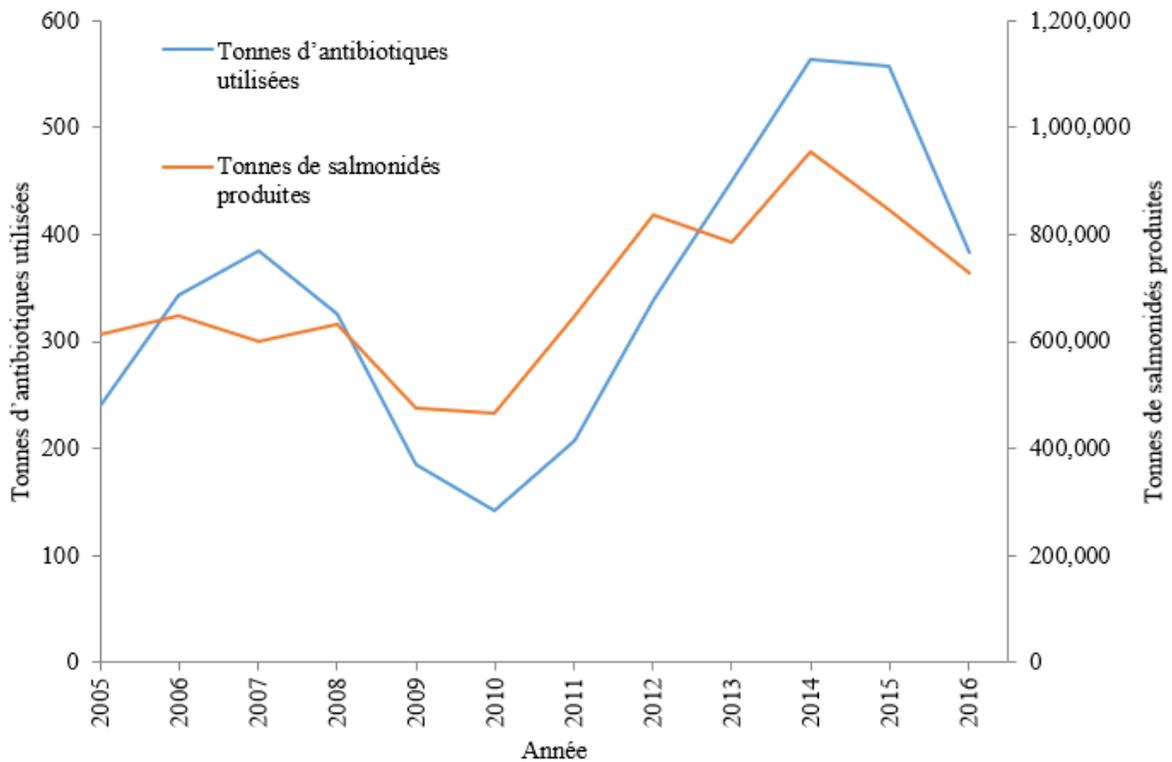


Figure 5. Utilisation d'antibiotiques au Chili par année, comparée à la production de salmonidés (tonnes) (Lozano et al., 2018).

Alors que l'utilisation d'antibiotiques au Chili suit clairement les tendances de la biomasse de poissons produits (figure 5), l'utilisation d'antibiotiques en Norvège a en fait fortement diminué (figure 6), malgré la croissance continue du secteur de l'aquaculture (FAO, 2018c) (Midtlyng et al., 2011). La Norvège a réussi à diminuer son utilisation d'antibiotiques grâce à des programmes de vaccination à grande échelle, à l'aménagement de l'espace des piscicultures pour éviter la propagation des maladies et à d'autres solutions techniques (Midtlyng et al., 2011). Vous trouverez plus de renseignements sur le succès de la Norvège ci-dessous dans la section *Vaccins*.

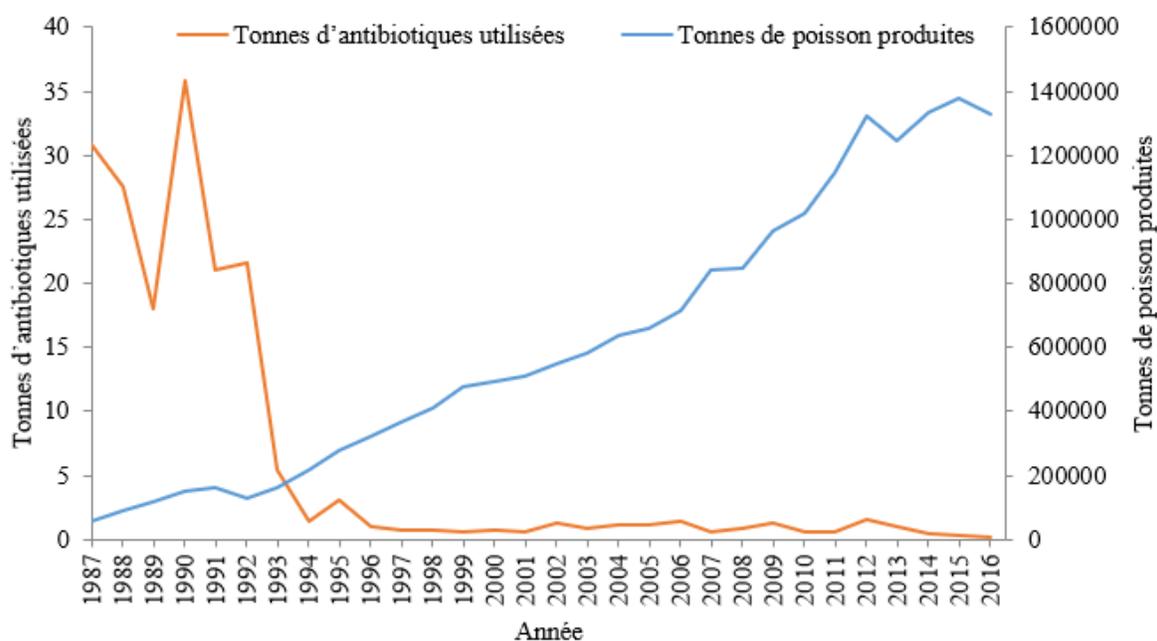


Figure 6. Utilisation d'antibiotiques en Norvège par année, comparée à la production de poissons d'élevage (tonnes) (Hjeltnes et al., 2017; FAO, 2018c).

Tableau 3. Législation concernant l'utilisation des antibiotiques en aquaculture, par pays.

Pays	Règlement	Réf. :
États-Unis	L'oxytétracycline, un mélange de sulfadiméthoxine et d'ormétoprime et le florfenicol sont autorisés pour les poissons-chats et les salmonidés. L'utilisation est limitée à certaines espèces pour le traitement de la bouche rouge entérique et de la furunculose respectivement. L'aquaculture ne représente qu'un faible pourcentage des antibiotiques vendus pour être utilisés chez les animaux aux États-Unis.	(Serrano, 2005; Kummerer, 2009; Kumar et al., 2015)
Canada	Les antibiotiques doivent être administrés sous la supervision d'un vétérinaire breveté. L'utilisation de l'oxytétracycline, de la sulfadiméthoxine mélangée à l'ormétoprime et du florfenicol est autorisée pour les poissons d'élevage.	
Norvège	Les antibiotiques doivent être administrés sous la supervision d'un vétérinaire breveté. Les antibiotiques approuvés pour l'utilisation sur les poissons d'élevage comprennent le florfenicol, l'oxolinsyre et l'oxytétracycline.	(Hjeltnes et al., 2017)
Chine	L'utilisation des antibiotiques est sous-déclarée et faiblement réglementée. Les antibiotiques approuvés pour	(Serrano, 2005)

Pays	Règlement	Réf. :
	l'aquaculture en Chine comprennent les sulfamides, la nystatine, la terramycine, l'auréomycine, la pénicilline, la streptomycine, la doxycycline, l'érythromycine et l'acide oxolinique.	
Chili	L'utilisation d'antibiotiques est plus élevée au Chili qu'en Norvège ou que chez d'autres grands producteurs de saumon. La réglementation est moins stricte, avec 12 antibiotiques génériques et 25 antibiotiques de marque dont l'utilisation est autorisée, sans précisions quant aux espèces auxquelles ils peuvent être administrés. Toutefois, les antibiotiques ne peuvent être utilisés que pour le traitement direct d'une maladie particulière, et non comme mesure préventive ou prophylactique. Le traitement doit être supervisé par un vétérinaire.	(Lozano <i>et al.</i> , 2018)
Royaume-Uni	L'oxytétracycline, l'acide oxolinique, l'amoxicilline et une combinaison de triméthoprime et de sulfadiazine sont autorisés.	(Kayansamruaj <i>et al.</i> , 2017)

ARG TROUVÉS DANS LES MILIEUX D'AQUACULTURE

Méthodes d'entrée et réservoirs

On craint que les antibiotiques qui restent dans le sol et l'eau à proximité des piscicultures contribuent au développement d'une résistance aux antibiotiques chez les agents pathogènes humains, en particulier dans les pays en développement, en raison de leur utilisation généralisée et non contrôlée. Cela s'explique notamment par le fait que les pays en développement sont généralement situés dans des climats chauds, ce qui signifie que les agents pathogènes sont acclimatés à des températures élevées qui leur permettraient de vivre dans l'intestin humain (Serrano, 2005) et que les conditions chaudes peuvent également réduire les temps de reproduction, ce qui permet d'accélérer les taux de croissance démographique.

Les sédiments du fond des océans abritent une communauté bactérienne florissante qui possède un énorme réservoir de gènes partagés (Watts *et al.*, 2017). La pression sélective des antibiotiques administrés aux poissons d'élevage fait que ce résistome contient davantage de gènes de résistance aux antibiotiques, ce qui modifie la composition des communautés bactériennes et favorise la propagation de la résistance aux antibiotiques (Watts *et al.*, 2017). Il a été déterminé que la plupart des antibiotiques ont une demi-vie de deux à trois semaines dans le sol, laquelle est prolongée à des températures inférieures à 20 °C (Serrano, 2005). L'oxytétracycline, l'un des antibiotiques les plus utilisés en aquaculture, peut avoir une demi-vie très variable de 9 à 419 jours selon le substrat et le degré d'anoxie (Björklund *et al.*, 1990; Capone *et al.*, 1996). La dilution étant considérée comme le principal mécanisme de réduction de la concentration, les phénomènes de remise en suspension des sédiments au fond de la mer jouent probablement un rôle important dans la détermination des concentrations locales.

Les antibiotiques constituent également une menace pour les bactéries qui vivent dans les eaux de surface. Les bactéries nitrifiantes endémiques des eaux douces, qui jouent un rôle écologique important, ont été endommagées par les antibiotiques utilisés en aquaculture dans un environnement simulé lors d'études en laboratoire (Kummerer, 2009).

Les antibiotiques et les ARG peuvent pénétrer dans les sédiments du fond de l'océan sous les piscicultures par l'intermédiaire des aliments pour poissons non consommés et des excréments des poissons (Muziasari *et al.*, 2014). Lorsque les poissons d'élevage reçoivent des antibiotiques par l'alimentation, la dose peut être plus élevée que celle qui est administrée aux animaux d'élevage, car la consommation d'aliments est moins efficace chez les poissons, notamment lorsqu'ils sont malades et souffrent d'une perte d'appétit, étant donné qu'il y a moins de contrôle sur chaque animal (Watts *et al.*, 2017). Lorsque les antibiotiques sont consommés par les poissons et ne sont pas complètement métabolisés, l'antibiotique qui sort de l'organisme dans les fèces est encore un composé actif (Kummerer, 2009). Dans certaines études, jusqu'à 80 % des antibiotiques administrés aux poissons peuvent pénétrer dans l'environnement au cours du traitement (Watts *et al.*, 2017). Les antibiotiques peuvent alors rester dans les sédiments (Kummerer, 2009), s'accumuler dans les tissus des poissons sauvages, ce qui non seulement les fait voyager loin de leurs sources d'origine, mais expose également les bactéries naïves qui peuvent alors développer une résistance (Zhao *et al.*, 2015). Ces poissons peuvent également être capturés pour la consommation humaine, ce qui pourrait théoriquement transférer les ARG ou les bactéries résistantes dans l'intestin humain, provoquant potentiellement des maladies ou le transfert des ARG vers des bactéries pathogènes pour l'humain (Zhao *et al.*, 2015).

L'oxytétracycline est l'un des antibiotiques les plus utilisés en aquaculture en raison de son faible coût et de son large éventail d'efficacité (Romero *et al.*, 2012). Toutefois, l'oxytétracycline est très difficile à métaboliser et, par conséquent, une grande quantité du médicament doit être administrée pour atteindre la dose souhaitée (Romero *et al.*, 2012). Jusqu'à 70 à 80 % de l'oxytétracycline administrée dans l'alimentation des poissons est excrétée dans l'eau où elle se biodégrade en grande partie. Toutefois, une partie persiste dans l'eau et dans les sédiments sous la pisciculture (en particulier, lorsque les courants sont faibles) (Romero *et al.*, 2012). Une étude chinoise de 2017 a montré la présence de gènes bactériens conférant une résistance à l'oxytétracycline (et aux sulfamides) dans l'eau et les sédiments associés aux piscicultures de la région de Guangzhou en Chine (Su *et al.*, 2017). Les auteurs suggèrent que le traitement incomplet des eaux usées provenant de sources terrestres peut perturber de manière significative les piscicultures et peut entraîner la dissémination des ARG et des antibiotiques dans l'environnement (Su *et al.*, 2017). Dans une autre étude réalisée dans une pisciculture norvégienne, l'oxytétracycline était encore détectable dans l'eau et les sédiments sous une pisciculture 89 à 142 jours après le traitement (Samuelsen *et al.*, 1992). Comme il est indiqué ci-dessus, l'exposition prolongée à des concentrations non létales d'un antibiotique entraîne la sélection des ARG chez les bactéries. Cette information génétique peut éventuellement se retrouver dans l'alimentation humaine ou être transférée latéralement à des agents pathogènes humains.

Certaines pratiques sanitaires plus « naturelles » qui utilisent des entités biologiques comme solution constitueraient une autre voie possible d'introduction des ARG dans les exploitations piscicoles. Par exemple, un grand nombre de poissons-nettoyeurs, comme des labres (Labridae) ou des lompes (Cyclopteridae), peuvent être utilisés comme prédateurs naturels des poux de mer qui se trouvent sur la peau des saumons cohabitant dans une cage marine. Chaque année, des millions de poissons-nettoyeurs sont produits dans des éclosiers, puis ensemencés avec des saumons. Ces poissons sont sensibles à bon nombre des mêmes agents pathogènes que ceux qui touchent le saumon et, par conséquent, sont traités avec les mêmes antibiotiques, ce qui suscite des inquiétudes quant à l'augmentation de la RMA (Erkinharju *et al.*, 2020). L'élaboration de vaccins pour les poissons-nettoyeurs accuse un retard par rapport aux efforts déployés pour les vaccins destinés au saumon.

Effet sur les communautés bactériennes

La présence d'antibiotiques et de gènes résistants aux antibiotiques dans les environnements entourant les piscicultures modifie la biodiversité des communautés bactériennes endémiques de ces zones (Watts *et al.*, 2017). Cela se produit parce que les souches résistantes de bactéries peuvent supplanter les souches non résistantes (Watts *et al.*, 2017).

Un modèle mathématique proposé par Rico *et al.* (2017) a utilisé des données précédemment compilées sur les seuils de résistance des bactéries environnementales pour modéliser les risques de développement de la résistance lorsque des antibiotiques sont libérés dans l'environnement. De façon semblable aux résultats de Su *et al.* (2017), l'eau et les sédiments d'où venaient les données provenaient d'environnements aquacoles d'Asie du Sud-Est, où les antibiotiques sont utilisés régulièrement et avec beaucoup moins de réglementations qu'en Amérique du Nord et en Europe (Rico *et al.*, 2017). Dans presque tous les scénarios calculés, au moins une partie des antibiotiques libérés dans l'environnement dépassait le seuil requis pour la propagation des ARG (Rico *et al.*, 2017).

Samuelsen *et al.*, (1992) ont cherché à décrire les propriétés de résistance et l'abondance des bactéries dans les sédiments sous la pisciculture pendant un an et demi après le traitement à l'oxytétracycline (Samuelsen *et al.*, 1992). Il y avait un nombre extrêmement élevé de bactéries résistantes (jusqu'à 90 %) dans les sédiments directement après le traitement, qui a ensuite baissé et s'est stabilisé avant d'augmenter progressivement vers la fin de l'étude, le pourcentage le plus élevé étant d'environ 50 % sous l'une des trois cages le dernier jour (Samuelsen *et al.*, 1992).

Une étude réalisée en 1995 par DePaola, Peeler et Rodrick (1995) a suivi la résistance à l'oxytétracycline dans les communautés bactériennes de l'eau d'un élevage de poissons-chats, ainsi que dans le microbiote interne des poissons, pendant un traitement à l'oxytétracycline administré par l'entremise d'aliments médicamenteux. Les auteurs ont constaté que la résistance à l'oxytétracycline dans les bactéries associées aux poissons médicamenteux augmentait régulièrement d'environ 10 % à 40 % pendant la période de traitement d'automne avant de revenir lentement à la normale pendant la période post-traitement (DePaola *et al.*, 1995). Au cours de l'expérience du printemps, la résistance a fluctué de 10 % avant le traitement à près de 90 % au milieu de la période de traitement, avant de chuter à environ 30 % pendant la période post-traitement (DePaola *et al.*, 1995).

Conséquences pour la santé humaine

L'utilisation d'antibiotiques dans l'aquaculture et la propagation des ARG qui en résulte ont déjà eu des conséquences perceptibles sur la santé publique. Des niveaux variables d'antibiotiques, dont certains à des concentrations nocives pour la santé humaine, ont été trouvés dans les produits des piscicultures chinoises (Mo *et al.*, 2017). La consommation de ces produits peut entraîner une médication accidentelle du consommateur, ce qui peut perturber la biodiversité et l'équilibre de la flore naturelle de l'individu, entraînant un affaiblissement de sa capacité à lutter contre les maladies et un risque accru d'infections (Heuer *et al.*, 2009). Les enfants, les personnes âgées et les autres individus dont la réponse immunitaire est affaiblie sont particulièrement exposés (Serrano, 2005). Il existe également des risques de développement d'une résistance aux antibiotiques dans la flore intestinale de l'humain, ainsi que des problèmes de diagnostic des allergies aux médicaments en raison de l'historique inexact de l'utilisation des antibiotiques (Mo *et al.*, 2017). Dans les pays développés, il existe généralement un délai obligatoire, compris entre 7 et 40 jours, entre le moment où un poisson peut être traité aux antibiotiques et celui où il peut être abattu pour être consommé, pour éviter une médication accidentelle du consommateur par des résidus dans les tissus de l'animal (Serrano, 2005).

Comme il est décrit ci-dessus, les bactéries environnementales peuvent partager des gènes de résistance aux antibiotiques entre elles. Ces gènes de résistance aux antibiotiques peuvent se retrouver dans le microbiome humain (Heuer *et al.*, 2009). Cela peut se produire de plusieurs façons. Les bactéries résistantes peuvent se trouver dans le poisson d'élevage récolté pour la consommation humaine (Weinstein *et al.*, 1997), être transmises aux travailleurs des piscicultures qui manipulent le poisson, être consommées dans l'eau potable (peu probable dans les pays développés) (Heuer *et al.*, 2009) ou être transmises des poissons d'élevage aux poissons sauvages qui sont ensuite capturés pour la consommation humaine (Zhao *et al.*, 2015). Quelle que soit la voie de transfert, l'utilisation d'antibiotiques en pisciculture a été liée au développement de la résistance aux antibiotiques chez les pathogènes humains (Heuer *et al.*, 2009). De nombreux antibiotiques utilisés pour traiter les poissons d'élevage sont également utilisés pour traiter les humains, ce qui rend encore plus dangereuse la propagation des gènes de résistance à ces médicaments dans le pool génétique bactérien (Heuer *et al.*, 2009). Dans le même ordre d'idées, certains agents pathogènes des poissons qui développent une résistance appartiennent au même genre que les agents pathogènes humains (ou sont suffisamment semblables à ces derniers) pour augmenter la probabilité de transfert de gènes entre eux (Heuer *et al.*, 2009). Les agents pathogènes humains peuvent également être présents dans les environnements aquatiques et produire des ARG comme résultat direct de la pression sélective (Heuer *et al.*, 2009). Ces agents pathogènes comprennent des espèces des genres *Salmonella* et *Shigella*, ainsi que des agents pathogènes opportunistes comme *Escherichia coli*, *E. tarda* et *Streptococcus iniae* (Heuer *et al.*, 2009). La propagation de la résistance aux antibiotiques chez les agents pathogènes humains entraîne une augmentation du nombre de foyers de maladies et une difficulté accrue à les traiter lorsqu'ils surviennent (Heuer *et al.*, 2009). Des études japonaises qui étudiaient plus précisément la tétracycline et la possibilité de transfert des ARG aux poissons d'élevage ont conclu que les gènes *tet* des bactéries prélevées dans les élevages avaient les mêmes origines que celles des souches résistantes cliniques (Furushita *et al.*, 2003).

SOLUTIONS DE RECHANGE

Élimination des antibiotiques de l'environnement

Milieux humides artificiels

Un milieu humide artificiel utilise les processus naturels des sédiments, des plantes et des microbes pour éliminer les contaminants des eaux usées (Bôto *et al.*, 2016). Une étude d'un microcosme en laboratoire a permis de tester la capacité des friches construites à éliminer les antibiotiques et les bactéries contenant des ARG des eaux usées d'une pisciculture (Bôto *et al.*, 2016). Les antibiotiques en question étaient l'enrofloxacin et l'oxytétracycline, tous deux largement utilisés en aquaculture (Bôto *et al.*, 2016). L'étude a été un grand succès, montrant une élimination de 99 % des particules d'antibiotiques et de 95 % des bactéries ciblées (Bôto *et al.*, 2016). Toutefois, si les friches construites sont considérées comme une solution verte à la contamination par les ARG dans les eaux usées des piscicultures, on sait peu de choses sur l'impact environnemental de cette stratégie, ainsi que sur les risques de libération de composés toxiques si la barrière végétale est endommagée (Bôto *et al.*, 2016).

Photolyse

Certains antibiotiques sont sensibles à la lumière, et leur décomposition peut être accélérée lorsqu'ils y sont exposés (Kummerer, 2009). La photodégradation des antibiotiques a lieu principalement dans les eaux de surface, et son efficacité dépend de l'intensité et de la fréquence de la source lumineuse ainsi que de la turbidité de l'eau (Kummerer, 2009). Les tentatives d'élimination des antibiotiques de l'eau en les exposant à la lumière doivent être

abordées avec prudence, car une décomposition incomplète peut rendre les composés instables et toxiques (Kummerer, 2009). L'oxytétracycline est particulièrement sensible à la photodégradation (Kummerer, 2009). Les fluoroquinolones peuvent être dégradées par la lumière UV (Kummerer, 2009).

Hydrolyse

L'hydrolyse désigne une réaction chimique au cours de laquelle de l'eau est consommée pour couper une molécule en deux. Certains antibiotiques subissent ce processus dans des conditions convenables, qui dépendent généralement de la température et du pH (Kummerer, 2009). Les β -lactames sont très facilement hydrolysés (Kummerer, 2009). Les bactéries résistantes à cette classe d'antibiotiques utilisent le processus d'hydrolyse pour ouvrir le cycle β -lactame, ce qui mène à la désactivation de l'activité du composé (Kummerer, 2009). L'introduction de ces bactéries dans un environnement aquacole pour qu'elles désactivent les antibiotiques résiduels ne semble pas être une option pour réduire la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques, bien au contraire, car ces bactéries pourraient potentiellement transmettre leurs gènes de résistance à d'autres dans le voisinage.

NÉCESSITÉ DE NOUVELLES APPROCHES

L'*Aeromonas salmonicida* est un agent pathogène qui cause d'énormes pertes économiques ainsi que la mortalité des poissons en aquaculture dans de nombreuses régions du Nord (Romero *et al.*, 2012). Il est notamment connu pour sa capacité à acquérir rapidement une résistance à un nouvel antibiotique (Romero *et al.*, 2012). À l'origine, le traitement utilisé contre l'*A. salmonicida* était le sulfonamide, mais plus de 75 % des isolats testés sont désormais résistants (Romero *et al.*, 2012). Il ne s'agit là que d'un seul cas où les antibiotiques deviennent inefficaces en raison de la résistance croissante. Compte tenu des préoccupations sanitaires liées à la résistance croissante des agents pathogènes aux antibiotiques courants, il est essentiel de trouver de nouveaux moyens de surmonter cette résistance ou de traiter les bactéries sans antibiotiques. Des solutions multiples seront nécessaires, car les causes du problème sont complexes et de nombreuses bactéries sont déjà résistantes à plusieurs médicaments (Finch et Hunter, 2006). Le simple passage à un autre antibiotique en cas de résistance n'est plus une option viable en raison du risque d'accroître le développement d'agents pathogènes multirésistants (Finch et Hunter, 2006).

Les grandes entreprises pharmaceutiques font peu d'efforts pour rechercher de nouveaux antibiotiques en raison de la faible incitation financière par rapport aux médicaments dits de « bien-être » (Finch et Hunter, 2006). La demande d'antibiotiques à large spectre est également plus faible que celle des médicaments qui ne traitent que quelques infections particulières, ce qui n'est pas non plus rentable pour les entreprises pharmaceutiques (Finch et Hunter 2006). Malgré l'augmentation du financement, on constate également une diminution de la découverte de composés antimicrobiens (Finch et Hunter, 2006).

Avant que le financement ne diminue au profit de la recherche sur les antibiotiques à large spectre, les vaccins étaient considérés comme l'option la plus prometteuse pour se défendre contre les bactéries infectieuses (Finch et Hunter, 2006). De nos jours, quand la recherche sur les vaccins est financée, c'est généralement pour des maladies pour lesquelles il n'existe aucun traitement antibiotique (Finch et Hunter, 2006). Des fonds supplémentaires devraient être consacrés à la recherche de vaccins pour les infections actuellement traitées par antibiotiques (Finch et Hunter, 2006).

En fin de compte, ce qui se passe au Canada quant aux stratégies de remplacement des antibiotiques dans la pisciculture reflétera ce qui se passe également au niveau international, puisque l'industrie de la pisciculture est étroitement liée. De nombreuses entreprises de

salmoniculture au Canada sont des multinationales dont le siège social est situé en Norvège. Les grandes entreprises pharmaceutiques ont également une portée internationale et ont des liens nationaux avec tous les pays qui élèvent actuellement du saumon. Les solutions développées dans un pays ont tendance à se répandre rapidement dans d'autres, souvent par l'intermédiaire de ventes commerciales (p. ex., les vaccins, la technologie du poisson-nettoyeur, les probiotiques, etc.) Par exemple, la Norvège est l'acteur dominant de l'industrie de la salmoniculture et, de ce fait, investit massivement dans de nouvelles approches pour lutter contre les maladies et les parasites. Comme le gouvernement canadien investit moins dans ce secteur, le Canada a généralement tendance à adopter une approche plus opportuniste et à accorder des licences et parfois à modifier les technologies qui ont été mises au point par d'autres, bien qu'il y ait quelques exceptions. Cela s'est produit avec la conception des cages, les systèmes d'alimentation, les vaccins, le contrôle des parasites, la nutrition, etc. L'une ou l'autre des approches de rechange sera probablement liée à d'autres efforts internationaux en cours, car il faudra démontrer que l'octroi de licences et la réglementation de la technologie fonctionnent dans les conditions canadiennes et qu'elles sont compatibles avec le niveau de risque relatif actuellement accepté par les gestionnaires de ressources canadiens.

Thérapie par bactériophages

Les bactériophages, des virus qui ciblent spécifiquement les bactéries, constituent l'une des options les plus prometteuses pour lutter contre les maladies bactériennes chez les poissons d'élevage. Les bactériophages, à titre de virus, sont essentiellement constitués d'un génome (ADN ou ARN) enfermé dans une enveloppe protectrice appelée *capside*, qui est constituée de protéines et/ou de lipoprotéines (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Ils ne disposent pas de la machinerie cellulaire nécessaire pour reproduire leur information génétique ou synthétiser les protéines de leurs capsides protectrices, et doivent donc détourner la machinerie d'un organisme hôte pour y parvenir (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Chez les phages lytiques/virulents, cela entraîne la mort de l'hôte (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Les bactériophages constituent le groupe d'organismes le plus abondant sur Terre, et les phages virulents jouent un rôle vital en tant que prédateurs dans les écosystèmes bactériens (Kutter et Sulakvelidze, 2004).

Les bactériophages peuvent être classés en deux groupes : lytique/virulent et *tempéré/lysogène* (Oliveira *et al.*, 2012). Un phage lytique ou virulent est un phage qui nécessite un *cycle lytique* pour se reproduire. Au début du cycle lytique, le virus envahit la cellule hôte, libère son génome et interrompt le métabolisme de l'hôte, la réplication de l'ADN et la synthèse des protéines (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Le virus peut également contenir des protéines qui détruisent le génome et les enzymes de l'hôte ou altèrent sa membrane (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Une fois que le virus a été répliqué, la cellule hôte se lyse, ou éclate, et libère de nouveaux phages dans l'environnement pour poursuivre le cycle (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Il existe également des phages tempérés ou lysogènes, qui ont la possibilité de vivre indéfiniment dans une cellule hôte dans un *cycle lysogène*, où le génome viral est intégré dans le génome de l'hôte ou reste dans la cellule sous la forme d'un plasmide (Oliveira *et al.*, 2012). Ces génomes viraux dormants, appelés *prophages*, se reproduisent tranquillement à mesure que la cellule hôte se réplique, et peuvent, dans les bonnes conditions, être activés et entrer dans le cycle lytique (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Les bactériophages étudiés pour utilisation en médecine sont généralement des bactériophages virulents (Oliveira *et al.*, 2012).

Les bactériophages les plus courants sont les *phages à queue*, qui ont une « queue » de protéines fibreuses attachée à leurs enveloppes protéiques pour infecter la cellule hôte. Ce processus est connu sous le nom d'*adsorption* (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Le virus reconnaît et se lie à une molécule précise à la surface de la cellule hôte. Presque n'importe quel type de

molécule de la membrane peut être un récepteur involontaire pour un phage (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Une fois que les fibres de la queue du phage se lient à ces récepteurs, les enzymes de l'extrémité de la queue dégradent la couche protectrice de peptidoglycane de la bactérie et le génome du phage est injecté dans la cellule (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Le virus contient des *promoteurs phagiques* qui reconnaissent l'ARN polymérase de l'hôte et l'obligent à transcrire les *gènes précoces* viraux, lesquels codent pour des protéines qui arrêteront la réplication de l'ADN de l'hôte et inactiveront les mécanismes de défense de l'hôte comme les protéases (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Comme mentionné ci-dessus, ces protéines peuvent avoir des propriétés destructrices pour l'acide nucléique, les protéines ou les membranes de l'hôte (Kutter et Sulakvelidze, 2004). La cellule est ensuite reprogrammée pour synthétiser du matériel génétique et des protéines pour produire de nouveaux phages. Lorsque les conditions sont réunies, les protéines virales connues sous le nom de *lysines* et de *holines* compromettent la membrane de l'hôte et la couche de peptidoglycane, tuant l'hôte et permettant à de nouveaux phages de s'échapper dans l'environnement (Kutter et Sulakvelidze, 2004).

Chaque espèce de bactériophage se spécialise à l'égard d'une ou de plusieurs souches précises d'une espèce hôte (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Cela donne à penser que des cocktails de phages peuvent être élaborés pour ne cibler qu'un organisme précis sans nuire vraiment à la flore naturelle de l'hôte, ce qui leur confère un potentiel comme moyen de traiter les maladies infectieuses en médecine humaine et vétérinaire. Cette spécificité signifie également que la première étape de la mise au point d'un traitement par phages consiste à déterminer avec certitude la bactérie agissant comme agent causal de la maladie (Oliveira *et al.*, 2012). Les étapes suivantes comprennent l'isolement des phages dans l'environnement de la bactérie, de nombreux cycles de purification, la caractérisation génétique des phages, l'établissement de la virulence contre la bactérie cible et le test de son efficacité à la fois en laboratoire (sur des plaques et dans des réservoirs) et sur le terrain (Oliveira *et al.*, 2012).

Applications des phages en aquaculture

Les traitements bactériophages pour les poissons d'élevage ont été largement étudiés au cours des 20 dernières années, et les premiers ont été mis en œuvre contre le *Lactococcus garvieae* au Japon en 1999 (Wang *et al.*, 2017b). Quelques expériences sur différents organismes d'élevage et pathogènes sont résumées ci-dessous, donnant un aperçu des avantages et des inconvénients de ces traitements.

Étude de cas n° 1

Les agents pathogènes de la famille des *Vibrio* sont courants chez les poissons et provoquent des taux de mortalité élevés lorsque les infections deviennent incontrôlables (tableau 1). Différentes espèces de *Vibrio* sont pathogènes pour une grande variété d'animaux aquatiques, des huîtres aux saumons (Wang *et al.*, 2017b). Le *V. harveyi* est une espèce de *Vibrio* qui infecte de nombreuses espèces d'invertébrés d'élevage, notamment les huîtres, les crevettes et les homards. Les traitements par bactériophages ont été testés et se sont révélés efficaces contre le *V. harveyi*, plusieurs phages différents ayant une virulence contre des dizaines de souches. Dans une étude récente, un échantillon de *Vibrio harveyi* a été utilisé pour amplifier des bactériophages isolés d'ormeaux malades (Wang *et al.*, 2017b). Deux bactériophages lytiques ont été identifiés et nommés vB_VhaS-a et vB_VhaS-tm (Wang *et al.*, 2017b). Ces deux phages présentent des similitudes avec les phages de *Vibrio* précédemment identifiés (Wang *et al.*, 2017b). Huit souches de *V. harveyi* ont été cultivées en combinaison avec les phages isolés et amplifiés pour déterminer lesquelles d'entre elles pouvaient être des cibles pour le virus (Wang *et al.*, 2017b). vB_VhaS-tm s'est avéré virulent contre les huit souches de *V. harveyi* testées, tandis que vB_VhaS-a était virulent contre six des huit souches testées (Wang *et al.*, 2017b). Lorsque des ormeaux infectés par le *V. harveyi* ont été traités avec un

cocktail contenant vB_VhaS-tm, le taux de survie était de 70 %, contre 0 % pour le groupe infecté par le *V. harveyi* et non traité (Wang *et al.*, 2017b). Les groupes témoins de phages et de bouillon n'ont eu aucun effet sur la survie, ce qui suggère que le cocktail de phages est à l'origine de l'augmentation de la survie chez les poissons malades (Wang *et al.*, 2017b).

Étude de cas n° 2

Le *V. harveyi* a également été traité avec succès par un autre bactériophage à large spectre (efficace contre 50 souches de *V. harveyi* testées) chez des larves de crevette dans un environnement de laboratoire. Ce traitement a mené à un taux de survie de 80 % par rapport au taux de survie de 25 % du groupe témoin (Vinod *et al.*, 2006). Compte tenu de ces résultats prometteurs, le traitement a été testé dans une écloserie de crevettes, où 35 000 larves de crevettes ont été traitées contre une épidémie d'origine naturelle de *V. harveyi* (Vinod *et al.*, 2006). Deux autres groupes ont également été testés dans le cadre de cette étude (Vinod *et al.*, 2006). Un groupe a reçu le traitement antibiotique standard et un autre groupe n'a reçu aucun traitement (Vinod *et al.*, 2006). L'expérience s'est déroulée sur 17 jours et les résultats peuvent être consultés ci-dessous (Fig. 7). Le traitement par phage a montré un taux de survie significativement plus élevé que le groupe traité par antibiotique et que le groupe témoin (Vinod *et al.*, 2006).

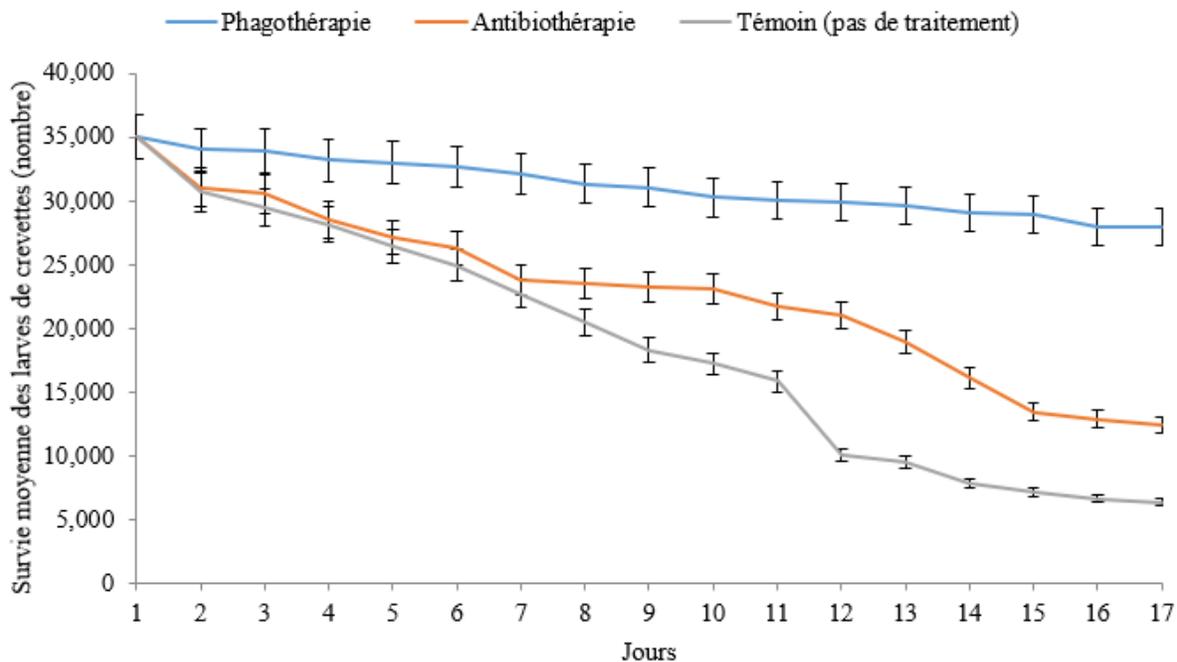


Figure 7. Survie des larves pendant le traitement d'une épidémie de *V. harveyi* dans une écloserie de crevettes, selon qu'elles ont reçu le traitement par bactériophage, le traitement antibiotique ou aucun traitement (Vinod *et al.*, 2006).

Étude de cas n° 3

Le *V. harveyi* n'est pas le seul agent pathogène contre lequel les traitements par bactériophages ont été efficaces. Dans l'aquaculture d'eau douce indienne, un antibiotique β -lactame appelé carbapénème est généralement utilisé pour traiter les infections à *Pseudomonas aeruginosa*, agent pathogène commun des poissons (tableau 1), car il est immunisé contre la plupart des β -lactamases (Khairnar *et al.*, 2013) (les antibiotiques

β -lactames nécessitent une fonction moléculaire appelée *anneau β -lactame* pour être efficaces. Les *β -lactamases* sont des enzymes bactériennes qui fendent cet anneau, conférant ainsi une résistance à l'antibiotique). Toutefois, les *P. aeruginosa* responsables de récentes épidémies ont développé des gènes codant pour une *métallo- β -lactamase* (MBL), qui est efficace contre le carbapénème et, par conséquent, le traitement habituel a été rendu inefficace (Khairnar *et al.*, 2013). Des traitements antibiotiques alternatifs existent, mais ils sont très coûteux ou ont de graves conséquences négatives sur la santé des poissons (Khairnar *et al.*, 2013). Le gène MBL est également médié par les plasmides et se propage rapidement parmi les souches bactériennes (Khairnar *et al.*, 2013). Par conséquent, une solution de rechange au traitement standard est désespérément nécessaire. Comme on peut retrouver les bactériophages ciblant une bactérie en grand nombre partout où leurs hôtes se rassemblent (Kutter et Sulakvelidze 2004), les eaux usées de ces piscicultures ont été utilisées pour isoler les phages propres au *P. aeruginosa* (Khairnar *et al.*, 2013). Vingt poissons-chats ont été infectés par le *P. aeruginosa* résistant aux antibiotiques, et le cocktail de phages a été testé dans un environnement de laboratoire (Khairnar *et al.*, 2013). Dix d'entre eux ont reçu le cocktail de phages appliqué sur leurs lésions cutanées, tandis que dix ont reçu un diluant appliqué comme témoin (Khairnar *et al.*, 2013). Cette phagothérapie a permis de réduire les lésions cutanées chez les poissons atteints d'une infection à *P. aeruginosa* par rapport au groupe témoin (Khairnar *et al.*, 2013).

Étude de cas no 4

L'agent pathogène des poissons *Streptococcus parauberis* est un coccus à Gram positif non mobile généralement traité par érythromycine, amoxicilline ou florfenicol (voir tableau 1), mais les souches résistantes (y compris les souches multirésistantes) sont de plus en plus fréquentes (Kwon *et al.*, 2017). Dans l'espoir d'isoler un bactériophage particulier à cet agent pathogène, un isolat confirmé de *S. parauberis* a été cultivé avec un filtrat d'échantillons de tissus homogénéisés provenant de poissons malades. Comme dans l'exemple décrit ci-dessus, le but était de trouver des virus se rassemblant dans un environnement riche en hôtes. Après des cultures répétées, la purification du bactériophage et l'analyse de l'ADN, le nouveau bactériophage Str-PAP-1 a été identifié (Kwon *et al.*, 2017). Pour tester son potentiel en tant que traitement, 55 souches de *S. parauberis* ont été isolées d'une pisciculture infectée pour utilisation en laboratoire, ainsi que des isolats de 5 autres agents pathogènes courants des poissons à des fins de comparaison (un isolat de chacun de *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus inae*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ichthyenteri* et *Edwardsiella ictaluri* a été utilisé dans l'étude) (Kwon *et al.*, 2017). Sur les 55 isolats de *S. parauberis* testés dans l'étude, la croissance de 35 a été inhibée par Str-PAP-1 (Kwon *et al.*, 2017). Le virus n'a montré de virulence contre aucune des cinq autres bactéries (Kwon *et al.*, 2017). Lorsque les poissons recevaient des aliments médicamenteux à Str-PAP-1, une plus faible abondance de *S. parauberis* était détectée dans leurs organes à la fin de l'étude, et l'infection et le taux de mortalité causés par la maladie étaient réduits (Kwon *et al.*, 2017). De manière inattendue, la croissance des poissons a également été améliorée lorsque les aliments ont été médicamenteux à Str-PAP-1 (Kwon *et al.*, 2017), ce qui suggère qu'il s'agit d'une solution de rechange aux antibiotiques prophylactiques. On espérait que Str-PAP-1 serait également efficace contre les autres agents pathogènes des poissons testés dans l'étude, mais il s'est révélé virulent uniquement contre le *S. parauberis* (Kwon *et al.*, 2017).

Comme le montrent ces résultats prometteurs, il existe de solides arguments en faveur du traitement par bactériophages, qui présente plusieurs avantages par rapport aux antibiotiques. Des ressources supplémentaires sont actuellement nécessaires pour la recherche sur les bactériophages, mais une fois les traitements développés, ils pourraient potentiellement être moins chers que les traitements antibiotiques (Oliveira *et al.*, 2012), d'autant plus que les phages se multiplient rapidement lorsqu'on leur fournit des hôtes (Madhusudana Rao et Lalitha

2015). L'impact environnemental des traitements par phages devrait être relativement faible, car les phages sont déjà abondants dans l'environnement (Madhusudana Rao et Lalitha 2015). La spécificité des phages par rapport à leurs cibles est probablement leur plus grand avantage sur les antibiotiques, car leurs effets sont limités à certains organismes (Oliveira *et al.*, 2012), ce qui contraste avec l'action des antibiotiques à large spectre, lesquels peuvent gravement endommager le microbiome d'un animal ou d'un environnement (Madhusudana Rao et Lalitha 2015). Contrairement aux antibiotiques, cette spécificité les rend également propres à la consommation s'ils sont présents dans les aliments (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015).

Désavantages

Toutefois, il reste plusieurs inconvénients dont il faut tenir compte lors du développement de bactériophages destinés à être utilisés en aquaculture. L'alimentation inefficace des animaux malades en raison d'un appétit réduit rend l'administration de la phagothérapie par l'alimentation difficilement réalisable (Oliveira *et al.*, 2012). Les injections constituent une voie plus directe, mais ne sont pas pratiques dans le cas de grandes piscicultures avec des centaines de milliers, voire des millions d'animaux à traiter (Oliveira *et al.*, 2012). Les phages sont propres à une souche plutôt qu'à une espèce, ce qui limite leur efficacité et nécessite l'identification et l'isolement de bactériophages contre de nombreuses variantes bactériennes (Oliveira *et al.*, 2012) pour mettre constamment à jour les banques de phages. Si certains phages sont efficaces contre jusqu'à 90 % des souches d'une espèce de bactérie, d'autres ne le sont que contre quelques-unes (Oliveira *et al.*, 2012). Cet inconvénient peut être annulé en délivrant plusieurs phages à la fois dans un cocktail, mais l'identification d'un bactériophage virulent pour chaque souche est un processus long qui nécessite une expertise et de l'équipement (Oliveira *et al.*, 2012). Troisièmement, les bactériophages qui se comportent de manière virulente en laboratoire peuvent devenir lysogènes dans les conditions plus difficiles du terrain, ce qui nécessite des tests *in vivo* approfondis avant qu'un traitement puisse être envisagé pour une mise en œuvre plus large (Oliveira *et al.*, 2012). Quatrièmement, on craint qu'un phage lysogène ne transfère des gènes de résistance aux antibiotiques à une bactérie, ou qu'un phage lytique ne provoque la libération de ces gènes dans l'environnement où ils pourraient être prélevés par des agents pathogènes par transformation (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015).

Enfin, comme pour les antibiotiques, les bactéries peuvent acquérir une résistance aux bactériophages en développant des gènes codant pour des anticorps neutralisant les phages ou en mutant pour perdre les molécules de surface que les phages utilisent comme récepteurs (Oliveira *et al.*, 2012). Toutefois, les phages lytiques tuent leurs hôtes avant que de nouveaux virus ne s'échappent dans l'environnement, ce qui rend moins préoccupante la multiplication d'une bactérie résistante (Oliveira *et al.*, 2012). L'administration de doses plus élevées d'un phage annule également les effets des anticorps neutralisant le phage (Oliveira *et al.*, 2012), et l'administration de plusieurs phages en cocktails tient compte des souches qui sont résistantes à un phage particulier (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015). La résistance aux phages dans les bactéries peut également être combattue en associant le traitement par phage à un traitement antibiotique (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015). Il faut donc tenir compte qu'il s'agit d'une bataille permanente pour le maintien de la santé des organismes cultivés et de la stase physiologique.

Inhibiteurs de la détection du quorum

La détection du quorum (QS) est un phénomène découvert chez les bactéries qui représente une méthode de communication intercellulaire entre les individus d'une espèce et peut-être d'autres espèces dans la communauté du biofilm. Ce système de communication permet aux bactéries d'entreprendre des processus qui sont coûteux et inefficaces lorsque les densités

cellulaires sont faibles, mais qui deviennent beaucoup plus efficaces au niveau communautaire lorsque les densités cellulaires sont élevées, comme pendant les périodes de synthèse des facteurs de virulence, de formation des biofilms et de production de protéases et de sidérophores. Un système de QS se compose de molécules de signal de QS et de composants protéiques régulateurs qui peuvent contrôler les comportements physiologiques et l'expression des gènes de virulence des agents pathogènes bactériens (Remy *et al.*, 2019, Zhao *et al.*, 2019). L'idée est que si ce système de QS peut être inhibé, l'augmentation exponentielle du nombre de pathogènes dans le microbiome de l'organisme ne se produira pas. Les populations de bactéries sont naturellement contrôlées dans la nature par d'autres bactéries et cette caractéristique a mené à la recherche d'inhibiteurs qui pourraient être utilisés dans les industries humaines et les soins de santé. Un examen du sujet montre qu'il existe plusieurs espèces marines qui produisent des inhibiteurs de détection du quorum, qu'il s'agisse de petites molécules ou d'enzymes inhibitrices (Zhao *et al.*, 2019). Les auteurs suggèrent que cette approche pourrait être utile pour des applications dans les domaines de la conservation des aliments, de l'aquaculture, de la santé humaine, de la protection écologique, etc., en contrôlant la détérioration des aliments médiée par la QS et en inhibant la formation de biofilms médiée par la QS et la virulence des agents pathogènes.

Il a été démontré que l'inhibition de la détection du quorum se produit dans le système digestif des poissons. Une étude chinoise menée sur des poissons rouges a montré qu'une enzyme d'extinction du quorum (inhibition de la détection du quorum) diminuait le pourcentage de bactéries pathogènes dans l'intestin (Zhou *et al.*, 2016). Les auteurs ont suggéré que les probiotiques de désactivation de quorum pourraient être utiles comme additif alimentaire non antibiotique et ainsi combattre les maladies bactériennes en aquaculture. D'autres études qui ont examiné l'inhibition de la détection du quorum ont montré qu'elle pouvait être efficace dans les traitements humains contre l'agent pathogène *Burkholderia* (Koch *et al.*, 2014) et également chez les plantes (Helman et Chernin, 2015).

En résumé, l'inhibition de la détection du quorum semble être un domaine qui se développe rapidement et qui pourrait avoir un rôle futur à jouer dans les stratégies de lutte contre les infections bactériennes, tant dans une perspective de soins de santé que pour les processus industriels.

Vaccins

La vaccination est le processus consistant à exposer un organisme à des *antigènes* (définis ci-dessous) associés à un agent pathogène pour déclencher une réponse immunitaire. La méthode d'exposition varie selon le type de vaccin, mais le point commun à tous les types est de déclencher la production par le système immunitaire d'anticorps et de cellules mémoires contre un agent pathogène pour lui permettre de le combattre efficacement en cas d'infection future (HHS, 2017).

Les processus du système immunitaire des vertébrés sont expliqués plus en détail ci-dessous dans la section *Immunostimulants*, mais quelques notions sont nécessaires pour comprendre le fonctionnement de base des vaccins. Lorsque l'organisme détecte un envahisseur étranger, il envoie des cellules appelées *macrophages* pour l'ingérer et le détruire (NIAIDS, 2012). Le macrophage va alors exposer, ou présenter, un *antigène* de cet organisme (molécule présente à la surface de l'agent pathogène qui le distingue des autres organismes) sur sa propre surface, qui sera reconnu par d'autres cellules immunitaires appelées cellules *B* et *T*. Les lymphocytes *T* modulent l'activité d'autres cellules immunitaires ou tuent les cellules qui ont été infectées par l'organisme porteur de l'antigène, et les lymphocytes *B* commenceront à produire des *anticorps* contre l'antigène. Les anticorps reconnaissent l'antigène à la surface de l'agent pathogène et s'y fixent, recouvrant finalement l'organisme envahisseur et l'empêchant de fonctionner ou

d'attaquer les cellules hôtes. Les anticorps signalent également aux cellules immunitaires de venir détruire l'envahisseur. Après la disparition de l'agent pathogène, certains des lymphocytes B et T participant à la lutte contre cet agent seront convertis en *cellules mémoires*, lesquelles peuvent se diviser rapidement et reprendre leurs fonctions si l'agent pathogène est à nouveau rencontré.

Un vaccin vise à simuler une infection pour permettre au receveur de produire des anticorps et des cellules mémoires avant la rencontre avec l'agent pathogène. Les types de vaccins comprennent les vaccins vivants atténués (où l'agent pathogène est administré vivant et désactivé), les vaccins inactivés (où l'agent pathogène est administré mort), les vaccins sous-unitaires (où des parties de l'agent pathogène que l'organisme reconnaîtra comme étrangères sont administrées, comme des protéines de surface) et les vaccins anatoxines (où un produit nocif sécrété par l'agent pathogène est administré) (HHS, 2017). Les vaccins peuvent également être monovalents, divalents ou multicomposants, selon le nombre d'agents pathogènes qu'ils ciblent.

Les poissons étant des vertébrés très simples dont le système immunitaire repose largement sur l'action des macrophages, la mise au point de vaccins à leur intention doit en tenir compte (Dadar *et al.*, 2017). D'autres préoccupations concernent la manière dont un vaccin sera administré à d'énormes populations de poissons dans des cages marines. Les voies d'alimentation, d'immersion et d'injection ont toutes été explorées (Dadar *et al.*, 2017). Dans la plupart des cas, les vaccins utilisés en aquaculture contiennent des agents pathogènes morts/inactivés, qui sont produits en exposant un grand nombre d'organismes à une substance létale comme le formol qui tuera les microbes sans détruire leurs molécules d'identification/antigènes (Dadar *et al.*, 2017). Les vaccins inactivés sont également plus sûrs que les vaccins vivants/atténués dans de nombreux cas (HHS 2017), tant que l'on prend soin de répliquer et de tuer les agents pathogènes (Dadar *et al.*, 2017). Les agents pathogènes courants des poissons (détaillés dans le tableau 1) qui font l'objet de vaccins inactivés comprennent plusieurs espèces de *Vibrio*, dont le *Vibrio salmonicida*, ainsi que l'*Aeromonas salmonicida* et le *Yersinia ruckeri*. L'un des inconvénients des vaccins inactivés est qu'ils doivent être administrés par injection, ce qui prend beaucoup de temps lorsqu'il s'agit d'un grand nombre de poissons (Dadar *et al.*, 2017). De plus, ils nécessitent généralement plusieurs doses pour être efficaces, ce qui exacerbe ce problème (HHS, 2017). Les vaccins atténués présentent également un potentiel en aquaculture. Ils offrent généralement un niveau de protection plus élevé par rapport aux vaccins inactivés et n'ont pas à être injectés (Dadar *et al.*, 2017). Toutefois, ils doivent faire l'objet de tests approfondis avant d'être mis en œuvre pour s'assurer que l'agent pathogène affaibli n'est pas en mesure de provoquer une infection à grande échelle (Dadar *et al.*, 2017). Enfin, les vaccins peuvent être *homologues* ou *hétérologues*. Dans un vaccin homologue, l'agent pathogène introduit est la cible, tandis que dans un vaccin hétérologue, un organisme est introduit pour conférer une immunité à un autre (Kapczynski *et al.*, 2017).

Les vaccins ont été explorés comme méthode de prévention des maladies en aquaculture depuis 1938, lorsque des carpes ont reçu une injection d'*Aeromonas punctata* inactivé, ce qui a entraîné une immunité contre la maladie (Dadar *et al.*, 2017). Avec la technologie disponible à l'époque, cette voie a toutefois été jugée comme prenant trop de temps pour une application à grande échelle (Dadar *et al.*, 2017). Les vaccins n'ont commencé à être autorisés pour l'utilisation en aquaculture que dans les années 1970 et ont été largement mis en œuvre depuis les années 1990 (Dadar *et al.*, 2017). La Norvège a réussi à réduire considérablement l'utilisation des antibiotiques grâce aux vaccins (voir ci-dessous). On a également constaté de grandes réductions de la morbidité et de la mortalité des poissons là où les vaccins ont été mis en œuvre (Dadar *et al.*, 2017).

Le secteur de l'aquaculture norvégienne utilise des vaccins pour réduire la quantité d'antibiotiques utilisés pour traiter les poissons d'élevage depuis 1987, avec un grand succès (Midtlyng *et al.*, 2011). En 2016, seulement 212 kg de substance active ont été vendus en Norvège pour le traitement antibiotique des poissons d'élevage (Fig. 8). Ces résultats sont le fruit d'une collaboration entre le gouvernement et les pisciculteurs pour vacciner les poissons contre la furonculose classique et d'efforts concentrés sur la mise au point de vaccins de qualité par l'industrie pharmaceutique, combinés à des initiatives non vaccinales, notamment la mise en jachère annuelle obligatoire et la planification spatiale des sites piscicoles pour minimiser la propagation de la maladie (Midtlyng *et al.*, 2011).

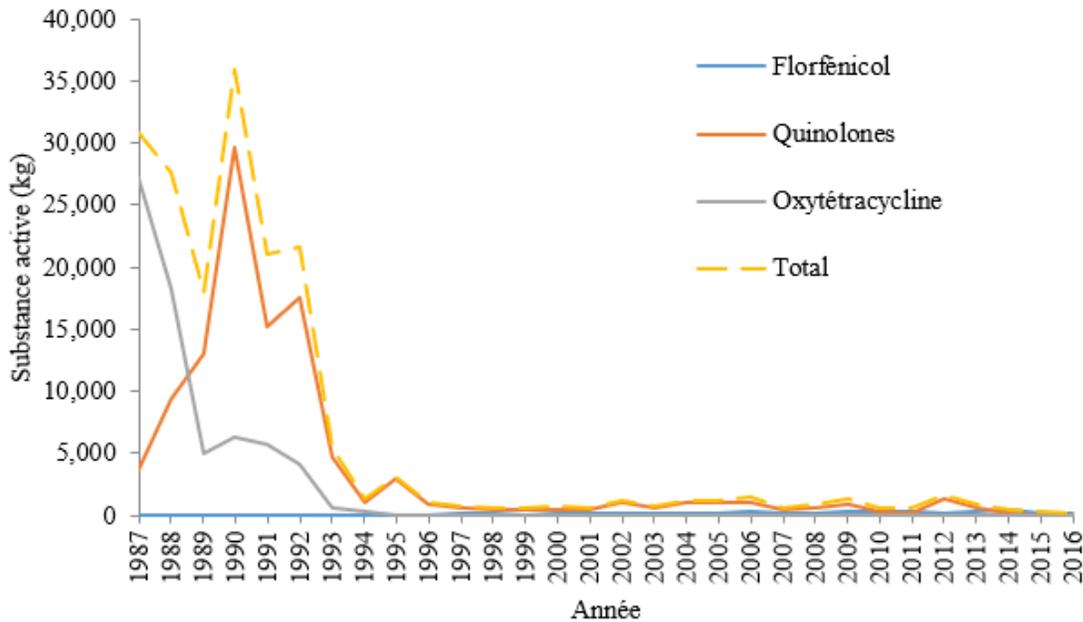


Figure 8. Antimicrobiens vendus pour être utilisés dans l'aquaculture norvégienne par catégorie, de 1987 à 2016 (kg de substance active) (Olsen, 2005; Institut de la santé publique, 2015).

Si la Norvège a obtenu les meilleurs résultats en matière de vaccination des poissons d'élevage pour réduire l'utilisation des antimicrobiens, des efforts sont également déployés dans le monde entier. Des vaccins contre 22 agents pathogènes bactériens et 6 viraux sont disponibles dans 40 pays pour 17 espèces de poissons d'élevage (Brudeseth *et al.*, 2013). Néanmoins, la vaccination reste une pratique peu courante dans des pays comme la Chine, où l'utilisation d'antimicrobiens dans le secteur de l'aquaculture est élevée, non réglementée et non déclarée (Brudeseth *et al.*, 2013). Le Canada, le Chili et le Royaume-Uni ont tous mis en œuvre des programmes à grande échelle de vaccination des poissons contre des agents pathogènes courants (Brudeseth *et al.*, 2013). Pour donner un exemple général des procédures utilisées dans le monde, les méthodes de vaccination du saumon de l'Atlantique sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4. Efforts de vaccination du saumon de l'Atlantique par pays (Brudeseth et al., 2013).

Pays	Maladies les plus courantes	Procédures de vaccination
Norvège	Furonculose classique, anémie infectieuse du saumon (AIS), vibriose, vibriose en eau froide et ulcère d'hiver	Vaccin à base d'eau et d'huile à six composants pour les six maladies susmentionnées, injecté aux saumoneaux sur le site en eau douce. Environ 30 % des saumoneaux reçoivent également un vaccin monovalent contre la nécrose pancréatique infectieuse (NPI).
Chili	Furonculose, vibriose, piscirickettsiose, NPI et AIS	Vaccin à base d'eau et d'huile à cinq composants contre les maladies mentionnées dans la colonne précédente, avec une vaccination orale occasionnelle contre la piscirickettsiose ou un vaccin monovalent par immersion contre le NPI, à la discrétion des producteurs.
Canada	Furonculose classique, anémie infectieuse du saumon (AIS), nécrose hémorragique infectieuse (NHI), vibriose et vibriose en eau froide	Côte Est : vaccination à base d'eau et d'huile contre la furonculose, l'AIS et les trois types de vibriose. Côte Ouest : même chose que ci-dessus, avec un vaccin supplémentaire à base de plasmide inter-musculaire contre la NHI. Il existe également un vaccin par immersion contre la maladie bactérienne de la bouche rouge entérique.
États-Unis	Furonculose classique, bouche rouge entérique, anémie infectieuse du saumon, vibriose et vibriose en eau froide	Pratiques de vaccination semblables à celles du Canada sur les deux côtes, mais aucun vaccin contre la NHI n'est homologué aux États-Unis. Les alevins de saumon reçoivent un vaccin supplémentaire contre la bouche rouge entérique et la furonculose.
Royaume-Uni	Nécrose pancréatique infectieuse (NPI), furonculose classique	Vaccin divalent à base d'eau et d'huile contre la furonculose et la NPI, ainsi que vaccin monovalent contre la maladie du pancréas
Îles Féroé	Furonculose classique, anémie infectieuse du saumon (AIS), nécrose hémorragique infectieuse, vibriose, vibriose en eau froide, ulcère d'hiver	Plan national d'urgence pour la vaccination des poissons d'élevage contre l'AIS. Plus de 90 % des saumoneaux ont été vaccinés avec un vaccin à sept composants contre les maladies bactériennes et virales communes.

Pays	Maladies les plus courantes	Procédures de vaccination
Australie et Nouvelle-Zélande	Maladie amibienne des branchies, la maladie bactérienne de la bouche rouge	Les vaccins sont encore en cours d'élaboration et leur utilisation n'est pas actuellement autorisée. Cependant, la Nouvelle-Zélande utilise un vaccin contre la maladie bactérienne de la bouche rouge.

L'efficacité des vaccins pour réduire les pertes de poissons causées par des maladies bactériennes a été documentée dans le monde entier (notamment dans le secteur norvégien), mais également en laboratoire. Quelques cas sont résumés ici, concernant le processus de mise au point de vaccins contre le *Streptococcus iniae*, un agent pathogène marin responsable de lourdes pertes chez les poissons d'élevage, notamment le tilapia (Klesius *et al.*, 2000). Comme le résume le tableau 1, l'agent pathogène attaque le système nerveux central du poisson, provoquant jusqu'à 50 % de mortalité et des pertes économiques massives dans certains cas (Low *et al.*, 1999; Baiano et Barnes, 2009). En raison de l'augmentation de la résistance au cours des dernières années, les traitements antibiotiques sont de moins en moins efficaces, ce qui souligne la nécessité d'une méthode de rechange pour la prévention et/ou le traitement de la maladie (Klesius *et al.*, 2000).

Il existe un sentiment d'urgence supplémentaire dans le cas de cette maladie, car le *S. iniae* est également un agent pathogène humain opportuniste. Bien qu'il cible principalement les poissons, il infecte également les humains si l'occasion se présente (Low *et al.*, 1999). Dans un cas, la bactérie a été isolée chez des patients humains atteints de méningite et de cellulite (Bachrach *et al.*, 2001). Il a été démontré que le transfert des poissons à des hôtes humains se produit lorsqu'une personne prépare à mains nues du poisson frais et cru pour la cuisson (Weinstein *et al.*, 1997).

Étude de cas n° 1

On a injecté le vaccin à tester à des tilapias dans un environnement de laboratoire. Deux vaccins contre le *S. inae*, l'un homologue et l'autre hétérologue, ont été administrés par voie intrapéritonéale et intramusculaire à des poissons dans un environnement de bassin. Dans tous les essais, on a constaté que les poissons vaccinés présentaient un taux de mortalité significativement inférieur à celui des poissons non vaccinés, avec une mortalité allant de 4 % à 63 %, contre une mortalité cumulée de 79 % pour les poissons non vaccinés. La procédure de vaccination la plus efficace était le vaccin hétérologue administré par voie intrapéritonéale (Klesius *et al.*, 2000).

Étude de cas n° 2

Le *S. iniae* continue d'être un problème en aquaculture dans des régions comme Israël et l'Amérique du Nord (Bachrach *et al.*, 2001). Dans le cadre d'une étude menée dans des piscicultures israéliennes de 1995 à 1997, le taux de mortalité des truites arc-en-ciel vaccinées contre le *S. iniae* a diminué de 50 % et est passé à environ 5 % (Bachrach *et al.*, 2001). Toutefois, en 1997, un nouveau foyer et une augmentation de la mortalité ont été signalés dans des piscicultures israéliennes, les poissons malades présentant des symptômes plus graves que ceux des foyers de *S. iniae* signalés précédemment (Bachrach *et al.*, 2001). Des échantillons ont été prélevés sur les poissons, isolés et soumis à une analyse d'ADN, à des tests biochimiques et à une observation morphologique (Bachrach *et al.*, 2001). Il a été conclu que l'organisme responsable de cette épidémie était bien le *S. iniae*, mais qu'il s'agissait d'une nouvelle souche contre laquelle le vaccin de 1995 n'était pas efficace (Bachrach *et al.*, 2001). Comme le vaccin n'a pas pu éradiquer complètement l'agent pathogène de stocks de poissons

importants et denses, un second sérotype, auparavant moins important, a pu prendre le dessus, rendant le vaccin inefficace (Bachrach *et al.*, 2001). Cet incident suggère qu'il faut surveiller les poissons qui sont vaccinés pour que les nouvelles souches d'agents pathogènes auparavant communs puissent être détectées, et pour que les besoins en matière de vaccins ou de traitements puissent être anticipés et si possible comblés pour prévenir des épidémies comme celle décrite ci-dessus (Bachrach *et al.*, 2001).

Étude de cas n° 3

Une étude plus récente, de 2017, détaille l'essai d'un nouveau vaccin (désormais appelé pEno) contre le *S. inae* chez le tilapia du Nil (Kayansamruaj *et al.*, 2017). Ce vaccin était destiné à prévenir les épidémies comme celle décrite dans l'étude de Bachrach ci-dessus. Les vaccins à ADN sont louangés pour leur capacité à déclencher une réponse immunitaire à la fois cellulaire et humorale, ce qui contribue à ce que l'organisme vacciné puisse se défendre contre une série de souches bactériennes (Kayansamruaj *et al.*, 2017). L'A-énolase, protéine de surface hautement conservée chez un large éventail d'espèces streptococciques, a été choisie comme cible vaccinale pour cette raison (Kayansamruaj *et al.*, 2017). Le vaccin contenait des séquences d'ADN associées à cette caractéristique (Kayansamruaj *et al.*, 2017). Le groupe de poissons vaccinés avec pEno a bénéficié d'un taux de survie de 72,5 %, contre 40 % et 25 % dans les groupes de vaccination fictive et témoins (Kayansamruaj *et al.*, 2017).

En résumé, les vaccins ont déjà eu du succès et continuent d'être prometteurs pour réduire l'utilisation des antimicrobiens dans l'aquaculture à l'échelle mondiale et, par conséquent, réduire l'exposition des bactéries dans l'environnement à des composés qui conduiraient à la propagation des ARG. Il convient de poursuivre les recherches sur le développement de vaccins pour les poissons d'élevage, en particulier ceux qui visent les caractéristiques conservées par de multiples souches bactériennes, pour prévenir les épidémies inattendues causées par des sérotypes peu courants.

Biocontrôle bactérien et probiotiques

Pour survivre dans un environnement hostile avec une communauté diversifiée de micro-organismes, de nombreuses espèces de bactéries ont développé la capacité de produire des métabolites qui tuent ou inactivent d'autres bactéries. Cette caractéristique est issue de la sélection naturelle et a pour fonction d'aider les bactéries à surmonter les prédateurs potentiels ou les concurrents pour les nutriments. Par conséquent, il existe des espèces de bactéries qui peuvent être utilisées pour tuer ou affaiblir d'autres espèces. Les mesures visant à exploiter cette capacité pour l'utiliser dans la lutte contre les agents pathogènes sont appelées *biocontrôle bactérien*.

Les *bactériocines* représentent un exemple de ces produits d'origine bactérienne. Il s'agit de protéines qui se fixent à des récepteurs sur la paroi cellulaire d'une bactérie sensible et qui sont absorbées à l'intérieur de la cellule (comme un bactériophage), où elles endommagent ensuite la machinerie cellulaire du destinataire : certaines percent des trous dans la membrane interne, détruisent le matériel génétique ou inhibent les processus métaboliques (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015). L'utilisation de bactériocines pures n'est pas une option réalisable pour le contrôle des maladies bactériennes en aquaculture, ou elle devra faire l'objet de recherches approfondies avant qu'un tel traitement ne devienne une possibilité (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015). Les bactériocines ont une plage de spécificité très étroite, généralement limitée à des espèces très semblables au producteur, et la culture de bactéries pour collecter ces protéines n'est pas financièrement pratique (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015). Toutefois, la production de bactériocines est un indicateur du potentiel d'une espèce en tant que *probiotique* (Madhusudana Rao et Lalitha, 2015).

Les *probiotiques* sont des microbes bénéfiques qui sont directement introduits chez un hôte (Sihag et Sharma, 2012). Cela inclut ceux introduits pour inhiber la croissance des agents pathogènes dans le système de cet organisme (Sihag et Sharma, 2012). Ils ont été utilisés avec succès pour traiter les maladies gastro-intestinales humaines dans le passé (Sihag et Sharma, 2012) et comme solutions de rechange aux antibiotiques en aquaculture (Newaj-Fyzul et Austin, 2015). Les bactéries et les champignons peuvent tous deux être utilisés comme probiotiques (Sihag et Sharma, 2012), et un large éventail d'organismes a été testé en aquaculture. Ils possèdent plusieurs stratégies pour interférer avec la croissance et la fonction des micro-organismes nuisibles, notamment la production de métabolites nuisibles aux bactéries pathogènes comme les antibiotiques, les lysozymes, les protéases et les bactériocines susmentionnées (Sihag et Sharma, 2012). Ils peuvent également entrer en compétition avec les agents pathogènes pour les nutriments comme le fer, pour l'énergie disponible ou pour les sites d'adhésion dans l'intestin de l'hôte (Sihag et Sharma, 2012). Les probiotiques peuvent également fortifier les processus naturels d'un organisme, en favorisant l'épaississement de l'épiderme, en augmentant la fonction digestive, en réduisant le stress ou en contribuant à la métamorphose (Newaj-Fyzul et Austin, 2015). Enfin, il est prouvé que les probiotiques améliorent la réponse immunitaire de l'hôte, nettoient l'eau en convertissant les matières organiques (comme les aliments rejetés) en CO₂, produisent des vitamines ou d'autres composés utiles et inhibent la croissance des algues ou d'autres agents d'encrassement (Sihag et Sharma, 2012). L'action de certains agents probiotiques est résumée dans le tableau ci-dessous.

Parmi les avantages de l'utilisation des probiotiques, on peut citer le fait qu'ils peuvent être produits localement et de manière rentable. Avec des nutriments adéquats et appropriés, les microbes se multiplient rapidement (Newaj-Fyzul et Austin, 2015). Parmi les autres avantages, citons l'amélioration de la croissance et de la résistance aux maladies (présentant une solution de rechange aux traitements antibiotiques prophylactiques) et une réduction globale du besoin de traitements chimiques (Newaj-Fyzul et Austin, 2015). Toutefois, il n'existe pas de preuves solides que les probiotiques sont réellement inoffensifs pour l'hôte, car les recherches dans ce domaine sont rares (Newaj-Fyzul et Austin, 2015). La durée de stockage des bactéries probiotiques dans les aliments pour animaux avant qu'elles ne commencent à mourir et à perdre leur efficacité suscite des préoccupations financières (Newaj-Fyzul et Austin, 2015). La possibilité que les bactéries probiotiques acquièrent des gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques à partir de bactéries pathogènes dans l'intestin de l'hôte suscite également des inquiétudes (van Reenen et Dicks, 2011). Dans un cas, des tests de laboratoire ont détecté des gènes de résistance aux antibiotiques dans plusieurs organismes utilisés comme probiotiques en aquaculture, avec des taux de résistance particulièrement élevés dans les genres *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* et *Pediococcus* (van Reenen et Dicks, 2011).

Tableau 5. Les probiotiques, leurs cibles et leurs bénéfices pour l'organisme hôte.

Probiotique	Type de bactérie	Organismes cibles	Mode d'action	Réf.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Gram positif, en forme de bâtonnet. Extrêmement semblable à <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> ,	Production de produits extracellulaires pour inhiber la croissance de la cible.	(Cao <i>et al.</i> , 2011)

Probiotique	Type de bactérie	Organismes cibles	Mode d'action	Réf.
<i>Pseudoalteromonas</i> S2V2	Gram négatif, en forme de bâtonnet.	<i>Vibrio</i> sp.	Production de composés à activité antibactérienne, notamment H ₂ S, gélatinases, oxydases et catalases. Produit également un antibiotique inconnu, non protéique, contre les <i>Vibrio</i> .	(Isnansetyo <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bacillus Coagulans</i>	Producteurs d'acide lactique, Gram positif, en forme de bâtonnet.	<i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Modulation de la réponse immunitaire, renforce l'expression des gènes bénéfiques et produit des composés antibactériens, dont l'acide lactique.	(Pan <i>et al.</i> , 2012)
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram positif, en forme de bâtonnet. Extrêmement semblable à <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Aeromonas</i> sp.	Amélioration de l'explosion oxydative et de l'activité lysosomale. Amélioration de l'immunité innée. Production de composés antimicrobiens, dont la peroxydase et l'a1-protéase.	(Newaj-Fyzul <i>et al.</i> , 2007)
<i>Brevibacillus brevis</i>	Gram positif, en forme de bâtonnet.	<i>Vibrio</i> sp.	Amélioration de la digestion, compétition avec les agents pathogènes, réduction de la réponse au stress	(Mahdhi 2012)

Probiotique	Type de bactérie	Organismes cibles	Mode d'action	Réf.
<i>Enterococcus gallinarum</i>	Coccus à Gram positif producteur d'acide lactique	<i>Vibrio anguillarum</i>	Production d'acide lactique, d'acide acétique et d'éthanol, lesquels ont des propriétés antimicrobiennes.	(Sorroza <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lactococcus lactis</i>	Coccus à Gram positif producteur d'acide lactique	<i>Streptococcus iniae</i> , <i>Streptococcus parauberis</i> , <i>Enterococcus viikkiensis</i> et <i>Lactococcus garviae</i>	Modulation de la réponse immunitaire pour augmenter les activités lysosomales et la production d'anticorps.	(Kim <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Coccus à Gram positif producteur d'acide lactique	<i>Vibrio anguillarum</i>	Augmentation de la production de globules rouges et blancs. Activité phagocytaire accrue dans les régions de la tête et des reins. Production d'acide lactique.	(Huang <i>et al.</i> , 2014)
<i>Pseudomonas</i> M162 et M174	Gram négatif, en forme de bâtonnet	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Concurrence avec le <i>F. psychrophilum</i> pour le fer lorsque la ressource est rare, augmente l'activité de l'explosion oxydative.	(Korkeaho <i>et al.</i> , 2011; Korkeaho <i>et al.</i> , 2012)

Immunosuppresseurs

Tout organisme vivant dispose de mécanismes de défense contre l'invasion d'agents étrangers. Chez les vertébrés, cela prend la forme d'une immunité innée/humorale et spécifique/acquise. L'immunité innée est la première ligne de défense et fait référence à toute action immunitaire qui n'est pas adaptée pour combattre un pathogène particulier (Hoseinifar *et al.*, 2015). Cela inclut l'action de cellules connues sous le nom de monocytes/phagocytes (qui vont localiser et ingérer les agents pathogènes envahissants), de neutrophiles et de cellules tueuses naturelles (Hoseinifar *et al.*, 2015). Cet aspect du système immunitaire est presque immédiatement déclenché après la détection par l'organisme de la présence de *motifs moléculaires associés à*

des agents pathogènes, ou de molécules que l'organisme reconnaîtra comme étrangères parce qu'elles n'apparaissent généralement pas dans les organismes eucaryotes (Hoseinifar *et al.*, 2015).

Les conditions non naturelles dans lesquelles les poissons d'élevage sont maintenus, soit des cages marines statiques et densément peuplées, ainsi que la manipulation par le personnel (Burrells *et al.*, 2001), entraînent un stress pour les animaux et une baisse de la réponse immunitaire (Vaseeharan et Thaya, 2013). Le poisson est donc plus vulnérable aux infections, et sa capacité à se défendre contre elles est réduite (Vaseeharan et Thaya, 2013). Des mesures ont été prises pour lutter contre les maladies des poissons d'élevage en leur administrant des immunostimulants. Un *immunostimulant* est une substance qui induit ou augmente une réponse immunitaire chez le receveur (Divyagnaneswari *et al.*, 2007). La forte dépendance des poissons vis-à-vis de leur système immunitaire inné (Divyagnaneswari *et al.*, 2007) signifie que la stimulation immunitaire pourrait contribuer à la défense de l'animal contre un large éventail d'agents pathogènes. Il a également été démontré que les immunostimulants facilitent la croissance et l'alimentation des poissons (Nya et Austin, 2009b), et ils sont utilisés comme solution de rechange aux antibiotiques prophylactiques (Logambal *et al.*, 2000).

Des études ont également été menées sur l'utilisation des plantes médicinales pour leurs propriétés antimicrobiennes. Il a été démontré que de nombreuses plantes communes, dont l'ail et la cannelle, inhibent la croissance des bactéries grâce aux propriétés des substances extracellulaires qu'elles produisent.

Des études ont également été menées sur l'administration d'immunostimulants en association avec un vaccin pour améliorer et prolonger la réponse immunitaire du receveur (Logambal *et al.*, 2000). On a constaté que dans la plupart des cas, la réponse est maximale lorsque l'immunostimulant est administré peu de temps avant la vaccination, ce qui suggère que l'immunostimulant prépare l'organisme à répondre à un vaccin (Logambal *et al.*, 2000).

Un autre avantage de l'utilisation des plantes médicinales est qu'elles sont biodégradables et ne persistent pas dans l'environnement comme le font les antibiotiques (Logambal *et al.*, 2000). Elles sont également plus sûres pour la consommation dans le cas où elles se retrouvent dans le poisson vendu pour l'alimentation, car beaucoup d'entre elles sont également utilisées pour la cuisine (Dorucu *et al.*, 2009). La culture à grande échelle de ces plantes rend leur acquisition moins coûteuse que celle de nombreux médicaments antibiotiques (Dorucu *et al.*, 2009).

Tableau 6. Immunostimulants utilisés en aquaculture et leurs modes d'action.

Immunostimulant	Caractéristiques	Mode d'action	Réf.
Ail (<i>Allivum sativum</i>)	Type d'oignon.	Augmente la résistance des poissons à l' <i>A. hydrophila</i> . Favorise la multiplication des érythrocytes et des leucocytes ainsi que les activités phagocytaires, respiratoires, antiprotéases et lysozymes. On observe également que la plante inhibe la croissance des bactéries.	(Nya et Austin, 2009b)

Immunostimulant	Caractéristiques	Mode d'action	Réf.
Gingembre (<i>Zingiber officiale</i>)	Racine de la plante à fleurs.	Montre un potentiel en tant que prophylactique en raison de ses effets positifs sur la croissance des poissons. Il sert également d'agent appétant pour améliorer l'efficacité alimentaire, ce qui se traduit par une meilleure croissance. Contient des composés antimicrobiens, le gingérol et le camphène. Les réponses immunitaires innées sont améliorées.	(Nya et Austin 2009a; Punitha <i>et al.</i> , 2008)
Cumin noir (<i>Nigella sativa</i>)	Graines d'herbe à fleurs.	L'immunité particulière est stimulée, ce qui entraîne une production accrue d'immunoglobulines et de protéines sériques. A un effet plus faible que beaucoup d'autres immunostimulants présentés dans ce document, mais montre un potentiel en tant qu'additif alimentaire prophylactique.	(Dorucu <i>et al.</i> , 2009)
Nucléotides alimentaires	Éléments constitutifs de l'ADN ou de l'ARN.	Augmente la résistance aux bactéries pathogènes, notamment le <i>V. anguillarum</i> et le <i>P. salmonis</i> .	(Burrells <i>et al.</i> , 2001)
Cannelle (<i>Cinnamosma fragrans</i>)	Écorce interne de l'arbre	Contient du <i>cinnamaldéhyde</i> , composé chimique ayant une activité antimicrobienne contre le <i>S. inae</i> .	(Randrianarivelo <i>et al.</i> , 2010; Rattanachaikunsopon et Phumkhachorn, 2010)
Vitamine D ₃	Stéroïde liposoluble également connu sous le nom de cholécalférol	Augmente l'activité des cellules phagocytaires et d'autres aspects du système immunitaire inné, avec très peu ou pas d'effet sur le système immunitaire spécifique.	(Cerezuela <i>et al.</i> , 2009)
Vitamine C	Acide ascorbique	Peu d'avantages ont été constatés dans les régimes comportant une	(Hardie <i>et al.</i> , 1991)

Immunostimulant	Caractéristiques	Mode d'action	Réf.
		supplémentation en vitamine C, mais des conséquences ont été enregistrées en cas de carence. Les poissons ayant des niveaux réduits de vitamine C souffrent d'une mortalité accrue lorsqu'ils sont infectés par l' <i>Aeromonas salmonicida</i> , ce qui suggère que l'alimentation pourrait être complétée par de la vitamine C si l'on craint que les poissons n'en reçoivent pas suffisamment.	
Chiendent pied-de-poule (<i>Cynodon dactylon</i>)	Graminée de saison chaude.	Montre un potentiel en tant que prophylactique en raison de ses effets positifs sur la croissance des poissons. Augmente la production d'albumine, de globuline, de cholestérol, de glucose, de triglycérides et de plusieurs protéines importantes. Augmentation de l'activité phagocytaire et des lysozymes. Contient des substances antimicrobiennes : cynodine, acide cyanhydrique et triticine. Réduit légèrement la mortalité chez les poissons confrontés au <i>Vibrio vulnificus</i> .	(Punitha <i>et al.</i> , 2008; Citarasu <i>et al.</i> , 2006)
Bael (<i>Aegle marmelos</i>)	Arbre fruitier.	Montre un potentiel en tant que prophylactique en raison de ses effets positifs sur la croissance des poissons. Augmente la production d'albumine, de globuline, de cholestérol, de glucose, de triglycérides et de plusieurs protéines importantes. Augmentation de l'activité phagocytaire et des lysozymes. Réduit légèrement la mortalité chez les poissons exposés au <i>Vibrio vulnificus</i> .	(Citarasu <i>et al.</i> , 2006)

Immunostimulant	Caractéristiques	Mode d'action	Réf.
Ashwagandha (<i>Withania somnifera</i>)	Plante frutière apparentée à la belladone.	Montre un potentiel en tant que prophylactique en raison de ses effets positifs sur la croissance des poissons. Augmente la production d'albumine, de globuline, de cholestérol, de glucose, de triglycérides et de plusieurs protéines importantes. Augmentation de l'activité phagocytaire et des lysozymes. Réduit légèrement la mortalité chez les poissons exposés au <i>Vibrio vulnificus</i> .	(Citarasu <i>et al.</i> , 2006)
Thoothuvalai (<i>Solanum trilobatum</i>)	Plante herbacée à fleurs.	Les fractions solubles dans l'eau et dans l'hexane renforcent l'immunité non spécifique par la production d'espèces réactives de l'oxygène, la production d'espèces réactives de l'azote et l'activité des lysozymes sériques. Les fractions hydrosolubles sont nettement plus efficaces. Les deux fractions augmentent la résistance des poissons à l' <i>A. hydrophila</i> .	(Divyagnaneswari <i>et al.</i> , 2007)
Basilic sacré (<i>Ocimum sanctum</i>)	Plante herbacée à fleurs.	L'extrait de feuille contient des composés phénoliques hydrosolubles et d'autres substances qui sont censés stimuler la réponse primaire et secondaire des anticorps dans les semaines qui suivent l'administration. La durée de la réponse primaire est augmentée et la période de latence entre la réponse primaire et la réponse secondaire des anticorps est réduite par rapport à un groupe témoin. La résistance à l' <i>A. hydrophila</i> est renforcée.	(Logambal <i>et al.</i> , 2000)

Immunostimulant	Caractéristiques	Mode d'action	Réf.
Poivre long (<i>Piper longum</i>)	Graines de la plante à fleurs	Effet positif sur l'appétit des poissons, améliorant l'efficacité alimentaire. Produit les composés à propriétés microbiennes suivants : pipérine, pipartine, piperlongumime, sylvatine, guinéésine, piperlongumime et filifiline. Améliore la survie lorsque les receveurs sont confrontés au <i>V. harveyi</i> .	(Punitha <i>et al.</i> , 2008)
<i>Phyllanthus niruri</i>	Plante tropicale	Produit des composés antimicrobiens : phyllanthine, phyllochrysinine, phyltétraline et quercitrine. Améliore également la fonction hépatique. Améliore la survie lorsque les receveurs sont confrontés au <i>V. harveyi</i> .	(Punitha <i>et al.</i> , 2008)
<i>Tridax procumbens</i>	Plante à fleurs	Produit un composé antimicrobien, le <i>b-sitostérol</i> . Améliore la survie lorsque les receveurs sont confrontés au <i>V. harveyi</i> .	(Punitha <i>et al.</i> , 2008)

Il existe de nombreuses preuves de l'utilisation de l'ail (*Allivum sativum*) comme immunostimulant en aquaculture. Il a été démontré que ses produits moléculaires stimulent les réponses immunitaires des poissons et des humains et qu'ils inhibent la croissance des bactéries et des virus (Nya et Austin, 2009b). Par exemple, une étude de laboratoire réalisée en 2009 a testé les effets d'une gamme de quantités d'ail dans la lutte contre une infection par l'*Aeromonas hydrophila* chez la truite arc-en-ciel (Nya et Austin, 2009b). L'ajout de 0,5 g d'ail ou plus par 100 g d'aliments entraînait une réduction considérable du taux de mortalité des poissons (Fig. 9).

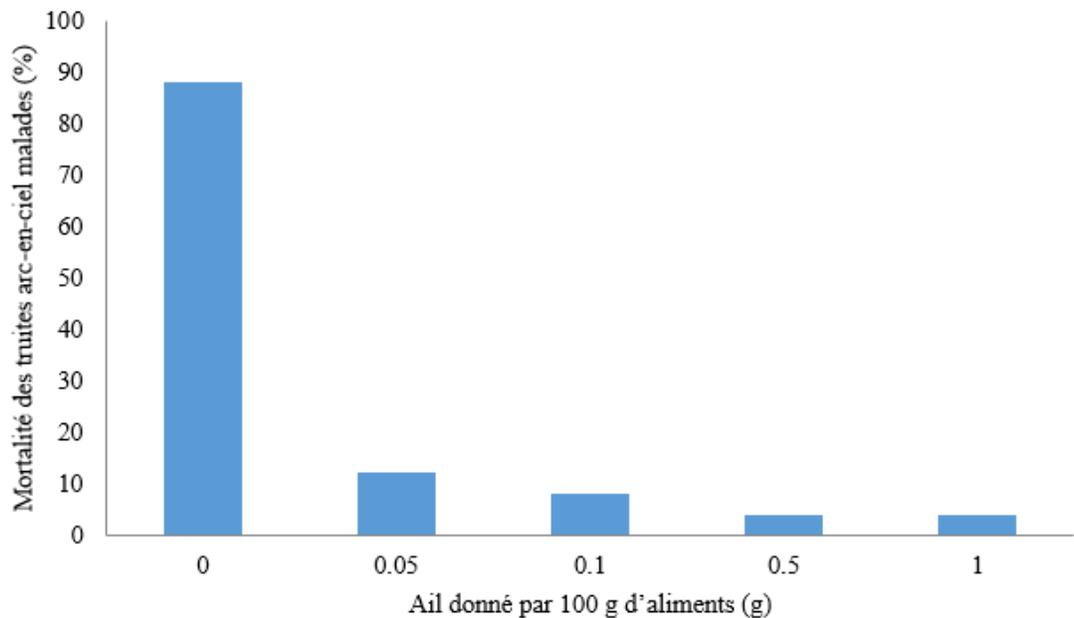


Figure 9. Taux de mortalité enregistré chez les truites arc-en-ciel infectées par l'*A. hydrophila*, en fonction de la quantité d'ail donnée dans leur alimentation.

Prébiotiques

Les poissons, comme les mammifères, possèdent une communauté diversifiée de bactéries qui vivent dans leur tractus intestinal. Les bactéries intestinales remplissent des fonctions importantes pour l'hôte, comme la décomposition de composés que l'hôte est incapable de digérer et la lutte contre les agents pathogènes, mais elles peuvent également avoir des effets négatifs en épuisant les ressources de l'hôte. Comme il a été décrit ci-dessus dans les sections *Probiotiques* et *Immunostimulants*, la modification du régime alimentaire d'un animal a des effets sur le microbiote de son intestin et, par conséquent, sur la santé de l'animal lui-même (Ringø *et al.*, 2016). La composition de la population microbienne dans l'intestin est également influencée par le sexe et l'âge de l'animal ainsi que par divers facteurs environnementaux, notamment la salinité et la qualité de l'eau (Ringø *et al.*, 2016).

Comme chez les autres animaux, le microbiote intestinal des poissons contribue à la décomposition des nutriments que l'animal est incapable de digérer par lui-même. Cela prend souvent la forme d'une fermentation de certains types de glucides, laquelle est un processus anaérobie (ne nécessitant pas d'oxygène) qui se déroule le long du tractus intestinal. La fermentation mène à la production d'acides bénéfiques qui modulent l'environnement intestinal ou qui peuvent être absorbés et transformés en énergie (Guerreiro *et al.*, 2017). Lorsque des substrats pour le processus de fermentation sont disponibles, les bactéries qui effectuent ces réactions sont favorisées et capables de se multiplier plus rapidement que les bactéries concurrentes (Guerreiro *et al.*, 2017). Si ces bactéries ont des effets positifs sur la santé de l'hôte (*biocontrôle bactérien et probiotiques*), il est souhaitable de compléter l'alimentation des poissons avec ces substrats pour favoriser leur croissance.

Un prébiotique est tout composé qui favorise la croissance des bactéries intestinales bénéfiques. Les prébiotiques sont souvent utilisés conjointement avec des probiotiques et d'autres additifs alimentaires pour obtenir le mélange idéal de bactéries dans l'intestin de

l'animal (Egerton *et al.*, 2018) et ils sont utilisés dans l'agriculture animale terrestre depuis près de 50 ans (D'Abramo, 2018). Les prébiotiques agissent comme un substrat pour l'action des bactéries bénéfiques dans l'intestin des poissons, ce qui permet à ces bactéries de se multiplier plus rapidement grâce à des ressources abondantes (Guerreiro *et al.*, 2017). Ils ne peuvent pas être digérés par le poisson et doivent au contraire être digérés par des bactéries bénéfiques pour favoriser leur multiplication (Guerreiro *et al.*, 2017). La propagation de ces bactéries entraîne la production de composés bénéfiques, la sécrétion d'enzymes digestives dans l'intestin et une augmentation de l'activité digestive (Guerreiro *et al.*, 2017). Les prébiotiques montrent un potentiel en tant que solution de rechange aux antibiotiques métaglycétiques et prophylactiques en raison de leurs effets positifs bien étudiés sur la croissance des poissons et la digestion des aliments, ainsi qu'en agissant comme immunostimulants et en augmentant la résistance aux maladies (Guerreiro *et al.*, 2017; D'Abramo, 2018). Bien que les résultats soient quelque peu mitigés, des essais ont montré que les prébiotiques peuvent réduire la mortalité chez les poissons et favoriser une prise de poids plus rapide et un bien-être général (Ringø *et al.*, 2016). Les *oligosaccharides* ou les glucides contenant 3 à 10 unités de sucres, comme le glucose ou le fructose, sont les prébiotiques les plus couramment utilisés en aquaculture (tableau 7).

Les prébiotiques représentent également une solution à certains des problèmes posés par l'administration de probiotiques aux animaux d'élevage. Les probiotiques étant des bactéries vivantes, ils sont capables d'interagir et d'échanger des renseignements génétiques avec la communauté bactérienne de l'intestin des poissons et de la pisciculture, ce qui peut entraîner des conséquences inattendues et la propagation de facteurs de virulence ou d'ARG (Guerreiro *et al.*, 2017). Les aliments probiotiques ont également une courte durée de conservation. Les aliments prébiotiques ont une durée de vie beaucoup plus longue et ne présentent pas le risque d'introduire de nouvelles bactéries dans les poissons, car ils ne font que moduler les bactéries dont les poissons sont déjà porteurs (Guerreiro *et al.*, 2017).

Tableau 7. Classes de prébiotiques testées en aquaculture et leurs effets.

Classe de prébiotiques	Caractéristiques	Mode d'action	Réf.
Fructo-oligosaccharides (FOS)	Oligosaccharides non digestibles constitués de chaînes courtes ou moyennes de glucose et de fructose	L'apport de FOS alimentaires favorise la croissance des bactéries dont l'hôte a besoin pour les fermenter. Ces bactéries peuvent conférer des avantages supplémentaires pour la santé et il a été démontré que la supplémentation en FOS améliore la croissance et la santé des poissons.	(Ringø <i>et al.</i> , 2016)
Fructo-oligosaccharides à chaîne courte (FOScc)	Semblables aux FOS, mais avec des chaînes de glucose/fructose plus courtes.	Favorise la croissance des bactéries intestinales bénéfiques, ce qui améliore la digestion, la conversion des aliments et la croissance des poissons.	(Ringø <i>et al.</i> , 2016)

Classe de prébiotiques	Caractéristiques	Mode d'action	Réf.
Levure	Champignon couramment utilisé pour les réactions de fermentation.	A un effet positif sur les microbes de l'hôte, ce qui entraîne une stimulation du système immunitaire.	(Ringø <i>et al.</i> , 2016)
Mannanes-oligosaccharides	Oligosaccharides portant un résidu de mannose	Interagit avec les bactéries pathogènes pour empêcher leur fixation à la paroi intestinale de l'hôte. Les agents pathogènes utilisent des protéines de liaison aux glucides pour adhérer aux oligosaccharides dans les membranes des cellules intestinales. Les mannanes-oligosaccharides peuvent agir comme substituts de ces récepteurs, empêchant ainsi la colonisation de l'hôte par l'agent pathogène. Par la suite, la croissance des espèces bénéfiques productrices de bactériocines est augmentée.	(Ringø <i>et al.</i> , 2016)
Arabinoxylanes-oligosaccharides	Glucides à chaîne courte à moyenne avec des résidus d'arabinoxylane. L'arabinoxylane est une forme de cellulose que l'on trouve dans les parois cellulaires des plantes comme le blé.	Il a été démontré qu'il augmente la croissance des bactéries productrices d'acide lactique (voir <i>Probiotiques</i>) dans l'intestin.	(Ringø <i>et al.</i> , 2016)

Argile rouge

L'argile est un groupe de sédiments qui se forment lorsque des minéraux feldspathiques subissent les effets de la pluie (Sciencing, 2017). Elle contient un groupe de minéraux, dont du SiO₂ et des traces de divers oxydes métalliques. Les grains mesurent moins de quatre micromètres, mais sont connus pour leurs propriétés d'attraction de l'eau et peuvent se dilater jusqu'à 100 % dans un environnement humide. Les particules se collent également très bien entre elles et sont connues pour attirer et retenir les ions métalliques en solution. Les dépôts d'argile contenant des niveaux élevés d'oxydes de fer et d'aluminium sont appelés argile rouge.

Une étude chinoise de 2016 a évalué l'utilité de l'argile rouge comme antimicrobien contre trois agents pathogènes des poissons : l'*Aeromonas salmonicida*, le *Vibrio alginolyticus* et le *Streptococcus equinus*. L'argile a réussi à réduire la croissance de l'*A. salmonicida* et du *V. alginolyticus* dès que les concentrations ont atteint 5 à 10 %, mais elle a agi comme un probiotique pour le *S. equinus*, en augmentant la prolifération de la bactérie et la synthèse des protéines (Jung *et al.*, 2016).

Pour étudier les raisons de ces effets ainsi que les modifications de la structure cellulaire pendant le traitement, les trois espèces ont été étudiées au microscope à contraste de phase et au microscope électronique à balayage (Jung *et al.*, 2016). Les nanoparticules d'argile se sont agrégées à l'*A. salmonicida* et au *V. alginolyticus*, et une élongation a également été observée chez l'*A. salmonicida*, même à de très faibles concentrations (Jung *et al.*, 2016). Les nanoparticules ne se sont pas fixées au *S. equinus*, et aucun changement morphologique n'a été observé (Jung *et al.*, 2016). La microscopie électronique a révélé des dommages aux membranes de l'*A. salmonicida* et du *V. alginolyticus*, tandis que des tests ultérieurs ont confirmé que ces bactéries subissaient un stress oxydatif accru (Jung *et al.*, 2016). L'immunité du *S. equinus* a été attribuée à la fluidité accrue de sa membrane, qui semble être une adaptation pour empêcher l'agrégation avec les substances nocives présentes dans l'eau (Jung *et al.*, 2016). Une fois agrégées à l'argile rouge, les autres cellules pouvaient être retirées des eaux de surface (Jung *et al.*, 2016).

Antibiotiques naturels

Les métaux, dans leur forme pure, sont connus depuis des millénaires comme des antibiotiques naturels et ont été utilisés pour lutter contre les bactéries (en particulier, le cuivre qui était relativement facile à obtenir) par les sociétés égyptiennes antiques et ont été activement incorporés dans les traitements médicaux au 19^e siècle en Europe (Grass *et al.*, 2011). On constate un regain d'intérêt pour l'utilisation des métaux pour réduire l'utilisation des antibiotiques dans les activités industrielles comme les hôpitaux et les installations de transformation des aliments, mais cela concerne principalement les surfaces (Yasuyuki *et al.*, 2010; Grass *et al.*, 2011). Les métaux agissent généralement en perturbant la membrane cellulaire de la bactérie. Dans l'environnement, l'accumulation de métaux et de leurs différentes formes dans les sédiments est généralement le reflet de l'activité industrielle en cours (Dean *et al.*, 2007). Par exemple, l'oxyde cuivrique utilisé comme revêtement antisalissure sur les filets des cages à saumon réduit leur colonisation par des bivalves et des hydroïdes parce qu'il présente une toxicité relative pour les larves et qu'il permet une circulation accrue de l'eau à travers les cages en filet. Ce revêtement est conçu pour s'éroder constamment, exposant ainsi des matériaux frais aux larves qui s'installent, mais les vieux matériaux se déposent généralement au fond, augmentant les concentrations de métaux lourds dans les sédiments. Cette pratique a été en grande partie remplacée par un lavage automatique à l'eau à haute pression des filets non traités, selon un cycle régulier. De même, du zinc est ajouté au régime alimentaire des poissons pour des raisons physiologiques nutritionnelles, mais une certaine proportion de cet élément n'est pas retenue par les poissons en raison de sa disponibilité biologique et se dépose dans les sédiments sous les cages.

Toutefois, malgré la nature antibactérienne des métaux dans leur forme pure, des renseignements importants provenant d'une multitude d'études environnementales montrent clairement une forte corrélation entre l'apparition de la résistance aux antibiotiques et les niveaux croissants de métaux lourds dans les sédiments (p. ex., Yu *et al.*, 2011, Zhao *et al.*, 2017, Han *et al.*, 2020, Lu *et al.*, 2020). Cette corrélation semble découler du fait que les conditions environnementales, comme l'anoxie, entraînent la sélection de bactéries capables de résister à ces environnements en modifiant leurs processus physiologiques. Ces processus

sont déterminés et contrôlés génétiquement par les gènes de l'organisme, dont certains peuvent être situés sur les plasmides où se trouvent également les gènes de résistance aux antimicrobiens.

Par conséquent, les métaux lourds ne sont probablement pas une panacée pour réduire l'utilisation des antimicrobiens dans le secteur de l'aquaculture. Ils peuvent jouer un rôle dans certains de ses aspects, comme le traitement et la manipulation des produits, mais il vaut probablement la peine d'essayer de les écarter des sédiments et de maintenir les concentrations à des niveaux naturels, car ils constituent un élément normal de l'écosystème.

ARTICLE : DONNÉES EMPIRIQUES SUR LES ARG EN AQUACULTURE

UNE ENQUÊTE SUR LES POPULATIONS MICROBIENNES ET LES GÈNES DE RÉSISTANCE AUX ANTIMICROBIENS (ARG) ASSOCIÉS AUX ÉLEVAGES DE SAUMON DANS LA BAIE DE FUNDY

Shawn M.C. Robinson¹, Lorraine Hamilton², Benjamin Forward³, Jonathan Day¹

¹Station biologique de St. Andrews, Pêches et Océans Canada, St. Andrews, Nouveau-Brunswick

²Institut océanographique de Bedford, Pêches et Océans Canada, Dartmouth, Nouvelle-Écosse

³Conseil de la recherche et de la productivité, Fredericton, Nouveau-Brunswick

INTRODUCTION

En 2018, un programme financé par le MPO a été lancé en vertu du *Règlement sur l'immersion en mer* de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* pour étudier l'impact sur l'environnement local des produits chimiques et des antibiotiques utilisés dans l'industrie de la salmoniculture. L'un des projets issus de ce programme visait à mesurer la fréquence des gènes de résistance aux antimicrobiens (ARG) dans les populations bactériennes environnantes des salmonicultures, comme d'autres études sur l'élevage du saumon réalisées dans diverses parties du monde (Tamminen *et al.*, 2011 a; Buschmann *et al.*, 2012b). L'hypothèse était que les ARG pourraient avoir un temps de résidence plus long que les antibiotiques en eux-mêmes et qu'ils pourraient donc donner une meilleure idée du risque global d'exposition aux antibiotiques dans le milieu environnant. Par conséquent, une enquête a été réalisée au cours de l'été et à la fin de l'automne 2018 dans le but d'examiner l'activité microbiologique autour des piscicultures, la diversité de la population bactérienne sur une base spatiale et temporelle et le pourcentage relatif d'ARG chez les bactéries associées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sites d'étude

Les salmonicultures choisies comme sites d'étude pour le présent projet ont été sélectionnées en fonction des registres de traitement de la santé des poissons au cours des cinq dernières années, conjointement avec les professionnels de la santé des poissons du ministère de l'Agriculture, de l'Aquaculture et des Pêches du Nouveau-Brunswick (MAAP) et ceux de Cooke Aquaculture Inc. (CAI). Pour cette première enquête sur les ARG, nous avons choisi un site qui avait un historique d'utilisation élevée, d'utilisation moyenne et d'utilisation faible d'antibiotiques. Les professionnels de la santé ont fourni une liste de cinq piscicultures dans chacune des trois catégories et nous (AIAL) en avons choisi une dans chaque catégorie sur la base de la logistique du travail sur le site et de toutes les données historiques d'études précédentes accessibles. Les sites d'échantillonnage choisis étaient Charlie Cove (élevée), île Navy (moyenne) et Davidson's Head (faible) (Fig. 10). Le site de Charlie Cove se trouvait dans une zone de gestion des baies distincte et était donc en année de jachère. Les caractéristiques hydrographiques étaient également légèrement différentes pour chaque site, mais tous sont des salmonicultures à long terme qui sont représentatives des élevages de la baie de Fundy.

Les sites de référence ont été choisis pour être comparés aux sites de la pisciculture; ils devaient être éloignés d'au moins 200 m de la pisciculture et fournir un certain contexte lié aux échantillons de la pisciculture (Fig. 10). Ces sites comprenaient deux usines de traitement des eaux usées dans la région, l'une à St. Stephen et l'autre à St. Andrews.

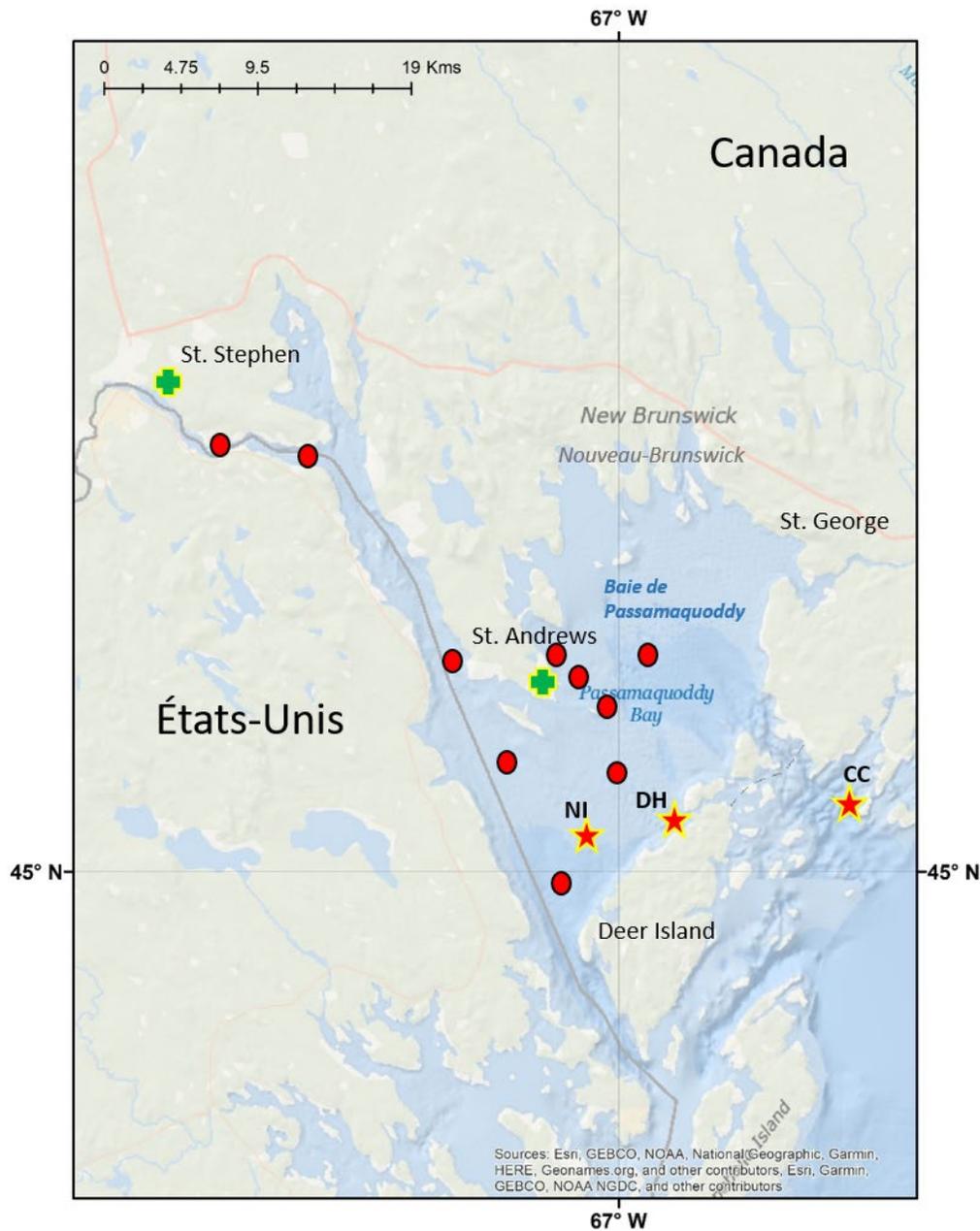


Figure 10. Emplacement des piscicultures (étoiles), des stations d'échantillonnage de référence (points rouges) et des installations de traitement des eaux usées (croix vertes) échantillonnées dans cette étude. NI = Île Navy, DH = Davidson's Head, CC = Charlie Cove.

Plan d'échantillonnage

Les échantillons ont été prélevés à la surface du benthos dans la pisciculture et les stations de référence, ainsi qu'au niveau des structures de support pélagiques à 5 m (la grille) qui

maintiennent les cages en place dans la pisciculture. Les échantillons ont été analysés pour l'ATP, l'ADNe et les ARG. Deux périodes ont été choisies pour l'échantillonnage : août 2018, période où la température de l'eau et la production sont les plus élevées, et décembre, moment où la température de l'eau est la plus basse et où la production est moindre. En été, les échantillons ont été prélevés dans le milieu benthique, dans deux transects rayonnant depuis chaque pisciculture. Pour la période hivernale, les échantillons ont été prélevés dans une seule pisciculture (Davidson's Head) et davantage d'échantillons de référence ont été prélevés.

Échantillonnage

Les échantillons benthiques ont été prélevés à l'aide d'un petit véhicule téléguidé (VTG) équipé d'un échantillonneur à seringue conçu sur mesure pouvant contenir cinq seringues et être déclenché à distance. Le VTG était déployé à une station d'échantillonnage, où le pilote le déposait doucement sur le fond. À l'aide des propulseurs, le pilote déplaçait doucement le VTG de gauche à droite, et des dents au bas de l'échantillonneur remettaient en suspension les sédiments de surface qui formaient alors un petit nuage. L'une des seringues de 50 ml était déclenchée et un échantillon de ce nuage était prélevé. Ensuite, le pilote faisait décoller le VTG du fond et le déplaçait de 1 ou 2 mètres dans une direction aléatoire, puis le processus était répété. Cinq échantillons répétés ont été prélevés à chaque station. Le VTG était ensuite ramené au navire où les seringues étaient retirées et remplacées par de nouvelles seringues stériles. Les seringues contenant les échantillons étaient immédiatement vidées dans des tubes Falcon stériles de 50 ml; 1 ml était extrait avec une pipette automatique et placé dans une solution d'extraction pour l'ATP (Ultralyse), puis le tube était placé sur de la glace pour le transport vers le laboratoire. Le navire se déplaçait ensuite vers la station suivante (pisciculture ou référence) où un autre échantillon était prélevé selon les mêmes protocoles.

L'échantillon en milieu pélagique a été prélevé par un plongeur autonome soit sur la grille de la pisciculture, soit au niveau d'une bouée de référence située à au moins 200 m de la pisciculture (p. ex., une bouée de navigation). Pour les échantillons de pisciculture, les stations d'échantillonnage potentielles ont été calculées à partir des côtés nord, sud, est et ouest de chaque cage (p. ex., s'il y avait 10 cages dans une pisciculture, cela nous donnait 40 emplacements d'échantillonnage potentiels). Nous avons ensuite choisi au hasard cinq stations à échantillonner. Pour prélever les échantillons, deux plongeurs nageaient le long de la grille à 5 m jusqu'à une station d'échantillonnage. Le plongeur passait sa main, recouverte d'un sac en plastique, sur environ 50 cm de la corde et remettait ainsi en suspension les sédiments et l'épifaune qui s'y trouvaient. Les plongeurs ont prélevé deux échantillons répétés à chaque station puis les ont ramenés au navire, où ils ont été traités comme décrit ci-dessus pour les échantillons benthiques.

Traitement des échantillons

Une fois les échantillons revenus au laboratoire, ils étaient traités le jour même, sauf ceux destinés à l'analyse de l'ATP, qui étaient stables pendant plusieurs jours. Un échantillon de 50 ml était retiré de la glace et réhomogénéisé, puis 5 ml étaient filtrés à travers un filtre GFC de 25 mm prépesé. Ce filtre était ensuite placé dans une étuve à 80 °C pendant 24 heures puis était pesé de nouveau pour calculer les mg/ml de sédiments dans le tube Falcon de 50 ml. L'échantillon restant dans le tube Falcon de 50 ml était pipeté sur un filtre stérile de 0,2 µm en aliquotes de 5 ml jusqu'à ce que le filtre devienne brun foncé ou que l'échantillon restant soit épuisé. Le filtre était ensuite plié à l'aide de pinces stériles, placé dans un tube Falcon stérile de 15 ml, et 1 ml d'alcool éthylique à 100 % était ajouté. Les échantillons étaient conservés au réfrigérateur jusqu'à leur transport au laboratoire du Conseil de la productivité de la recherche à Fredericton, au Nouveau-Brunswick, où l'ADN était extrait pour un traitement ultérieur.

Analyse de l'ATP

L'analyse de l'ATP a été effectuée selon les protocoles analytiques établis par [LuminUltra® Technologies Ltd.](#). En bref, 1 ml de l'échantillon d'origine prélevé par le VTG était pipeté dans un tube UltraLyse préparé (comme mentionné ci-dessus dans l'échantillonnage). Le tout était agité et laissé au repos pendant jusqu'à 24 heures. Selon la quantité de matière présente dans l'échantillon d'origine, une couche colloïdale se déposait généralement au fond du tube. Un échantillon de 1 ml était prélevé à l'aide d'une pipette automatique dans le tube UltraLyse, sans perturber la couche colloïdale, et pipeté dans un tube UltraLute préparé où il était inversé trois fois pour mélanger le contenu et laissé au repos pendant 4 minutes. À l'aide d'une pipette automatique, 0,1 ml de la solution était placé dans une coupe à échantillon et on ajoutait 0,1 ml de Luminase. Le mélange était agité 5 fois et placé dans le luminomètre pour la lecture. Le luminomètre et la Luminase étaient étalonnés au début et à la fin de chaque cycle de traitement.

Analyse de l'ADNe

L'ADN a été extrait des échantillons et le gène de l'ARNr 16S amplifié selon le flux de travail suggéré par Illumina, mais des modifications décrites ailleurs ont été intégrées (Caporaso *et al.*, 2011; Caporaso *et al.*, 2012). Les régions V3 ou V4 (ou les deux) du gène de l'ARNr 16S bactérien ont été séquencées, car il a été démontré que cette région est très fiable pour le regroupement des communautés (Liu *et al.*, 2007; Hamady et Knight, 2009). Le séquençage a été effectué sur un instrument Illumina MiSeq en utilisant des lectures de 2 x 300 pb et générant 2 000 à 45 000 lectures par échantillon.

Analyse des ARG

Tous les extraits d'ADN ont été quantifiés à l'aide de la trousse d'analyse Quant-iT PicoGreen dsDNA (ThermoFisher Scientific) et lus sur un lecteur de plaques Synergy H1 (BioTek). Les échantillons d'ADN étaient dilués à 1:2 pour garantir un volume suffisant pour tous les tests qPCR. L'inhibition de la qPCR a été vérifiée pour tous les échantillons à l'aide des réactifs à témoin positif interne exogène (IPC) TaqMan (ThermoFisher Scientific). Les réactions de PCR quantitative ont été mises en place selon les recommandations du fabricant, au moyen de 3 µL d'extrait d'ADN dilués et du Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England BioLabs). Toutes les réactions de qPCR ont été réalisées sur un système de PCR en temps réel QuantStudio 7 (ThermoFisher Scientific). L'analyse n'a révélé aucun signe d'inhibition de la PCR.

L'amplification a été évaluée pour le locus de référence 16S et neuf gènes de résistance aux antibiotiques (voir le tableau 8). Les réactions qPCR 16S ont été réalisées au moyen de 3 µL d'extraits d'ADN dilués, 1X Luna Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs), 0,5 U Antarctic thermolabile UDG (New England BioLabs) et 0,025 µM de chacune des amorces 16SF et 16SR (voir le tableau 8). Les cycles de qPCR étaient les suivants : 25 °C pendant 10 minutes, 95 °C pendant 1 minute et 45 cycles de 94 °C pendant 15 secondes et 60 °C pendant 30 secondes suivis d'une analyse de la courbe de fusion.

Pour les neuf gènes de résistance aux antibiotiques évalués, les réactions qPCR étaient constituées d'extraits d'ADN dilués, de 1X Luna Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs) et de 0,025 µM de chacune des amorces sens et antisens (voir tableau 8). Pour les locus *tetA*, *tetK*, *tetM* et *sul2*, les cycles de qPCR ont été les suivants : 95 °C pendant 1 minute et 45 cycles de 94 °C pendant 15 secondes et T_a °C (voir tableau 8) pendant 30 secondes suivis d'une analyse de la courbe de fusion. Pour les locus *tetB*, *int1* et *sul1*, les cycles de qPCR ont été les suivants : 95 °C pendant 1 minute et 45 cycles de 94 °C pendant 15 secondes

et Ta °C (voir tableau 8) pendant 20 secondes et 72 °C pendant 20 secondes suivis d'une analyse de la courbe de fusion.

L'amplification pour l'IPC, le 16S et tous les gènes de résistance aux antibiotiques a été faite en triple. Toutes les plaques de qPCR comprenaient une courbe standard à sept points (10⁶ à 10⁰) (en triple) créée à partir de la dilution en série de gBlocks (Integrated DNA Technologies) avec les locus cibles. Les résultats des courbes de fusion ont été évalués à l'aide du logiciel QuantStudio Real-Time PCR v1.3 (ThermoFisher Scientific). Tous les gènes de résistance aux antibiotiques ont été inspectés visuellement et le résultat (nombre de copies) n'a été inclus que lorsqu'au moins deux des trois répétitions présentaient des courbes de fusion cohérentes avec les contrôles gBlock. La moyenne et l'écart-type des deux ou trois réactions qPCR répondant à ce critère ont été calculés. Lorsqu'il n'y avait qu'une seule ou aucune répétition montrant un pic de courbe de fusion cohérent avec les contrôles gBlock, un résultat d'absence d'amplification a été rapporté.

Tableau 8. Locus de résistance aux antibiotiques, renseignements sur les amorces et température d'hybridation de la qPCR.

Locus	Antibiotique	Citation pour les amorces qPCR	Température d'hybridation (Ta) de la qPCR (°C)	Type de cycle
16S	Non applicable (Référence)	Jang <i>et al.</i> , 2018	60	Rapide
tetA	Oxytétracycline	Tamminen <i>et al.</i> , 2011b	64	Rapide
tetB	Oxytétracycline	Jang <i>et al.</i> , 2018	53	Standard
tetK	Oxytétracycline	Buschmann <i>et al.</i> , 2012a	60	Standard
tetM	Oxytétracycline	Tamminen <i>et al.</i> , 2011b	60	Standard
floR	Florfenicol	Su <i>et al.</i> , 2017	60	Standard
int1	Non applicable (intégrase de classe 1)	Jang <i>et al.</i> , 2018	58	Standard
sul1	Sulfadiazine et sulfadiméthoxine	Jang <i>et al.</i> , 2018	56	Rapide
sul2	Sulfadiazine et sulfadiméthoxine	Jang <i>et al.</i> , 2018	68	Standard

Le rapport des données sur les ARG a été fait par une mesure normalisée où le nombre total de copies d'un gène particulier a été divisé par le nombre total de copies du gène ribosomal 16S. On obtient ainsi un nombre proportionnel à la taille de la population totale des bactéries traitées dans l'échantillon.

RÉSULTATS

Résultats pour l'ATP

Les données des échantillons d'ATP ont montré une forte relation entre la répartition spatiale et la proximité de l'exploitation aquacole. Malgré la perte de certains échantillons répétés pour l'échantillon d'été prélevé dans le transect benthique (à la suite d'une erreur humaine), la mise en commun des échantillons provenant des différentes piscicultures à chacune des distances a tout de même montré une concentration d'ATP par gramme de poids sec (PS) élevée au bord de la pisciculture et diminuant très rapidement vers les niveaux naturels à 20 m (Fig. 11). Les densités moyennes variaient d'environ 25 000 pg ATP/g PS à la pisciculture à environ 4 000 à 20 m de distance. La variabilité (erreur type) était la plus élevée à la station de 0 mètre, mais était relativement homogène à toutes les autres distances. Les échantillons de Davidson's Head prélevés à la fin de l'automne ont montré la même tendance générale que celle de l'été, avec des concentrations d'ATP significativement plus élevées dans les échantillons benthiques de la pisciculture par rapport au site de référence à 200 m. Les moyennes des échantillons prélevés à la fin de novembre à la pisciculture (environ 80 000 pg ATP/g PS) étaient presque trois fois plus élevées que celles des échantillons prélevés en août à la pisciculture (25 000 pg ATP/g PS). Les échantillons d'eau du milieu pélagique ont montré un schéma différent, l'ATP étant presque deux fois plus élevée au site de référence qu'au site d'élevage (Fig. 12a). Une différence a également été observée entre les piscicultures quant aux échantillons prélevés au niveau des grilles, les niveaux les plus bas ayant été enregistrés à Charlie Cove (Fig. 12b). Les échantillons prélevés en novembre sur le site de Davidson's Head n'indiquaient pas de différence significative entre l'exploitation et le site de référence en ce qui concerne les concentrations d'ATP (23 700 c. 25 000 pg ATP/g PS, respectivement).

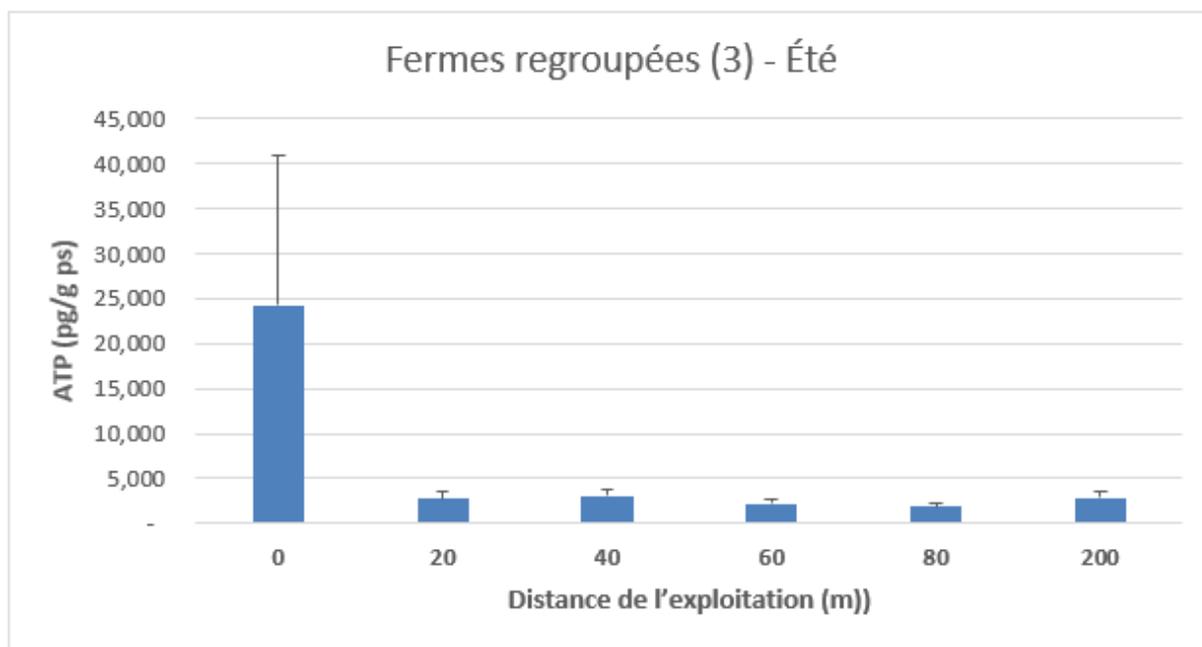


Figure 11. Concentrations d'ATP (pg ATP/g poids sec) en fonction de la distance par rapport au bord de la pisciculture. Trois sites sont mis en commun. Les barres d'erreur représentent un écart-type.

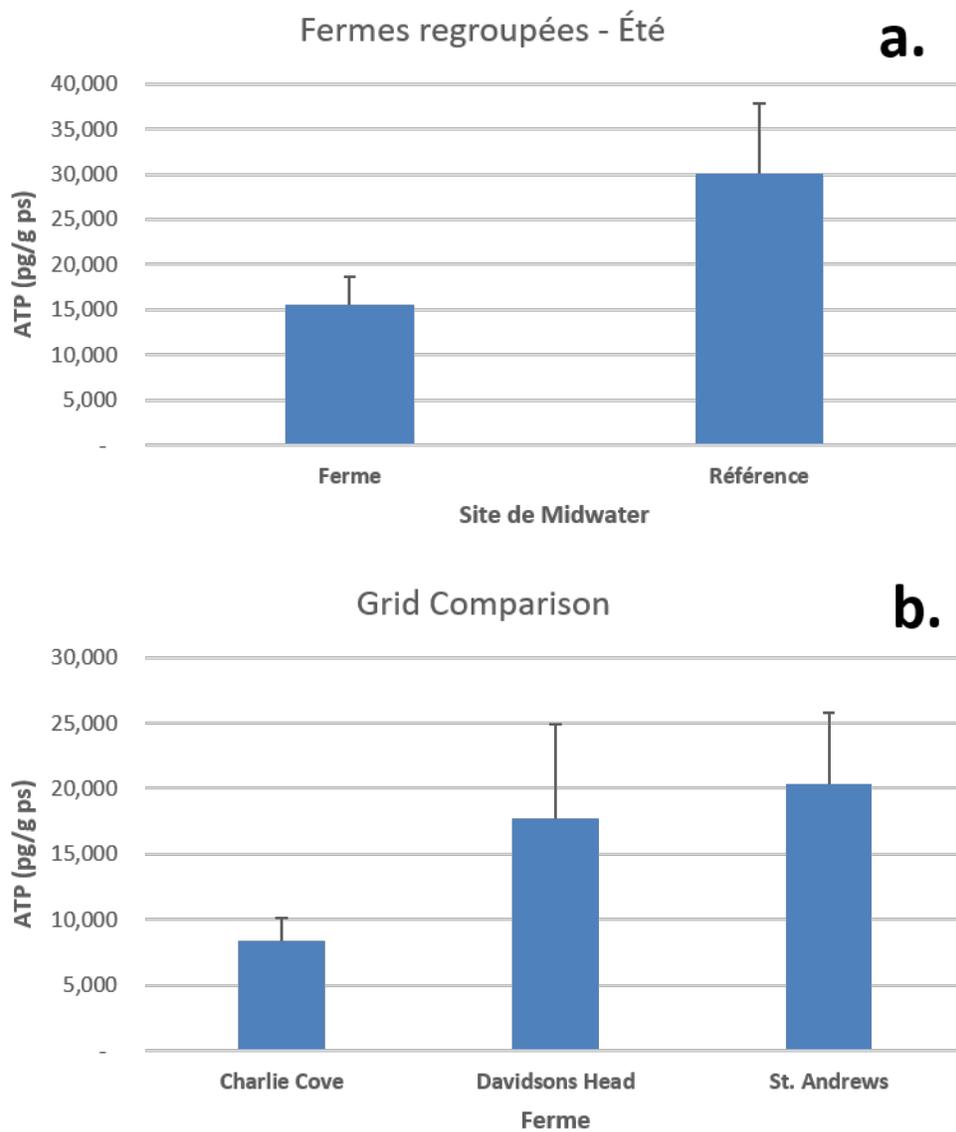


Figure 12. Concentrations moyennes d'ATP en milieu pélagique dans les exploitations regroupées par rapport aux sites de référence en août 2018. b.) Comparaison des concentrations d'ATP sur la grille dans les trois piscicultures en août 2018. Chaque barre d'erreur représente un écart-type

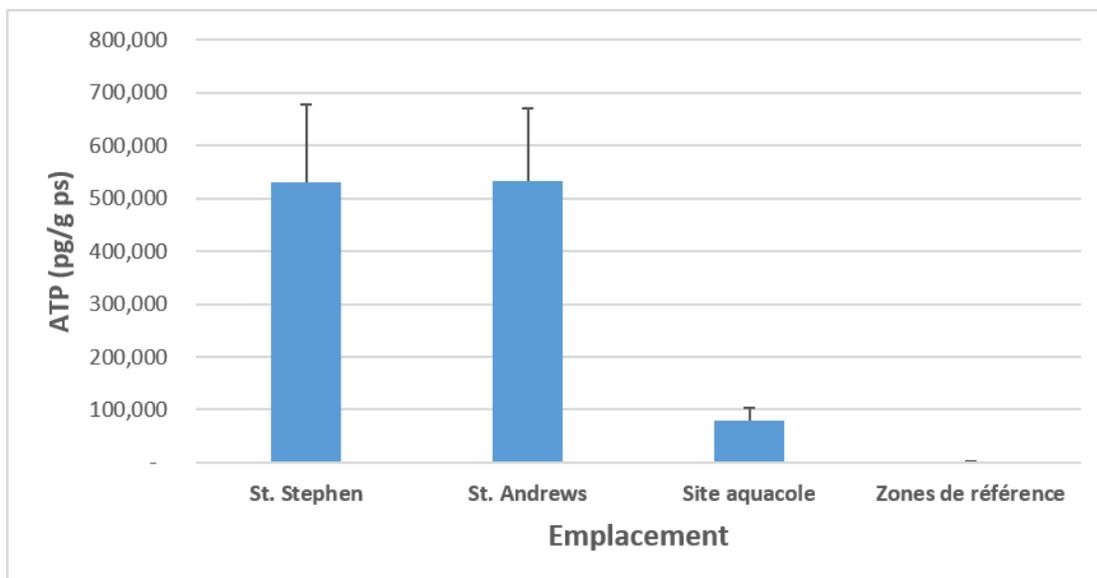


Figure 13. Concentrations moyennes d'ATP dans les sites de référence, les piscicultures et les installations de traitement des eaux usées. St. Stephen et St. Andrews représentent les installations de traitement des eaux usées. Chaque barre d'erreur représente un écart-type.

Il y a eu beaucoup plus de stations de référence au cours de la période de novembre pour fournir plus de contexte pour les concentrations d'ATP par rapport à la pisciculture. Aucun échantillon comparable n'a été prélevé en été. Les profils microbiens de l'ATP montrent des groupements distincts en ce qui concerne les densités bactériennes. Les échantillons des installations de traitement des eaux usées présentaient un ordre de grandeur plus élevé d'ATP (environ 500 000 pg ATP/g PS) que les échantillons benthiques des exploitations aquacoles (environ 79 000 pg ATP/g PS) (Fig. 13). Les salmonicultures présentaient un ordre de grandeur plus élevé d'ATP que les sites de référence généraux situés à plus de 200 m de la salmoniculture (2 200 pg ATP/g PS).

Résultats pour l'ADNe

Répartitions globales

Les analyses métagénomiques des échantillons de sédiments benthiques ont révélé la présence de 70 classes de bactéries, mais la majeure partie des bactéries (sur la base du nombre de lectures) était représentée par environ 10 classes différentes. Les classes bactériennes présentaient un profil distinct dans les piscicultures et les sites de référence (Fig. 14). Les piscicultures étaient souvent dominées par les classes Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria et Flavobacteriia, où elles pouvaient représenter jusqu'à 60 % des bactéries, alors que dans les stations de référence, les Gammaproteobacteria étaient généralement dominantes avec les Deltaproteobacteria, les alpha Proteobacteria et les cyanobactéries Oscillatoriothycideae. Le nombre de bactéries non classées dans les échantillons benthiques variait de 6 à 12 %.

Le site de Davidson's head est la seule pisciculture qui a été échantillonnée à la fois en été et en hiver. En été, les Deltaproteobacteria ont dominé la pisciculture par un facteur de deux par rapport aux Gammaproteobacteria, tandis qu'en hiver, les Gammaproteobacteria étaient dominantes, par environ 50 %. Les Epsilonprotéobacteria sont restées élevées aux deux saisons et représentaient environ 10 à 12 % des bactéries présentes.

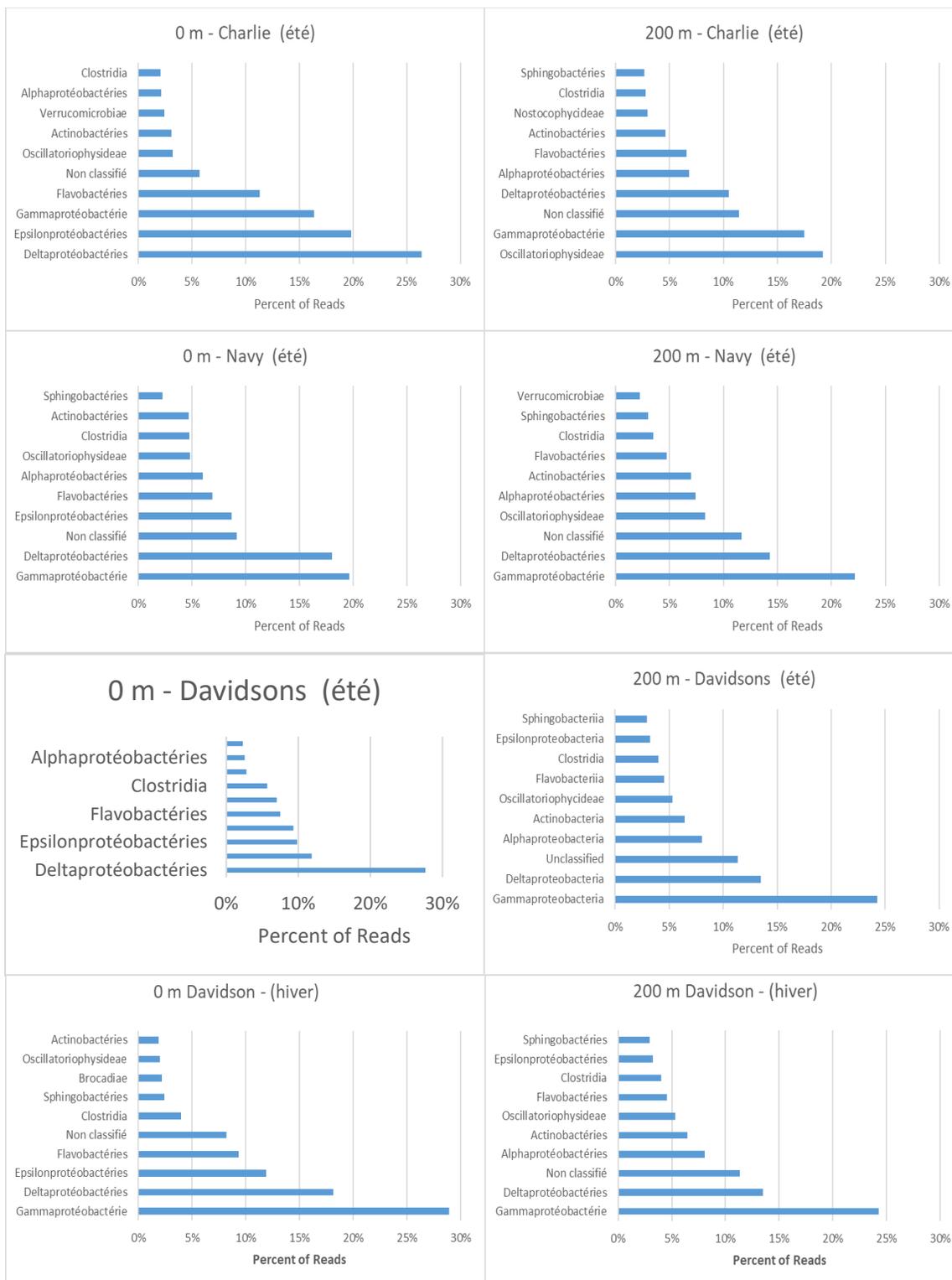


Figure 14. Proportion des dix principales classes bactériennes (y compris les bactéries non classées) trouvées dans les échantillons de sédiments benthiques du bord de la cage à 0 m et de la station de référence à 200 m pour les trois piscicultures étudiées dans ce projet. Les échantillons d'été ont été prélevés en août 2018, et les échantillons d'hiver, à la fin novembre.

Tendances spatiales

Les données des transects des trois piscicultures pendant l'été ont montré que les classes dominantes (Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria et Flavobacteriia) étaient plus abondantes à la pisciculture et diminuaient rapidement dans les échantillons plus éloignés des cages à poissons (Fig. 15). Une classe moins abondante, les Spirochaetes, a également présenté une diminution de son abondance avec l'augmentation de la distance par rapport aux piscicultures, bien que cette tendance ait été un peu plus floue à la pisciculture de Charlie Cove. À l'inverse, les Oscillatoriothycideae et les Nitrospira présentait la tendance inverse avec une abondance croissante loin des piscicultures.

L'étude de l'ADNe a montré que 15 genres de bactéries pathogènes pour les poissons étaient présents dans les échantillons benthiques autour des salmonicultures (tableau 9). Les abondances des genres différaient souvent de deux ordres de grandeur, et certains genres étaient assez rares (p. ex., *Piscirickettsia*, *Renibacterium* et *Yersinia*).

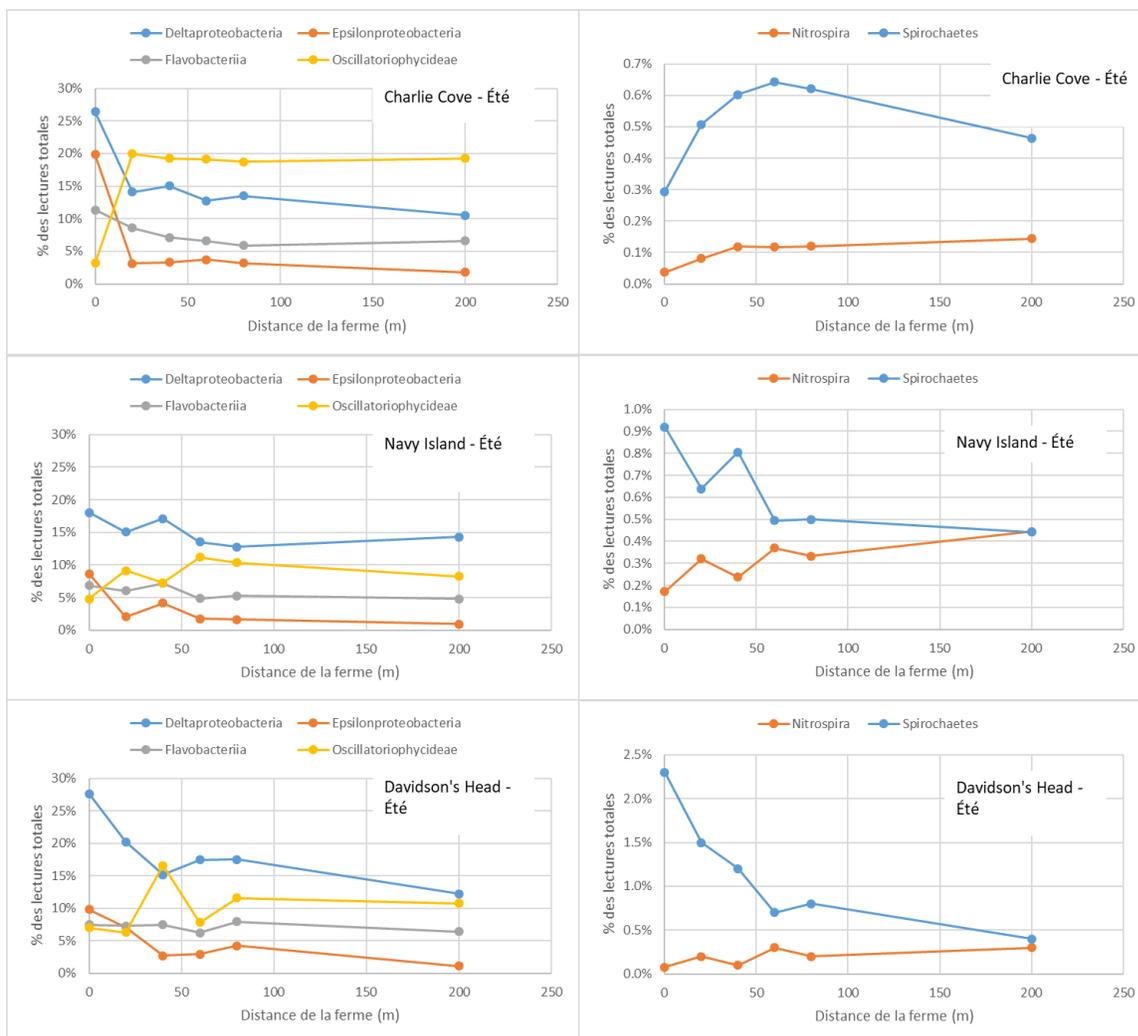


Figure 15. Distribution des classes bactériennes dominantes le long d'un transect de 200 mètres en août 2018 dans trois salmonicultures de la baie de Fundy. Les pourcentages correspondent à la moyenne des lectures de cinq répétitions de l'échantillon pour cette distance (p. ex., la moyenne de cinq répétitions prises à 20 m et ensuite calculée en pourcentage pour toutes les classes trouvées à cette distance).

Tableau 9. Liste de présence/absence des genres bactériens d'intérêt pour la santé des poissons trouvés dans les échantillons de sédiments benthiques prélevés sur des transects s'éloignant de trois salmonicultures et des zones de référence sondées dans la baie de Fundy en août 2018 et en novembre 2018. Il est à signaler que la plupart des espèces de ces genres ne sont pas pathogènes, mais leur présence suggère que les conditions environnementales sont propices à l'existence de ces types de bactéries.

Genre	Pisciculture			Zone de référence
	Navy	Davidsons	Charlie	
<i>Acinetobacter</i>	P	P	P	P
<i>Aliivibrio</i>	P	P	P	P
<i>Arthrobacter</i>	P	P	P	P
<i>Flavobacterium</i>	P	P	P	P
<i>Francisella</i>	P	P	P	P
<i>Moritella</i>	P	P	P	P
<i>Mycobacterium</i>	P	P	P	P
<i>Photobacterium</i>	P	P	P	P
<i>Piscirickettsiose</i>	P*	P*	P*	P*
<i>Pseudomonas</i>	P	P	P	P
<i>Renibacterium</i>	A	A	P*	A
<i>Shewanella</i>	P	P	P	P
<i>Tenacibaculum</i>	P	P	P	P
<i>Vibrio</i>	P	P	P	P
<i>Yersinia</i>	P	P**	P	P*

* Faible nombre de lectures

** Non présent dans les échantillons d'hiver

Gènes résistants aux antibiotiques (ARG)

Les résultats de l'enquête montrent que les ARG étaient tous présents en différentes quantités dans pratiquement tous les échantillons prélevés, allant de 16 % à 100 % selon l'antibiotique. Les concentrations relatives d'ARG varient de plusieurs ordres de grandeur entre les échantillons en fonction de leur emplacement.

Florfénicol

Les ARG associés au florfénicol ont été trouvés dans 79 % de tous les échantillons que nous avons analysés, et les concentrations variaient d'environ trois ordres de grandeur. Il ont été trouvés en fortes concentrations à l'installation de traitement des eaux usées de St. Stephen et, dans une moindre mesure, à celle de St. Andrews (Fig. 16). L'abondance des gènes de résistance au florfénicol semblait avoir tendance à augmenter avec l'augmentation de la distance par rapport aux piscicultures; toutefois, il y avait un signal raisonnablement fort à 0 m à Davidson's Head, et il n'y avait pas de tendance forte à l'île Navy. On a constaté une baisse de l'abondance du florfénicol entre les échantillons d'été et d'hiver à Davidson's Head. À la marque de 0 mètre, les ARG ont chuté de $6,3 \times 10^{-6}$ en août à $1,3 \times 10^{-6}$ en novembre. Au repère de 200 mètres, les ARG de florfénicol sont passés de $1,7 \times 10^{-6}$ à zéro en novembre. Au niveau de la grille, les ARG sont passés de $4,8 \times 10^{-7}$ en août à zéro en novembre. Les échantillons recueillis en milieu pélagique à la station de référence n'ont montré aucune indication d'ARG associés au florfénicol, que ce soit en été ou en hiver.

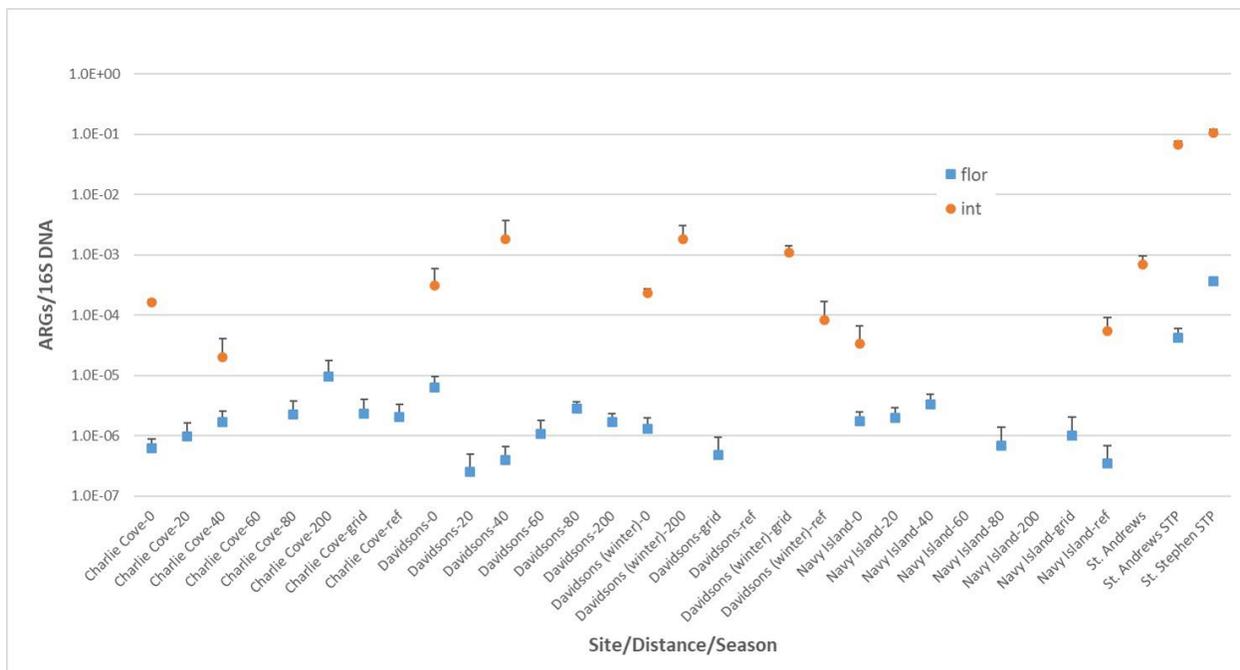


Figure 16. Abondance relative des ARG au florfénicol et à l'intégrase dans les stations d'échantillonnage de trois salmonicultures dans la baie de Fundy, à deux périodes de l'année, en août et à la fin novembre (désignée par « hiver ») 2018. Les barres d'erreur représentent une erreur type.

Intégrase

Le gène associé à l'intégrase a été trouvé dans 45 % de tous les échantillons testés et variait de près de quatre ordres de grandeur. Les installations de traitement des eaux usées de St. Stephen ($1,1 \times 10^{-1}$) et de St. Andrews ($6,7 \times 10^{-2}$) présentaient les concentrations les plus élevées du gène (Fig. 16). L'ARG était présent à la station de 0 m dans chacune des trois piscicultures, mais aucune tendance n'a été observée quant à la diminution de l'abondance avec la distance, car des concentrations élevées d'ARG ont été mesurées dans certaines des stations les plus éloignées de la pisciculture. Davidson's Head présentait des concentrations allant de zéro à $1,8 \times 10^{-3}$, Charlie Cove, de zéro à $1,6 \times 10^{-4}$, et l'île Navy, de zéro à $5,5 \times 10^{-5}$.

Sulfonamides

L'ARG associé au sulfonamide sul1 a été trouvé dans 77 % des échantillons analysés, et l'ARG associé au sul2, dans 97 % des échantillons. La concentration de ces ARG variait de six ordres de grandeur parmi l'ensemble des stations. Pour le sul1, il y avait une relation positive entre la concentration et la distance de la pisciculture à Charlie Cove, mais cette tendance, bien qu'existante, n'était pas aussi forte dans le cas des deux autres sites. L'ARG au sul2 n'a montré aucune tendance réelle avec la distance dans le site de Charlie Cove, mais il y avait une relation négative entre la concentration et la distance dans les deux autres sites (Fig. 17). Dans le site de Davidson's Head, les concentrations des échantillons d'hiver avaient tendance à être inférieures aux concentrations d'été en ce qui concerne l'ARG au sul2.

L'autre signal élevé provenait de l'installation de traitement des eaux usées de St. Stephen, où l'ARG au sul2 s'élevait à $3,2 \times 10^{-3}$. Les échantillons prélevés dans les milieux pélagiques au niveau des grilles et des stations de référence présentaient tous des concentrations faibles par rapport aux échantillons benthiques.

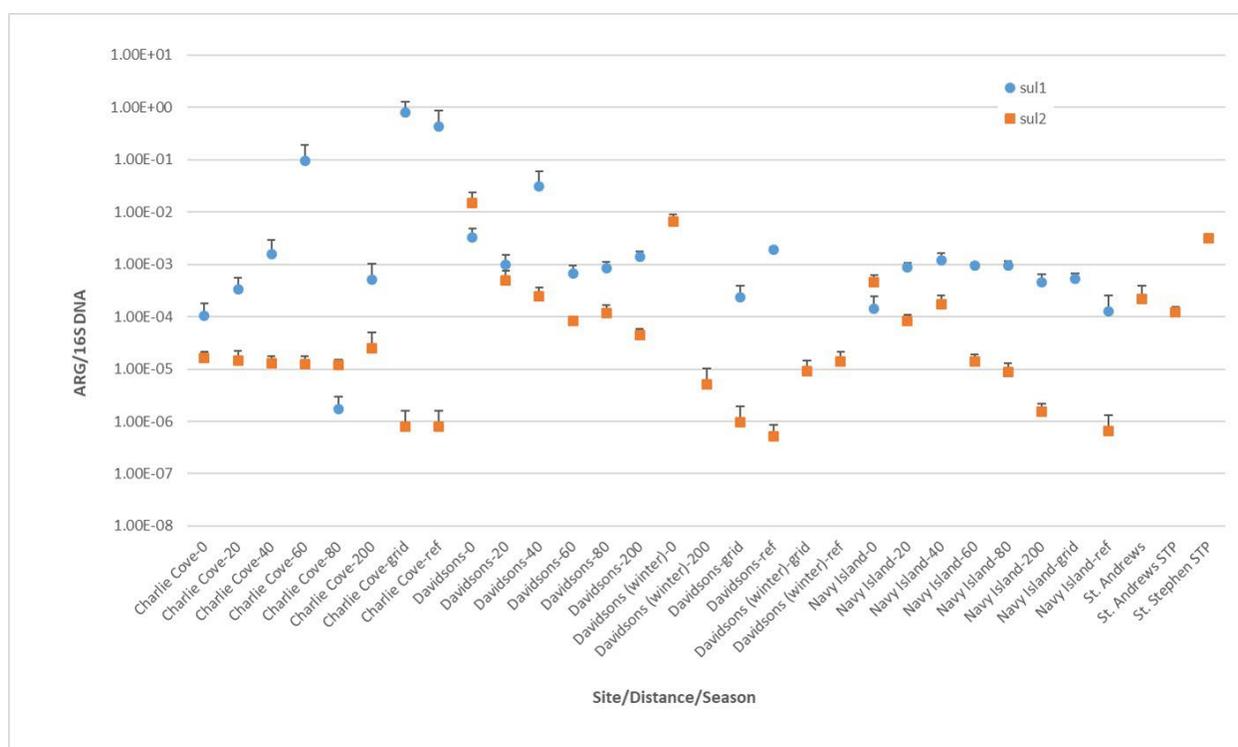


Figure 17. Abondance relative des ARG aux sulfonamides sul1 et sul2 dans les stations d'échantillonnage de trois salmonicultures de la baie de Fundy, à deux périodes de l'année, en août et à la fin novembre (désignée par « hiver ») 2018. Les barres d'erreur représentent une erreur type.

Tétracycline

Le pourcentage d'échantillons dans lesquels des ARG à la tétracycline ont été détectés variait selon le gène : tetA (84 %), tetB (16 %), tetK (68 %) et tetM (68 %), la variation pour tous les ARG était d'environ cinq ordres de grandeur. La plus grande abondance de gènes de tétracycline a été observée pour tetA ($3,3 \times 10^{-4}$ ARG/16 S ADN) et tetM ($2,1 \times 10^{-3}$) à la station de 0 m de la pisciculture Davidson's Head dans les échantillons d'été et d'hiver ($8,2 \times 10^{-4}$) ainsi que pour tetA à la station d'épuration de St. Stephen ($1,4 \times 10^{-3}$) (Fig. 18). Les ARG à la tétracycline affichaient une tendance à la baisse avec l'augmentation de la distance par rapport à la pisciculture et chutaient assez rapidement de 0 à 20 m et au-delà. Cette tendance à la

baisse a été observée pour tetA, tetK et tetM. Les valeurs moyennes à la station de 200 mètres étaient assez faibles dans toutes les piscicultures : Charlie Cove ($3,4 \times 10^{-7}$), Davidson's Head ($4,6 \times 10^{-6}$) et île Navy ($2,4 \times 10^{-7}$). Les échantillons prélevés dans les milieux pélagiques au niveau des grilles et des stations de référence présentaient des concentrations très faibles d'ARG à la tétracycline.

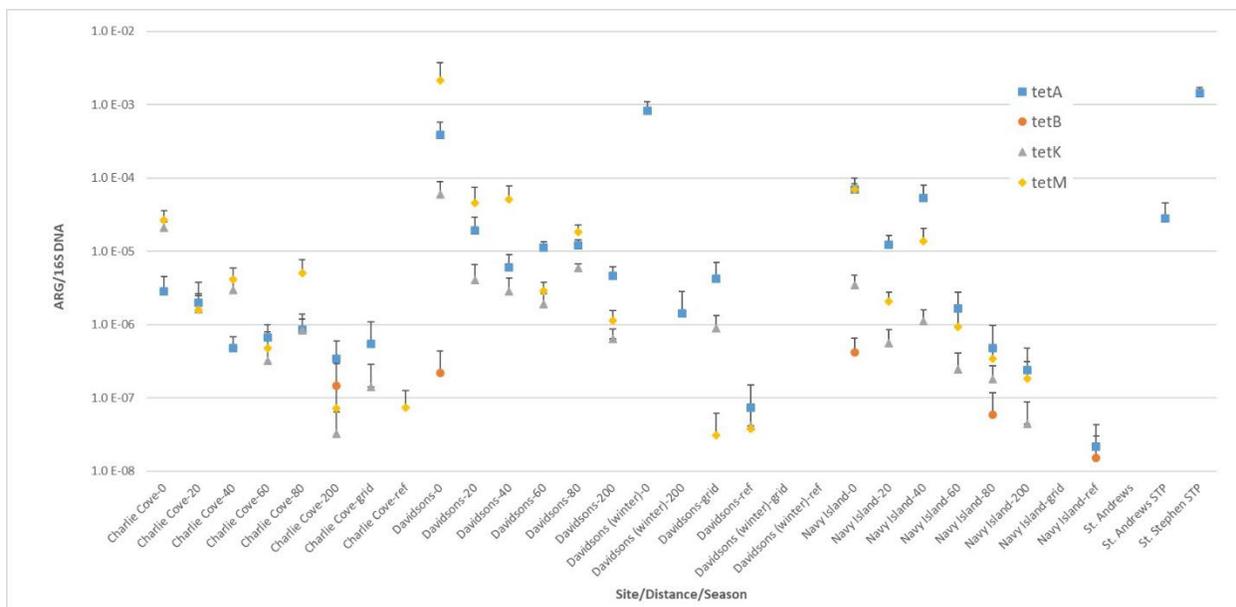


Figure 18. Abondance relative pour les ARG à la tétracycline (tetA, tetB, tetK, tetM) dans les stations d'échantillonnage de trois salmonicultures de la baie de Fundy, à deux périodes de l'année, en août et à la fin novembre (désignée par « hiver ») 2018. Les barres d'erreur représentent une erreur type.

L'analyse de la relation entre les différents ARG a montré qu'il y avait une corrélation importante dans le cas de certains gènes (tableau 10). Le gène de l'intégrase de classe 1 était corrélé avec floR et tetA. Le gène de sul2 était corrélé avec tetA, tetK et tetM, mais présentait une plus faible corrélation avec tetB. Les gènes tetK et tetM étaient corrélés.

Tableau 10. Matrice de corrélation des huit ARG étudiés dans cette étude.

	sul1	sul2	floR	tetA	tetB	tetK	tetM	int1
sul1	1							
sul2	-0,08	1						
floR	-0,05	0,16	1					
tetA	-0,09	0,52	0,83	1				
tetB	-0,09	0,36	-0,05	0,05	1			
tetK	-0,08	0,83	-0,05	0,14	0,40	1		
tetM	-0,05	0,90	-0,03	0,18	0,44	0,94	1	
int1	-0,07	0,10	0,90	0,70	-0,09	-0,08	-0,05	1

ANALYSE

Tendances relatives à l'ATP

Les données sur l'ATP montrent clairement que les populations microbiennes sont considérablement accrues autour des exploitations aquacoles par rapport aux zones de référence qui sont plus représentatives de l'écosystème naturel. Cette amplification des populations bactériennes, déduite des données sur l'ATP, est approximativement d'un ordre de grandeur supérieur à celle des zones de référence, car les bactéries se nourrissent de manière opportuniste du carbone organique déposé par la pisciculture. Les concentrations d'ATP ne sont élevées qu'à proximité des cages, les échantillons prélevés à partir de 20 m et jusqu'à 200 m montrant tous une chute marquée des concentrations d'ATP. Cette observation était uniforme dans les échantillons d'été et d'hiver, bien que cette dernière comparaison n'ait été faite qu'entre les stations de 0 et de 200 mètres. La présente observation d'une activité microbienne accrue à proximité des piscicultures, basée sur l'ATP, concorde avec les observations faites en Méditerranée dans les piscicultures de daurade royale (*Sparus aurata*) et de bar (*Dicentrarchus labrax*) (Karakassis *et al.*, 2000). Leurs données ont montré une augmentation de l'activité benthique jusqu'à 25 m de la pisciculture, après quoi elle diminuait rapidement pour atteindre les concentrations naturelles. Des résultats similaires sur l'augmentation de l'activité bactérienne à proximité des salmonicultures ont également été observés en Australie (Bissett *et al.*, 2006; Bissett *et al.*, 2007; Bissett *et al.*, 2008).

Les échantillons prélevés en milieu pélagique au niveau de la grille et des stations de référence présentaient des concentrations d'ATP par gramme de sédiment distinctes en été, mais comparables en hiver. Toutefois, il faut tenir compte de la quantité totale de sédiments pour calculer la biomasse totale des microbes. Les cordes des stations de référence étaient assez propres et présentaient très peu de sédiments, alors que les cordes de la grille étaient chargées de sédiments et d'organismes salissants (S. Robinson, observation personnelle). Nous pouvons déduire certains renseignements de la différence moyenne relative entre le poids des sédiments dans les échantillons des seringues provenant de la pisciculture et ceux provenant des sites de référence (4,6:1 - pisciculture:référence). Cela suggère qu'il y avait presque cinq fois la quantité totale d'ATP (p. ex., des bactéries) sur les grilles des piscicultures par rapport aux lignes d'amarrage de la station de référence.

Les plus faibles concentrations d'ATP en milieu pélagique ont été observées au site de Charlie Cove, ce qui est logique étant donné que cette pisciculture était en jachère alors que les deux autres piscicultures étaient actives. Les concentrations moyennes d'ATP à ce site ne représentaient que 50 % de celles du site de Davidson's Head ou de l'île Navy.

Les concentrations d'ATP mesurées dans d'autres zones de la région donnent un aperçu de la contribution potentielle d'autres activités anthropiques. Les zones de référence présentaient entre elles des concentrations d'ATP très similaires sur de larges échelles spatiales, mais ne représentaient que 10 % des concentrations trouvées dans les piscicultures et 1 % de celles trouvées dans les installations de traitement des eaux usées. Les concentrations d'ATP provenant des installations de traitement des eaux usées de St. Andrews et de St. Stephen étaient similaires et étaient d'un ordre de grandeur supérieur à celles des salmonicultures. Ces observations suggèrent que l'une ou l'autre des sources ponctuelles (piscicultures ou installations de traitement) peut produire des quantités importantes de bactéries pouvant interagir avec le milieu naturel. De telles tendances ont été montrées pour les installations de traitement des déchets terrestres dans le passé (Thiyagarajan *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2016).

Tendances en matière d'ADNe

Des tendances très nettes ont été observées dans la diversité des populations de bactéries à proximité des salmonicultures, au niveau des classes taxinomiques. Les classes permettant le mieux de discriminer la proximité des salmonicultures étaient les suivantes :

Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Flavobacteriia, Spirochaetes et Nitrospira. Les trois premières classes représentent souvent près de 50 % de tous les OTL détectés dans les échantillons. De telles observations montrant un profil clair de classes précises de bactéries existant à proximité des conditions riches en nutriments d'une salmoniculture ont également été faites dans d'autres régions. Par exemple, la classe des Flavobacteria s'est révélée être assez importante dans la dégradation initiale des biopolymères de la matière organique sédimentaire en tant que l'un des colonisateurs initiaux (Bissett *et al.*, 2008). La répartition globale des classes bactériennes en relation avec la pisciculture est également raisonnablement uniforme dans différentes zones géographiques (Keeley *et al.*, 2018; Stoeck *et al.*, 2018; Keeley *et al.*, 2020).

Il peut être important de comprendre quels groupes taxinomiques sont produits à proximité des salmonicultures puisque l'échange de gènes peut être plus facile entre des espèces taxinomiquement similaires (Kidwell, 2001). Si un certain ensemble d'espèces est sélectionné à proximité d'une pisciculture aquacole et que ces espèces représentent un pourcentage relativement élevé du microbiome des organismes produits (poissons, mollusques et crustacés) qui seront vendus sur le marché de l'alimentation humaine (Wang *et al.*, 2017 a), la probabilité que des ARG soient échangés avec des agents pathogènes humains appartenant à des groupes taxinomiques similaires est peut-être plus élevée. Certains des agents pathogènes humains appartenant aux classes dominantes recensées autour des piscicultures dans le cadre de la présente étude sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11. Liste des agents pathogènes humains par classe taxinomique et leurs effets. Il est à signaler que la plupart des espèces de ces genres ne sont pas pathogènes, mais leur présence suggère que les conditions environnementales sont propices à l'existence de ces types de bactéries.

Classe	Pathogène pour l'humain Genres	Maladie
Gammaproteobacteria	<i>Enterobacter</i>	infections des voies urinaires et respiratoires chez les patients hospitalisés
	<i>Klebsiella</i>	peut provoquer une pneumonie
	<i>Shigella</i>	Toxine de Shiga, qui peut détruire les cellules du tractus gastro-intestinal
	<i>Vibrio</i>	peut provoquer de graves infections des plaies
	<i>Yersinia</i>	agents pathogènes humains; le <i>Y. pestis</i> provoque la peste bubonique et la peste pneumonique; le <i>Y. enterocolitica</i> peut être un agent pathogène provoquant la diarrhée chez l'humain

Classe	Pathogène pour l'humain Genres	Maladie
Deltaproteobacteria	<i>Campylobactéries</i>	peut provoquer une entérite grave en cas de consommation de viande insuffisamment cuite
	<i>Helicobacter</i>	peut provoquer une gastrite chronique, des ulcères gastriques et un cancer de l'estomac
Alphaproteobacteria	<i>Brucella</i>	cause la brucellose chez les bovins et les humains
	<i>Chlamydia</i>	peut causer la chlamydie, le trachome et la pneumonie
	<i>Rickettsies</i>	peut provoquer la fièvre pourprée des montagnes Rocheuses et le typhus

[Référence](#)

Tendances relatives aux ARG

La présente recherche a montré que les ARG sont courants dans l'environnement benthique marin, bien que les concentrations dans une population bactérienne puissent varier considérablement, de plus de six ordres de grandeur.

Dans la série d'ARG à la tétracycline, tetA était le plus abondant, suivi de tetM. Ces deux ARG diminuaient avec l'augmentation de la distance par rapport aux piscicultures, ce qui suggère qu'il y avait une pression sélective maintenant ce gène à proximité de la pisciculture. Ce profil était uniforme entre les piscicultures, bien que la pisciculture de Charlie Cove ait eu des valeurs plus faibles (environ un ordre de grandeur) que les deux autres, ce qui s'explique par son statut de jachère à l'époque. Il est également intéressant de noter que Charlie Cove était aussi le site où l'on utilisait le plus d'antibiotiques, d'après les dossiers historiques de l'industrie et de la province du Nouveau-Brunswick. Dans le cadre d'études en microcosme, on a constaté que les ARG à la tétracycline augmentaient dans les cas où la tétracycline était ajoutée en association avec la farine de poisson (Han *et al.*, 2018). Sur une période de 14 jours, les ARG à la tétracycline ont augmenté dans le cas de traitements avec de la farine de poisson. On pense que les ARG à la tétracycline sont associés au système de pompe d'efflux (tetA) et aux protéines solubles de protection des ribosomes (tetM), qui entraînent une résistance aux antibiotiques chez la bactérie marine *Edwardsiella tarda*, laquelle crée des problèmes dans l'élevage des anguilles (Lo *et al.*, 2014). Les concentrations de tetA trouvées dans la présente étude étaient semblables à ceux de deux élevages de truites arc-en-ciel dans la mer baltique (environ 10^{-5}), mais les concentrations de tetM étaient inférieures de deux ordres de grandeur à celles mesurées dans ces élevages (Tamminen *et al.*, 2011a). D'autres études ont également trouvé des ARG à la tétracycline dans les sédiments associés à des piscicultures (Miranda et Zemelman, 2001 2002; Miranda *et al.*, 2003; Buschmann *et al.*, 2012b; Tomova *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2018).

Le groupe des ARG au sulfonamide a montré que ces gènes étaient assez omniprésents puisqu'ils ont été trouvés dans 77 % et 97 % des échantillons pour sul1 et sul2, respectivement. Le gène sul1 était plus abondant que le gène sul2 et il semblait présenter une dynamique différente en fonction de la distance par rapport à la pisciculture et également selon que le site était actif ou en jachère. Il est intéressant de noter que les schémas observés dans les piscicultures de la baie de Fundy étaient assez comparables à ceux trouvés dans trois piscicultures étudiées près de Singapour. Les deux études ont révélé que le gène sul1 était un peu plus élevé loin de la pisciculture, tandis que le gène sul2 semblait accru plus près des piscicultures dans la baie de Fundy, alors qu'il n'y avait pas de différence en ce qui concerne le gène sul2 entre la pisciculture et les sites de référence à Singapour (Ng *et al.*, 2018). Ces deux gènes ont été trouvés dans plusieurs études portant sur les impacts de la pisciculture (Muziasari *et al.*, 2014; Capkin *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2017; Jang *et al.*, 2018; Ng *et al.*, 2018).

Cette étude a révélé un certain nombre de corrélations intéressantes. On a constaté que le gène de l'intégrase de classe 1 (int1) était fortement corrélé avec les ARG au florfenicol (floR) et à la tétracycline (tetA). Il est intéressant de noter qu'il présentait une faible corrélation avec l'un ou l'autre des ARG à la tétracycline. Le gène int1 est couramment lié aux gènes conférant une résistance aux antibiotiques, aux désinfectants et aux métaux lourds et a également été suggéré comme un bon indicateur des impacts anthropiques (Gillings *et al.*, 2015). Selon les résultats de la présente étude, les concentrations d'int1 les plus élevées se trouvaient en général le plus près des piscicultures et également aux deux installations de traitement des eaux usées, où ces concentrations étaient de presque deux ordres de grandeur plus élevées que celles des autres stations d'échantillonnage. Il est généralement admis que le gène int1 est fortement associé au développement de problèmes de résistance aux antibiotiques chez les animaux d'élevage, tant terrestres qu'aquatiques (Čížek *et al.*, 2010; Ndi et Barton 2011; Jechalke *et al.*, 2013; Gillings *et al.*, 2015; Jang *et al.*, 2018; Sáenz *et al.*, 2019).

CONCLUSIONS

Les conclusions générales de cette première étude empirique sont que les salmonicultures et d'autres points d'accumulation organique importante (comme les installations de traitement des eaux usées) sont des « points chauds » pour la création d'un grand nombre de bactéries. Ces bactéries se développent et évoluent rapidement et créent des schémas spatiaux tant au niveau de l'abondance (en raison de l'abondance de carbone organique disponible dans les flux de déchets) que de la diversité taxonomique (en raison des conditions environnementales créées dans le site). Les gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) sont un phénomène naturel chez les bactéries marines et ils sont présents dans presque toutes les populations bactériennes que nous avons échantillonnées, bien que nous ne puissions pas les rattacher à un groupe taxonomique précis à ce stade. Bien que ces ARG soient naturels, ils sont renforcés dans les piscicultures et dans les installations de traitement des eaux usées, probablement verticalement par la sélection naturelle et aussi horizontalement par l'échange de plasmides basé sur la présence du gène de l'intégrase de classe I (int1). Le risque que les ARG présentent pour la gestion de la santé des poissons dans la pisciculture ou pour la santé humaine par l'entremise de la consommation d'espèces d'élevage (ou d'espèces sauvages touchées à proximité) dépend de la probabilité de transfert des ARG aux agents pathogènes des poissons ou des humains. Nous ne disposons d'aucune donnée pertinente à l'échelle régionale à ce sujet, mais d'autres études internationales ont suggéré qu'il est possible que les piscicultures puissent augmenter les ARG au-dessus des concentrations environnementales de référence qui ont des répercussions sur la santé humaine. Il faudra effectuer des recherches plus approfondies sur ce sujet pour qu'une évaluation correcte des risques puisse être effectuée quant à la probabilité de l'introduction d'ARG dans le résistome des agents pathogènes des humains ou des poissons.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La propagation des gènes de résistance aux antibiotiques associée à l'utilisation d'antibiotiques en aquaculture constitue une menace non seulement pour l'industrie aquacole, mais également potentiellement pour la santé humaine, car il a été démontré par l'examen de diverses études que les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être transmis à des agents pathogènes humains par ce vecteur. De nombreux antibiotiques utilisés en aquaculture sont également utilisés en médecine humaine, ce qui accroît le danger lorsque des gènes conférant une résistance à ces médicaments entrent dans le résistome microbien. La présente étude a montré empiriquement que le processus d'augmentation des ARG dans les populations bactériennes associé à la salmoniculture est présent dans la baie de Fundy, bien que l'échelle à laquelle cela se produit sur une base spatiale et temporelle et les répercussions sur l'approvisionnement alimentaire provenant de l'industrie soient encore inconnues. Pour l'ensemble du secteur de l'aquaculture, il convient de s'efforcer de réduire l'utilisation d'antibiotiques dans la mesure du possible par l'intermédiaire d'une série de stratégies de rechange. Cela se produit déjà à l'échelle de l'industrie et de la gestion gouvernementale au Canada et à l'étranger. Comme il a été décrit plus haut, cet objectif a été atteint dans certaines régions à la suite d'une législation contre l'utilisation d'antibiotiques à des fins non thérapeutiques et à des efforts de vaccination (la Norvège en est un bon exemple). Des tentatives fructueuses ont également été menées à l'échelle expérimentale pour réduire l'utilisation des antibactériens en mettant en œuvre la phagothérapie, les inhibiteurs de détection du quorum, les probiotiques, les immunostimulants et les médicaments à base de plantes. À l'avenir, il conviendra d'approfondir les recherches visant à évaluer les échelles temporelles et spatiales de la résistance microbienne aux antibiotiques dans les piscicultures aquacoles, dans le milieu environnant ainsi que dans l'approvisionnement alimentaire provenant de l'industrie et des espèces commerciales sauvages qui sont associées à des sources ponctuelles d'apport d'antibiotiques dans l'environnement par des activités anthropiques. Cet objectif s'inscrit dans le cadre de l'initiative « Une seule santé », qui consiste à mettre en œuvre des pratiques/traitements non antibiotiques pour lutter contre les maladies bactériennes pour ralentir la transmission des gènes de résistance aux antibiotiques aux agents pathogènes humains par le traitement des maladies dans les organismes produits. Une fois que l'on aura acquis une meilleure compréhension de ces aspects, il sera possible de procéder à une évaluation correcte des risques liés aux activités aquacoles pour répondre à des questions comme : les régimes de traitement appropriés, les incidences probables sur l'environnement, les implications du choix du site et le risque global pour la santé humaine.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Aedo, S., Ivanova, L., Tomova, A., and Cabello, F.C. 2014. Plasmid-related quinolone resistance determinants in epidemic *Vibrio parahaemolyticus*, uropathogenic *Escherichia coli*, and marine bacteria from an aquaculture area in Chile. *Microbial Ecology* 68(2): 324-328.
- Alonso, A., Sanchez, P., and Martinez, J.L. 2001. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 3(1): 7901-7911.
- Bachrach, G., Zlotkin, A., Hurvitz, A., Evans, D.L., and Eldar, A. 2001. Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a streptococcus vaccine. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(8): 3756-3758.
- Baker, M., Hobman, J.L., Dodd, C.E.R., Ramsden, S.J., and Stekel, D.J. 2016. Mathematical modelling of antimicrobial resistance in agricultural waste highlights importance of gene transfer rate. *FEMS Microbiology Ecology* 92(4): doi: 10.1093/femsec/fiw1040.
- Baiano, J.C., and Barnes, A.C. 2009. Towards control of *Streptococcus iniae*. *Emerg. Infect. Dis.* 15(12): 1891-1896.
- Bennett, P.M. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* 153 Suppl 1: S347-357.
- Bissett, A., Bowman, J., and Burke, C. 2006. Bacterial diversity in organically-enriched fish farm sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 55(1): 48-56.
- Bissett, A., Burke, C., Cook, P.L.M., and Bowman, J.P. 2007. Bacterial community shifts in organically perturbed sediments. *Environmental Microbiology* 9(1): 46-60.
- Bissett, A., Bowman, J.P., and Burke, C.M. 2008. Flavobacterial response to organic pollution. *Aquatic Microbial Ecology* 51(1): 31-43.
- Björklund, H., Bondestam, J., and Bylund, G. 1990. Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. *Aquaculture* 86(4): 359-367.
- Bôto, M., Almeida, C.M.R., and Mucha, A.P. 2016. Potential of constructed wetlands for removal of antibiotics from saline aquaculture effluents. *Water* 8 465: doi:10.3390/w8100465.
- Bouchard, D.A., Brockway, K., Giray, C., Keleher, W., and Merrill, P.L. 2001. First report of Infectious Salmon Anaemia (ISA) in the United States. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 21(2): 3.
- Brudeseth, B.E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B.N., Lindmo, K., Løkling, K.E., Bordevik, M., Steine, N., Klevan, A., and Gravningen, K. 2013. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish and Shellfish Immunology* 35(6): 1759-1768.
- Bullock, G. 1977. *Vibriosis in Fish*. US Fish and Wildlife Service. Fish Disease Leaflet 50. April 1977. 125: 12 p.
- Burrells, C., Williams, P., Southgate, P., and Wadsworth, S. 2001. Dietary nucleotides: A novel supplement in fish feeds. *Aquaculture* 199(1-2): 159-169.
- Burridge, L., Weis, J.S., Cabello, F., Pizarro, J., and Bostick, K. 2010. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* 306(1-4): 7-23.
- Buschmann, A.H., Tomova, A., López, A., Maldonado, M.A., Henríquez, L.A., Ivanova, L., Moy, F., Godfrey, H.P., and Cabello, F.C. 2012a. Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. *PLOS ONE* 7(8): e42724.

-
- Cabello, F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* 8(7): 1137-1144.
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., and Buschmann, A.H. 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology* 15(7): 1917-1942.
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Buschmann, A.H., and Dölz, H.J. 2016. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases* 16(7): e127-e133.
- Cao, H., He, S., Wei, R., Diong, M., and Lu, L. 2011. *Bacillus amyloliquefaciens* G1: A potential antagonistic bacterium against eel-pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2011: 824104.
- Capkin, E., Ozdemir, S., Ozturk, R.C., and Altinok, I. 2017. Determination and transferability of plasmid-mediated antibiotic resistance genes of the bacteria isolated from rainbow trout. *Aquaculture Research* 48(11): 5561-5575.
- Capone, D.G., Weston, D.P., Miller, V., and Shoemaker, C. 1996. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture* 145(1-4), 55-75.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., and Knight, R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 4516-4522.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G., and Knight, R. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *Isme Journal* 6(8): 1621-1624.
- Centre for Coastal Health 2016. [Antimicrobial Resistance Report: Animal Health](#). BC Ministry of Agriculture.
- Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., and Angeles Esteban, M. 2009. Effects of dietary vitamin D3 administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 26(2): 243-248.
- Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N., and Murugan, V. 2006. Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. *Fish Shellfish. Immunol.* 21(4): 372-384.
- Čížek, A., Dolejská, M., Sochorová, R., Strachotová, K., Piačková, V., and Veselý, T. 2010. Antimicrobial resistance and its genetic determinants in aeromonads isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Microbiology* 142(3-4): 435-439.
- Council of Canadian Academies. 2019. *When Antibiotics Fail*. Ottawa (ON): The Expert Panel on the Potential Socio-Economic Impacts of Antimicrobial Resistance in Canada, Council of Canadian Academies. ISBN: 978-1-926522-75-3: 268 p.
- D'Abramo, L.R. 2018. Fulfilling the potential of probiotics, prebiotics, and enzymes as feed additives for aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 49(3): 444-446.

-
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V.N., Hoseinifar, S.H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C., and Joshi, S.K. 2017. Advances in aquaculture vaccines against fish pathogens: Global status and current trends. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture* 25(3): 184-217.
- Dean, R.J., Shimmield, T.M., and Black, K.D. 2007. Copper, zinc and cadmium in marine cage fish farm sediments: An extensive survey. *Environmental Pollution* 145(1): 84-95.
- DePaola, A., Peeler, J.T., and Rodrick, G.E. 1995. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds. *Applied and Environmental Microbiology* 61(6): 2335-2340.
- Di Cesare, A., Luna, G.M., Vignaroli, C., Pasquaroli, S., Tota, S., Paroncini, P., and Biavasco, F. 2013. Aquaculture can promote the presence and spread of antibiotic-resistant *Enterococci* in marine sediments. *PLoS ONE* 8(4):e62838.
- Divyagnaneswari, M., Christyapita, D., and Michael, R.D. 2007. Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* leaf fractions. *Fish Shellfish. Immunol.* 23(2): 249-259.
- Dorucu, M., Ispir, U., Colak, S., Altinterim, B., and Celayir, Y. 2009. The effect of black cumin seeds, *Nigella sativa*, on the immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mediterranean Aquaculture Journal* 2(1): 27-33.
- Drexler, M. 2010. [How infection works](#). In *What You Need To Know About Infectious Disease*. National Academies Press, Washington DC, USA.
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., and Ross, R.P. 2018. The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology* 9: doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873
- Erkinharju, T., Dalmo, R.A., Hansen, M., and Seternes, T. 2020. Cleaner fish in aquaculture: review on diseases and vaccination. *Reviews in Aquaculture*. Doi: 10.1111/raq.12470
- Falk, K., Namork, E., Rimstad, E., Mjaaland, S., and Dannevig, B.H. 1997. Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Virology* 71(12): 9016-9023.
- FAO. 2016. [The State of World Fisheries and Aquaculture. 2016. Contributing to food security and nutrition for all.](#): 200 p.
- FAO. 2018a. [Global capture production 1950-2016](#). In *FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. FishstatJ, Rome.*
- FAO. 2018b. [The State of World Fisheries and Aquaculture 2018](#) - Meeting the sustainable development goals. *The State of the World, Rome.*
- FAO. 2018c. [Global aquaculture production 1950-2016](#). In *FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. FishstatJ, Rome.*
- Finch, R., and Hunter, P.A. 2006. Antibiotic resistance--action to promote new technologies: report of an EU Intergovernmental Conference held in Birmingham, UK, 12-13 December 2005. *J. Antimicrob. Chemother.* 58 Suppl 1: i3-i22.
- Furones, M.D., Rodgers, C.J., and Munn, C.B. 1993. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual Review of Fish Diseases*: 20: 105-125.

-
- Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Torii, K., Hasegawa, T. and Ohta, M. 2003. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9): 5336-5342.
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., and Zhu, Y.-G. 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal* 9(6): 1269-1279.
- Grass, G., Rensing, C., and Solioz, M. 2011. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Applied and environmental microbiology* 77(5): 1541-1547.
- Gudmundsdottir, B., and Gudmundsdottir, S. 1997. Evaluation of cross protection by vaccines against atypical and typical furunculosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 20(1): 343-350.
- Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., and Enes, P. 2017. Prebiotics as functional ingredients: Focus on Mediterranean fish aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. 10: 800-832.
- Hamady, M., and Knight, R. 2009. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Research* 19(7): 1141-1152.
- Han, Q.F., Zhao, S., Zhang, X.R., Wang, X.L., Song, C., and Wang, S.G. 2020. Distribution, combined pollution and risk assessment of antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding the Yellow Sea, North China. *Environment International* 138. Doi: 10.1016/j.envint.2020.105551.
- Han, Y., Wang, J., Zhao, Z., Chen, J., Lu, H., and Liu, G. 2018. Combined impact of fishmeal and tetracycline on resistomes in mariculture sediment. *Environmental Pollution* 242: 1711-1719.
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C., and Secombes, C.J. 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 95: 201-214.
- Hawkey, P.M. and Jones A.M. 2009. The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64(suppl_1): i3-i10.
- Heuer, O.E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., and Angulo, F.J. 2009. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin. Infect. Dis.* 49(8): 1248-1253.
- HHS. 2017. [Vaccine basics](#). Vaccine Types U.S Department of Health and Human Services [accessed July 23 2018].
- Hjeltnes, B., Borno, G., Jansen, M.D., Haukass, A., and Waldes, C.E. 2017. The health situation in Norwegian aquaculture, 2016. Norwegian Veterinary Institute.
- Helman, Y., and Chernin, L. 2015. Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. *Molecular Plant Pathology* 16(3): 316-329.
- Hoseinifar, S.H., Esteban, M.Á., Cuesta, A., and Sun, Y.-Z. 2015. Prebiotics and fish immune response: A review of current knowledge and future perspectives. *Reviews in Fisheries Science Aquaculture* 23(4): 315-328.
- Huang, J., Wu, Y., and Chi, S. 2014. Dietary supplementation of *Pediococcus pentosaceus* enhances innate immunity, physiological health and resistance to *Vibrio anguillarum* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish Shellfish Immunology* 39(1): 196-205.

-
- Isnansetyo, A., Istiqomah, I., Muhtadi, Sinansari, S., Hernawan, R.K., Triyanto, and Widada, J. 2009. A potential bacterial biocontrol agent, strain S2V2 against pathogenic marine *Vibrio* in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(6): 1103-1113.
- Jang, H.M., Kim, Y.B., Choi, S., Lee, Y., Shin, S.G., Unno, T., and Kim, Y.M. 2018. Prevalence of antibiotic resistance genes from effluent of coastal aquaculture, South Korea. *Environmental Pollution* 233: 1049-1057.
- Jechalke, S., Schreiter, S., Wolters, B., Dealtry, S., Heuer, H., and Smalla, K. 2013. Widespread dissemination of class 1 integron components in soils and related ecosystems as revealed by cultivation-independent analysis. *Frontiers in Microbiology* 4(JAN). doi: 10.3389/fmicb.2013.00420.
- Jung, J., Jee, S.C., Sung, J.S., and Park, W. 2016. High concentration of red clay as an alternative for antibiotics in aquaculture. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26(1): 130-138.
- Kapczynski, D.R., Pantin-Jackwood, M.J., Spackman, E., Chrzastek, K., Suarez, D.L., and Swayne, D.E. 2017. Homologous and heterologous antigenic matched vaccines containing different H5 hemagglutinins provide variable protection of chickens from the 2014 U.S. H5N8 and H5N2 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza viruses. *Vaccine* 35(46): 6345-6353.
- Karakassis, I., Tsapakis, M., Hatziyanni, E., Papadopoulou, K.N., and Plaiti, W. 2000. Impact of cage farming of fish on the seabed in three Mediterranean coastal areas. *ICES Journal of Marine Science* 57(5): 1462-1471.
- Kayansamruaj, P., Dong, H.T., Pirarat, N., Nilubol, D., and Rodkhum, C. 2017. Efficacy of α -enolase-based DNA vaccine against pathogenic *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 468: 102-106.
- Keeley, N., Wood, S.A., and Pochon, X. 2018. Development and preliminary validation of a multi-trophic metabarcoding biotic index for monitoring benthic organic enrichment. *Ecological Indicators* 85: 1044-1057.
- Keeley, N., Valdemarsen, T., Strohmeier, T., Pochon, X., Dahlgren, T., and Bannister, R. 2020. Mixed-habitat assimilation of organic waste in coastal environments - It's all about synergy! *Science of the Total Environment* 699: 1044-1057.
- Khairnar, K., Raut, M.P., Chandekar, R.H., Sanmukh, S.G., and Paunekar, W.N. 2013. Novel bacteriophage therapy for controlling metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* infection in catfish. *BMC Veterinary Research* 9: doi: 10.1186/1746-6148-9-264.
- Kidwell, M.G. 2001. Horizontal Transfer. *In Encyclopedia of Genetics. Edited by S. Brenner and J.H. Miller. Academic Press, New York. pp. 973-975.*
- Kim, D., Beck, B.R., Heo, S.B., Kim, J., Kim, H.D., Lee, S.M., Kim, Y., Oh, S.Y., Lee, K., Do, H., Lee, K., Holzapfel, W.H., and Song, S.K. 2013. *Lactococcus lactis* BFE920 activates the innate immune system of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), resulting in protection against *Streptococcus iniae* infection and enhancing feed efficiency and weight gain in large-scale field studies. *Fish Shellfish Immunol.* 35(5): 1585-1590.
- Klesius, P.H., Shoemaker, C., and Evans, J. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 188(3-4): 237-246.
-

-
- Koch, G., Nadal-Jimenez, P., Reis, C.R., Muntendam, R., Bokhove, M., Melillo, E., Dijkstra, B.W., Cool, R.H., and Quax, W.J. 2014. Reducing virulence of the human pathogen *Burkholderia* by altering the substrate specificity of the quorum-quenching acylase PvdQ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(4): 1568-1573.
- Korkea-aho, T.L., Heikkinen, J., Thompson, K.D., von Wright, A., and Austin, B. 2011. *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Appl. Microbiol.* 111(2): 266-277.
- Korkea-aho, T.L., Papadopoulou, A., Heikkinen, J., von Wright, A., Adams, A., Austin, B., and Thompson, K.D. 2012. *Pseudomonas* M162 confers protection against rainbow trout fry syndrome by stimulating immunity. *J. Appl. Microbiol.* 113(1): 24-35.
- Kraemer, S.A., Ramachandran, A., and Perron, G.G. 2019. Antibiotic pollution in the environment: from microbial ecology to public policy. *Microorganisms* 7(6), 180. doi: 10.3390/microorganisms7060180.
- Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., and El-Matbouli, M. 2015. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research* 46(1): doi: 10.1186/s13567-015-0238-4.
- Kumar, V., and Roy, S. 2017. Aquaculture drugs: Sources, active ingredients, pharmaceutical preparations and methods of administration. *Journal of Aquaculture Research & Development* 08(09). doi: 10.4172/2155-9546.1000510.
- Kummerer, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere* 75(4): 417-434.
- Kutter, E., and Sulakvelidze, A. 2004. *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press.
- Kwon, A.S., Kang, B.J., Jun, S.Y., Yoon, S.J., Lee, J.H., and Kang, S.H. 2017. Evaluating the effectiveness of *Streptococcus parauberis* bacteriophage Str-PAP-1 as an environmentally friendly alternative to antibiotics for aquaculture. *Aquaculture* 468: 464-470.
- Liu, S.G., Luo, Y.R., and Huang, L.F. 2016. Dynamics of size-fractionated bacterial communities during the coastal dispersal of treated municipal effluents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(13): 5839-5848.
- Liu, Z.Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F.D., and Knight, R. 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research* 35(18): doi:10.1093/nar/gkm541.
- Lo, D.Y., Lee, Y.J., Wang, J.H., and Kuo, H.C. 2014. Antimicrobial susceptibility and genetic characterisation of oxytetracycline-resistant *Edwardsiella tarda* isolated from diseased eels. *The Veterinary Record* 175(8): doi: 10.1136/vr.101580.
- Logambal, S.M., Venkatalakshmi, S., and Dinakaran Michael, R. 2000. Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. in *Oreochromis mossambicus*. *Hydrobiologia* 430:113-120.
- Low, D.E., Liu, E., Fuller, J., and McGeer, A. 1999. *Streptococcus iniae*: an emerging pathogen in the aquaculture industry. In *Emerging Infections. Edited by W.M. Scheld, W.A. Craig, D. Armstrong and J.M. Hughes*. ASM Press, Washington, D.C. pp. 53-65.
- Lozano, I., Díaz, N.F., Muñoz, S., and Riquelme, C. 2018. [Antibiotics in Chilean aquaculture: A review](#). In *Antibiotic Use in Animals*.
-

-
- Lu, L.H., Liu, J., Li, Z., Zou, X., Guo, J.S., Liu, Z.P., Yang, J.X., and Zhou, Y.Y. 2020. Antibiotic resistance gene abundances associated with heavy metals and antibiotics in the sediments of Changshou Lake in the three Gorges Reservoir area, China. *Ecological Indicators* 113. Doi: 10.1016/j.ecolind.2020.106275.
- Lulijwa, R., Rupia, E.J., and Alfaro, A.C. 2020. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture* 12(2): 640-663. doi: 10.1111/raq.12344.
- Lunder, T., Evensen, Ø., Holstad, G., and Hastein, T. 1995. Winter ulcer' in the Atlantic salmon *Salmo salar*. Pathological and bacteriological investigations and transmission experiments. *Diseases of Aquatic Organisms* 23(1): 39-49.
- Madhusudana Rao, B., and Lalitha, K.V. 2015. Bacteriophages for aquaculture: Are they beneficial or inimical. *Aquaculture* 437: 146-154.
- Mahdhi, A. 2012. Probiotic properties of *Brevibacillus brevis* and its influence on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval rearing. *African Journal of Microbiology Research* 6: 6487-6495.
- Midtlyng, P.J., Grave, K., and Horsberg, T.E. 2011. What has been done to minimize the use of antibacterial and antiparasitic drugs in Norwegian aquaculture? *Aquaculture Research* 42(SUPPL. 1): 28-34.
- Miranda, C.D., and Zemelman, R. 2001. Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepción Bay, Chile. *Marine Pollution Bulletin* 42(11): 1096-1102.
- Miranda, C.D., and Zemelman, R. 2002. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture* 212(1-4): 31-47.
- Miranda, C.D., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S., and Roberts, M.C. 2003. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(3): 883-888.
- Miranda, C.D., Godoy, F.A., and Lee, M.R. 2018. Current status of the use of antibiotics and the antimicrobial resistance in the Chilean salmon farms. *Frontiers in Microbiology* 9(JUN). doi: 10.3389/fmicb.2018.01284.
- Mo, W.Y., Chen, Z., Leung, H.M., and Leung, A.O. 2017. Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24(10): 8978-8989.
- Muziasari, W.I., Managaki, S., Parnanen, K., Karkman, A., Lyra, C., Tamminen, M., Suzuki, S., and Virta, M. 2014. Sulphonamide and trimethoprim resistance genes persist in sediments at Baltic Sea aquaculture farms but are not detected in the surrounding environment. *PLoS One* 9(3): e92702.
- Ndi, O.L., and Barton, M.D. 2011. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *Journal of Fish Diseases* 34(8): 589-599.
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A.A., Mutani, A., Ramsabhag, A., Brunt, J., and Austin, B. 2007. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J. Appl. Microbiol.* 103(5): 1699-1706.
- Newaj-Fyzul, A., and Austin, B. 2015. Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *J. Fish. Dis.* 38(11): 937-955.
-

-
- NIAIDS 2012. [How Do Vaccines Work? National Institute of Allergies and Infectious Diseases](#). National Institute of Health.
- Ng, C., Chen, H., Goh, S.G., Haller, L., Wu, Z., Charles, F.R., Trottet, A., and Gin, K. 2018. Microbial water quality and the detection of multidrug resistant *E. coli* and antibiotic resistance genes in aquaculture sites of Singapore. *Marine Pollution Bulletin* 135: 475-480.
- Norwegian Veterinary Institute. 2016a. Use of Antibiotics in Norwegian Aquaculture. The Norwegian Veterinary Institute, Oslo. Report 22-2016. 12 p.
- Nya, E.J., and Austin, B. 2009a. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 32(11): 971-977.
- Nya, E.J., and Austin, B. 2009b. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish. Dis.* 32(11): 963-970.
- Oliveira, J., Castilho, F., Cunha, A., and Pereira, M.J. 2012. Bacteriophage therapy as a bacterial control strategy in aquaculture. *Aquaculture International* 20(5): 879-910.
- Olsen, O. 2005. [Fish Farming 2004](#). Official Statistics of Norway. ISBN 82-537-7049-9.
- Pan, C.-Y., Wang, Y.-D., and Chen, J.-Y. 2012. Immunomodulatory effects of dietary *Bacillus coagulans* in grouper (*Epinephelus coioides*) and zebrafish (*Danio rerio*) infected with *Vibrio vulnificus*. *Aquaculture International* 21(5): 1155-1168.
- Poirel, L., Cattoir, V., and Nordmann, P. 2012. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Frontiers in Microbiology* 3: doi: 10.3389/fmicb.2012.00024.
- Public Health Institute 2015. 2014: [The consumption of salmon lice is high and continues to increase](#) [accessed 07/24 2018].
- Punitha, S.M.J., Babu, M.M., Sivaram, V., Shankar, V.S., Dhas, S.A., Mahesh, T.C., Immanuel, G., and Citarasu, T. 2008. Immunostimulating influence of herbal biomedicines on nonspecific immunity in Grouper *Epinephelus tauvina* juvenile against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture International* 16(6): 511-523.
- Randrianarivelo, R., Danthu, P., Benoit, C., Ruez, P., Raherimandimby, M., and Sarter, S. 2010. Novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery: effects of the essential oil of *Cinnamosma fragrans* on survival and bacterial concentration of *Penaeus monodon* larvae. *J. Appl. Microbiol.* 109(2): 642-650.
- Rasul, G., Majumdar, B.C., and Akter, T. 2017. Aqua-chemicals and antibiotics Used in reshwater aquaculture of Sylhet, Bangladesh. *Journal of Agricultural Science and Engineering* 3(2): 20-26.
- Rattanachaikunsopon, P., and Phumkhachorn, P. 2010. Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fisheries Science* 76(2): 287-293.
- Remy, B., Mion, S., Plener, L., Elias, M., Chabriere, E., and Daude, D. 2018. Interference in bacterial quorum sensing: a biopharmaceutical perspective. *Frontiers in Pharmacology* 9: doi: 10.3389/fphar.2018.00203.
- Rico, A., Jacobs, R., Van den Brink, P.J., and Tello, A. 2017. A probabilistic approach to assess antibiotic resistance development risks in environmental compartments and its application to an intensive aquaculture production scenario. *Environ. Pollut.* 231(Pt 1): 918-928.
-

-
- Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J.L.G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Å., Olsen, R.E., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Owen, M., Lauzon, H.L., Martinsen, L.L., De Schryver, P., Bossier, P., Sperstad, S., and Merrifield, D.L. 2016. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition* 22(2): 219-282.
- Roberts, R.J., and Pearson, M.D. 2005. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 28: 383-390.
- Romero, J., Gloria, C., and Navarrete, P. 2012. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. *In Health and Environment in Aquaculture*. doi: 10.5772/28157.
- Rozas, M., and Enriquez, R. 2014. Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *J Fish Dis.* 37(3): 163-188.
- Ruane, N.M., and Jones, S.R.M. 2013. Amoebic gill disease of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish 60: 6 p.
- Sáenz, J.S., Marques, T.V., Barone, R.S.C., Cyrino, J.E.P., Kublik, S., Nesme, J., Schloter, M., Rath, S., and Vestergaard, G. 2019. [Oral administration of antibiotics increased the potential mobility of bacterial resistance genes in the gut of the fish *Piaractus mesopotamicus*](#). *Microbiome* 7(1).
- Samuelsen, O.B., Torsvik, V., and Ervik, A. 1992. Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *The Science of the Total Environment* 114: 25-36.
- Sciencing. 2017. [What is Red Clay?](#)
- Seiler, C., and Berendonk, T.U. 2012. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front Microbiol* 3: doi: 10.3389/fmicb.2012.00399 .
- Serrano, P.H. 2005. Rome - Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 469: 97 p.
- Sharker, R., Sumi, K.R., Ferdous, Z., and Ali, M.M. 2014. Drugs and chemicals used in aquaculture activities for fish health management in the coastal region of Bangladesh. *International Journal of Life Sciences Biology and Pharma Research* 3(4): ISSN 2250-3137.
- Sihag, R.C., and Sharma, P. 2012. Probiotics: The new eco-friendly alternative to antibiotics in aquaculture. *Fisheries and Aquatic Science* 7(2): 72-103.
- Skold, O. 2000. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates* 3(3): 155-160.
- Sorroza, L., Real, F., Acosta, F., Acosta, B., Deniz, S., Roman, L., El Aamri, F., and Padilla, D. 2013. A probiotic potential of *Enterococcus gallinarum* against *Vibrio anguillarum* infection. *Fish Pathology* 48(1): 9-12.
- Stoeck, T., Frühe, L., Forster, D., Cordier, T., Martins, C.I.M., and Pawlowski, J. 2018. Environmental DNA metabarcoding of benthic bacterial communities indicates the benthic footprint of salmon aquaculture. *Marine Pollution Bulletin* 127: 139-149.
- Su, H., Liu, S., Hu, X., Xu, X., Xu, W., Xu, Y., Li, Z., Wen, G., Liu, Y., and Cao, Y. 2017. Occurrence and temporal variation of antibiotic resistance genes (ARGs) in shrimp aquaculture: ARGs dissemination from farming source to reared organisms. *Science of The Total Environment* 607-608: 357-366.
-

-
- Tamminen, M., Karkman, A., Lõhmus, A., Muziasari, W.I., Takasu, H., Wada, S., Suzuki, S., and Virta, M. 2011a. Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure. *Environmental Science and Technology* 45(2): 386-391.
- Thiyagarajan, V., Tsoi, M.M.Y., Zhang, W., and Qian, P.Y. 2010. Temporal variation of coastal surface sediment bacterial communities along an environmental pollution gradient. *Marine Environmental Research* 70(1): 56-64.
- Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., Rajagunalan, S., and Singh, S.V. 2013. Antibiotic resistance - An emerging health problem: Causes, worries, challenges and solutions –A review. *International Journal of Current Research* 5: 1880-1892.
- Tomova, A., Ivanova, L., Buschmann, A.H., Rioseco, M.L., Kalsi, R.K., Godfrey, H.P., and Cabello, F.C. 2015. Antimicrobial resistance genes in marine bacteria and human uropathogenic *Escherichia coli* from a region of intensive aquaculture. *Environmental Microbiology Reports* 7(5): 803-809.
- Topp, E., Larsson, D.G.J., Miller, D.N., Van den Eede, C., and Virta, M.P.J. 2018. Antimicrobial resistance and the environment: assessment of advances, gaps and recommendations for agriculture, aquaculture and pharmaceutical manufacturing. *Fems Microbiology Ecology* 94(3): fix185.
- UN. 2017. [Latest data sources used to derive estimates for total population, fertility, mortality and migration by countries or areas in *In World Population Prospects*](#). Edited by U. Nations.
- van Reenen, C.A., and Dicks, L.M. 2011. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Arch. Microbiol.* 193(3): 157-168.
- Vaseeharan, B., and Thaya, R. 2013. Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture International* 22(3): 1079-1091.
- Vester, B., and Garrett, R.A. 1987. Une mutation codée par un plasmide et dirigée vers un site dans l'ARN 23S d'*Escherichia coli* confère une résistance à l'érythromycine: implications dans le mécanisme d'action de l'érythromycine. *Biochimie* 69(8):891-900.
- Vinod, M.G., Shivu, M.M., Umesha, K.R., Rajeeva, B.C., Krohne, G., Karunasagar, I., and Karunasagar, I. 2006. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture* 255: 117-124.
- Wang, H.P., Yan, H., Zhao, J.R., and Shi, L. 2017a. Quantitative detection of six classes of antibiotic resistance and class I Integron genes in aquatic products. *Modern Food Science and Technology* 33(5): 270-276.
- Wang, Y., Barton, M., Elliott, L., Li, X., Abraham, S., O'Dea, M., and Munro, J. 2017b. Bacteriophage therapy for the control of *Vibrio harveyi* in greenlip abalone (*Haliotis laevis*). *Aquaculture* 473: 251-258.
- Watts, J.E.M., Schreier, H.J., Lanska, L., and Hale, M.S. 2017. The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: Sources, sinks and solutions. *Marine Drugs* 15(6). doi:110.3390/md15060158.
- Webb, H., Angulo, F., Granier, S., Scott, H., and Loneragan, G. 2017. Illustrative examples of probable transfer of resistance determinants from food animals to humans: Streptothricins, glycopeptides, and colistin. *F1000Research* 6(1805): doi: 10.12688/f1000research.12777.12681.
-

-
- Weinstein, M.R., Litt, M., Kertesz, D.A., Wyper, P., Rose, D., Coulter, M., McGeer, A., Facklam, R., Ostach, C., Willey, B.M., Borczyk, A., and Low, D.E. 1997. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *New England Journal of Medicine* 337(9): 589-594.
- Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(3):577-585.
- Wen, Y.P., Pu, X.Y., Zheng, W., and Hu, G. 2016. High prevalence of plasmid mediated quinolone resistance and incq plasmids carrying qnrS 2 gene in bacteria from rivers near hospitals and aquaculture in China. *Plos One* 11(7): e0159418.
- Yasuyuki, M., Kunihiro, K., Kurissery, S., Kanavillil, N., Sato, Y., and Kikuchi, Y. 2010. Antibacterial properties of nine pure metals: a laboratory study using *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biofouling* 26(7): 851-858.
- Yu, S., Wang, M., and Hong, Y. 2011. Antibiotics in environmental matrices and their effects on microbial ecosystems. *Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica* 31(15): 4437-4446.
- Zhao, J.L., Liu, Y.S., Liu, W.R., Jiang, Y.X., Su, H.C., Zhang, Q.Q., Chen, X.W., Yang, Y.Y., Chen, J., Liu, S.S., Pan, C.G., Huang, G.Y., and Ying, G.G. 2015. Tissue-specific bioaccumulation of human and veterinary antibiotics in bile, plasma, liver and muscle tissues of wild fish from a highly urbanized region. *Environ. Pollut.* 198: 15-24.
- Zhao, J., Li, X.Y., Hou, X.Y., Quan, C.S., and Chen, M. 2019. Widespread existence of quorum sensing inhibitors in marine bacteria: potential drugs to combat pathogens with novel strategies. *Marine Drugs* 17(5): doi 10.3390/md17050275.
- Zhou, S., Zhang, A., Yin, H., and Chu, W. 2016. *Bacillus* sp. QSI-1 modulate quorum sensing signals reduce *Aeromonas hydrophila* level and alter gut microbial community structure in fish. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6: doi: 10.3389/fcimb.2016.00184.
- Zhao, Z., Wang, J., Han, Y., Chen, J., Liu, G., Lu, H., Yan, B., and Chen, S. 2017. Nutrients, heavy metals and microbial communities co-driven distribution of antibiotic resistance genes in adjacent environment of mariculture. *Environmental Pollution* 220: 909-918.