

THESE DE DOCTORAT DE

ONIRIS

ÉCOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale : *Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*

Spécialité : *Microbiologie, virologie et parasitologie*

Par

Nicolas HELSENS

Caractérisation des communautés bactériennes et des profils de résistance aux antibiotiques dans le filet de truite arc-en-ciel

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 05 Novembre 2020

Unités de recherche : UMR INRAE 1014 Secalim, Oniris, Nantes
UMR INRAE 1300 Bioepar, Oniris, Nantes

Rapporteurs avant soutenance :

Sophie PAYOT-LACROIX
Nathalie WERY

Directrice de Recherche, INRAE, Nancy, France
Directrice de Recherche, INRAE, Narbonne, France

Composition du Jury :

Président :
Olivier GROVEL

Professeur, Université de Nantes, France

Examineurs :
Sébastien LECLERCQ

Chargé de Recherche, INRAE, Nouzilly, France

Directrice de thèse :
Catherine MAGRAS

Professeure, Oniris, Nantes

Co-encadrants de thèse :
Ségolène CALVEZ
Hervé PRÉVOST

Maître de conférences, Oniris, Nantes
Professeur, Oniris, Nantes

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord Mme Nathalie WERY et Mme Sophie PAYOT-LACROIX d'avoir accepté d'être rapportrices de cette thèse. Merci également à Mr Sébastien LECLERCQ et Mr Olivier GROVEL d'être examinateurs de mon travail de thèse.

Merci au RFI « Food for Tomorrow » et à la Région Pays de Loire d'avoir financé ce projet. Merci aux différents acteurs de la filière truite pour leur participation dans la réalisation de ce projet.

Merci à Marie-France PILET et Christine FOURICHON de m'avoir accueilli et de m'avoir aidé à m'intégrer à la vie de leurs unités respectives.

Merci à Michel LE HENAFF, Sylvie BAUCHERON, François MEURENS et Monique ZAGOREC d'avoir accepté de faire partie de mon Comité de Suivi Individuel, pour vos conseils précieux et vos bonnes idées tout le long de ce travail, merci également de m'avoir recadré et remotivé lorsque c'était nécessaire. Merci tout particulièrement à Monique pour ces discussions et ce gros coup de main surtout dans la dernière ligne droite.

Merci à Catherine MAGRAS d'avoir dirigé cette thèse. Merci de m'avoir fait réfléchir et de m'avoir appris à réfléchir, de m'avoir encadré, cadré et recadré. Merci d'avoir répété les choses, parfois les mêmes pendant 3 ans, de me pousser à me poser les bonnes questions et de m'aider à prendre du recul sur mon travail. Merci à Ségolène CALVEZ d'avoir encadré ces travaux, merci pour tes conseils, tes discussions, tes remarques toujours pertinentes, merci de m'avoir bougé et parfois d'avoir été stressée à ma place quand il le fallait. Merci aussi de m'avoir réappris à conduire (j'ai réessayé depuis, pas plus probant...). Merci à Hervé PRÉVOST pour ton encadrement, pour ta passion, pour tes idées et tes remarques, tes discussions intéressantes et tes connaissances que tu es toujours prompt à partager.

Merci à Agnès BOUJU-ALBERT et Albert ROSSERO pour leur appui technique inestimable pendant cette thèse, pour leur aide et leurs conseils, pour avoir supporté mes protocoles incomplets, mes informations contradictoires et besoins de dernière minute. Je n'aurais pas pu faire autant de chose, et pas aussi bien, sans vous.

Merci à toute l'équipe de Secalim d'avoir rendu les journées agréables, pour les discussions et les pauses qui font du bien, les bons moments, parfois les moments difficiles. Je suis fier d'avoir fait partie du quotidien de cette unité et reconnaissant d'avoir croisé votre route.

Thank you Gladys, you were my first experience as a supervisor and you made it as easy and interesting as possible. Thank you for your hard work, for coping with me, for our discussions. I wish you the best.

Merci à Dominique HURTAUD-PESSEL et à l'unité Analyse des Résidus et Contaminants du laboratoire de Fougères de l'Anses d'avoir été partenaires de ce projet. Merci également à Romain CAUSSE-VEDRINES et Sophie MICHON-COUDOUEL pour leur aide pour la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques et l'analyse des résultats.

Merci à Anne GOUGEON-JOLIVET et Odile SERGENT pour leur aide et leurs conseils depuis mes premiers pas dans le monde de la recherche, j'espère avoir répondu à vos attentes et j'espère que nos chemins se croiseront à nouveau.

Merci à Graziella MIDELET et Arnaud BRIET pour ce stage passé à Boulogne-sur-Mer qui est un peu le début de tout ce qui suit. Merci également à toute l'équipe du Laboratoire des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture. Big up particulier à Thomas et Alexandre.


Merci à ma famille, mes parents pour leur soutien et leurs encouragements inextinguibles (c'est pas faux), pour les blagues de qualité et pour l'esprit que j'ai ouvert grâce à vous. Merci à mon frère pour pareil mais en Lego, merci à mes oncles, tantes et cousin-e-s d'être la meilleure famille. A mes grand-parents, je veux dire merci pour tout.

Merci à la team Pouik-Pouik, Benjamin, Du, Georges, Aurélien, Norman, Alizée, Morgane, et Juliana, merci à Pauline, à Raouf et à Vincent et Nassima pour la vie au G5 et les coudes toujours serrés. Merci à la team des docs Bioepar, Mathilde, Hélène, Georges (encore), Niki, Romain, Caroline, Vianney, Marie et Adèle pour les repas des docs et les discussions où on peut tous se plaindre en chœur.

Merci particulier à Erwann pour sa douceur. Merci à Nico pour plein de trucs mais surtout pour nos discussions, ça va être difficile de trouver quelqu'un avec qui parler (de sport, de tout et de la vie) aussi bien qu'avec toi.

Merci aux copains de pharma, Arthur (<3), Yanna, Cécile, Pauline et Margot, Marion, Isabelle, Guillaume et Matthieu, ça fait 8 ans et c'est toujours cool. Merci d'être timbrés.

Merci à Julien (<3), Maxime, Simon, Céline, Marion, Rozenn, Gautier et tous les autres que j'oublie, de faire partie des meilleurs amis du monde, et pour les verres et les blagues et tout le reste.

 Merci Justine d'être là, de me trouver drôle et de l'être beaucoup trop, de me supporter et de me soutenir, de me tenir chaud en dehors et en dedans. Ce n'est que le début.

Merci à Atlas et Chaton, on s'ennuierait sans vous.

Merci à Alexandre ASTIER.

Table des matières

Remerciements	i
Table des matières	iv
Liste des abréviations	viii
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux	xii
Introduction	1
Chapitre 1 : Bibliographie	5
1.1 - La résistance bactérienne aux antibiotiques.....	5
1.1.1 - Mécanismes de résistance aux antibiotiques	5
1.1.1.1 - Mécanismes dirigés vers la cible cellulaire.....	7
1.1.1.2 - Mécanismes dirigés vers l'antibiotique.....	8
1.1.1.3 - Mécanismes de transmissions des gènes de résistance	10
a) Plasmides.....	10
b) Transposons.....	11
c) Ilots génomique : ICE et IME.....	12
d) Intégrons.....	13
1.1.1.4 - Ce qu'il faut retenir	14
1.1.2 - Méthodes d'analyses de l'antibiorésistance.....	14
1.1.2.1 - Méthodes phénotypiques.....	14
1.1.2.2 - Méthodes génotypiques.....	17
1.1.2.3 - Ce qu'il faut retenir	18
1.1.3 - L'antibiorésistance dans le monde et plans de surveillance.....	19
1.1.4 - L'antibiorésistance dans les aliments d'origine animale et les filières de production	25
1.2 - Place de la filière piscicole dans l'antibiorésistance.....	27
1.2.1 - Résistance aux antibiotiques et filière piscicole dans le monde	28
1.2.2 - La filière piscicole en France : production, traitements antibiotiques et antibiorésistance	30
1.2.3 - Ce qu'il faut retenir.....	35
1.3 - Communautés bactériennes associées aux denrées issues de la filière piscicole.....	35
1.3.1 - Méthodes de récupération des bactéries à partir de la matrice.	36
1.3.2 - Méthodes d'analyses des communautés bactériennes	37
1.3.2.1 - Méthodes phénotypiques.....	37
1.3.2.2 - Méthodes génotypiques.....	38
1.3.3 - Présence de bactéries pathogènes	42
1.3.4 - La flore bactérienne des animaux de production et des denrées en pisciculture	43

1.4 - Stratégie adoptée pour la caractérisation des communautés bactériennes et des profils de résistance aux antibiotiques	44
Chapitre 2 : Mise au point de la méthode de récupération du microbiote bactérien et de son ADN.	47
2.1 - Préambule	47
2.2 - Comparison of Stomaching versus Rinsing for Recovering Bacterial Communities from Rainbow Trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Fillets	49
2.2.1 - Introduction	50
2.2.2 - Material and Methods.....	52
2.2.2.1 - Rainbow trout fillet samples.	52
2.2.2.2 - Bacterial marker and sample inoculation.	53
2.2.2.3 - Stomaching method.....	53
2.2.2.4 - Rinsing method.	55
2.2.2.5 - Bacterial counts.....	55
2.2.2.6 - Calculation of the Recovery Ratios.....	55
2.2.2.7 - DNA extraction.	56
2.2.2.8 - qPCR assays.....	56
2.2.2.9 - Statistical analyses.	57
2.2.3 - Results and Discussion	58
2.2.3.1 - <i>B. thermosphacta</i> enumeration.....	58
2.2.3.2 - <i>B. thermosphacta</i> PCR quantification.....	60
2.2.3.3 - Bacterial total counts in fresh rainbow trout fillets.	61
2.2.3.4 - Selection of a recovery method.....	62
2.2.4 - Acknowledgements.....	63
2.3 - Ce qu'il faut retenir.....	63
Chapitre 3 : Stratégie de prélèvement	65
3.1 - Recrutement des fermes piscicoles et de l'atelier de filetage	66
3.2 - Questionnaire	68
3.3 - Détermination du plan de prélèvement.....	68
3.4 - Préparation des échantillons des filets	71
Chapitre 4 : Caractérisation phénotypique de la résistance aux antibiotiques des souches d'intérêt.	73
4.1 - Identification des bactéries d'intérêt.....	73
4.2 - Matériels et méthodes	75
4.2.1 - Détection, isolement et identification des 3 genres bactériens	75
4.2.1.1 - <i>Listeria</i>	75
4.2.1.2 - <i>Pseudomonas</i>	75
4.2.1.3 - <i>Aeromonas</i>	76
4.2.2 - Analyse CMI de <i>Pseudomonas</i> spp.	77

4.2.2.1 - Préparation des solutions d'antibiotiques.....	77
4.2.2.2 - Préparation des plaques de CMI.....	78
4.2.2.3 - Préparation de l'inoculum, inoculation et incubation.	79
4.2.2.4 - Contrôle qualité.....	80
4.2.2.5 - Interprétation des résultats	81
4.3 - Résultats et discussion	83
4.3.1 - <i>Listeria</i>	83
4.3.2 - <i>Aeromonas</i>	83
4.3.3 - <i>Pseudomonas</i>	84
4.3.3.1 - Identification des isolats et confirmation de l'identification.....	84
4.3.3.2 - Analyse des profils de résistance aux antibiotiques	85
Chapitre 5 : Caractérisation génotypique de la résistance aux antibiotiques des communautés bactériennes et détection des résidus	91
5.1 - Quantification du niveau moyen de la flore bactérienne des filets.....	93
5.2 - Séquençage haut-débit de l'ADNR 16S	94
5.2.1 - Matériels et Méthodes	95
5.2.1.1 - Origine et choix des échantillons	95
5.2.1.2 - Séquençage.....	95
5.2.1.3 - Analyse bio-informatique.....	96
5.2.2 - Résultats	96
5.2.3 - Conclusions	97
5.3 - Détection des gènes de résistance aux antibiotiques par PCR haut-débit.....	98
5.3.1 - Matériel et méthodes	98
5.3.1.1 - Détermination des ARG recherchés	98
5.3.1.2 - Sélection des souches contenant des gènes de résistances caractérisés, et préparation des inocula.....	99
5.3.1.3 - Préparation des inocula	99
5.3.1.4 - Inoculation des échantillons et récupération de l'ADN bactérien.....	100
5.3.1.5 - Détection des ARG par qPCR haut-débit.....	101
5.3.1.6 - Analyse des données et interprétation	102
5.3.2 - Résultats et discussion.....	102
5.3.2.1 - Evaluation du seuil de détection	102
5.3.2.2 - Effet de l'abondance relative des souches.....	103
5.3.2.3 - Conclusion	104
5.4 - Préambule à l'article 2	104
5.5 - Antibiotic resistome and bacterial communities of farmed rainbow trout filets (<i>Oncorhynchus mykiss</i>): Research Paper.....	105

5.5.1 - Introduction	106
5.5.2 - Material and Methods.....	109
5.5.2.1 - Sampling plan	109
5.5.2.2 - Analysis of antibiotic residues.	111
5.5.2.3 - DNA extraction.	112
5.5.2.4 - Enumeration of bacterial counts by q-PCR targeting the tuf gene.....	113
5.5.2.5 - Antibiotic resistance gene qPCR array.....	113
5.5.2.6 - 16S rRNA gene sequencing and data processing.	114
5.5.2.7 - Statistical analysis.	115
5.5.3 - Results	116
5.5.3.1 - Antibiotic residues assay.	116
5.5.3.2 - Analysis of the fillet-related bacterial microbiota	117
a) Bacterial load of the fillets.....	117
b) Characterization of the bacterial communities.	117
5.5.3.3 - Detection of antibiotic resistance genes.	125
5.5.4 - Discussion.....	128
5.5.5 - Data Availability Statement	133
5.6 - Ce qu'il faut retenir.....	133
Chapitre 6 : Evolution des gènes de résistance aux antibiotiques et des communautés bactériennes sous l'effet d'un vieillissement des filets.....	135
6.1 - Matériel et méthodes.....	135
6.2 - Résultats et discussion	136
6.2.1.1 - Caractérisation du microbiote	136
6.2.1.2 - Caractérisation des gènes de résistance aux antibiotiques.	139
6.1 - Ce qu'il faut retenir.....	141
Discussion générale	143
Références	151
Valorisation des travaux réalisés	164
Annexes	166
Annexe I : Questionnaire soumis aux éleveurs lors de la campagne de prélèvements	166
Annexe 2 : Liste des gènes de résistance aux antibiotiques recherchés, séquence des amorces et fonction des gènes.....	170

Liste des abréviations

ABC : ATP-Binding Cassette

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

ARG : *Antimicrobial Resistance Genes*

ATP : Adenosine Tri-Phosphate

BHI : *Brain-Heart Infusion*

BLSE : Beta-Lactamase à Spectre Étendu

CARD : *Comprehensive Antibiotic Resistance Database*

CFC : *Cephalothine-Sodium Fusidate-Cetrimide*

CFU : *Colony-Forming Unit*

CLSI : *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

C_T : *Cycle Threshold*

DGAL : Direction Générale de l'Alimentation

DGGE : *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

dNTP : *DesoxyriboNucleotide Tri-Phosphate*

EARS : *European Antimicrobial Resistance Surveillance network*

ECDC : *European Centre for Disease prevention and Control*

ECOFF : *Epidemiological Cut-OFF value*

EFSA : *European Food Safety Authority*

EUCAST : *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FAO : *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FISH : *Fluorescence In Situ Hybridization*

FROGS : *Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution*

GLASS : *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System*

GSP : *Glutamate Starch Phenol red agar*

HTS : *High-Throughput Sequencing*

LC-MS/MS : *Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*

LMR : Limite Maximale de Résidus

MALDI-ToF : *Matrix-Associated Laser Desorption-Ionization-Time of Flight*

MATE : *Multidrug And Toxic compound Extrusion*

MDR : *MultiDrug-Resistance*

MFS : *Major Facilitator Superfamily*

MH : Mueller-Hinton

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OTC : Oxytétracycline

OTU : *Operational Taxonomic Unit*

PBS : *Peptone Buffer Saline*

PCA : *Plate Count Agar*

PCR : Polymerase Chain Reaction

PLP : Protéines de Liaison à la Pénicilline

QC : *Quality Control*

RND : *Resistance-Nodulation-cell Divison*

RR : *Recovery Ratio*

SMR : *Small Multidrug Resistance*

STAA : *Streptomycin-Thallos Acetate-Actidione*

TGGE : *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure 1 : Introduction des nouveaux antibiotiques (trait rouge) et détection des premières souches résistantes (croix violettes).....	6
Figure 2 : Cible des antibiotiques et mécanismes de résistance (Wright, 2010)	7
Figure 3 : Représentation schématique de la structure d'un transposon	11
Figure 4 : Structure et fonctionnement d'un intégron.....	13
Figure 5 : Distribution des diamètres d'inhibition de différents antibiotiques pour <i>S. aureus</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>K. pneumoniae</i> et des <i>Staphylococcus</i> à coagulase-négatif (CoNS).....	16
Figure 6 : Nombre de décès par an attribuables à l'antibiorésistance et prédictions pour 2050.....	19
Figure 7 : Frise d'apparition des principales résistances d'importance clinique entre la découverte des antibiotiques (Source : Site de Santé Publique France).....	20
Figure 8 : Evolution du pourcentages d'entérobactéries productrices de carbapénèmases (CPE).....	21
Figure 9 : Proportion des souches de <i>Streptococcus pneumoniae</i> résistantes à la pénicilline, en fonction de l'usage quotidien d'antibiotiques (Albrich et al., 2004).	21
Figure 10 : Distribution des isolats d' <i>Escherichia coli</i> totalement sensibles, et résistants à un, deux, trois, quatre et cinq groupes d'antibiotiques testés (aminopénicillines, fluoroquinolones, céphalosporine de 3 ^e génération, aminosides). Rapport ECDC Europe, Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, 2018.	23
Figure 11 : Place de l'aliment dans le circuit de transmission de résistances aux antibiotiques par les bactéries. Woolhouse, M. E., & Ward, M. J. (2013). Sources of antimicrobial resistance. Science, 341(6153), 1460-1461.	25
Figure 12 : Représentation schématique d'un élevage piscicole et des activités pouvant favoriser l'apparition de résistances	31
Figure 13 : Représentation schématique du processus d'amplification et de séquençage utilisé pour le séquençage Illumina. D'après Rizzi et al. (2012).....	40
Figure 14 : Stratégie suivie pour la caractérisation des communautés bactériennes et des profils de résistance aux antibiotiques dans les filets de truite arc-en-ciel	46
Figure 15 : Schematic representation of the protocols	54
Figure 16 : Mean Recovery Ratios (%) of <i>B. thermosphacta</i> a) in the recovery suspensions (plate counting) and b) in the DNA extracts (qPCR); stratified by recovery method, versus the initial <i>B. thermosphacta</i> concentrations on the filets.	59
Figure 17 : Situation des 2 élevages recrutés et positionnement des activités pouvant influencer l'environnement d'élevage des poissons.	67
Figure 18 : Représentation schématique du plan de prélèvements.....	71
Figure 19 : a) Schéma des coupes réalisées pour la levée des filets, numérotées de ① à ⑤ dans l'ordre de leur réalisation et b) Photographie prise pendant le filetage au laboratoire.....	72

Figure 20 : Profils de CMI des antibiotiques vis-à-vis des souches de <i>Pseudomonas</i> testées.....	87
Figure 21 : Nombre de souches présentant de 1 à 5 profils de "non-sensibilité" aux antibiotiques testés.	88
Figure 22 : Quantification de la flore bactérienne totale en log UFC/g des 56 échantillons, obtenue par quantification du gène <i>tuf</i>	93
Figure 23 : Représentation schématique de l'inoculation des échantillons a) à l'aide des suspensions homogènes et b) à l'aide des suspensions non-homogènes.....	101
Figure 24 : Schematic representation of the sampling plan.....	110
Figure 25 : Cumulated histograms of the relative abundance (%) of the bacterial communities belonging to the most abundant A) Phyla and B) genera on fresh rainbow-trout fillets, depending on the farm and filleting conditions. Each histogram represents the sequences summed from the 14 fillets in each condition.....	120
Figure 26 : Relative abundance of the most abundant genera (top 10) on fresh rainbow-trout fillets, depending on the farm and filleting conditions.....	121
Figure 27 : α -diversity indices with boxplots for all samples depending on the farm and filleting conditions. Each dot represents a single fillet.	122
Figure 28 : A) Visualization of the impact of the farm and filleting conditions on the bacterial community structures of the fillets through MDS distribution of the samples' β -diversity according to the Jaccard dissimilarity. Each dot represents a single fillet. B) UpSet plot showing the intersection of OTUs depending on the farm localization and/or filleting condition. Blue bars in the left panel display the total number of OTUs per condition. The number of OTUs detected in one to four conditions is shown as barplots.	123
Figure 29 : Visualization of the impact of A) the farm and filleting conditions (Bray-Curtis dissimilarity); and of B) the impact of the filleting conditions alone (Farm A and B combined, Bray-Curtis dissimilarity), through MDS distribution of the samples' β -diversity. Each dot represents a single fillet.	125
Figure 30 : Antibiotic resistance genes detected and their relative abundance per 16S rDNA copy in the rainbow-trout fillets.....	126
Figure 31 : Relationship between the presence (blue dots) or absence (red dots) of antibiotic resistance genes and bacterial communities. MDS distribution is based on the Bray-Curtis dissimilarity index of β -diversity. Each dot represents a single fillet.	127
Figure 32 : Composition taxonomique des échantillons frais (NCF1, 2 et 3) et vieillis (NCS1, 2 et 3) au niveau a) de la Classe, b) du Genre.	137
Figure 33 : α -diversité des échantillons en fonction de leur condition (frais ou vieillis).	139

Liste des tableaux

Tableau 1 : Indications, temps d'attente et LMR des antibiotiques ayant une AMM pour les poissons.	33
Table 2 : Mean RR ^a (%) of <i>B. thermosphacta</i> in the cellular pellet (after filtration) according to the initial inoculation of the fillets (3 replicates).....	60
Table 3 : Mean endogenous aerobic viable bacteria levels (log CFU/g) of rinsed rainbow trout fillets measured by plate counting or qPCR targeting the gene <i>tuf</i> (N = 3).....	62
Tableau 4 : Caractéristiques des truites prélevées dans chaque élevage au moment du prélèvement. ..	68
Tableau 5 : Choix de la taille de l'échantillon en fonction de la prévalence de l'évènement recherché (f) et de la taille de la population (N) (source : Cannon et Roe (1982))......	69
Tableau 6 : Nombre d'individus – poissons et filets – prélevés en fonction de la condition étudiée	70
Tableau 7 : Solvants utilisés pour la préparation des solutions mères d'antibiotique, d'après les recommandations du CLSI (2015).	78
Tableau 8 : Antibiotiques et concentrations (µg/ml) testés pour les CMI des souches de <i>Pseudomonas</i> spp.	79
Tableau 9 : Molécules ou associations de molécules antibiotiques et concentrations testées (µg/mL) pour les CMI de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	80
Tableau 10 : Concentrations cible dans lesquelles doivent se trouver les CMI pour la souche contrôle qualité <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (CLSI, 2015).....	80
Tableau 11 : Critères d'interprétation des CMI selon le référentiel M100 du CLSI (2015) relatif à l'analyse de la résistance aux antibiotiques des bactéries non-Enterobacteriaceae.....	81
Tableau 12 : Nombre d'isolats de <i>Pseudomonas</i> spp. présomptifs, et confirmés, nombre d'échantillons positifs, en fonction de l'origine des échantillons.....	85
Tableau 13 : Concentrations bactériennes moyennes et écart-types en fonction de l'origine des échantillons.....	94
Tableau 14 : Concentration en ADN des extraits séquencés et nombre de reads ADN _r 16S pleine longueur obtenues pour les 9 échantillons testés suite à l'étape d'assemblage, avant et après l'élimination des séquences correspondant à l'ADN du poisson.....	97
Tableau 15 : Liste des souches bactériennes marqueuses utilisées et leur ARG caractérisé.	99
Tableau 16 : Abondance relative des gènes (seuil de détection fixée à < 27C _T) en fonction de la charge bactérienne dans les inocula et valeurs de C _T détectées.	103
Tableau 17 : Abondance relative des gènes (seuil de détection fixée à < 27C _T) et valeurs de C _T détectées	104
Table 18 : Detection and quantification of antibiotic residues in the rainbow-trout fillets, depending on farm and filleting conditions.	116
Table 19 : Mean bacterial load of fillets quantified using the <i>tuf</i> gene-targeted qPCR, in log CFU/g.	117
Table 20 : Number of reads, affiliated OTUs, and DNA concentration (ng/µL) in each sample.	118

Tableau 21 : Charge bactérienne moyenne quantifiée par le dénombrement de la flore aérobie mésophile et gènes de résistance aux antibiotiques détectés dans les échantillons frais (3) et vieillis (3). 141

Introduction

L'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques est un enjeu majeur de santé publique. Son impact sociétal et économique est important et de plus en plus marqué. En effet, le nombre de décès par an dans le monde dus à l'antibiorésistance est actuellement estimé à 700 000, dont 5500 en France, et les prédictions les plus alarmistes annoncent un chiffre de 10 millions de décès par an en 2050 (The Review on Antimicrobial Resistance (Chaired by Jim O'Neill), 2016). Face à l'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques et l'accroissement des échecs thérapeutiques associés, la question de la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les denrées alimentaires, et du rôle de celles-ci dans leur dissémination, a été posée par plusieurs études et rapports (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020a; Woolhouse et al., 2015). Il semble intéressant de croiser l'étude du résistome, soit l'ensemble des gènes de résistance aux antibiotiques et les vecteurs facilitant leur dissémination présents dans un écosystème (Wright, 2007) et l'étude du microbiote bactérien des denrées prêtes à consommer, pour caractériser ce risque de dissémination. Cette caractérisation passe notamment par la recherche de gènes de résistances aux antibiotiques et par l'analyse de résistances phénotypiques aux antibiotiques.

Dans le cadre de l'évaluation du rôle des denrées alimentaires dans cette dissémination de la résistance aux antibiotiques, l'intérêt de la filière piscicole repose tout d'abord sur un aspect économique. Les volumes de production de la truite arc-en-ciel s'élèvent à 41 000 tonnes par an en France et sa haute valeur nutritionnelle valorise un attrait croissant pour sa consommation (Dewailly et al., 2007). Un autre aspect tient aux environnements de production de cette denrée. Le système de la production primaire, l'élevage, peut être particulièrement exposé par son environnement lui-même, puisque la rivière est un réservoir de gènes de résistance potentiellement liés aux activités agricoles et urbaines voisines (autres élevages, stations d'épurations des eaux usées, hôpitaux etc...) (Diwan et al., 2018; Gordon et al., 2007; Rowe et al., 2016; Yousfi et al., 2019) mais aussi par ses pratiques de traitements antibiotiques en cas de maladies animales. Dans l'environnement des ateliers de transformation, des contaminations croisées sont possibles par les surfaces et les équipements de l'atelier. Ainsi, les denrées issues de l'aquaculture ont déjà été observées comme étant la source de

bactéries pathogènes (Chen et al., 2010a; Ishida et al., 2010), potentiellement porteuses de gènes de résistances aux antibiotiques (Briet et al., 2018; Ndi and Barton, 2011; Romero et al., 2017). Des résidus d'antibiotiques ont également été détectés dans les environnements d'élevage (sols, eaux, sédiments) (Gao et al., 2012; Jia et al., 2018; Xiong et al., 2015). Cependant les quelques études portant directement sur le filet de poisson frais en tant que denrée alimentaire ont étudié soit le microbiote bactérien (Chaillou et al., 2015), soit la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques (Chen et al., 2010a). Elles ne prennent pas en compte les environnements de production et de transformation qui sont deux facteurs influençant fortement le microbiote bactérien du filet frais.

Dans ce cadre, ces travaux de thèse visent à répondre à la question suivante : Quels sont les profils de résistance aux antibiotiques des bactéries des filets de truite arc-en-ciel ?

Pour cela, nous avons visé à réaliser une première caractérisation du microbiote bactérien du filet de truite arc-en-ciel et de son profil de résistance aux antibiotiques, à deux stades de la chaîne de production : à l'issue de l'élevage sur le produit primaire et à l'issue de la première transformation, c'est-à-dire après un filetage simple en atelier de transformation. Deux situations d'élevage potentiellement à exposition différente ont été étudiées. Le microbiote a été décrit par métagénomique de l'ADNr 16S et pour caractériser son profil de résistance, trois descripteurs ont été utilisés :

- La présence de gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) par qPCR haut-débit grâce à la technologie Smartchip Realtime PCR.
- Le dosage de résidus d'antibiotiques, par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).
- La détection de résistances exprimées aux antibiotiques, par la caractérisation des concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques vis-à-vis de trois genres bactériens d'intérêt : un danger alimentaire, un pathogène de la santé animale et une espèce altérante.

La mise au point d'un protocole de récupération des communautés bactériennes autorisant une extraction fiable du microbiote bactérien à partir d'une matrice complexe d'un point de vue histologique possédant une charge bactérienne estimée faible (DGAL/SDSSA/2015-619) et la détermination d'un plan d'échantillonnage ont été un préalable méthodologique.

Le **Chapitre 1** de ce manuscrit apportera les principaux éléments du contexte scientifique de la

résistance bactérienne aux antibiotiques en abordant notamment les différents déterminants de résistance aux antibactériens (bactéries et gènes) et les méthodes de caractérisation du profil de résistance d'un microbiote bactérien. La place des filières piscicoles dans la problématique de l'antibiorésistance et le contexte français de production la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) seront abordés.

Le **Chapitre 2** présentera les résultats de la phase de détermination de la méthode optimale d'extraction des bactéries, à l'aide d'une bactérie « témoin » permettant de quantifier un rendement de récupération. Ces travaux ayant fait l'objet d'une publication acceptée dans le *Journal of Food Protection*, ils seront présentés sous la forme du manuscrit accepté.

Le **Chapitre 3** présentera le plan de prélèvement et d'échantillonnage retenu pour caractériser les évolutions du microbiote bactérien et de son profil de résistance en fonction des étapes et conditions de la production des filets.

Le **Chapitre 4** est consacré à l'analyse phénotypique de la résistance aux antibiotiques des genres bactériens, *Listeria*, *Aeromonas* et *Pseudomonas*, isolés de ces filets. Cette étude a fait en partie l'objet d'un stage de Master 2 réalisé par Gladys Pangga, que j'ai co-encadré.

Le **Chapitre 5** présentera l'analyse génotypique du microbiote bactérien, des gènes de résistance aux antibiotiques et la recherche des résidus, pour les filets testés issus des 4 conditions de prélèvement : 2 conditions reflétant l'environnement « élevage » (ferme A et ferme B), et 2 conditions reflétant l'environnement « atelier ». Une phase de calibration, d'une part pour estimer la profondeur du séquençage autorisé et les éventuels ajustements nécessaires par rapport aux extrêmes de variation de charges bactériennes des filets, et d'autre part pour tester les capacités de détection de la qPCR haut-débit par la technologie Smartchip Realtime PCR (Takara) des gènes de résistance (ARG), a été un préalable. Ces résultats font l'objet d'une publication soumise à la revue *Frontier in Microbiology*. Ils seront donc présentés sous la forme du manuscrit.

Le **Chapitre 6** apporte une étude complémentaire visant à étudier l'évolution des communautés bactériennes chez des filets de poissons vieillis comparés à des filets de poissons frais, et les impacts sur la détection de gènes de résistance.

Une discussion générale avant de conclure ces travaux et d'ouvrir des perspectives clôturera ce mémoire.

Chapitre 1 : Bibliographie

Ce chapitre présentera tout d'abord les mécanismes de résistance aux antibiotiques et les modes de transmissions impliqués puis les méthodes d'analyse de l'antibiorésistance chez les bactéries. Les plans de surveillance de l'antibiorésistance ainsi que les données collectées concernant son impact sanitaire et économique seront ensuite présentés, suivi du rôle des aliments dans la diffusion de l'antibiorésistance. L'état des lieux de la production de truite arc-en-ciel en France, ainsi que l'usage des antibiotiques dans la filière piscicole et sa place dans le circuit de transmission de résistances aux antibiotiques seront ensuite explorés, à travers la description de bactéries résistantes aux antibiotiques et du microbiote bactérien associé aux denrées. Finalement, la stratégie envisagée pour répondre aux objectifs seront définis.

1.1 - La résistance bactérienne aux antibiotiques

1.1.1 - Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules naturellement sécrétées par des micro-organismes fongiques ou des bactéries et font partie de leur arsenal mis en place pour se défendre contre les stressés extérieures mais également dans la compétition pour la colonisation de niches écologiques. Les organismes produisant ces molécules ont développé des mécanismes de résistance afin de ne pas être affectés par les antibiotiques qu'ils produisent. De plus, comme toute pression de sélection, la production de molécules antibiotiques par les bactéries a favorisé la prolifération d'organismes ayant un avantage évolutif qui leur a permis de se multiplier dans un environnement hostile pour ceux qui ne le possédaient pas. Cet avantage évolutif est la résistance aux antibiotiques. Les organismes producteurs d'antibiotiques et leurs cibles co-évoluent de manière constante dans une compétition évolutive, et l'usage des antibiotiques par l'Homme n'a fait qu'accélérer une sélection naturelle pré-existante (Drancourt, 2016).

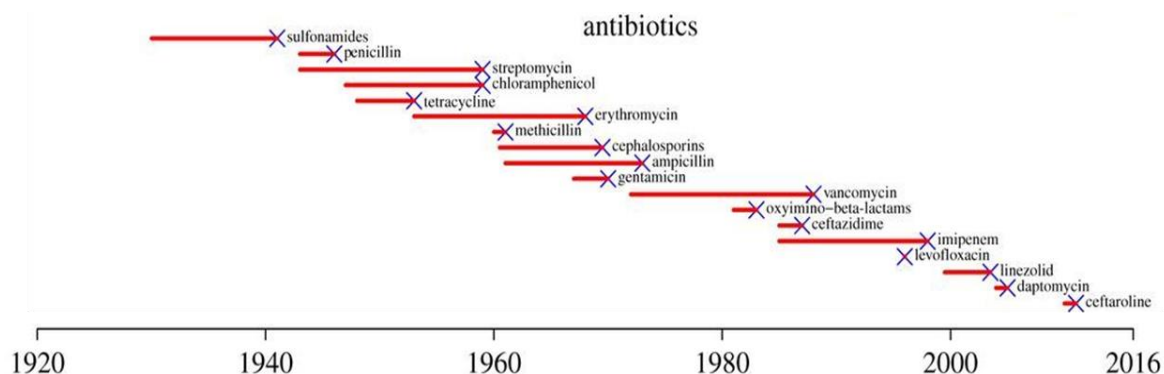


Figure 1 : Introduction des nouveaux antibiotiques (trait rouge) et détection des premières souches résistantes (croix violettes).

Adapté de Kennedy et Read (2017)

Il est par ailleurs intéressant de noter que, comme le montre la Figure 1 (Kennedy et Read, 2017), l'émergence d'une résistance intervient rapidement, en général une dizaine d'années, après la mise sur le marché d'une molécule antibiotique.

La résistance des bactéries aux antibiotiques peut être native, auquel cas elle est due à une imperméabilité structurelle, à l'absence de cible ou à la production constitutive d'une enzyme. La résistance naturelle peut concerner des bactéries phylogénétiquement proches, appartenant à une même espèce ou genre par exemple. Elle peut également concerner des bactéries appartenant à une même catégorie. Par exemple, les bactéries à Gram négatif sont constitutivement résistantes à la vancomycine, du fait de la structure de leur paroi bactérienne. La résistance peut également être acquise, auquel cas elle concerne certaines souches d'une même espèce et peut être due à l'acquisition d'un élément mobile qui a conféré la résistance aux cellules qui l'ont capté, ou due à des mutations (modification de la cible, diminution de perméabilité, augmentation d'efflux...). Les cellules résistantes peuvent à leur tour transmettre cette résistance aux autres cellules par transfert horizontal, mais aussi aux cellules des générations suivantes par transfert vertical.

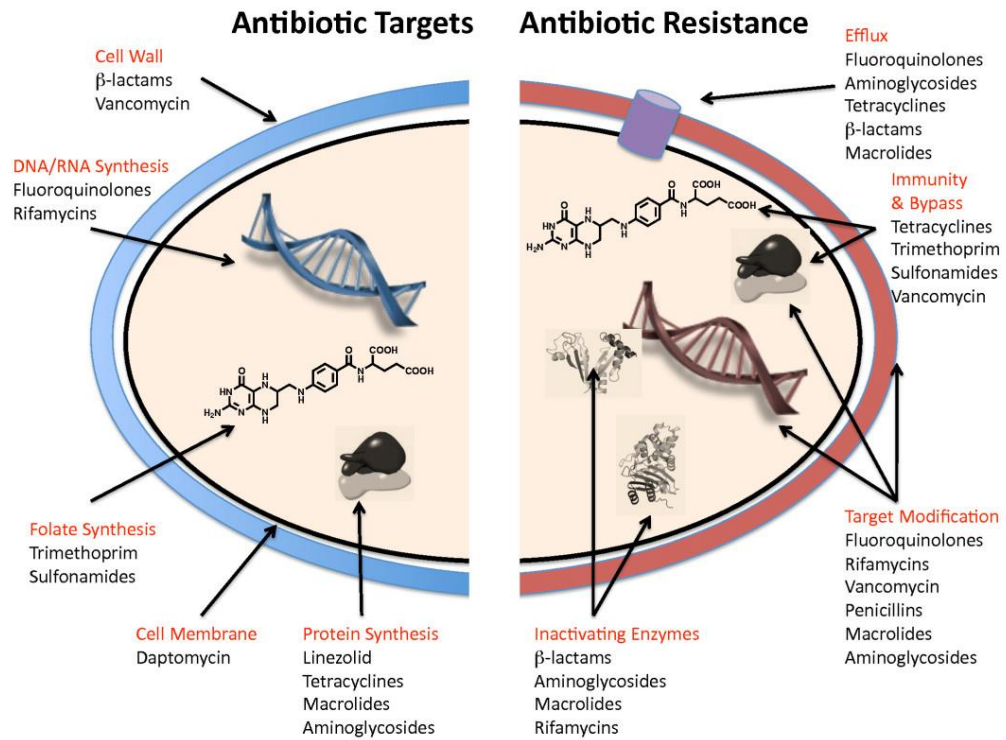


Figure 2 : Cible des antibiotiques et mécanismes de résistance (Wright, 2010)

Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la résistance aux antibiotiques sont divers et dépendent en partie du mode d'action des antibiotiques ciblés (Figure 2). Ces mécanismes peuvent être différenciés en fonction de leur mode d'action qui peut concerner la cible de l'antibiotique ou l'antibiotique en lui-même.

1.1.1.1 - Mécanismes dirigés vers la cible cellulaire

Les mécanismes de résistance dirigés vers les cibles des antibiotiques sont principalement des mécanismes visant à modifier leur structure. Ces modifications peuvent avoir lieu au niveau génétique, auquel cas le gène codant pour la protéine est muté et le site de fixation de l'antibiotique est modifié. L'antibiotique ne peut donc plus agir sur sa cible. C'est le cas notamment avec les résistances aux quinolones et fluoroquinolones. Ces molécules inhibent la croissance bactérienne en se fixant à l'ADN et en empêchant la réplication de l'ADN bactérien. Leurs cibles sont les topoisomérases comme la gyrase de l'ADN bactérien dont l'inhibition conduit à une dégradation de l'ADN. Une modification des gènes codant pour ses protéines empêche les quinolones et fluoroquinolones d'agir. Des mutations des gènes

codant pour l'ADN gyrase *gyrA* (Ser-81→Phe) ou pour la topoisomérase IV *parC* (Ser-79→Phe) ont été décrites comme responsables de résistances respectivement à la sparfloxacine et à la ciprofloxacine, en fonction de la cible préférentielle de ces antibiotiques (Pan et al., 2001). La modification de la cible peut également être faite via un mécanisme agissant sur la protéine traduite plutôt que sur le gène. C'est le cas par exemple lors de certaines résistances aux macrolides. Les macrolides sont des antibiotiques inhibant la croissance bactérienne en bloquant la synthèse protéique. Ils se fixent sur l'ADNr 23S de la sous-unité 50S du ribosome et empêchent l'élongation du peptide en cours de traduction par encombrement stérique du site d'élongation. La présence et l'expression d'un gène *erm* (erythromycin ribosome methylation, *ermA* ou *ermB* par exemple) permet la synthèse d'une enzyme dont l'activité de méthylation du site de liaison de l'antibiotique sur l'ADNr 23S va empêcher son action et conférer à la bactérie qui le porte une résistance aux macrolides mais également aux autres antibiotiques de la famille des MLS_B (macrolides, lincosamides, streptogramine B) (Weisblum, 1998). L'inhibition de l'action des antibiotiques peut se faire via la synthèse de protéines cibles non réceptives. C'est le cas notamment dans le cadre de la résistance aux β-lactamines chez *Staphylococcus aureus*. La présence et l'expression chez certaines souches du gène *mecA* permet la synthèse d'une protéine PLP2a. Cette protéine a une affinité réduite aux β-lactamines. Sa surexpression relative par rapport aux autres protéines de type PLP (Protéines de Liaison aux Pénicillines) permet une efficacité réduite voire annulée des antibiotiques de la famille des β-lactamines (Reygaert, 2009).

1.1.1.2 - Mécanismes dirigés vers l'antibiotique

Les mécanismes de résistance dirigés vers les molécules antibiotiques sont des mécanismes d'inhibition de la molécule via sa dégradation par une enzyme, ou des mécanismes actifs d'épuration de la molécule grâce à des transporteurs membranaires spécifiques ou non qui rejettent les molécules antibiotiques appartenant à une ou plusieurs familles en fonction de leur spécificité. La diminution de la perméabilité membranaire fait également partie de ces mécanismes de résistance. La production d'une enzyme inactivant l'antibiotique est un des principaux exemples de mécanismes dirigés vers l'antibiotique. Il concerne par exemple la résistance aux β-lactamines. Ces molécules ciblent la paroi cellulaire en se liant aux PLP, ce qui inhibe la structuration de la paroi. Ces antibiotiques sont dégradés

par des enzymes, les β -lactamases, décrites pour la première fois par Abraham and Chain en 1940. Ces enzymes hydrolysent le cycle β -lactame de ces antibiotiques et confèrent une résistance à certaines familles de β -lactamines (ou toutes), en fonction de leur spectre d'action. L'activité de ces enzymes peut être inhibée par des inhibiteurs de β -lactamases, tels que l'acide clavulanique, qui sont souvent co-administrés avec les antibiotiques pour augmenter leur spectre d'action.

L'efflux de la molécule antibiotique est un autre mécanisme de résistance très courant. Il se fait via la synthèse d'une pompe à efflux par l'expression d'un complexe de gènes codant pour les protéines qui constituent les différentes sous-unités de la pompe. C'est notamment un des mécanismes qui confère un profil de multirésistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* (Köhler et al., 1997). L'activation de la pompe se fait via un mécanisme actif dépendant du type de pompe. Les pompes à efflux de type RND (Resistance-Nodulation-cell Division) utilisent comme source d'énergie le gradient transmembranaire de protons, et leur surexpression confère des résistances multiples aux antibiotiques (Yoon et al., 2013). À cette famille appartiennent les pompes à efflux de résistance aux antibiotiques de type Acr et Mdt. Les pompes de type ABC (ATP-Binding Cassette) hydrolysent l'ATP comme source d'énergie. Les pompes MacAB-TolC (Nishino et al., 2006) et tet(35) (Teo et al., 2002) sont des exemples de pompes à efflux de type ABC. Ces deux superfamilles de pompe à efflux sont les plus répandues, mais existent également les pompes de type MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance) et MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) parmi les éléments cellulaires responsables de résistance aux antibiotiques. Une absorption limitée ou nulle des antibiotiques peut également protéger la cellule. Cette diminution de la perméabilité membranaire est notamment présente chez les bactéries Gram négatives, qui ont un grand nombre de résistances intrinsèques aux antibiotiques grâce au lipopolysaccharide agissant comme une barrière, ou des mycobactéries dont la structure de la paroi empêche les molécules hydrophiles, dont certains antibiotiques, de pénétrer dans la cellule (Lambert, 2002). Certains antibiotiques nécessitent d'emprunter des porines pour pénétrer dans la cellule bactérienne. C'est le cas notamment des β -lactamines, tétracyclines, du chloramphénicol et des fluoroquinolones. La diminution du nombre de porines, ou la modification de leur structure, permet une diminution de l'entrée de l'antibiotique dans la cellule et l'augmentation de la résistance de la bactérie à cet antibiotique (Delcour, 2009).

1.1.1.3 - Mécanismes de transmissions des gènes de résistance

Tous les mécanismes de résistance ayant pour origine un gène de résistance peuvent se transmettre verticalement d'une génération à l'autre, mais également horizontalement grâce à des mécanismes d'intégration d'ADN extérieur. Ces mécanismes sont la transformation, au cours de laquelle les bactéries intègrent de l'ADN libre, la transduction, qui désigne l'entrée de l'ADN dans la cellule grâce à un vecteur (un virus bactériophage par exemple), et la conjugaison, au cours de laquelle le transfert se fait par contact entre les bactéries. Les gènes concernés sont transférés grâce à des éléments génétiques mobiles, parmi lesquels peuvent être cités les transposons, les plasmides et les îlots génomiques. Les phages peuvent également servir de vecteurs de transferts de gènes de résistance aux antibiotiques. Ces éléments peuvent contenir plusieurs gènes de résistance (ARG) et ainsi conférer plusieurs résistances à la bactérie qui les exprime. Dans le cadre de l'étude de la résistance aux antibiotiques dans les communautés bactériennes d'une denrée alimentaire, le transfert de gènes de résistance ou de souches résistantes d'un environnement à un autre est un élément clé. L'environnement d'élevage et l'environnement de l'atelier de transformation sont deux sources de contamination par lequel le résistome des denrées peut être enrichi, que ce soit par le transfert de communautés portant des résistances ou par le transfert de gènes d'une communauté à l'autre. Dans ce cadre, les résistances portées par des gènes plasmidiques et chromosomiques sont à prendre en considération.

a) Plasmides

Les plasmides sont des fragments d'ADN non chromosomiques, dont la taille peut varier d'un millier à plusieurs millions de paires de bases. Ils peuvent porter plusieurs gènes de résistance et se transmettre d'une bactérie à l'autre par un processus de conjugaison, c'est-à-dire un transfert horizontal de matériel génétique par contact direct entre les cellules bactériennes. Les plasmides conjugatifs possèdent dans leur séquence les éléments génétiques nécessaires à leur transfert, tandis que les plasmides mobilisables reposent sur les mécanismes de la cellule hôte pour effectuer ce transfert. La diffusion de plasmides contenant des gènes de résistance aux antibiotiques est favorisée par la pression exercée par l'usage des antibiotiques en santé humaine et animale (Bennett, 2008). La capacité d'un

plasmide à être transférée à une bactérie dépend de son spectre d'hôte, définie expérimentalement. De plus, le potentiel de persistance d'un plasmide dans une bactérie dépend de son groupe d'incompatibilité, qui définissent la capacité de différents plasmides à cohabiter dans une même cellule hôte. Ainsi, deux plasmides du même groupe d'incompatibilité ne peuvent pas cohabiter. Certains plasmides sont transférables à un grand nombre d'hôtes, tel que le plasmide RK2 qui semble être compatible avec la plupart des bactéries Gram négatives (Blatny et al., 1997).

b) Transposons

Les éléments transposables ou transposons ont été découverts par Barbara McClintock au cours de travaux portant sur les chromosomes de cellules de maïs, dont certaines parties semblaient changer de position au cours de la division cellulaire (McClintock, 1953). Ces éléments sont des séquences d'ADN capable de se déplacer dans le génome d'une cellule ou d'une cellule à l'autre, catégorisés chez les organismes procaryotes en transposon composites ou non-composites. Les transposons composites sont constitués d'un gène codant pour une transposase, encadré par deux séquences répétées inverses, et ce trinôme appelé séquence d'insertion encadre lui-même le ou les gènes qui vont être mobilisés. Cet ensemble constitue un transposon. La transposase codée par les gènes des séquences d'insertion est l'enzyme qui va catalyser le déplacement du transposon en le séparant du reste du génome et en l'intégrant à une autre localisation (Figure 3).

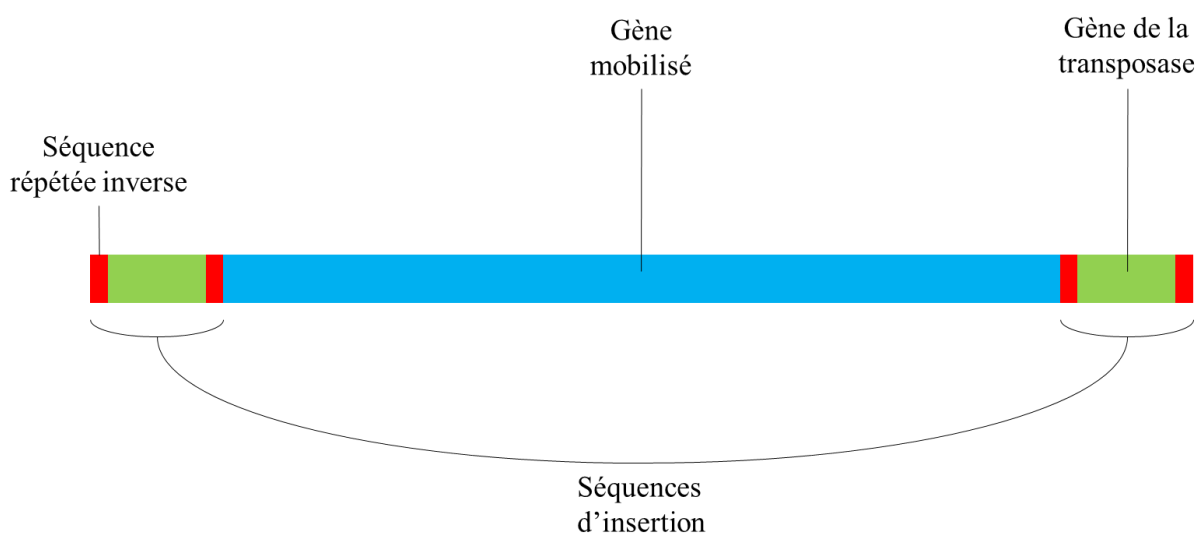


Figure 3 : Représentation schématique de la structure d'un transposon

Les transposons non-composites ne possèdent pas de séquences d'insertion. Ils sont encadrés de séquences répétées inverses dont la séquence terminale qui est reconnue par la transposase ce qui permet la transposition. Ces transposons contiennent également un gène codant pour une résolvasse, qui réprime la transposase et permet la réplication du transposon.

Dans le cadre de la transmission de gènes de résistance aux antibiotiques, les transposons jouent un rôle déterminant. Ils permettent le déplacement d'un gène entre différents ADN, par exemple entre un plasmide et le chromosome d'une bactérie, ou entre plusieurs éléments génétiques mobiles. Ainsi, les transposons peuvent mobiliser des gènes de résistance chromosomiques vers un plasmide ou inversement intégrer des gènes de résistance plasmidiques dans un chromosome, ce qui va permettre leurs persistances dans les générations bactériennes suivantes (Frost et al., 2005). Le transposon non-composite *Tn1696* confère par exemple des résistances à la gentamicine, streptomycine, au chloramphénicol et au sulfaméthoxazole chez *Pseudomonas aeruginosa* (Rubens et al., 1979).

c) **Ilots génomique : ICE et IME**

Les ilots génomiques sont des éléments pouvant être excisés et intégrés aux chromosomes ou plasmides de bactéries. Ils peuvent être séparés en deux catégories : les ilots génétiques conjugatifs (ICE : *integrative and conjugative elements*) et les ilots génétiques mobilisables (IME : *integrative and mobilisable elements*) (Bellanger et al., 2014). Les ICE peuvent se conjuguer grâce à la présence dans leur structure d'un module de conjugaison permettant leur mobilité, alors que les IME nécessitent un mécanisme extérieur pour être mobilisés. Les ilots génomiques portent des gènes permettant l'adaptation de la cellule hôte à l'environnement, dont des gènes de résistance aux antibiotiques. L'ICE Tn5397 par exemple a été décrit chez *Clostridioides difficile* et contient notamment le gène de résistance à la tétracycline *tetM* (Roberts et al., 2001). Peut également être cité l'IME SGI1 décrit chez *Salmonella* qui contient plusieurs gènes conférant des résistances à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine, au sulfaméthoxazole et à la tétracycline (Doublet et al., 2005).

d) Intégrons

Les intégrons ne sont pas des éléments génétiques mobiles, mais ils permettent la dissémination et la capture de gènes impliqués dans l'adaptation génétique des bactéries aux conditions environnementales. Ce sont des structures moléculaires permettant une évolution rapide du génome bactérien. Ils sont constitués d'un gène *intI*, d'un site d'insertion adjacent *attI*, d'une cassette de gènes variable et d'un promoteur transcriptionnel Pc (Kovalevskaya, 2002).

Les cassettes de gènes sont des éléments génétiques non-réplicatifs. Elles contiennent un site de recombinaison *attC*, permettant leur intégration ou excision de l'intégron, ainsi qu'un ou plusieurs gènes qui seront intégrés avec le promoteur Pc au plasmide ou au chromosome par l'intégrase codée par le gène *intI*. Cette insertion nécessite que l'intégrase reconnaisse le site d'insertion *attI* pour exciser la cassette et l'insérer dans l'intégron. Une fois l'insertion réalisée, le promoteur va permettre la transcription des gènes de la cassette (Kovalevskaya, 2002).

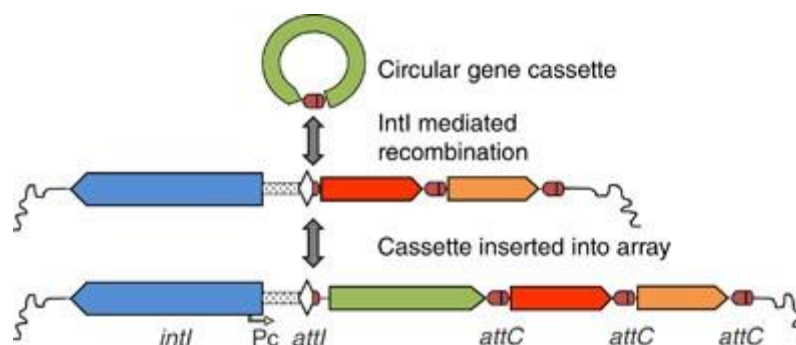


Figure 4 : Structure et fonctionnement d'un intégron.

Source : Gillings et al., (2015)

Les cassettes sont donc les éléments portant les gènes de résistance qui peuvent être disséminés par transfert horizontal. Plus de 130 cassettes de gènes conférant des résistances aux antibiotiques ont été décrites (Partridge et al., 2009), dont la présence est souvent liée à des profils de multirésistances. Une pression de sélection antibiotique exercée sur une population bactérienne peut sélectionner les souches possédant des gènes de résistance présents sur des plasmides ou des transposons, qui eux-mêmes peuvent posséder des intégrons. Le transfert de ces éléments entraîne le transfert des intégrons possédant des cassettes portant des gènes de résistance et favorise l'apparition de profils de multirésistances.

1.1.1.4 - Ce qu'il faut retenir

La résistance aux antibiotiques est un phénomène complexe mettant en jeu des mécanismes propres à la cellule bactérienne concernée mais également des coopérations, échanges et transmissions entre différentes cellules. Les traitements antibiotiques appliqués aux humains et aux animaux exercent une pression sélective directe sur les flores commensales tandis que les résidus d'antibiotiques dans les effluents des villes, hôpitaux, élevages ou stations d'épuration par exemple exercent une pression sélective indirecte sur les communautés bactériennes environnementales et commensales. L'étude ciblée du niveau de résistance des bactéries d'un écosystème, c'est-à-dire centrée sur une ou plusieurs espèces d'intérêt, est notamment utile pour évaluer les résistances exprimées par des bactéries pathogènes. Elle ne permet cependant d'obtenir qu'une vision limitée du résistome. C'est pourquoi il semble pertinent d'appréhender le résistome au niveau d'un écosystème bactérien plutôt qu'au niveau d'une ou de quelques espèces d'intérêt. De plus l'étude des mécanismes mis en jeu et des gènes responsables de leur expression permet une meilleure évaluation du risque que l'observation de phénomènes phénotypiques puisque certains gènes peuvent être présents, non exprimés mais transmis sous l'effet d'une pression de sélection. Différentes méthodes d'analyses existent pour caractériser l'antibiorésistance des bactéries d'un milieu, et le choix de ces méthodes dépend des questions auxquelles les études visent à répondre.

1.1.2 - Méthodes d'analyses de l'antibiorésistance

1.1.2.1 - Méthodes phénotypiques

La mesure phénotypique de la résistance aux antibiotiques peut se faire par des méthodes de dilution des antibiotiques en milieu liquide ou solide, ou par diffusion des antibiotiques en milieu solide. Les antibiogrammes sont une méthode d'analyse de la résistance aux antibiotiques via la diffusion d'antibiotiques par disques. Ils consistent à faire se développer un tapis bactérien en présence d'un disque imprégné d'antibiotique à une concentration définie qui va diffuser dans la gélose et inhiber la croissance des colonies à un diamètre plus ou moins grand autour du disque (Biemer, 1973). Ce diamètre correspond au diamètre d'inhibition permettant de déterminer la sensibilité ou la résistance d'une bactérie à un antibiotique. Cette technique est utilisée en routine au laboratoire et permet d'étudier sur un seul

inoculum un grand nombre d'antibiotiques différents et de déceler d'éventuelles synergies. La méthode de diffusion par disque d'antibiotiques est en revanche limitée par les conditions de culture spécifiques de certaines bactéries (bactéries intra-cellulaires, bactéries anaérobies) et par le fait que certains antibiotiques diffusent mal dans les milieux gélosés. De plus des variations des conditions utilisées (densité de l'inoculum initial, pH, salinité...) peuvent conduire à interpréter des sensibilités ou des résistances erronées. Les diamètres d'inhibition peuvent être sources de biais puisqu'ils sont déterminés ou ajustés le plus souvent visuellement. Il existe une méthode dérivée, appelée E-test, qui consiste à utiliser une bande de papier imprégnée d'un gradient de concentration d'un antibiotique qui sera déposée sur un milieu gélosé ensemencé avec la bactérie d'intérêt. Elle permet de déterminer plus précisément la concentration minimale inhibant la croissance de la bactérie (CMI) (Rosser et al., 1999).

La méthode de dilution en milieu liquide reste la méthode de référence pour l'analyse de la résistance aux antibiotiques dans le milieu médical (ISO 20776-1). Elle consiste à ensemencer une gamme de dilution de demi en demi d'un antibiotique avec un inoculum standardisé. Il permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est la première concentration inhibant visiblement la croissance bactérienne. Cependant, l'écart parfois important entre les dilutions successives la rend peu précise. De plus, elle ne permet pas de déceler d'interactions entre les antibiotiques et nécessite un essai par antibiotique à tester. La dilution en milieu solide est une méthode dont le principe est similaire, à la seule différence que comme son nom l'indique, l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé au lieu d'être liquide. Les bactéries sont ensuite déposées sur le milieu gélosé, à l'endroit où ont été déposés les antibiotiques, et les dépôts bactériens dont l'antibiotique a inhibé ou non la croissance peuvent ensuite être observés.

Pour réaliser et interpréter les données obtenues grâce aux analyses phénotypiques, il existe différents référentiels standardisés, parmi lesquels peuvent être cités par exemple le référentiel du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) aux Etats-Unis et le référentiel de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) en Europe. Ces deux référentiels retiennent des critères d'interprétation différents pour déterminer la résistance ou la sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique donné. De plus, les notions utilisées dans chacun des deux référentiels (« breakpoint » et « cut-off » ou ECOFF pour « Epidemiological Cut-off Value ») sont à prendre en compte.

En effet, ces deux notions ne sont pas à utiliser dans le même contexte et tendent à exacerber les différences d'interprétation. Dans le milieu médical, les « breakpoints » permettent d'évaluer la résistance antimicrobienne d'une souche clinique, en définissant des valeurs (diamètre de diffusion ou CMI) servant à classer les souches comme Sensibles (S), Intermédiaires (I) ou Résistantes (R) afin de justifier la mise en place d'un protocole thérapeutique.

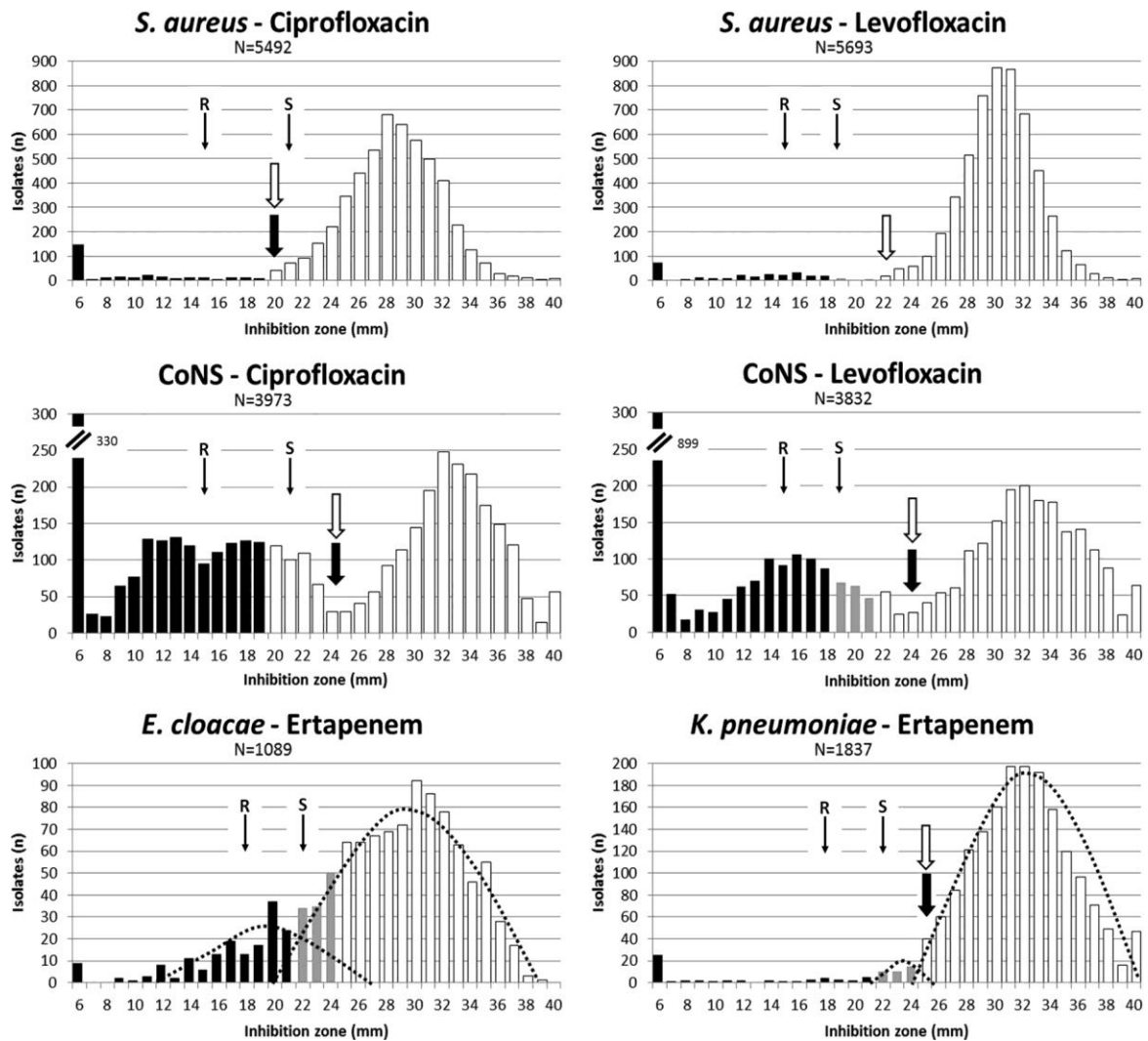


Figure 5 : Distribution des diamètres d'inhibition de différents antibiotiques pour *S. aureus*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* et des *Staphylococcus* à coagulase-négatif (CoNS). Les flèches noires et blanches représentent respectivement les ECOFF déterminés par le référentiel EUCAST et les ECOFF déterminés au cours de l'étude. Les breakpoints du référentiel EUCAST correspondant à des résistances (R) et à des sensibilités (S) sont marqués par les flèches noires fines. Les histogrammes noirs, gris et blancs représentent les souches cliniquement résistantes, intermédiaires ou sensibles selon les breakpoint du CLSI. Source : Hombach et al. (2014).

En épidémiologie, le terme « ECOFF » définit une valeur seuil servant à séparer une population microbienne en deux sous-populations, population sauvage ou population non-sauvage, en fonction du diamètre d'inhibition d'un antibiotique ou bien de sa concentration minimale inhibitrice (CMI). Pour un antibiotique donné, les bactéries sauvages sont les souches dont la sensibilité est égale ou inférieure à la valeur seuil et les bactéries non-sauvages sont les souches plus résistantes à cet antibiotique. Ce critère permet d'observer une diminution de la sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique, ce qui ne signifie pas forcément l'acquisition d'une résistance clinique. La différence entre breakpoint et ECOFF est illustrée par la Figure 5. Les ECOFF sont déterminés par l'application d'une loi normale sur la répartition des diamètres d'inhibition, ce qui permet de définir un critère correspondant à un phénotype sauvage ou non-sauvage. Les breakpoints, comme dit précédemment, sont des valeurs prédisant la réussite ou l'échec thérapeutique d'un traitement antibiotique. Il est intéressant de noter que le CLSI, référentiel américain, et l'EUCAST, référentiel européen, divergent sur certains critères de résistance, qui eux-mêmes ne correspondent pas toujours à la dichotomie « sauvage vs non-sauvage » des phénotypes de résistance.

1.1.2.2 - Méthodes génotypiques

La caractérisation de la résistance aux antibiotiques d'une souche peut également nécessiter l'usage de méthodes moléculaires ciblées permettant d'identifier les marqueurs génétiques de la résistance plutôt que de détecter leur expression. Elles permettent également de chercher la présence d'éléments génétiques permettant leur transfert horizontal et leur diffusion. Peuvent être citées par exemple la PCR classique et la PCR en temps-réel qui permettent de détecter des gènes spécifiques dans le génome d'une souche ou dans le résistome d'une communauté bactérienne. Ces méthodes permettent une identification rapide mais ciblée, nécessitant une sélection préalable des gènes dont la présence est recherchée.

L'avènement des méthodes haut-débit a permis de réduire voire de s'affranchir des limitations présentées par la sélection des gènes de résistance recherchés. La PCR haut-débit est un outil permettant de réaliser en un seul *run* un grand nombre de réactions. La réalisation de ces réactions en nanovolumes permet par exemple de réaliser 5184 puits par puce pour le cas du Smartchip Realtime PCR de Takara

(Muziasari et al., 2017; Wang et al., 2014). Il est ainsi possible d'augmenter le nombre de gènes recherchés, d'inclure dans une même analyse des éléments mobiles ou des gènes de ménage en contrôle interne, et de tester plusieurs échantillons à la fois. L'analyse des données est ensuite similaire à celle réalisée pour une PCR en temps réel, à savoir la validation de la courbe de fusion et d'amplification. Cette méthode étant sensible, le seuil de quantification est généralement plus bas que pour la PCR en temps-réel, à savoir 27 cycles d'amplification (Muziasari et al., 2017; Zhu et al., 2013) alors que des valeurs allant jusqu'à 35 ou 40 cycles peuvent être prises en compte en PCR en temps-réel (Spencer et al., 2016).

Le séquençage total du génome permet également de caractériser les déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques dans une souche ou une communauté complexe. Les séquences obtenues sont dans ces cas confrontées à des bases de données telles que ResFinder (Bortolaia et al., 2020). *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD)* (McArthur et al., 2013) permet également de détecter les séquences correspondant à des gènes connus de résistance aux antibiotiques. Peuvent également être citées PlasmidFinder pour la détection de plasmides (Carattoli et al., 2014) et INTEGRALL pour la détections d'intégrons et de cassettes de gènes (Moura et al., 2009).

1.1.2.3 - Ce qu'il faut retenir

Différentes méthodes existent pour la caractérisation des profils de résistance aux antibiotiques. Les méthodes phénotypiques sont généralement utilisées pour étudier la résistance de pathogènes humains ou animaux et pour caractériser des dangers alimentaires. Les méthodes génotypiques peuvent compléter les données obtenues via l'analyse des phénotypes en déterminant les caractères génétiques associés aux résistances exprimées et les éléments favorisant la diffusion de ces gènes. Elles peuvent également être utilisées pour évaluer le niveau de résistance des bactéries associées à une denrée ou à un environnement. Cette évaluation est encore plus précise lorsque ces méthodes sont associées à des analyses telles que les dosages de résidus d'antibiotiques et la caractérisation de communautés bactériennes qui aident à discuter les résultats obtenus.

Une des limites associées à l'analyse des résistances phénotypiques est le manque de critères d'interprétation pour certains genres bactériens non-pathogènes ou environnementaux qui peut rendre

difficile l'observation de résistances. La mise en place de plans de surveillance peut permettre d'enrichir les données existantes sur les niveaux de résistance des bactéries, pathogènes ou non, pour aider à l'établissement de cut-off par exemple et faciliter l'interprétation des résultats.

1.1.3 - L'antibiorésistance dans le monde et plans de surveillance

La résistance des bactéries aux antibiotiques est un enjeu majeur de santé publique. Le nombre d'infections dues à des bactéries résistantes aux antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire est en forte augmentation, et cet état de fait est corrélé à l'usage des antibiotiques en santé humaine et vétérinaire (Cantas et al., 2013; World Health Organisation, 2005).

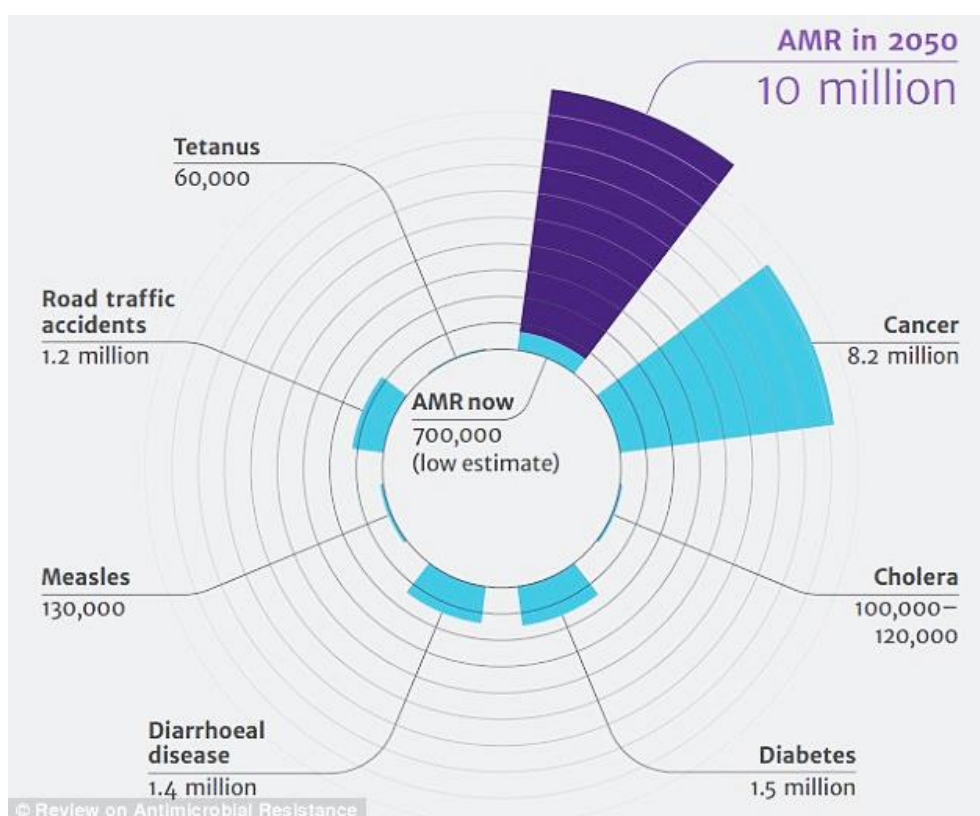


Figure 6 : Nombre de décès par an attribuables à l'antibiorésistance et prédictions pour 2050. O'Neill, J., 2016. Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations, The Review On Antimicrobial Resistance.

Ces infections sont responsables d'au moins 700 000 décès par an (Figure 6), dont 5500 par an en France, avec un coût économique estimé à 1,5 milliards € par an en Europe et 20 milliards € par an aux Etats-Unis (The Review on Antimicrobial Resistance (Chaired by Jim O'Neill), 2016). Selon ces auteurs ce coût humain et financier s'élèvera à 10 millions de morts par an en 2050, avec un coût de

100.000 milliards de dollars par an. A titre de comparaison, la prise en charge des cancers et leurs impacts indirects ont coûté en 2010, 290 milliards de dollars dans le monde, avec une augmentation estimée à 458 milliards de dollars en 2030 (Bloom et al., 2011).



Figure 7 : Frise d'apparition des principales résistances d'importance clinique entre la découverte des antibiotiques (Source : Site de Santé Publique France)

En santé humaine, le nombre de souches et des espèces bactériennes résistantes aux antibiotiques est en forte croissance. La mise sur le marché d'un antibiotique est rapidement suivie de l'apparition de résistances, avec l'émergence et la diffusion récente de bactéries multirésistantes (Figure 7). Une étude menée en Belgique note une augmentation du nombre d'isolats d'Entérobactéries productrices de carbapénémases entre 2007 et 2014 (Figure 8). Ce nombre a triplé entre 2013 et 2014 avec un passage d'environ 300 isolats à presque 900 entre ces deux années. Cette augmentation est due principalement au nombre croissant de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* et *Escherichia coli* résistantes.

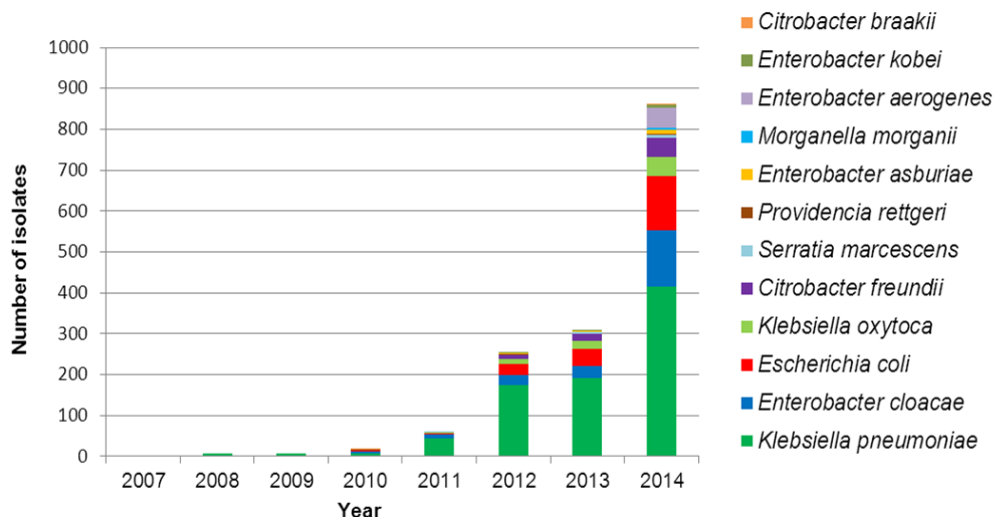


Figure 8 : Evolution du pourcentages d'entérobactéries productrices de carbapénèmes (CPE). National Reference Centre, Belgium, January 2007 – December 2014.

Une étude de 2004 a permis d'observer que plus de 40 % des souches de *S. pneumoniae* d'origine clinique humaine isolées en France étaient résistantes à la pénicilline, contre moins de 10 % en Allemagne et aux Pays-Bas par exemple, avec une corrélation forte observée entre cette proportion et l'usage quotidien d'antibiotique (Figure 9, Albrich et al., 2004).

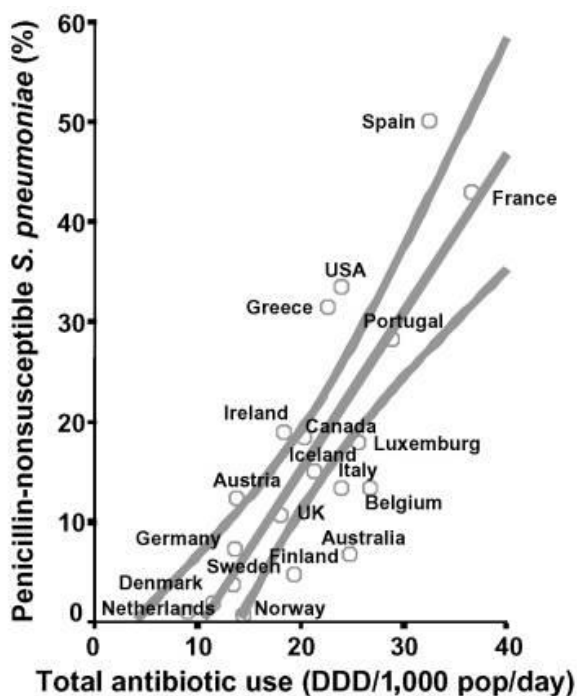


Figure 9 : Proportion des souches de *Streptococcus pneumoniae* résistantes à la pénicilline, en fonction de l'usage quotidien d'antibiotiques (Albrich et al., 2004).

La résistance bactérienne aux antibiotiques fait l'objet de plusieurs plans de surveillance. Au niveau mondial, l'OMS a mis en place en 2015 le plan GLASS (Global Antimicrobial resistance Surveillance System) dont le but est de coordonner la surveillance de l'antibiorésistance aux différentes échelles, mondiale, nationales et régionales à travers la collection, l'analyse et la diffusion de données obtenues par les différents organismes de recherche locaux. L'OMS édite chaque année un rapport des données collectées dans les différents pays participants au réseau de surveillance. Un réseau similaire a été établi au niveau européen, à savoir le réseau EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) administré par l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Ce réseau collecte des données d'antibiorésistance obtenues par les institutions et organismes de recherche nationaux participant, et publie chaque année un rapport des données collectées. Dans le rapport de 2018, il a par exemple été noté qu'en Europe, les souches collectées d'*Escherichia coli* d'origine clinique humaine étaient fréquemment résistantes à cinq des principales familles d'antibiotiques (aminopénicillines, fluoroquinolones, céphalosporines de troisième génération et aminosides), avec jusqu'à 70 % des souches résistantes à au moins une des cinq familles et jusqu'à 20 % des souches isolées résistantes aux cinq. En France, environ 40 % des souches étaient totalement sensibles mais 20 % des souches étaient résistantes à 3 familles d'antibiotiques ou plus (Figure 10).

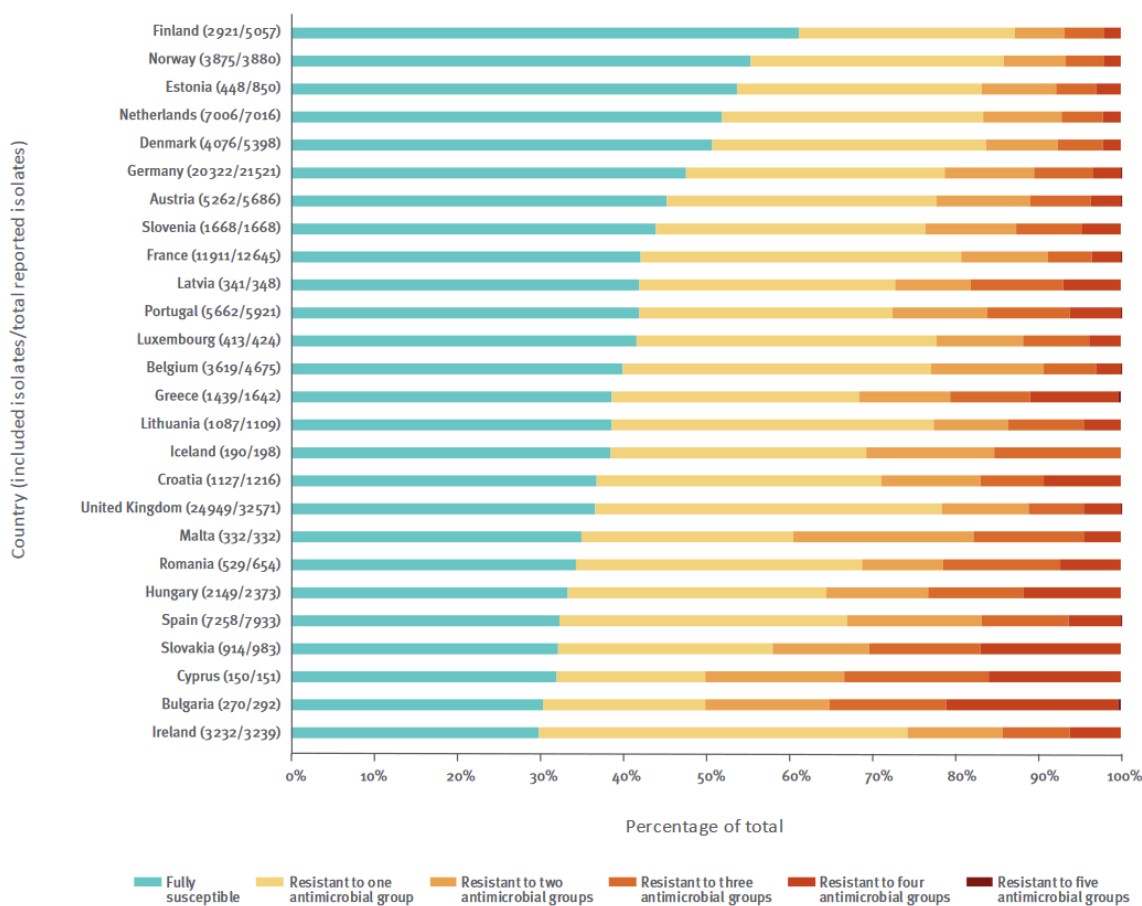


Figure 10 : Distribution des isolats d'*Escherichia coli* totalement sensibles, et résistants à un, deux, trois, quatre et cinq groupes d'antibiotiques testés (aminopénicillines, fluoroquinolones, céphalosporine de 3^e génération, aminosides).

Rapport ECDC Europe, Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, 2018.

Cependant, dans ce rapport de 2018, il a été noté qu'en France, la tendance était plutôt à la diminution du nombre de souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques entre 2015 et 2018. Cette tendance est parfois à l'inverse de celle observée en Europe, qui est à l'augmentation pour la résistance d'*E. coli* aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération (C3G).

Ces deux réseaux collectent principalement des données issues de prélèvements réalisés en milieu hospitalier et concernent des pathogènes humains. L'EFSA (European Food Safety Authority) collabore au niveau européen avec l'ECDC et l'Agence Européenne des Médicaments pour surveiller et contrôler l'usage d'antibiotiques dans la filière agro-alimentaire, et pour analyser les risques liés à la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans cette filière, avec notamment l'adoption du plan One Health en 2017 pour la surveillance du risque de zoonoses dans la filière agro-alimentaire et la diffusion de l'antibiorésistance. Dans son rapport de 2020 portant sur la résistance aux antibiotiques des

bactéries zoonotiques (EFSA, 2020), l'EFSA a observé que la filière aviaire était en Europe la plus grande source de *Salmonella* résistantes aux antibiotiques, puisque 84,56 % des souches résistantes à la tigécycline et 82,83 % des souches résistantes à la colistine provenaient de cette filière (isolats cliniques prélevés des animaux ou isolats issus de carcasses). Les denrées alimentaires issues de cette filière étaient également sources de bactéries résistantes aux antibiotiques puisque 43,1 % des échantillons de viande de dinde étaient positifs pour la recherche de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM), ce qui constitue les deux plus fortes prévalences de SARM parmi les denrées alimentaires analysées (viande bovine, porcine, de poulet et de lapin). En France, le réseau Résapath (Réseau d'épidémiologie et de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales) de l'Anses est « un réseau de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes isolées de l'animal » (<https://resapath.anses.fr>). Il surveille l'émergence de résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes pour les animaux en regroupant les données obtenues par les laboratoires partenaires et publie un bilan annuel. Comme dans le rapport de l'ECDC, il a été noté que l'évolution du nombre de résistances aux antibiotiques en France était à la diminution dans les souches pathogènes d'origine animale et humaine. Cela peut notamment être dû à des plans de contrôle tel que le plan EcoAntibio 1 dont un des principaux succès a été une diminution de 37 % de l'exposition des animaux aux antibiotiques en France entre 2011 et 2016. Il faut également noter qu'entre 2011 et 2018, la vente d'antibiotiques en médecine vétérinaire a diminué de 48,16 % en France (Anses, 2019a).

L'ensemble de ces réseaux et plans de surveillance permet d'obtenir des informations sur les niveaux de résistances des bactéries pathogènes pour les humains ou les animaux. Il est cependant plus rare de trouver des données portant sur le résistome d'une matrice ou d'un environnement, ou sur des bactéries non-pathogènes. Il est intéressant de noter que la filière piscicole est faiblement représentée dans les plans de surveillance et que peu de données sont disponibles dans les rapports publiés par les différents réseaux. Cependant, cette filière est supposée particulièrement exposée aux effluents d'activités humaines et l'étude des communautés bactériennes qui lui sont associées pourrait apporter des informations importantes sur les niveaux d'antibiorésistance des bactéries de l'environnement et des denrées alimentaires, et sur le risque potentiel pour les consommateurs.

1.1.4 - L'antibiorésistance dans les aliments d'origine animale et les filières de production

La question du rôle de l'aliment dans la transmission à l'Homme de bactéries résistantes et/ou dans le transfert entre bactéries de l'écosystème microbien de l'aliment doit être posée. Selon Woolhouse et Ward (2013), la résistance aux antibiotiques peut être transmise de l'animal au consommateur par divers moyens dont l'aliment fait partie, via le transfert de communautés bactériennes (Figure 11). En effet, le microbiote bactérien des denrées d'origine animale est influencé par les traitements antibiotiques appliqués aux animaux de production, leur flore endogène, mais aussi les bactéries environnementales et les effluents d'activités humaines. Il est cependant difficile de quantifier ces échanges et de connaître la mesure dans laquelle chaque élément affecte les communautés bactériennes et le résistome des denrées alimentaires.

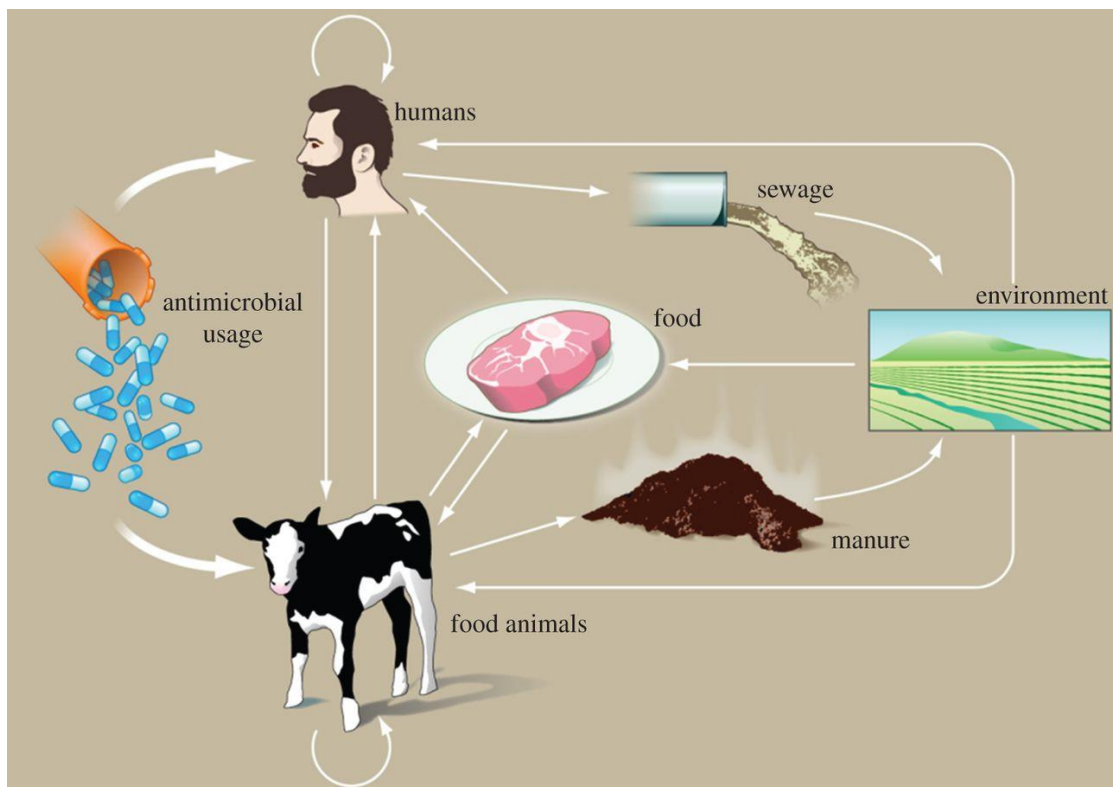


Figure 11 : Place de l'aliment dans le circuit de transmission de résistances aux antibiotiques par les bactéries. Woolhouse, M. E., & Ward, M. J. (2013). Sources of antimicrobial resistance. *Science*, 341(6153), 1460-1461.

Dans le cadre du rôle des filières de production animale dans la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques, l'exemple du gène *mcr-1* est un des plus parlants. Ce gène code une résistance à la colistine. Cet antibiotique de la famille des polymyxines a été découvert en 1950, et son action provoque une augmentation de la perméabilité membranaire des bactéries et la mort cellulaire par fuite du contenu cytoplasmique. La colistine est principalement utilisée en santé animale et constitue une molécule de dernier recours pour les infections humaines à certaines bactéries multirésistantes, ce qui lui a valu une place dans la liste des antibiotiques critiques (World Health Organisation, 2019). Face à l'augmentation du nombre de résistance à la colistine chez les souches commensales d'*E. coli* d'origine animale en Chine, une étude a été menée pour établir les déterminants génétiques liés à ce phénotype. Une première souche isolée en 2013, identifiée SHP45 et présentant un profil de multirésistance, a été décrite comme possédant un déterminant plasmidique de résistance à la colistine, plus tard appelée *mcr-1* pour *mobile colistin resistance*. Par la suite, ce gène a été décrit dans plusieurs autres souches isolées entre 2011 et 2014. Ces souches étaient des souches d'*E. coli* d'origine animale, alimentaire ou clinique humaine, et 3 souches de *K. pneumoniae* clinique humaine, avec des pourcentages de prévalence allant de 0,7 % des souches testées pour *K. pneumoniae* à 28 % pour *E. coli* d'origine aviaire (Liu et al., 2016). Suite à cette étude, d'autres équipes ont cherché à savoir si ce gène était endémique de la Chine. Ainsi, Webb et al. (2016) ont rapporté la présence de ce gène dans des bactéries d'origine géographique différente, sans aucun lien établi avec les souches analysées en Chine. Ces isolats étaient quatre souches de *Salmonella*, isolées en 2012 et 2013, dont trois d'origine alimentaire et une issue d'un environnement d'élevage de volaille. Les gènes étaient portés par un plasmide IncP ou IncX4. La même année, ce gène a été décrit dans des souches initialement isolées en Chine dans les années 1980 (Shen et al., 2016) période à laquelle la colistine a commencé à être utilisée chez les animaux de production agro-alimentaire, suggérant une émergence du gène après une période de « dormance » et une sous-estimation de sa prévalence. Il a depuis été décrit dans des bactéries isolées dans cinq continents différents, et la première hospitalisation liée à une souche multirésistante portant le gène *mcr-1* a été rapportée en 2016 (McGann et al., 2016). Ces observations, ainsi que de nombreuses autres études portant sur la présence de ce gène dans des bactéries d'origine humaine ou animale, ont amené l'agence européenne des médicaments et l'EFSA à préconiser l'usage de la colistine en médecine vétérinaire uniquement dans le

cas où aucun autre traitement n'est efficace. Depuis cette première description, la famille des gènes plasmidiques de résistance à la colistine s'est agrandie et le dernier rapport décrit le gène *mcr-10* dans une souche d'*Enterobacter roggenkampii* isolée en 2016, encore une fois en Chine (Wang et al., 2020). Le risque lié à l'antibiorésistance dans la filière agro-alimentaire et plus particulièrement les filières animales est réel, et l'exemple de la résistance à la colistine met en lumière la possibilité qu'une partie de ce risque soit ignoré parce que sa caractérisation nécessite en premier lieu de savoir quoi chercher.

Les denrées alimentaires d'origine animale possèdent un microbiote bactérien fortement influencé par le microbiote de l'animal mais aussi par l'environnement d'élevage et l'environnement agro-alimentaire où se produisent la-les transformation(s). Ce microbiote est potentiellement porteur de gènes de résistance aux antibiotiques et peut être un vecteur de résistance aux antibiotiques (bactéries résistantes et gènes de résistance). Les aliments d'origine animale sont influencés par l'environnement et peuvent être sources de bactéries pathogènes pour les consommateurs. La présence de bactéries résistantes aux antibiotiques et de leurs gènes de résistance mérite d'être étudiée, notamment par l'étude du résistome de ce microbiote alimentaire qui pourrait constituer un élément important dans le réseau de transmission de résistances aux antibiotiques entre les bactéries.

1.2 - Place de la filière piscicole dans l'antibiorésistance

Comme dit précédemment, les aliments d'origine animale sont à l'interface entre l'environnement et le consommateur. Cette affirmation est d'autant plus vraie pour la filière piscicole puisque l'environnement d'élevage est un environnement « ouvert ». En effet, les bassins d'élevage sont alimentés par l'eau des rivières qui passe à travers un filtre mécanique visant à retenir les gros éléments présents dans l'eau (branchages par exemple), mais aucune filtration des éléments microscopique n'est mise en place en amont de ceux-ci. Pour cette raison, la rivière constitue une des sources de bactéries résistantes qui peuvent être retrouvées dans les poissons d'élevage. Ces éléments peuvent contribuer à modifier le microbiote bactérien des animaux d'élevage et des denrées qui en sont issues, et par conséquent leur résistome peut également être impacté de façon variable en fonction des réglementations et pratiques d'élevage exercées dans les différents pays.

1.2.1 - Résistance aux antibiotiques et filière piscicole dans le monde

La production aquacole mondiale représentait 82 millions de tonnes en 2018 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020b) dont 88,7 % sont produits en Asie. Les principaux pays producteurs sont la Chine (57,9 % du volume mondial), l'Inde, l'Indonésie, le Vietnam et le Chili. Comme dit précédemment, les produits issus de la filière piscicole sont susceptibles de contenir des bactéries résistantes aux antibiotiques. Les pratiques d'élevage sont susceptibles d'impacter fortement les niveaux d'antibiorésistance dans l'environnement et les denrées. Dans une revue publiée en 2019, Lulijwa et ses collaborateurs ont étudié les usages d'antibiotiques en aquaculture dans les 15 principaux pays producteurs de produits aquacoles. Sur 67 antibiotiques principalement utilisés dans ces pays, le Vietnam en utilisait 39 et la Chine 33. Ce nombre élevé d'antibiotiques utilisés en aquaculture, associé à l'usage d'antibiotiques dans d'autres filières, peut expliquer les forts taux de résistance aux antibiotiques dans les denrées aquacoles et l'eau des rivières dans ces pays. Par exemple, de fortes prévalences d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques dans des poissons d'élevage et sauvages ont été rapportées au Vietnam. Dans ces études, les poissons élevés en bassins portaient pour 38,5 % d'entre eux une souche possédant le gène *bla_{CTX-M-1}* et pour 48,7 % d'entre eux une souche possédant le gène *sul2*, conférant une résistance aux antibiotiques de la famille des sulfamides. De même, 65 % des poissons élevés en cage portaient une souche possédant les gènes *bla_{CTX-M-1}* et *bla_{TEM}*, conférant des résistances aux β -lactamines, et 20,5 % des poissons sauvages portaient les gènes *sul1* et *sul2* (Hoa et al., 2020). Les traitements appliqués aux élevages terrestres peuvent également impacter l'antibiorésistance des bactéries associées aux bassins d'élevage piscicole, comme décrit par Dang et al. en 2011. Dans un système d'élevage intégré porc-poisson, les antibiotiques administrés aux porcs par l'alimentation augmentaient la résistance d'*E. coli* et *Enterococcus* spp. ce qui impactait les niveaux de résistance des bactéries présentes dans l'eau des bassins. Concernant d'autres pays d'Asie, des résistances phénotypiques à un ou plusieurs antibiotiques parmi le chloramphénicol, la clindamycine, la rifampicine, la spectinomycine et la tétracycline ont été observées dans des souches de *Salmonella* spp. isolées de tilapia et de poisson-chats issus de marchés en Malaisie (Budiati et al., 2013). Les gènes *bla_{CTX-M-1}*, *qnrS*, *qnrB* (conférant des résistances aux quinolones), *sul1* et *sul2* ont également été détectés

dans de souches d'*E. coli* isolées de sédiments de rivière en Inde (Diwan et al., 2018).

En Europe, des profils de résistance à la pénicilline, l'ampicilline, le méropénème, l'érythromycine et l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole ont été caractérisés dans des souches de *Listeria monocytogenes* isolées en écouvillonnant différentes surfaces dans un atelier de transformation de poissons en Pologne (Skowron et al., 2018). Des souches de *V. parahaemolyticus* isolées de coquillages vendus dans des marchés en Pologne affichaient de hautes valeurs de CMI vis-à-vis notamment de l'ampicilline et de la streptomycine avec respectivement 87,5 % et 70,3 % de résistances phénotypiques chez les souches testées (Lopatek et al., 2015). Abraham et al. (2015) ont isolé des souches d'*Aeromonas* à partir de poissons d'élevage en Italie et analysé les CMI par la méthode de la dilution en milieu liquide. Les souches étaient toutes résistantes à un ou deux antibiotiques parmi l'acide oxolinique, l'amoxicilline, l'ampicilline, la céphalothine, le chloramphénicol, l'érythromycine, la fluméquine, le florfénicol, la gentamicine, la kanamycine, l'oxytétracycline, la streptomycine, la sulfadiazine, la tétracycline et le triméthoprime. Deux souches étaient résistantes à 11 antibiotiques et une était résistante à 12 antibiotiques testés. L'application de technologies moléculaires haut-débit à l'étude du résistome des poissons d'élevage a permis de décrire la présence d'ARG et d'éléments génétiques mobiles, principalement à partir d'échantillons de contenu intestinal, et des ARG ont également été décrits dans certains échantillons de peau et de branchies (Muziasari et al., 2017). Enfin, le séquençage du génome d'isolats d'*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolées d'échantillons cliniques prélevés chez des truites atteintes de furonculose au Danemark a permis Bartkova et al. (2017) de détecter des gènes de résistance aux β -lactamines, triméthoprime, sulfamides, aminosides, phénicoles et tétracycline.

Une étude a été menée sur les niveaux de résistance aux antibiotiques de souches d'*E. coli* et de *S. aureus* isolées de poissons et produits aquatiques vendus dans des supermarchés aux Etats-Unis. Les auteurs ont observé que 41,4 % des *E. coli* et 87 % des *S. aureus* étaient résistants à la ciprofloxacine et 33,3 % des *E. coli* et 61,3 % des *S. aureus* étaient résistants à la gentamicine (Okyere et al., 2018). Des profils de multirésistances ont été détectés dans des bactéries Gram négatives isolées de saumons d'élevage au Chili (Fernández-Alarcón et al., 2010). Il a ainsi été possible d'identifier le gène *floR*, conférant des résistances au chloramphénicol et au florfénicol, dans des bactéries Gram négatives isolées

de saumons d'élevage au Chili (Fernández-Alarcón et al., 2010).

En Australie, des gènes de résistance à la tétracycline, à la streptomycine et des β -lactamases ont été décrits dans des souches d'*Aeromonas* isolées de prélèvements environnementaux ou animaux dans un élevage de truite arc-en-ciel (Ndi and Barton, 2011).

1.2.2 - La filière piscicole en France : production, traitements antibiotiques et antibiorésistance

Comme précisé précédemment, le système piscicole principalement adopté en France est un système d'élevage ouvert (Figure 12), dans lequel les bassins sont alimentés par l'eau de rivière, uniquement filtrée par un filtre mécanique au niveau de la dérivation. Les activités humaines en amont des bassins d'élevage, les conditions climatiques, et les pratiques d'élevage (utilisation de molécules) peuvent impacter, en amont et en aval de l'élevage, l'eau de la rivière et de ce fait l'environnement direct d'élevage des poissons. D'après un rapport de France AgriMer de 2019, portant sur « Les filières pêche et aquaculture en France », la France était en 2018 le 3^e pays d'Europe en termes de volumes de production de poissons, pêche et aquaculture confondues, avec 698 000 tonnes représentant 11 % du total Européen, derrière l'Espagne (18 %) et le Royaume-Unis (14 %). D'après des statistiques Insee parues en 2016, la production continentale de la truite en France représentait en 2018 environ 41 000 tonnes, soit 97 % de la production piscicole française (<https://www.poisson-aquaculture.fr>). Les filets sont vendus à 50 % sous forme « fumés » et 50 % sous forme « crus frais ». Nous n'avons pas trouvé d'information concernant la présentation sous laquelle les filets frais de truite sont le plus souvent vendus. Nous avons donc choisi d'étudier le filet frais entier non conditionné, puisque cette unité de vente, conservée sur glace entre 0°C et +2°C et exposée à l'air libre, est un élément courant dans le commerce.

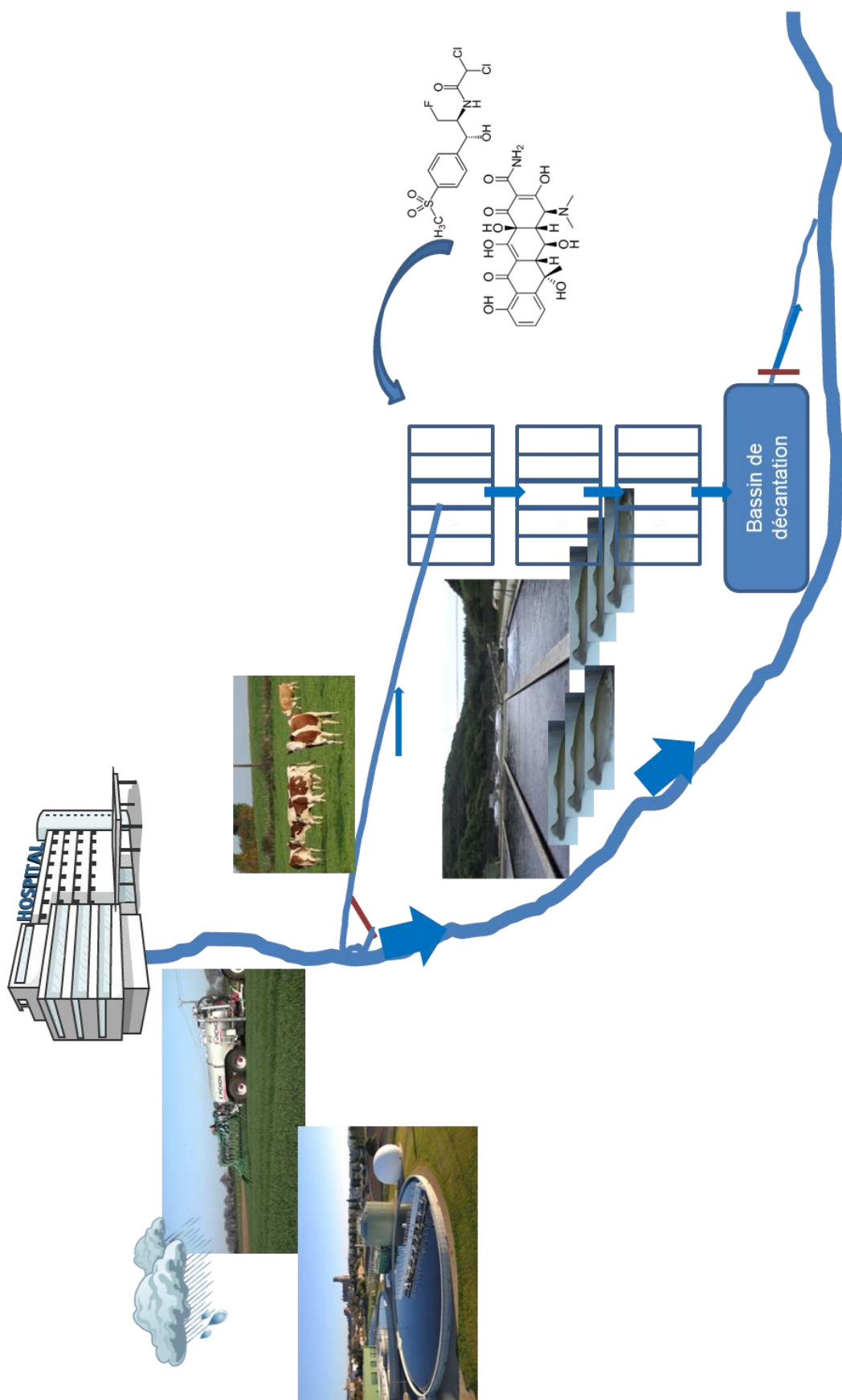


Figure 12 : Représentation schématique d'un élevage piscicole et des activités pouvant favoriser l'apparition de résistances

L'aquaculture, comme toutes les productions animales destinées à la production de denrées pour l'Homme, est soumise à des réglementations strictes concernant la sécurité des denrées issues de la transformation ou des productions de ces animaux et concernant les traitements chimiothérapeutiques pour le maintien de la santé de ces animaux. En effet, les denrées et les aliments pour les animaux de production sont soumis à un cadre réglementaire dont la priorité est d'assurer la sécurité et la qualité tout au long des différentes étapes de sa production. L'Europe a donc décidé d'encadrer tous les acteurs impliqués directement ou indirectement dans la production d'une denrée pour avoir une vision systémique de la chaîne de production alimentaire (Règlement CE N° 178/2002). Ce règlement définit les étapes de la production, de la transformation et de la distribution comme « toutes les étapes, dont l'importation, depuis et y compris la production primaire d'une denrée alimentaire, jusque et y compris son entreposage, son transport, sa vente ou sa livraison au consommateur final, ainsi que le cas échéant, l'importation, la production, la fabrication, l'entreposage, le transport, la distribution, la vente et la livraison des aliments pour animaux ».

L'usage des antibiotiques promoteurs de croissance est interdit depuis 2006 en Europe en vertu des directives 96/22/CE, 2003/74/CE et 2008/97/CE. De même, la décontamination chimique des denrées alimentaires d'origine animale est interdite en vertu du règlement CE No 853/2004, et cette interdiction inclut les substances antibiotiques. Seuls certains antibiotiques possèdent une autorisation de mise sur le marché (AMM) permettant leur administration aux poissons. De fait, toute administration d'un antibiotique doit faire suite à une prescription vétérinaire dans le cadre d'un protocole de soin. L'administration des antibiotiques se fait via l'alimentation des poissons. L'antibiotique est incorporé à l'aliment ou déposé à sa surface à l'aide d'un substrat huileux, à une concentration dépendante de la posologie correspondant à l'infection ciblée et du stade de développement du poisson. Les aliments médicamenteux sont ensuite distribués à l'ensemble du lot à traiter, sans discrimination entre les poissons malades et les poissons sains.

Les antibiotiques ayant une AMM pour les poissons sont le florfénicol, la fluméquine, l'acide oxolinique, l'oxytétracycline et l'association sulfadiazine-triméthoprime. Pour chaque administration et en fonction des molécules, un temps d'attente forfaitaire ou fixé par l'AMM, exprimé en jours ou degrés-jours (la température de l'eau multipliée par le nombre de jours) doit être observé avant l'abattage du

poisson en vue de la production de denrées. Ce temps d'attente doit garantir que la matière première ne contient pas de résidus de l'antibiotique administré au-dessus d'une limite légale appelée « limite maximale de résidus » (LMR) (Tableau 1), qui dépend de la pharmacocinétique de l'antibiotique et de la matière première d'origine animale destinée à être transformée en denrée (ex : muscle, œuf, lait etc...).

Tableau 1 : Indications, temps d'attente et LMR des antibiotiques ayant une AMM pour les poissons.

Antibiotique	Indication principale : infections à	Temps d'attente	LMR
Florfénicol	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	135 degrés-jours	1000 µg/kg
Fluméquine	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Yersinia ruckerii</i> <i>Vibrio anguillarum</i>	2 jours	600 µg/kg
Acide oxolinique	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Yersinia ruckerii</i>	6 jours	100 µg/kg
Oxytétracycline	<i>Lactococcus garvieae</i> <i>Vibrio anguillarum</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	300 degrés-jours	100 µg/kg
Triméthoprime-Sulfadiazine	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Yersinia ruckerii</i> <i>Vibrio anguillarum</i>	500 degrés-jours	50 µg/kg

Cependant, une prescription médicamenteuse hors AMM est possible dans le cadre défini par l'article L4143-4 du Code de la Santé Publique (« système de la cascade »). Dans ce cadre, il peut notamment être prescrit par un vétérinaire un médicament vétérinaire autorisé pour des animaux d'une autre espèce ou pour des animaux de la même espèce mais dans une indication thérapeutique différente, un médicament autorisé pour l'usage humain ou un médicament vétérinaire autorisé dans un autre Etat membre de l'Union Européenne (directive 2001/82/CE). De ce fait, d'autres molécules antibiotiques peuvent être administrées aux poissons, en plus de celles ayant une AMM pour les poissons, à la condition que la LMR de ces molécules soit connue. Le temps d'attente pour les antibiotiques utilisés dans le cadre de la cascade est fixé à 500 degrés jour.

Ce cadre de prescription des antibiotiques dans la filière aquacole garantit le bon usage de ces molécules et permet d'éviter l'émergence de résistances bactériennes aux antibiotiques. Cependant il n'est pas uniforme à travers le monde. Si les réglementations en vigueur en France sont pour la plupart

issues de directives et réglementations européennes, d'autres pays du monde n'exercent pas les mêmes réglementations. C'est pourquoi les résultats issus de la bibliographie ne sont pas toujours comparables en fonction de l'origine des échantillons. La filière d'élevage piscicole contribue donc à l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques, à l'instar des autres productions alimentaires d'origine animale, mais est également exposée à celles-ci à travers l'eau des rivières qui alimente les bassins d'élevage.

Des plans de contrôle ont été mis en place, comme le plan EcoAntibio dont l'objectif est d'une part de limiter l'usage des antibiotiques à usage vétérinaire, toutes filières animales confondues, avec des mesures réglementaires et des campagnes de sensibilisation, et d'autre part de promouvoir des alternatives et les mesures prophylactiques pour limiter ces usages. L'usage d'antibiotiques en aquaculture est également surveillé par différents plans en France, dont le réseau Resapath, qui collecte et rapporte des données d'antibiorésistance issues des filières de production animale, ne comptait dans son rapport de 2018 que 182 antibiogrammes issus de la filière poisson, soit 0,3 % du total, dont 43 % provenaient de bactéries isolées de truites arc-en-ciel. *Aeromonas salmonicida* comptait pour 58 % du total des antibiogrammes reçus. Devant le faible nombre de données collectées, aucune analyse n'avait été réalisée (Anses, 2019b). Il semble donc important de collecter des données d'antibiorésistance des bactéries isolées de la filière poisson pour enrichir les données disponibles et aider à l'établissement de plans de surveillance. De fait, des résistances aux antibiotiques ont été rapportées dans des prélèvements associés à la filière piscicole. Une étude portant sur la résistance aux antibiotiques de souches d'*Aeromonas* et de *Pseudomonas* isolées à partir de prélèvements d'eau, a été menée entre 2004 et 2005 (Gordon et al., 2007). Au cours de cette étude, des antibiogrammes ont été réalisés sur les souches isolées et 10 *Aeromonas* et 32 *Pseudomonas* présentaient des profils de résistance à entre 3 et 6 antibiotiques parmi le florfénicol, le chloramphénicol, la streptomycine, l'oxytétracycline, la ciprofloxacine et l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole. Certaines des souches d'*Aeromonas* résistantes possédaient le plasmide pAB5S9 renfermant plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques dont *floR*, *tetR*, *tetY*, *strB*, *strA* et *sul2* (Gordon et al., 2008). Des résistances phénotypiques concernant le florfénicol, la fluméquine et l'érythromycine ont été observées chez *Yersinia ruckeri*, un pathogène des poissons (Calvez et al., 2014). Finalement, une autre étude menée en 2003 sur des bactéries pathogènes pour les poissons en France (Michel et al., 2003) a décrit des divergences de profils de résistance des

bactéries vis-à-vis du florfénicol et du chloramphénicol. Le florfénicol semblait rester efficace sur la plupart des souches testées. Les souches d'*Aeromonas salmonicida* étudiées étaient en revanche plus résistantes au chloramphénicol. L'hypothèse avancée en conclusion de cette étude était que cette résistance avait pour origine des traitements antérieurs répétés avec le chloramphénicol, et que le florfénicol semblait entraîner moins d'apparition de résistances.

1.2.3 - Ce qu'il faut retenir

Les poissons, les environnements d'élevage et les produits issus de la filière piscicole peuvent être sources de bactéries résistantes aux antibiotiques. Les contextes de production peuvent fortement influencer sur la fréquence de ces résistances. Les antibiotiques administrés aux poissons sont une de ces influences, mais les traitements appliqués aux autres élevages et l'usage des antibiotiques en médecine humaine sont également susceptibles d'impacter la résistance des bactéries du milieu aquacole. C'est pourquoi le pays d'origine des données publiées est à prendre en compte lors de leur analyse.

La plupart des études portent sur la recherche de bactéries pathogènes en santé humaine ou animale et peu d'études portent un regard global sur le niveau de résistance de communautés bactériennes complexes. De plus, les éléments non directement liés à l'antibiorésistance mais pouvant fortement l'influencer, tels que la présence de résidus d'antibiotique, la présence d'installations humaines à proximité du site de prélèvement ou les processus de transformation des denrées par exemple ne sont pas toujours pris en compte. La structure des communautés bactériennes portant les gènes de résistance est un autre élément important dans l'analyse des profils de résistance aux antibiotiques d'un écosystème.

1.3 - Communautés bactériennes associées aux denrées issues de la filière piscicole

Pour obtenir une image plus précise de l'antibiorésistance associée à un milieu, l'étude de la structure des communautés bactériennes de ce milieu est une étape nécessaire. En effet, il est possible que certaines résistances ne soient pas détectées, occultant ainsi le risque de portage de gènes par des

bactéries non-pathogènes pouvant les transmettre à d'autres communautés. De plus, l'avènement des analyses haut-débit peut permettre de relier le résistome et les communautés bactériennes, ce qui offre une caractérisation précise du résistome et des risques pour la santé humaine associés à la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les environnements d'élevage et les denrées d'origine animale.

1.3.1 - Méthodes de récupération des bactéries à partir de la matrice.

Plusieurs méthodes de récupération des bactéries sont utilisées, et le choix dépend principalement du type de matrice dont la flore bactérienne doit être analysée. Partant du principe que le muscle du poisson en bonne santé est un tissu aseptique, la contamination bactérienne du filet est principalement superficielle, que ce soit au niveau de la peau ou à la surface du muscle au moment du filetage. Ainsi, la plupart des méthodes de récupération utilisées sont des méthodes conservant l'intégrité de la matrice. Parmi celles-ci peut être cité l'écouvillonnage de la surface du filet, côté muscle et/ou côté peau (Chen et al., 2010b; Muziasari et al., 2017). Cette méthode a l'avantage d'être facile à mettre en place et de ne récupérer que les cellules bactériennes, emportant parfois une quantité négligeable de cellules superficielles qui se détachent de la matrice. La culture bactérienne ou l'extraction d'ADN à partir de ce prélèvement est ainsi facilitée. Cependant, malgré l'utilisation d'un gabarit pour standardiser la surface écouvillonnée, cette méthode peut poser des problèmes de répétabilité avec une proportion variable de bactéries prélevées (Niskanen and Pohja, 1977; Salo et al., 2000). Elle peut ainsi ne pas convenir pour des analyses nécessitant une grande quantité d'ADN, surtout lorsqu'elle est appliquée à des matrices faiblement contaminées comme le filet frais. Le raclage des surfaces à l'aide d'une lame (de verre ou un scalpel par exemple) offre les mêmes avantages que l'écouvillonnage mais nécessite la présence sur la matrice d'un mucus dans lequel se trouvent les bactéries. Cette méthode présente également des problèmes de répétabilité (Lokesh and Kiron, 2016; Schmidt et al., 2000).

Afin de s'affranchir des problèmes liés à la répétabilité, il est possible de traiter l'ensemble de l'échantillon plutôt qu'une surface estimée représentative. L'immersion de l'échantillon dans une solution et son rinçage mécanique peut être une alternative (Nedoluh et al., 2001; Wang and Silva, 1999).

Cette méthode, principalement utilisée dans les analyses de carcasses de volailles (Sarlin et al., 1998), permet une récupération globale des bactéries présentes à la surface de l'échantillon. L'ajout d'un agent tensioactif dans la solution de rinçage facilite par ailleurs le détachement des bactéries. Cette méthode permet de conserver l'intégrité de l'échantillon et une récupération représentative de la flore bactérienne (Nedoluh et al., 2001) néanmoins, là encore, des problèmes de répétabilité sont rapportés (Hammack et al., 2004). Une autre alternative, qui est la méthode la plus utilisée pour l'étude du microbiote bactérien de denrées alimentaires, et en particulier pour les denrées aquatiques, est la récupération des bactéries à partir des échantillons grâce à un stomacheur, méthode que l'on appellera « stomachage » dans la suite de ce document (Chaillou et al., 2015; Macé et al., 2012). Il permet la meilleure récupération des communautés bactériennes (Nedoluh et al., 2001), mais est destructeur pour l'échantillon. L'utilisation d'un filtre mécanique pendant l'homogénéisation est alors nécessaire pour retenir la plupart des particules de la matrice et ainsi obtenir un homogénat propice à la réalisation des analyses microbiologiques et/ou moléculaires.

1.3.2 - Méthodes d'analyses des communautés bactériennes

1.3.2.1 - Méthodes phénotypiques

La plupart des investigations microbiologiques requièrent l'identification ciblée d'un ou plusieurs genres bactériens ou espèces d'intérêt. Dans ces conditions, les méthodes les plus communes consistent en la mise en culture sur des milieux, sélectifs ou non, des bactéries récupérées à partir de la matrice, suivie d'une identification bactérienne par des méthodes phénotypiques, biochimiques et/ou moléculaires. Ces méthodes sont le plus souvent utilisées pour l'analyse de souches d'intérêt, pathogènes ou altérantes par exemple, mais peuvent également être utilisées pour la caractérisation de communautés bactériennes. Cette « culture haut-débit » implique la mise en culture d'une matrice ou d'un homogénat obtenu à partir d'une matrice, contenant des communautés bactériennes complexes. En appliquant différentes conditions de culture (milieux sélectifs, température, composition en oxygène), il est ainsi possible de favoriser sélectivement la croissance de différentes espèces bactériennes qui sont identifiées par séquençage de l'ADNR 16S ou spectrométrie de masse MALDI-ToF (Lagier et al., 2018).

1.3.2.2 - Méthodes génotypiques

Comme pour la recherche de résistances aux antibiotiques, les méthodes génotypiques, dont la plus utilisée est la PCR, sont complémentaires des analyses phénotypiques mais peuvent également être utilisées en tant que telles pour l'analyse et l'identification de souches ou communautés bactériennes. L'usage d'amorces spécifiques d'un genre ou d'une espèce permet de n'amplifier que l'ADN appartenant à ce groupe et de confirmer l'identification microbiologique ou d'identifier des espèces ou genres d'intérêt sans passer par une étape de culture. Le séquençage de l'ADN bactérien est de plus en plus utilisé pour identifier les souches d'intérêt. Il peut se faire par la méthode de Sanger, dans lequel l'identification des nucléotides de la séquence se fait via la polymérisation d'un brin d'ADN à partir du brin à séquencer avec l'incorporation aléatoire de bases terminatrices de l'élongation. Cette méthode permet de séquencer de courts fragments d'ADN (1000 paires de bases au plus), et ne convient donc que lorsque l'identification de la souche d'intérêt est possible via le séquençage d'un seul gène, tel que le gène de l'ADNR 16S. L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH, de l'anglais *fluorescence in situ hybridization*) peut également être utilisée. Cette méthode permet le marquage en fluorescence de cellules spécifiques en fonction des sondes utilisées et l'évaluation visuelle par microscopie de la présence ou de l'absence des bactéries d'intérêt. L'identification bactérienne peut également se faire via l'hybridation de l'ADN bactérien sur des puces à ADN pour le séquencer. Ces méthodes nécessitent l'usage de sondes spécifiques, ce qui exclut son usage pour l'identification de communautés complexes. Ces méthodes concernent donc l'analyse de souches bactériennes isolées, mais ne conviennent pas à l'analyse de communautés bactériennes complexes.

Les méthodes haut-débit permettent d'augmenter le nombre d'amplification pour séquencer le génome entier d'une souche ou pour caractériser des communautés complexes. Le séquençage *shotgun* permet de séquencer des génomes entiers voire des métagénomes, soit le génome d'une population bactérienne complexe. Dans ce cas, l'ADN est décomposé en petits segments aléatoires qui sont séquencés selon la méthode de Sanger, puis assemblés par chevauchement de leurs extrémités pour reconstruire la séquence initiale de la souche d'intérêt. Cette méthode permet donc le séquençage de plus grands fragments mais nécessite l'analyse de très grandes quantités de données et peut être sujet à

des erreurs d'alignement. Caractériser non plus une ou plusieurs espèces d'intérêt mais l'ensemble des communautés permet de s'affranchir de l'étape de sélection du nombre et du type de souches à étudier. Il est ainsi possible de connaître la diversité et la richesse des communautés associées à un échantillon et d'étudier leur variation dans différentes conditions d'expérimentation ou de prélèvement. Les méthodes les plus utilisées pour l'étude sans a priori des communautés bactériennes associées à une matrice ou à un environnement sont les méthodes de séquençage haut-débit (HTS de l'anglais *high-throughput sequencing*). Parmi celles-ci, l'amplification, le séquençage et l'affiliation des variantes d'un gène spécifique tel que le gène de l'ADNR 16S permet d'obtenir une image globale des communautés bactériennes. Différentes technologies sont utilisées, parmi lesquelles le pyroséquençage 454 et le séquençage Illumina peuvent être citées. Le pyroséquençage est une méthode de séquençage par synthèse. En effet, le brin d'ADN à séquencer sert de matrice à la synthèse de son brin complémentaire. Les solutions de dNTP (désoxyribonucléotides-triphosphates) A, T, G et C sont ajoutées une par une et à chaque ajout, l'ATP produit par sulfuration d'un pyrophosphate permet l'action d'une luciférase, ce qui émet un signal lumineux d'intensité proportionnelle au nombre de nucléotides ajoutés à la séquence. La séquence nucléotidique du fragment d'ADN initial peut ainsi être déduite. Le séquençage en parallèle d'un grand nombre de fragments différents fixés sur un support solide permet l'application de cette technologie au séquençage haut-débit et à la caractérisation de flores bactériennes complexes. Les limites de cette technologie résident dans sa précision et dans la faible taille des lectures obtenues (300 à 500 nucléotides). Le séquençage Illumina repose sur le signal fluorescent spécifique émis par le dNTP lorsqu'il est introduit dans le brin d'ADN en cours d'élongation (Figure 13). Le brin d'ADN à séquencer est tout d'abord coupé en segments (appelés « tags ») à l'extrémité desquels sont attachés des adaptateurs. Les sites de liaisons des amorces, les séquences terminales et des index sont ensuite ajoutés au tag. Les indexes servent à identifier les séquences provenant d'un même échantillon, ce qui permet de séquencer plusieurs échantillons à la fois. Les séquences terminales permettent de lier le fragment d'ADN à la cible solide sur laquelle l'amplification et le séquençage auront lieu, appelée flow cell. Celle-ci est couverte d'oligonucléotides complémentaires des séquences terminales, et la liaison des deux permet l'attachement du tag à la flow cell. L'étape suivante est la génération des clusters, c'est-à-dire des groupes d'amplicons synthétisés à partir d'un même tag. Pour cela, les tags s'attachent par leur

séquence terminale libre à un oligonucléotide complémentaire proche en formant une structure en pont. La polymérase s'attache ensuite à ce point et synthétise le brin complémentaire du brin anti-sens, qui a donc la même séquence que le tag. L'amplicon double-brin est ensuite dénaturé et le résultat est deux brins complémentaires séparés, attachés chacun à la flow cell par une séquence terminale. Ce processus se répète un grand nombre de fois jusqu'à obtenir un cluster de copies d'un même tag, toutes regroupées dans la même zone de la flow cell. A la fin de l'amplification, les brins anti-sens sont éliminés de la flow cell pour ne laisser que les brins sens qui seront séquencés via la synthèse d'un brin complémentaire avec des dNTP fluorescents. L'émission d'une fluorescence signifiant l'addition d'un dNTP au brin en cours d'élongation, il est possible de connaître la séquence du brin matrice.

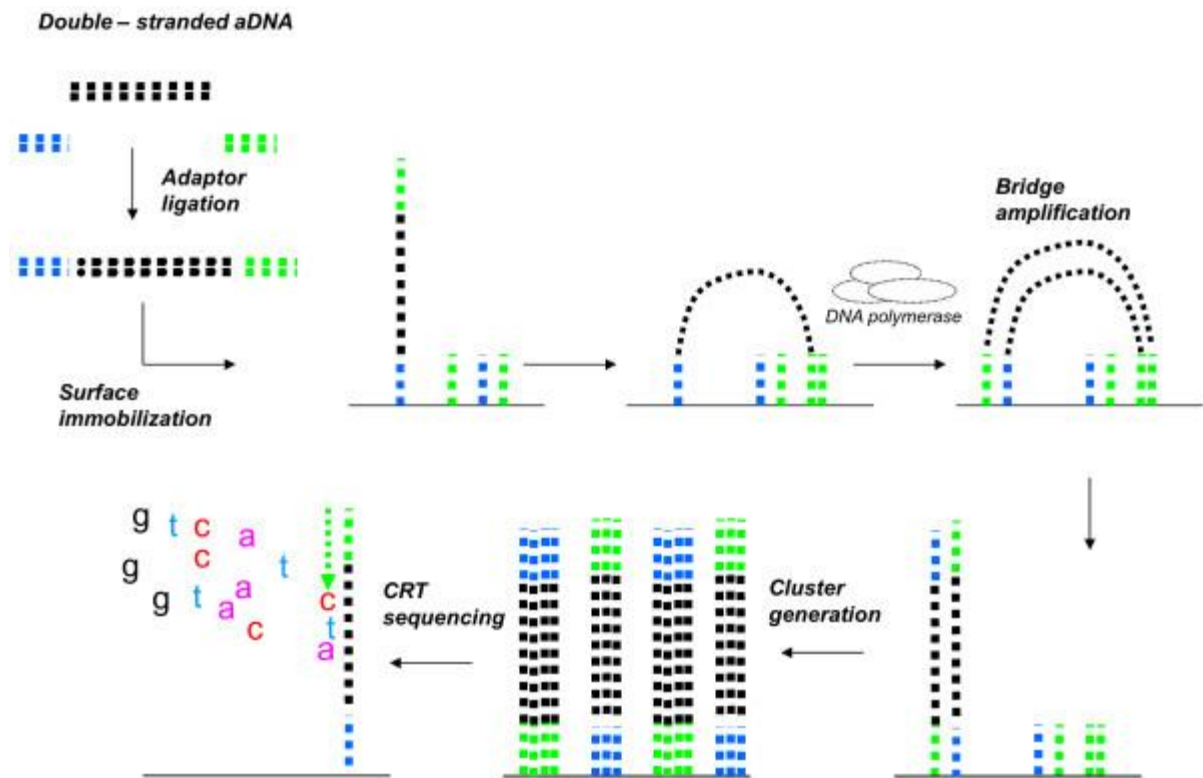


Figure 13 : Représentation schématique du processus d'amplification et de séquençage utilisé pour le séquençage Illumina.
D'après Rizzi et al. (2012).

L'identification des communautés bactériennes par ces méthodes impliquant le séquençage de l'ADN nécessite l'étude du génome entier ou d'un ou plusieurs gènes caractéristiques. Le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S est le plus utilisé et le plus connu, c'est le gène pour lequel les banques de données sont les plus riches. Il est constitué de plusieurs régions appelées V1 à V9. Pour les analyses

de métagénomique, les régions V1-V3 et V3-V4 sont les plus souvent ciblées, et la longueur de ces cibles permet une meilleure identification des communautés présentes mais augmente le risque d'erreurs dans l'identification des bases (Soriano-Lerma et al., 2020). Il est également possible de séquencer les gènes *gyrB* (Barret et al., 2015; Poirier et al., 2018) ou *rpoB* (Vos et al., 2012) par exemple. Les gènes séquencés pour l'identification des communautés bactériennes doivent posséder un taux élevé de substitution des bases dans leur fragment hypervariable, ce qui permet de discriminer les différentes versions du gène en fonction de l'espèce qui le possède. Le gène *gyrB* possède est le plus variable entre les différentes souches, ce qui permet une identification des taxa au niveau de l'espèce voire de la sous-espèce (Poirier et al., 2018). Cependant les bases de données auxquelles les amplicons doivent être comparées pour l'identification ne sont pas aussi fournies que pour l'ADNR 16S, ce qui fait de ce dernier le gène préférentiel pour les analyses des communautés bactériennes. Le séquençage *shotgun* peut également être appliqué à l'étude de communautés microbiennes complexes. Il permet de combiner l'affiliation des séquences permettant l'identification bactérienne à l'étude d'autres gènes du métagénome. Les gènes détectés peuvent ainsi être associés à leur environnement génomique et connaître la communauté bactérienne dans laquelle il est présent.

Ces méthodes de séquençage haut-débit nécessitent une forte quantité de bactéries sur la matrice et un ADN de bonne qualité (sans inhibiteurs, sans ADN de matrice etc...). Ce problème de sensibilité peut être contourné en enrichissant la flore bactérienne de la matrice, en stockant celle-ci dans des conditions d'incubation permettant la croissance bactérienne par exemple, mais les conditions choisies sélectionnent alors les bactéries qui vont se multiplier et impose un biais de sélection. Elles nécessitent également une analyse bio-informatique des données obtenues. Les séquences doivent être regroupées en fonction de leur similitude pour former des clusters qui correspondront à une unité taxonomique unique (OTU de l'anglais *operational taxonomic unit*). Plus le cluster contiendra des séquences et plus il représentera une communauté dont l'abondance relative au sein de l'échantillon sera forte. Ils seront ensuite confrontés à une base de données regroupant les séquences connues du gène utilisé pour l'identification afin d'être affiliés, ce qui permettra de connaître les types de communautés présentes dans l'échantillon.

D'autres méthodes et technologies de séquençages et analyse du microbiote bactérien peuvent être utilisées. Peuvent être citées par exemple le séquençage Ion Torrent, dans lequel la base ajoutée pendant l'élongation du brin d'ADN est identifiée par la libération d'un proton H^+ au moment de son insertion. Un autre exemple est la technologie Nanopore qui séquence les brins d'ADN en identifiant les nucléotides qui passent à travers un pore, ce qui fait varier un courant électrique en fonction du nucléotide passant à travers le pore.

La caractérisation d'un écosystème associé à une denrée alimentaire implique l'évaluation de la structure des communautés bactériennes associées à travers leur richesse (le nombre d'OTU au sein d'une communauté) et leur abondance (la proportion relative des OTU). Différents indices de diversité peuvent être utilisés, pouvant exprimer la diversité intrinsèque d'un échantillon (α -diversité) ou la diversité entre les échantillons d'une population (β -diversité). La richesse, aussi appelé *Observed*, est un de ces indices d' α -diversité. L'indice de Chao1 permet d'estimer le nombre d'espèces dans le prélèvement à partir du nombre d'OTU dans l'échantillon, et les indices de Shannon et de Simpson (ou *Inverted-Simpson*) expriment l'équilibre entre les différentes OTU d'un échantillon en prenant en compte l'abondance relative des OTU au sein de l'échantillon. De même que les indices d' α -diversité, les indices de β -diversité peuvent refléter l'uniformité de la présence d'OTU au sein des échantillons ou leur spécificité à certains échantillons (indice de Jaccard), ainsi que leur abondance relative d'un échantillon à l'autre (indice de Bray-Curtis). Ils peuvent également exprimer ces informations en prenant en compte la distance taxonomique entre les OTU des communautés bactériennes (respectivement indice Unifrac et Weighted-Unifrac).

1.3.3 - Présence de bactéries pathogènes

Comme pour l'analyse de la résistance aux antibiotiques, le principal objectif de l'étude de la flore associée à l'élevage piscicole et aux denrées est la recherche de bactéries pathogènes pour l'homme et la caractérisation du risque pour les consommateurs. En 2017, les denrées d'origine piscicoles étaient responsables de 12,8 % des infections alimentaires déclarées en Europe (EFSA, 2018). Le principal agent responsable était l'histamine, suivie des biotoxines marines. Les principaux agents bactériens

étaient *Salmonella* et *Vibrio parahaemolyticus*. Les listérioses constituent également un risque potentiel puisqu'il a été rapporté que 6 % des produits poissons ou dérivés testés étaient positifs pour *L. monocytogenes*. (EFSA, 2018). Dans une étude chinoise publiée en 2010, des *L. monocytogenes* ont été décrites dans des filets frais et congelés de poisson-chats ainsi que dans des prélèvements réalisés dans l'atelier de transformation (Chen et al., 2010b). L'analyse de poissons, crustacés et coquillages destinés à la consommation a permis la détection de souches de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* et de *P. aeruginosa* (Boss et al., 2016). Il est donc possible que les poissons et produits aquatiques soient source de bactéries pathogènes dont certaines peuvent causer des infections alimentaires, et/ou peuvent présenter des profils de résistance pouvant conduire à des échecs thérapeutiques ou à la diffusion de ces résistances dans le microbiote intestinal des consommateurs.

1.3.4 - La flore bactérienne des animaux de production et des denrées en pisciculture

Si la plupart des études portent sur la présence de bactéries pathogènes associées aux poissons, la flore bactérienne non pathogène est un élément d'importance dans l'étude de l'antibiorésistance parce qu'elle peut participer à la diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement.

Cette flore bactérienne est variable en fonction de l'espèce à laquelle appartient l'hôte, mais il existe également une variabilité inter-individuelle au sein des espèces (Chiarello et al., 2015; Larsen et al., 2013; Tarnecki et al., 2016). L'environnement dans lequel les poissons évoluent influe également sur le microbiote bactérien de leur peau (Lokesh and Kiron, 2016). Cependant, les communautés bactériennes de la peau des poissons ont été décrites comme étant plus diverses et phylogénétiquement différentes de celles retrouvées dans l'eau environnante (Chiarello et al., 2015; Z. Zhang et al., 2018). Le stade de développement de l'hôte est également un facteur de variation du microbiote (Z. Zhang et al., 2018). Dans une étude publiée par Chaillou et al. en 2015, une analyse métagénomique par pyroséquençage du microbiote bactérien de filets de saumon et de cabillaud a montré qu'ils étaient principalement composés de Proteobacteria et de Bacteroidetes, dont l'origine était majoritairement environnementale (eau, sédiments, sol).

Le microbiote de la peau de la truite arc-en-ciel est également composé de Proteobacteria et de Bacteroidetes (Lowrey et al., 2015; X. Zhang et al., 2018), ainsi que de Tenericutes et de Firmicutes (Lowrey et al., 2015). Ces phyla sont également retrouvés dans le microbiote intestinal de la truite arc-en-ciel (Wong et al., 2013). Finalement, des analyses ont été réalisées sur des filets entiers (chair et peau). Nedoluh et al., (2001) ont identifié des *Aeromonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* et *Shewanella* dans des filets de truite arc-en-ciel grâce à des méthodes culturales. L'analyse par séquençage de l'ADNR 16S des communautés bactériennes de filets entiers de saumon, tilapia et poisson-chat a permis d'observer une dominance des Gammaproteobacteria et des Firmicutes (Okyere et al., 2018).

1.4 - Stratégie adoptée pour la caractérisation des communautés bactériennes et des profils de résistance aux antibiotiques

Au cours de cette analyse bibliographique, il apparaît que le microbiote bactérien associé au poisson en tant que denrée alimentaire est influencé par la composition de la denrée, par exemple le filet avec ou sans peau mais surtout les environnements, tels que ceux de l'élevage des animaux producteurs, incluant leurs pratiques d'utilisation des traitements antibiotiques, et ceux de la transformation et des ateliers agro-alimentaires. Un manque d'études globales portant sur ces denrées d'origine aquacole, a fortiori sur les filets frais, a été observé, de même qu'un manque d'études croisant les différents types de données notamment phénotypiques et génotypiques des communautés bactériennes avec des facteurs influençant la résistance aux antibiotiques – la présence de résidus d'antibiotiques, la présence de gènes et la présence et la résistance aux antibiotiques de genres bactériens identifiés comme pathogènes (humain ou animal) ou porteurs naturels de résistance.

Pour toute caractérisation du microbiote bactérien et de son profil, nous avons vu que les méthodes engagées nécessitent de récupérer ce microbiote bactérien. Or, si des études existent sur la comparaison de méthodes d'analyse des communautés bactériennes (Neilson et al., 2013), le choix des gènes cibles (Poirier et al., 2018; Vos et al., 2012) ou la méthode d'extraction de l'ADN adéquat en fonction de la matrice (Psifidi et al., 2015), peu d'études questionnent les méthodes de récupération des

bactéries à partir de cette matrice filet (Nedoluh et al., 2001; Rouger et al., 2017). Cette étape est pourtant un élément primordial dont il convient de connaître les capacités et limites pour interpréter les résultats obtenus grâce aux analyses qui la suivent. Elle peut influencer la nature des communautés récupérées ou la quantité et la qualité de l'ADN pour les analyses moléculaires. Il a donc été décidé de commencer cette thèse par une analyse méthodologique permettant de décider quelle méthode de récupération conviendrait à la caractérisation des communautés bactériennes des filets de truite arc-en-ciel et de leurs profils de résistance aux antibiotiques.

Afin de correspondre le plus possible à une réalité commerciale en lien avec les pratiques actuelles en France, la matrice retenue pour constituer l'échantillon est la chair du poisson recouverte de la peau, conservée à l'air et sous froid positif, c'est-à-dire le filet frais.

Les temps suivants ont été consacrés à la stratégie de prélèvement et au calibrage des méthodes de biologie moléculaire envisagée afin de construire notre « design expérimental » en situation de terrain. Plusieurs questions à ce stade nécessitaient une réponse :

- A quelles étapes de la chaîne de production se placer ?
- Quels effectifs de poissons prélever pour quelle capacité de détection ?
- Quels échantillons pour quelle analyse : phénotypique, génotypique, chimique ? (Figure 14)
- La présence d'une possible faible charge bactérienne de ces filets est-elle une limite à la mise en œuvre des techniques de haut débit ?

Enfin, une étude complémentaire expérimentale ayant conduit au « vieillissement microbiologique » de filets a été réalisée.

Comme mentionné dans l'introduction, les chapitres successifs de ce manuscrit présenteront ainsi ces étapes de travail.

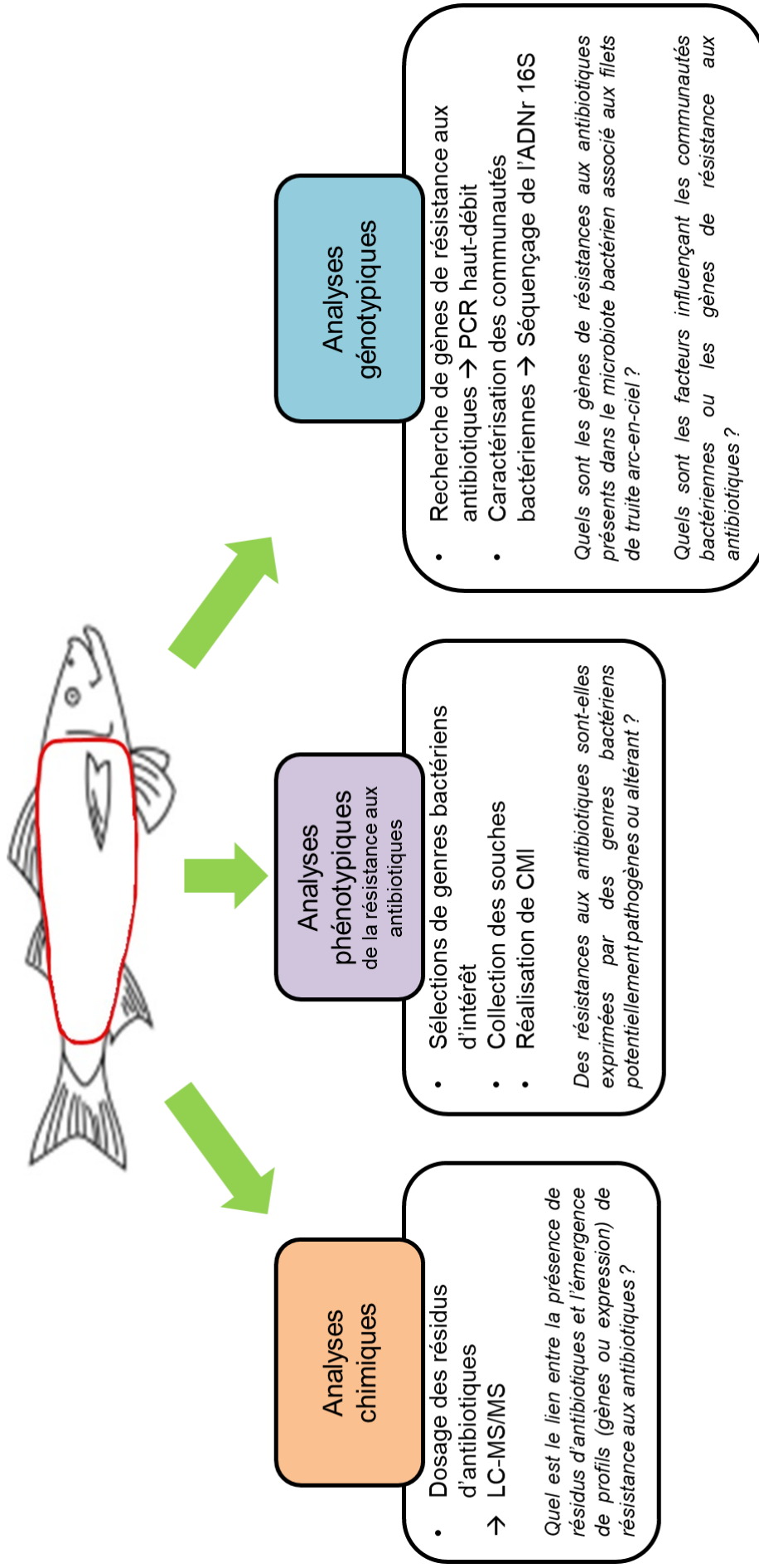


Figure 14 : Stratégie suivie pour la caractérisation des communautés bactériennes et des profils de résistance aux antibiotiques dans les filets de truite arc-en-ciel

Chapitre 2 : Mise au point de la méthode de récupération du microbiote bactérien et de son ADN

2.1 - Préambule

La matrice étudiée, le filet (chair + peau) frais de truite arc-en-ciel, possède une charge bactérienne *a priori* estimée faible et un certain nombre d'éléments histologiques et biochimiques (présence de mucus, de tissu adipeux, de chair, d'inhibiteurs etc...) qui peuvent être des freins à une récupération aisée de bactéries et à leur analyse (Schrader et al., 2012). La prise en compte de ces paramètres pour la conception d'un protocole fiable de récupération des bactéries et de leur ADN est donc nécessaire avant de réaliser les prélèvements terrain. En effet, le protocole de traitement des échantillons peut faire varier les données obtenues de façon i) qualitative, auquel cas certains éléments que nous souhaitons rechercher - bactéries, gènes de résistance - pourraient ne pas être détectés, ou ii) quantitative, auquel cas l'abondance relative ou absolue de ces éléments pourraient être mésestimée. La levée de ce premier verrou technique avec la mise au point d'un protocole expérimental calibré a été un préalable avant d'engager des analyses de qPCR et de séquençage haut débit sur des échantillons en provenance du terrain en plus grand nombre.

L'utilisation d'une bactérie inoculée a été proposée, servant de « témoin » et permettant de quantifier un rendement de récupération à partir de la matrice, à plusieurs étapes du protocole, puis d'extraction de leur ADN. Il s'agit pour cette matrice de l'espèce bactérienne *Brochothrix thermosphacta*. En effet, cette bactérie a été rarement retrouvée dans la flore cultivable du poisson frais (Lowrey et al., 2015), ce qui limite le risque d'une interaction entre les bactéries endogènes et la contamination appliquée sur les échantillons. Deux méthodes de récupération des bactéries depuis la matrice, le stomacage et le rinçage mécanique, ont été retenues suite à l'analyse de la bibliographie.

Le protocole que nous avons développé devait nous permettre de faire un choix entre ces deux

méthodes pour une mise en œuvre ultérieure en permettant :

- d'évaluer la capacité de récupération de la flore bactérienne « totale » et du témoin *Brochothrix thermosphacta* via le calcul du rendement de récupération.

- d'évaluer par une quantification moléculaire - qPCR du gène *rpoC* de *Brochothrix thermosphacta*, et du gène *tuf* pour la flore totale). - la qualité et la quantité de l'ADN extrait de ces bactéries.

- de rechercher un optimum coût/temps de réalisation pour permettre une mise en œuvre ultérieure sur un nombre élevé d'échantillons.

Ce travail sera présenté sous la forme de la publication scientifique acceptée dans la revue *Journal of Food Protection* en mars 2020.

2.2 - Comparison of Stomaching versus Rinsing for Recovering Bacterial Communities from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fillets

Research Note

Comparison of Stomaching versus Rinsing for Recovering Bacterial Communities from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fillets

Nicolas Helsens^{a,b*}, Ségolène Calvez^b, Agnès Bouju-Albert^a, Albert Rossero^a, Hervé Prévost^a, Catherine Magras^a

^aINRAE, Oniris, SECALIM, 44300, Nantes, France

^bINRAE, Oniris, BIOEPAR, 44300, Nantes, France

Keywords: Rainbow trout fillets, rinsing, stomaching, bacterial recovery, DNA extraction, bacterial communities

*Corresponding author: Nicolas Helsens nicolas.helsens@oniris-nantes.fr

Tel: +33 2 40 68 76 79; Fax: +33 2 40 68 77 51

Abstract

The use of high-throughput methods allows a better characterization of food-related bacterial communities. However, such methods require large amounts of high quality bacterial DNA, which may be a challenge when dealing with a complex matrix that has a low concentration of bacteria like fresh fish fillets. Therefore, the choice of method used to recover bacteria from a food matrix in a cost-effective way is critical, yet little information is available on the performance of commonly used methods. We assessed the recovery capacity of two such methods: stomaching and mechanical rinsing. The efficiency of the methods was evaluated through the quantitative recovery and compatibility with end-point qPCR. Fresh rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets were inoculated with a bacterial marker, *Brochothrix thermosphacta*, at different concentrations (7.52 to 1.52 log CFU/g). The fillets were processed by one of the two methods and the recovery of the marker in the suspensions was

assessed by plate counting and qPCR targeting *B. thermosphacta-rpoC*. The same analyses were performed on 6 non-inoculated fresh fillets. Stomaching and mechanical rinsing allowed an efficient and repeatable recovery of the bacterial communities from the 42 inoculated fillets. No significant differences of Recovery Ratios were observed between the marker enumerated in the inoculation suspensions and in the corresponding recovery suspensions after rinsing and stomaching. However, the stomaching method allowed too many particles to pass through the filters bag, making necessary a limiting supplementary filtration step. As a consequence, only the rinsing recovery method allowed a proper PCR quantification of the inoculated *B. thermosphacta*. The mean recovered bacterial level of the fillets was around 3 log CFU/g. It seems more relevant and cost-effective to recover the endogenous bacterial microbiota of a fish fillet structure using the rinsing method rather than the stomaching method.

Highlights:

- Stomaching and mechanical rinsing allow a satisfying quantitative bacterial recovery.
- The mechanical rinsing method allowed the best PCR quantification of bacteria.
- A standardized rinsing is recommended for the recovery of food bacterial communities.

2.2.1 - Introduction

The bacterial communities of foodstuffs can carry hazards of low occurrence, such as pathogenic bacteria or antimicrobial-resistant bacteria. Currently, the use of standard microbiological methods alone may not be adapted to the analysis of the wide variety of foodstuff-related bacteria. The investigation of rare events like patterns of antibiotic resistance genes (ARGs) in small food bacterial communities may encounter challenges, such as uncultivable states or too many bacterial detection conditions (Allen, 2014). High-throughput methodologies such as functional metagenomics (Mullany, 2014) or high-throughput qPCR (Waseem et al., 2019) can be used, but they require a large amount of bacterial DNA (500-1000 ng for 454 sequencing) (Thomas et al., 2012). A key element in these methodologies is the extraction of bacterial DNA from a contaminated matrix, which relies greatly on the recovery of the bacteria from the matrix. Furthermore, many events occur only in a small proportion of the tested

samples. As such, it becomes necessary to process many samples to investigate them.

Fish products are particularly interesting subjects to observe the contribution of environments to the biodiversity of this food's bacterial communities, as raceways are exposed to elements in the water (Woolhouse et al., 2015), sediments (Novais et al., 2018) and the processing environment (Skowron et al., 2018). Fish-related foodstuffs are also widely produced and consumed (more than 20 kg per capita, globally in 2016) (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020b). The rainbow trout, a major freshwater species raised mostly in western Europe (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017) is of interest for assessing the impact of a river environment.

A fish fillet is a complex matrix consisting of skin with mucus, muscles and a thin layer of adipose tissue, which may interfere with the DNA extraction yield and the capacity of the bacteria recovery methods. This is why extracting the bacterial communities in a reliable way may present a challenge of its own (Fosse et al., 2006; Nedoluh et al., 2001). Several methods are used to isolate the microbiota. Some protocols include the scrapping of fish mucus with a glass slide (Fernández-Alarcón et al., 2010; Lokesh and Kiron, 2016) or the swabbing of fishes (Chen et al., 2010a; Muziasari et al., 2017). Although non-destructive, these methods appear to lack precision in the recovery, especially on such a tissue matrix (Gill and Badoni, 2005; Niskanen and Pohja, 1977). In fact, the ability of bacteria to adhere to tissue and fish skin varies, mainly due to the mucus composition (Benhamed et al., 2014; Shephard, 1994). The most commonly used recovery method is the stomaching of a sample in a saline buffer (Chaillou et al., 2015; Macé et al., 2012). It allows the best recovery ratio and is preferentially used to extract bacterial communities from food matrices with similar tissue structure, such as beef, pork skin and chine, and fish (Alnajrani et al., 2018; Nedoluh et al., 2001). However, stomaching can destroy the structure of the fish fillet and can produce a suspension densely charged with eukaryote cells and tissue debris. The rinsing method is mainly used for analyses of whole poultry carcasses (Sarlin et al., 1998). It has a satisfactory recovery capacity, albeit slightly lower than that of the stomaching method (Nedoluh et al., 2001), but may present some repeatability issues (Hammack et al., 2004).

Although some studies have shown that the biodiversity of the endogenous bacterial communities of fish fillets is high (Galié et al., 2018; González et al., 1999), it seems that the level of contamination is in contrast low. It is between 2 and 4 log CFU/cm² for fish fillets (Austin, 2006), and

between 3.5 and 5 log CFU/cm² according to the criteria of mesophilic aerobic count authorized by the DGAL/SDSSA/2015-619 instructions. In fact, while the muscles of healthy animals, including fishes, do not contain micro-organisms (GILL, 1979), endogenous bacterial communities are constituted during transformation processes with varying hygiene standards. These bacterial communities can originate from a primary contamination, where the bacteria are directly transferred from a reservoir to the matrix. This happens, for example, when intestinal contents or elements from the skin surface contaminate the muscle during processing. The contamination can also be secondary, resulting from a crossed-contamination, when the surfaces or materials are sullied by previous foodstuffs and act as intermediary media. In rainbow trout, and more generally in fish, primary muscle contamination can originate from the skin mucus, gills or digestive tract. This depends on the season and the type of farming system involved (Chytiri et al., 2004; González et al., 1999), and on the processing environment (Galié et al., 2018).

This study aimed to carry out and assess the efficiency of two methods, mechanical rinsing and stomaching, to extract endogenous bacterial DNA from rainbow trout fillets in order to analyze the bacterial communities using conventional and molecular methods.

2.2.2 - Material and Methods

2.2.2.1 - Rainbow trout fillet samples.

The fishes, from a French fish farm, were stunned according to animal welfare regulation (Council Regulation (EC) No 1099/2009), transported on ice to the laboratory, and filleted within six hours after slaughtering. The fillets were then stored at -20 °C until use, then they were thawed at 6 °C for 14-16 hours before use. Sections of 30-g fillet (1 to 1.5 cm thickness and a skin surface of about 25 cm²) were removed under sterile conditions (Figure 15).

2.2.2.2 - Bacterial marker and sample inoculation.

The *Brochothrix thermosphacta* DSMZ 20171 strain was used as a marker. As it is rarely found on the surface of fresh fillet skin (Lowrey et al., 2015), endogenous *B. thermosphacta* are not expected to interfere with the results. It is easily cultivable under aerobic conditions and because it is not pathogenic, it is easy and safe to manipulate. As a Gram-positive bacterium, DNA extraction is usually reported to be harder compared to Gram-negative bacteria. A frozen culture of the strain was transferred to be cultivated at 25 °C for 48h on BHI Agar (Brain-Heart Infusion, BD, Germany), and then was grown in BHI broth at 25 °C in order to obtain a 10⁹ CFU/mL culture. Eight milliliters of this liquid culture were centrifuged at 10 000 g for 3 min. The supernatant was discarded and the cell pellet was re-suspended in 2 mL saline solution (water + 9 % NaCl). The resulting 4-fold concentrated cell suspension (4 x 10⁹ CFU/mL). was serially 10-fold diluted in saline solution. The inoculates ranged 4 x 10⁹ CFU/mL to 4 x 10³ CFU/mL (Figure 15). The skin surface of the fillet samples was inoculated using a calibrated spray device in order to obtain a homogenous repartition of the bacteria. 250 µL of the 4-fold concentrated inoculates were vaporized to obtain a *B. thermosphacta* inoculation of 10⁹ to 10³ CFU/sample corresponding to 7.52 to 1.52 log CFU/g. After inoculation samples were maintained for 15 min at room temperature.

2.2.2.3 - Stomaching method.

Each inoculated sample was pummeled with 120 mL of sterile Peptone Buffer Saline (PBS) (Interchim, France) supplemented with 1 % (v/v) Tween 80 (VWR, France) for 4 min in a stomacher bag with a 63 µm porosity filter (BagPage+ 400 F, Interscience, France). To reduce the rainbow trout cells contamination, 9 mL of the recovery suspension were filtered under centrifugation (10 000 g, 10 min) using two NucleoSpin Filters Midi (Macherey-Nagel, France). The supernatant was then eliminated and the pellet was re-suspended in 9 mL of saline solution for *B. thermosphacta* enumeration, then was centrifuged again at 10 000 g for 10 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was stored at -20 °C until DNA extraction.

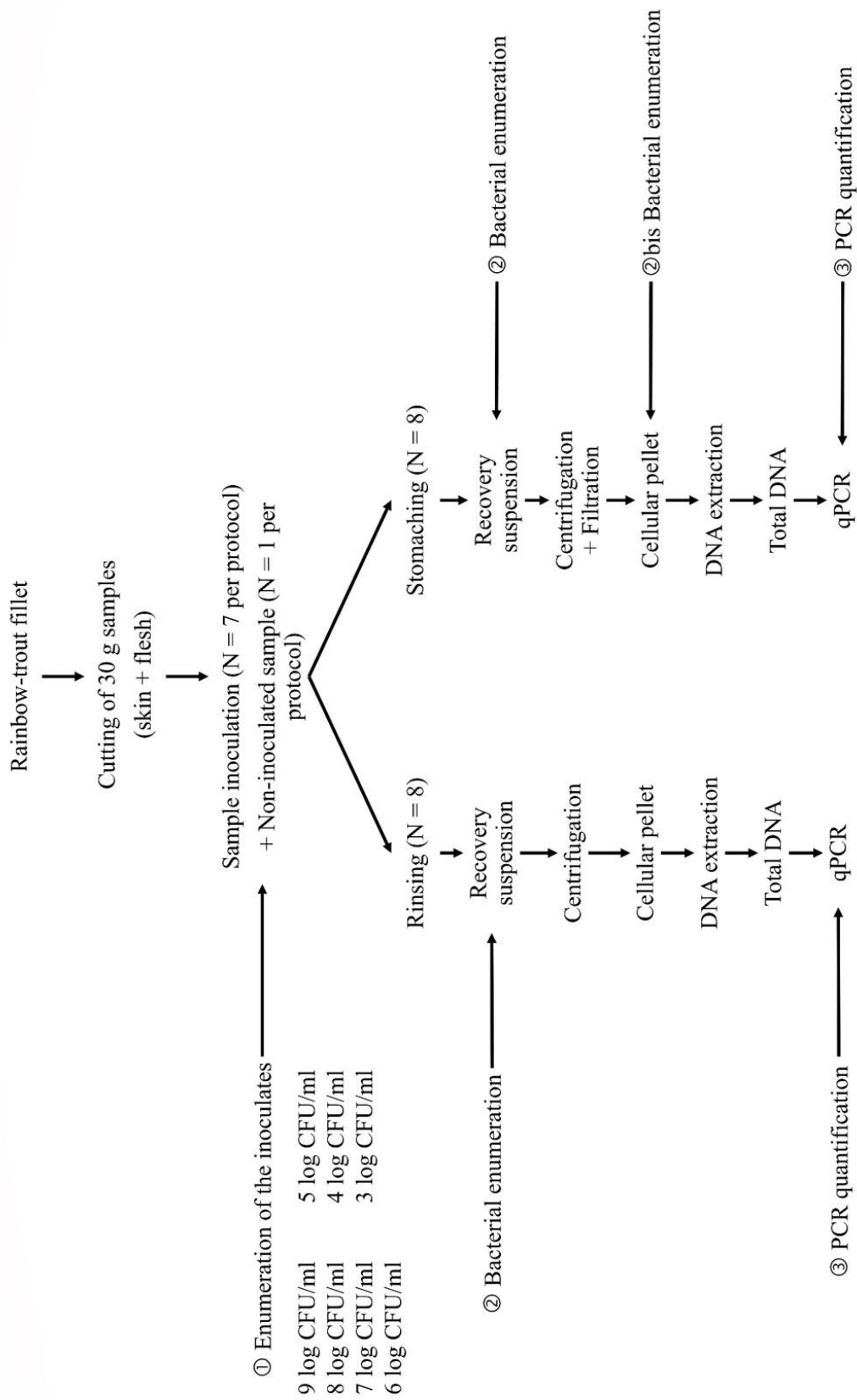


Figure 15 : Schematic representation of the protocols

2.2.2.4 - Rinsing method.

Each inoculated sample was placed with 50 mL of Peptone Buffer Saline (PBS) (Interchim, France) supplemented with 5 % Tween 80 (VWR, France) in a stomacher bag with a 63 µm porosity filter (BagPage+ 400 F, Interscience, France). Then the sample was gently massaged by hand for one minute then mechanically agitated using a Laboshake© lateral shaker (Gerhardt, Germany) at 350 oscillations/min for 4 min. The resulting suspension was centrifuged at 17 000 g for 15 min. The supernatant was discarded and the pellet was stored at -20 °C until DNA extraction.

Each protocol was performed in triplicate, each time on 8 samples, namely 7 inoculated samples and one non-inoculated sample.

2.2.2.5 - Bacterial counts.

B. thermosphacta was spread plated on Streptomycin-Thallos Acetate-Actidione (STAA) agar plates supplemented with STAA Selective Supplement (Oxoid, United Kingdom), then incubated at 25 °C for 48 h. Aerobic viable bacteria were spread plated on plate count agar (PCA) (Merck, Germany), inoculated plates were incubated at 15 °C for 48 h. The *B. thermosphacta* and aerobic viable bacteria were enumerated in the inocula, in the recovery suspensions and in the re-suspended pellets. Enumerations were performed in triplicate.

2.2.2.6 - Calculation of the Recovery Ratios.

The mean concentration (CFU/mL) of recovered *B. thermosphacta* in the suspensions was calculated as follows (Figure 15):

$$\text{Bacterial enumeration obtained at step ①, ②, ②bis (CFU/mL)} = \frac{\sum_{r=1}^3 n_r \times F_r}{3} \times \frac{T}{V}$$

Where n is the number of colonies on STAA plate r, F is the dilution factor, V is the volume of the bacterial suspension streaked on one plate, and T is the total volume of the bacterial suspension. The number of fillet recovered bacteria (log CFU/g) then was deduced and the bacterial Recovery Ratio (RR)

was calculated from inoculated fillet counts (IC) and the recovery suspension counts (RSC) obtained after stomaching and after the filtration step for the rinsing method, as follows:

$$\text{Recovery Ratio (RR \%)} = \left(1 - \frac{\text{IC} - \text{RSC}}{\text{IC}}\right) \times 100$$

2.2.2.7 - DNA extraction.

The rinsing or stomaching pellet was re-suspended in 400 μL of lab-made lysis solution pH 4 (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1.2 % Triton X-100 (Sigma, USA), 20 mg/mL lysozyme (Euromedex, France)). The lysis was performed at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h. The suspension was transferred in microtubes containing acid-washed glass beads (150-212 μm diameters) (Sigma Aldrich, France) and shaken 40 s at 55 m/s using a FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals, France). The DNA was extracted using the Dneasy® PowerFood® Microbial Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol, starting at the MBL Buffer step. The mechanical lysis step along with a chemical lysis step allowed an efficient lysis of the bacterial cells. A N60 NanoPhotometer® (Implen, Germany) was used to quantify the DNA extracted. The DNA extracts were stored at -20 $^{\circ}\text{C}$ until use.

2.2.2.8 - qPCR assays.

For the quantification of *B. thermosphacta* (Figure 15), specific *rpoC* primers (Forward: 5'-ATACTGTACCAATGGTTGCTC -3'; Reverse: 5'-CAACAGTGATAACATCAGTTAC -3') were used (Bouju-Albert, 2019; personal communication). The reaction was performed in a final volume of 12.5 μL containing 6.25 μL of 2X SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, France), 0.25 μL of each primer at 50 μM , 2.75 μL of water and 3 μL of DNA extract. The amplification program included an initial denaturing step of 3 min at 95 $^{\circ}\text{C}$ followed by 39 cycles of 15 s at 95 $^{\circ}\text{C}$ and 1 min at 60 $^{\circ}\text{C}$. The C_T to CFU/mL conversion was obtained thanks to a standard *B. thermosphacta* DNA scale ranging from 10^8 to 10^2 CFU/mL. The quantification of the total bacterial cells present in the non-inoculated samples was performed by *tuf* qPCR. This quantitative PCR targets the *tuf* gene, which has been shown to be highly conserved among a large number of bacterial genera, mainly as a single-copy in their genome (Tanaka et al., 2010). A quantitative *tuf* qPCR kit for bacteria (Takara, Otsu, Shiga,

Japan), using SYBR® green technology, was used. The reaction was performed with 5 µL of template DNA in a total volume of 25 µL, according to the manufacturer's protocol (Takara Bio, Japan). The amplification program was as follows: 30 s at 95 °C, then 35 cycles of 5 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. A positive *tuf* gene standard stock solution provided in the kit was used to generate a linear standard curve by plotting the C_T values versus 5.10⁵ to 5.10² copies/reaction, which allowed the results to be expressed in copies/g, equivalent to CFU/g. All amplifications were run on a CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, France). A negative control (ultrapure water instead of sample DNA) was included in each run. All amplification reactions were run in triplicate.

2.2.2.9 - Statistical analyses.

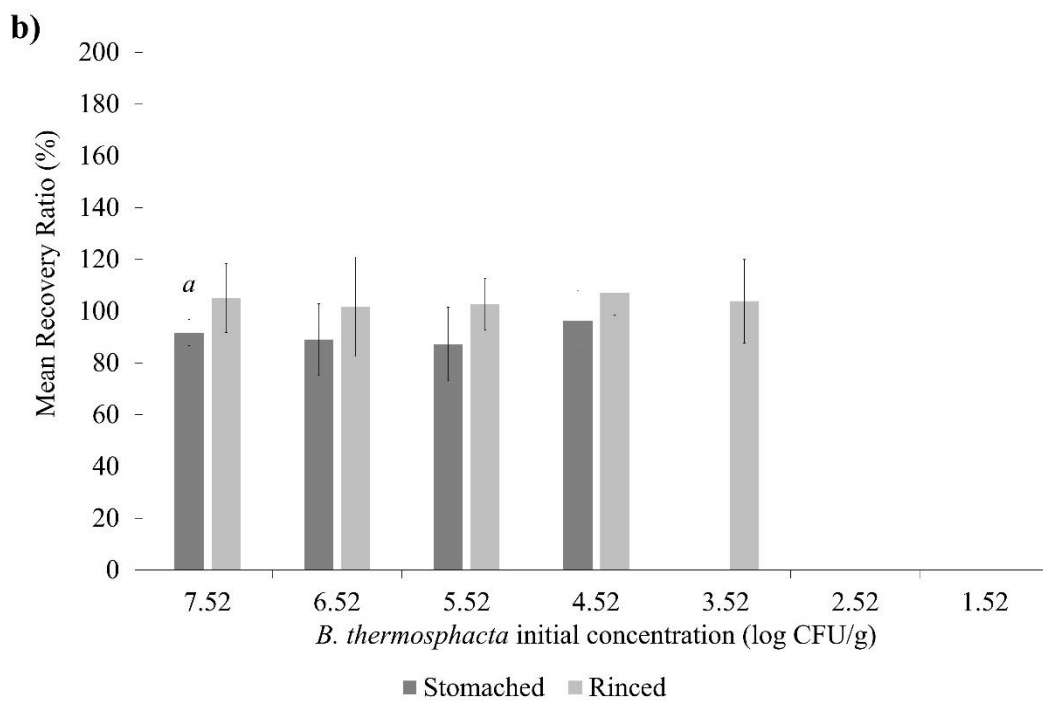
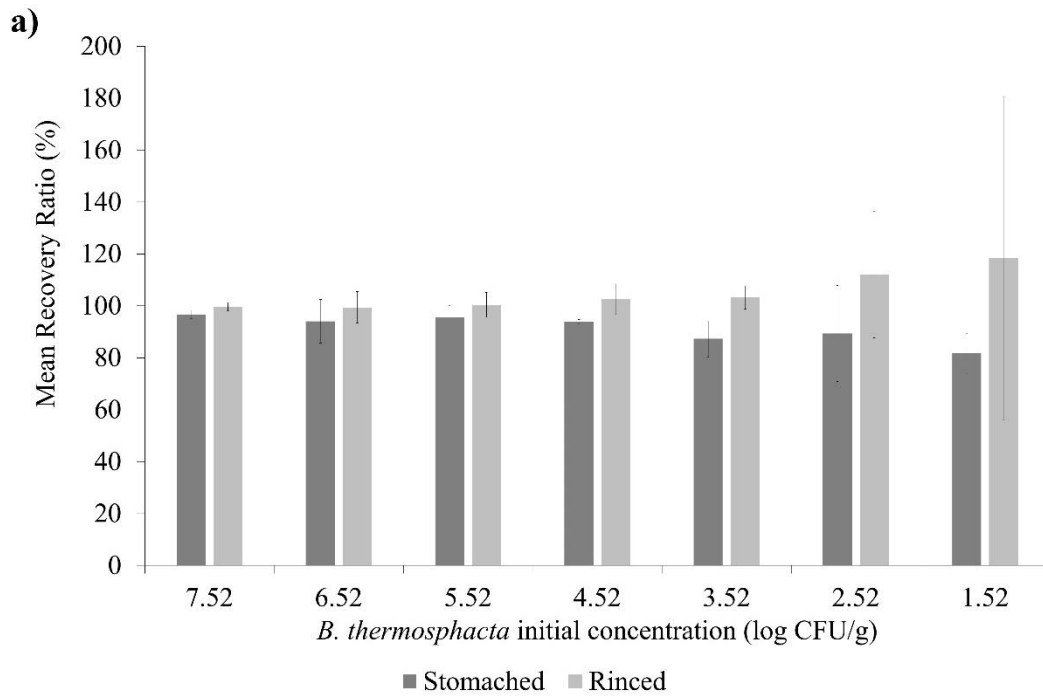
The statistical analyses were performed using XLSTAT software (v. 2019.2.2). The tests used were Student's t-tests, where the p-values were calculated by comparing the data series to a theoretical value or between each other, and a significant difference was expressed by a p-value below the 5 % confidence interval.

2.2.3 - Results and Discussion

2.2.3.1 - *B. thermosphacta* enumeration.

The stomaching method, most often used for bacterial community recovery from a complex food matrix (Liu et al., 2017; Macé et al., 2012) was expected to be more efficient and repeatable than any other method (Anderson et al., 1987; Avens and Miller, 1970) including rinsing, whose repeatability appears to be poor (Hammack et al., 2004; Nedoluh et al., 2001). A filtration-centrifugation step is often required after the homogenization step, to separate the eukaryote from prokaryote cells in a stomaching recovery suspension (Chaillou et al., 2015; Macé et al., 2012). On the other hand, PCR amplification of bacterial DNA extracted from chicken legs was described as possible when the samples were rinsed regardless of the DNA extraction procedure used (Rouger et al., 2017). This compared favorably to stomaching, which in the same study did not allow PCR amplification, and to swabbing or scrapping of samples, which allowed PCR amplification but only with a certain DNA extraction procedure. In order to identify which method, stomaching or rinsing, was most efficient for bacterial cell recovery and DNA extraction from fish fillets, we used as a bacterial marker, *Brochothrix thermosphacta*, at different concentration (7.52 to 1.52 log CFU/g) to compare the Recovery ratios (RR) of these 2 methods.

The inoculated *B. thermosphacta* were well recovered in the rinsing and in the stomaching suspensions, although the enumeration of weakly concentrated bacteria seemed to be imprecise, with wider SDs (Figure 16a). In contradiction with previous studies cited above, no significant differences were observed between the *B. thermosphacta* enumerated in the inoculation suspensions and in the corresponding recovery suspensions after rinsing and stomaching (p-value > 0.05, Student's t-test). The RRs were higher than 90 % for the two recovery methods, except for concentrations of stomached samples less than 4.52 log CFU/g (Figure 16a). For both methods, larger standard deviations (SD) were observed for the lowest concentrated samples (< 2.52 log CFU/g). Both methods had equally satisfying RR and few repeatability issues, even though the SD of samples with low contamination appeared to be wider.



^a inoculated and recovered count are significantly different (p -value < 0.05)

Figure 16 : Mean Recovery Ratios (%) of *B. thermosphacta* a) in the recovery suspensions (plate counting) and b) in the DNA extracts (qPCR); stratified by recovery method, versus the initial *B. thermosphacta* concentrations on the fillets.

After the filtration step of the stomaching recovery suspensions, the RRs of the samples with 7.52 log CFU/g, 4.52 log CFU/g and 1.52 log CFU/g were 94.96 %, 91.46 % and 89.79 % respectively (Table 2). It was concluded that the filters did not retain a significant amount of bacteria, but provided an efficient clarification of the homogenate by retaining most of the matrix particles.

Table 2 : Mean RR^a (%) of *B. thermosphacta* in the cellular pellet (after filtration) according to the initial inoculation of the fillets (3 replicates)

Sample contamination log CFU/g	Mean <i>B. thermosphacta</i> log CFU/g (N = 3)		RR % (SD)
	Inoculated	Recovered	
	Mean (SD)	Mean (SD)	
7.52	7.65 (0.09)	7.26 (0.12)	94.96 (2.69)
4.52	4.71 (0.05)	4.31 (0.03)	91.46 (0.58)
1.52	1.65 (0.04)	1.48 (0.17)	89.79 (11.97)

RR = Recovery Ratio; SD = Standard Deviation

2.2.3.2 - *B. thermosphacta* PCR quantification.

B. thermosphacta was enumerated using *rpoC*-qPCR in the rinsing and stomaching samples. The calculated RRs between the *rpoC*-qPCR quantified and the viable counts of *B. thermosphacta* (CFU/g) are shown in Figure 16b. For the inoculations less than 3.52 log CFU/g for stomaching recovery, and less than 2.52 log CFU/g for rinsing recovery, the limit of quantification was reached and the amplifications were not included in the data analyses. After rinsing, the RRs were below 100 % for all the concentrations, and they were lower after stomaching recovery (from 96.29 % to 96.37 %). Nevertheless, there were no significant differences with the initial inoculates (p-value > 0.05), except for 7.52 log CFU/g stomached samples.

It appeared that the rinsing method rendered it possible to quantify samples with lesser initial contaminations. In fact, many matrix particles were present in the stomaching recovery suspension and the filters were saturated after one centrifugation. For timing and budget reasons, only two filters were used per sample (9 mL in total per sample). Consequently, only 7.5 % of the recovery suspension were

filtered and centrifuged. The subsequent DNA extraction therefore was performed on only part of the recovery suspension. This is why, on stomached samples, the detection threshold was reached when the initial contamination was between 3 and 4 log CFU/g. Unlike the stomaching method, few matrix particles were suspended in the rinsing suspensions, avoiding the need to separate eukaryotic cells from the bacteria. Consequently, all the bacteria suspended by the rinsing process could be lysed and their DNA could be extracted. This resulted in a detection threshold of the *B. thermosphacta-rpoC* qPCR of between 2 and 3 log recovered bacteria per gram of sample.

When the fillets were rinsed, few repeatability issues were observed, in contradiction with previous studies where repeatability was regarded as the main bias of rinsing (Hammack et al., 2004; Nedoluh et al., 2001). This was achieved by making the process as automated as possible with the use of a mechanical agitator. The operator-dependent step, where the sample was gently massaged, was made as standard as possible with timed steps and homogenous movements. It appeared then that this method allowed an efficient and repeatable recovery of the bacterial communities from a fish matrix like the rainbow trout fillets.

2.2.3.3 - Bacterial total counts in fresh rainbow trout fillets.

The mean level of fillet endogenous aerobic bacteria using PCA enumeration in the stomaching suspension and the rinsing suspension was 3.63 log CFU/g (N = 3) and 3.02 log CFU/g (N = 3) respectively. No significant difference between the two methods was observed (Table 3). After DNA extraction and *tuf* gene qPCR, the mean bacterial level of fillet rinsing samples was 3.32 log CFU/g. No significant differences between the PCA counts and the qPCR quantified total bacterial flora (p-value > 0.05, Student's t-test) was observed. However, due to results below the quantification limit (between 3 and 4 log), the stomaching method did not allow quantification of the *tuf* gene. These mesophilic aerobic flora quantification data were consistent with previously published data: from 10² to 10⁴ CFU/cm² (Austin, 2006) for fish skin, from 10¹ to 10⁷ CFU/g for rainbow trout (Diler et al., 2000). Furthermore, it confirms the limits of the stomaching method, which appears not to be suitable for the analysis of fish fillets.

Table 3 : Mean endogenous aerobic viable bacteria levels (log CFU/g) of rinsed rainbow trout fillets measured by plate counting or qPCR targeting the gene *tuf* (N = 3)

Recovery method	Mean <i>B. thermosphacta</i> log CFU/g (N = 3)				pvalue < 0.05
	Plate counting		qPCR		
	Mean	SD	Mean	SD	
Rinsing	3.02	0.32	3.32	0.91	NS ^a
Stomaching	3.63	0.44	/ ^b	/ ^b	/ ^b

^a NS = non significant ^b quantification considered non-specific and non-exploitable; SD = Standard Deviation; / indicates that the bacteria levels could not be quantified

2.2.3.4 - Selection of a recovery method.

When studying food matrix with low bacterial contaminations, the recovery method can have a strong quantitative and qualitative impact on the enumeration and/or identification results. In this study, the protocol selection criteria were based on a good recovery ratio, but the cost-effectiveness of the protocols and the amount of time required to complete them also were considered. Although stomaching showed a good recovery efficiency of bacteria, this method is too destructive of the fresh rainbow trout fillet, causing too large a flow of particles through the filter bag. The high quality filtration then needed to conduct end-point qPCR quantification becomes too expensive in terms of time and equipment. Mechanical rinsing was the recovery method that best met the criteria, namely a high quantitative recovery of bacteria, and compatibility with end-point qPCR quantification which can be performed independently from the operator.

In conclusion, it seems more relevant and cost-effective to recover the endogenous bacterial communities of a fish fillet structure using the rinsing method rather than the stomaching method. Nevertheless, it has been observed that the method used to recover the bacteria from the matrix may impact the biodiversity of the extracted flora (Nedoluh et al., 2001). The next step to consider would therefore be to examine the bacterial diversity using a procedure such as 16S metabarcoding.

2.2.4 - Acknowledgements

The authors would like to thank Sabrina Saltaji and Emmanuel Jaffrès (INRAE, Oniris, SECALIM, Nantes, France) for providing the *rpoC* primer sequences and for helpful discussions. This work was financed by the European Union and the “Région Pays de la Loire” (RFI “Food for Tomorrow” call for proposals 2016 - Contract N° 34000656 - PhD grant to Nicolas Helsens).

2.3 - Ce qu’il faut retenir

Cette étude s’appuie sur des données quantitatives de récupération de la souche, *Brochothrix thermosphacta* DSMZ 20171, utilisée comme témoin et inoculée sur des échantillons de filet de truite arc-en-ciel (chair plus peau). Nos résultats confirment pour les deux techniques de récupération utilisées, rinçage mécanique et stomachage, ont une bonne capacité de récupération quantitative des bactéries à partir de cette matrice filet de poisson (>80% pour les deux méthodes, quelle que soit la taille de l’inoculum initial). Cependant, le stomachage requiert une étape supplémentaire de filtration-centrifugation de la suspension de récupération qui nécessite soit, pour une filtration totale de la suspension, l’usage d’un grand nombre de filtres, soit l’extraction de l’ADN bactérien seulement à partir d’une partie de cette suspension. La mise en œuvre du protocole de stomachage est de ce fait plus coûteuse et prend plus de temps que la mise en œuvre du protocole de rinçage. Aussi, le rinçage mécanique des filets a été retenue pour l’étude des communautés bactériennes et des gènes de résistance pour la suite de ces travaux de thèse.

Chapitre 3 : Stratégie de prélèvement

Ce chapitre décrit la stratégie de prélèvement et le plan d'échantillonnage des poissons et des filets pour la réalisation de la campagne de collecte sur le terrain selon les conditions d'étude considérées, permettant la détection, la quantification et la caractérisation du microbiote bactérien et des éléments de caractérisation de son profil de résistance aux antibiotiques, soit, les gènes de résistance aux antibiotiques, les résidus d'antibiotiques et l'expression phénotypique de résistances aux antibiotiques (CMI) de souches de trois espèces bactériennes d'intérêt. Ce plan d'échantillonnage a été décrit aussi mais plus brièvement dans le matériel et méthode de la publication soumise à *Frontiers in Microbiology*, présentée dans le Chapitre 5.

L'analyse de la bibliographie a mis en avant plusieurs éléments à prendre en compte. Tout d'abord, l'existence d'une variation inter-individuelle (entre poissons) de différents caractères du profil de résistance qui ont été étudiés, des communautés bactériennes, et une prévalence globalement faible des événements tels que l'acquisition d'une résistance et/ou la présence d'un gène, ou la présence de résidus en deçà des LMR. La capacité à détecter ces événements « rares » dans un microbiote probablement paucimicrobien est donc un aspect technique qui a dû être estimé.

La population de poissons envisagée (espèce, taille du groupe ...), la structuration et la situation géographique des sites d'élevage, l'historique médicamenteux et infectieux lors de la phase d'élevage, et le procédé de filetage dans un atelier de transformation sont autant d'éléments pouvant influencer les communautés bactériennes des filets frais mis sur le marché et leur profil de résistance. Dans cette étude, l'unité épidémiologique retenue est le lot de truite arc-en-ciel d'élevage prêt à être abattu, issu d'un bassin d'élevage, comprenant plusieurs milliers de poissons.

Notre stratégie a visé à identifier des conditions de prélèvement nous permettant d'observer le microbiote bactérien « primaire » et son profil de résistance lié uniquement à l'environnement et aux pratiques d'élevage des poissons, et le microbiote bactérien « secondaire » sur lequel a été exercée l'influence de l'environnement de l'atelier de transformation.

3.1 - Recrutement des fermes piscicoles et de l'atelier de filetage

Les deux élevages piscicoles, appelés A et B, devaient avoir un niveau présumé d'exposition aux activités humaines (stations de traitement des eaux usées, aires urbaines) le plus différent possible. En effet notre hypothèse était que ce niveau d'exposition environnementale lors de l'élevage des poissons impacte fortement leur flore bactérienne (cutanée, digestive, branchiale ...) ainsi que la présence de gènes de résistance et les résistances phénotypiques. Pour observer une possible évolution des profils de résistance en fonction des niveaux présumés d'exposition des fermes, ces élevages devaient être de préférence sur la même rivière. Pour observer l'influence croisée de l'environnement de transformation et de l'environnement d'élevage (l'environnement au sens strict et les pratiques) sur le microbiote du filet, nous avons recherché des élevages travaillant avec le même atelier de filetage.

Les deux élevages étaient volontaires, recrutés grâce au réseau professionnel de l'entreprise Bretagne Truite. Chaque éleveur a reçu une fiche d'information sur le projet Foodresistome dans lequel s'inscrit cette thèse et auquel il était amené à participer. Cette fiche comprenait un résumé du projet, ses motivations et objectifs, la nécessité et le périmètre d'un questionnaire sur les pratiques d'élevage. Ce sujet de l'antibiorésistance étant un sujet sensible actuellement dans la société, notre stratégie de publication et des éléments visant à assurer notre transparence quant aux résultats obtenus ont été donnés et discutés.

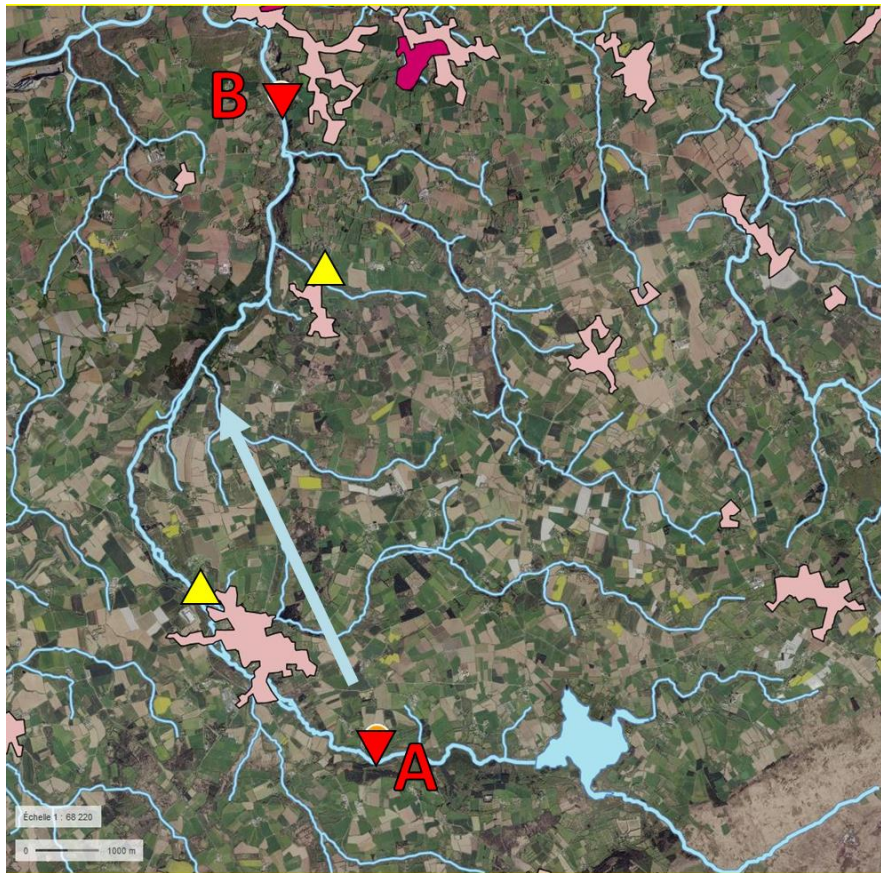


Figure 17 : Situation des 2 élevages recrutés et positionnement des activités pouvant influencer l’environnement d’élevage des poissons.

Légende : Les triangles rouges = les fermes piscicoles (A et B), les triangles jaunes = des stations de traitements des eaux usées, les zones en rose = les zones urbanisées et la flèche bleue = le sens du courant de la rivière.

La disposition respective sur la rivière des deux élevages ainsi que des zones à proximité avec des activités remarquables par rapport au risque d’antibiorésistance, notamment une ville, des stations de traitement des eaux urbaines usées, est illustrée Figure 17. L’élevage A est proche de la source de la rivière, en amont de la ville (3 km). L’élevage B est en aval de deux zones urbanisées chacune avec une station de traitement des eaux usées.

Les contraintes liées au niveau d’exposition et au calendrier de réalisation de la thèse, ont amené à avoir des truites d’âge et de poids différents entre les deux élevages (

Tableau 4). Néanmoins, bien que la bibliographie ait montré des différences de microbiote des poissons entre les stades alevins et adultes (Z. Zhang et al., 2018), aucune étude chez la truite (ou d’autres espèces) n’a été conduite sur des stades adultes d’âges différents montrant d’éventuelles évolutions du microbiote. La condition de l’âge ne nous est donc pas apparue comme prioritaire.

Tableau 4 : Caractéristiques des truites prélevées dans chaque élevage au moment du prélèvement.

	Age	Poids moyen	Durée du jeûne
Elevage A	14 mois	730 g	2 jours
Elevage B	24 mois	3 300 g	9 jours

3.2 - Questionnaire

Pour chaque ferme piscicole, une fiche de renseignements a été transmise à l'éleveur afin de connaître l'historique de vie du lot des poissons (Annexe 1). Les informations recherchées étaient :

- D'ordre zootechnique : Le nombre de bassins et l'origine des poissons du lot prélevé, le type d'alimentation en eau des bassins ;
- D'ordre sanitaire et en lien avec les pratiques de biosécurité : les vaccinations du lot prélevé et le mode de vaccination, la détection des maladies infectieuses et les traitements antibiotiques administrés aux poissons ainsi que leur mode d'administration, le protocole non détaillé du nettoyage des bassins, la présence d'autres piscicultures sur la rivière et leur positionnement géographique par rapport à l'élevage ;

3.3 - Détermination du plan de prélèvement

Comme nous l'avons évoqué en introduction de ce chapitre, notre étude devait avoir la capacité de détecter un évènement de faible fréquence – résistance phénotypique et/ou présence de gènes de résistance – au sein d'une communauté d'espèces bactériennes, dont l'abondance peut elle-même être faible (Gordon et al., 2007; Muziasari et al., 2017). Malgré la présence de données bibliographiques concernant l'apparition de résistances chez des espèces pathogènes ou dans le résistome d'un environnement, la prévalence de la résistance bactérienne au sein d'une communauté bactérienne associée à une matrice alimentaire fraîche n'a pas pu être déterminée. Nous sommes donc partis d'un compromis entre un effectif permettant de détecter un évènement avec une sensibilité satisfaisante au vu des résultats publiés précédemment et la réalité économique et technique des analyses dans la population d'étude. Les recommandations publiées par Cannon et Roe (1982) (Tableau 5) permettent de déterminer la taille d'un échantillon en fonction de la prévalence de l'évènement à détecter.

f // N	10	24	30	40	50	60	70	80	90	100	150	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1500	2000	3000	4000	5000	10000	20000	30000	40000	50000	100000	
0.01	10	24	30	40	49	58	68	75	83	89	115	132	153	166	174	180	184	188	190	192	199	203	206	208	209	211	212	213	213	213	213	
0.02	10	24	30	40	49	56	63	68	74	78	95	106	118	125	129	132	135	136	138	139	142	144	146	147	147	148	149	149	149	149	149	
0.03	10	24	30	38	44	49	54	58	61	64	73	79	85	88	90	92	93	94	94	95	96	97	98	98	98	99	99	99	99	99	99	
0.04	10	23	28	35	39	43	46	49	51	53	59	62	66	68	69	70	71	71	71	72	73	73	73	74	74	74	74	74	74	74	74	
0.05	10	23	27	32	35	38	41	42	44	45	49	52	54	55	56	57	57	57	58	58	58	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	
0.06	10	22	25	29	32	34	36	37	38	39	42	44	46	47	47	48	48	48	48	48	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	
0.07	10	21	23	27	29	31	32	33	34	35	37	38	40	40	41	41	41	41	41	41	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42
0.08	10	20	22	25	27	28	29	30	31	31	33	34	35	35	36	36	36	36	36	36	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
0.09	10	19	21	23	24	26	26	27	28	28	30	30	31	32	32	32	32	32	32	32	32	32	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
0.10	10	18	19	21	23	24	24	25	25	26	27	28	28	28	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
0.15	9	14	15	16	16	17	17	17	18	18	18	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
0.20	8	11	12	12	13	13	13	13	13	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
0.25	7	9	10	10	10	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
0.30	7	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
0.35	6	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
0.40	5	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
0.45	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0.50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
0.60	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
0.70	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
0.80	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Tableau 5 : Choix de la taille de l'échantillon en fonction de la prévalence de l'évènement recherché (f) et de la taille de la population (N) (source : Cannon et Roe (1982)).

Nous avons retenu un effectif de 14 poissons, permettant de détecter un évènement dont la prévalence est de 20 % dans une population de taille supérieure à 100 individus. Vingt-huit poissons d'un seul bassin de chacun des deux élevages ont donc été prélevés, 14 ont été filetés au laboratoire et 14 ont été filetés à l'atelier de transformation (Tableau 6 et Figure 18).

Tableau 6 : Nombre d'individus – poissons et filets – prélevés en fonction de la condition étudiée

	Filetage au laboratoire	Filetage à l'atelier	Total filets
Elevage A	14	14	28
Elevage B	14	14	28
Total poissons	28	28	56

Les prélèvements ont été réalisés séparément sur deux journées, le 15 janvier 2019 pour l'élevage A et le 22 janvier 2019 pour l'élevage B. Pour chacun des élevages, les truites arc-en-ciel prélevées ont été identifiées par un numéro d'ordre de 1 à 28. Ce numéro d'ordre a été complété d'une lettre de codage pour signifier l'origine « primaire » du microbiote du filet : R (pour Raceway = bassin) l'environnement d'élevage ; F (pour Factory) l'environnement de transformation en plus de l'environnement d'élevage.

Les poissons ont été abattus par percussion crânienne en accord avec les réglementations sur le bien-être animal (Règlement CE No 1099/2009). Pour chacun des élevages, les truites identifiées 1R à 14R ont été gardées entières et placées au froid positif dans de la glace pilée jusqu'à leur filetage au laboratoire. Les autres identifiées 15F à 28F ont été amenées à l'atelier de transformation pour y être filetées dans l'ordre de leur numéro. Ce filetage a été réalisé en fin d'une journée de travail pour l'atelier de transformation c'est-à-dire vers 12h00. Aucun changement dans la réalisation de l'opération unitaire de filetage n'a été engagé. Aucune procédure spécifique de nettoyage-désinfection avant l'arrivée des truites n'a été engagé. Il est cependant à noter que quelques conditions ont été changées : le temps passé par les poissons dans l'atelier a été raccourci par rapport au processus habituel, du fait d'un abattage conduit en élevage et non à l'atelier ; la saignée des poissons, le parage et l'emballage des filets levés n'ont pas été réalisés.

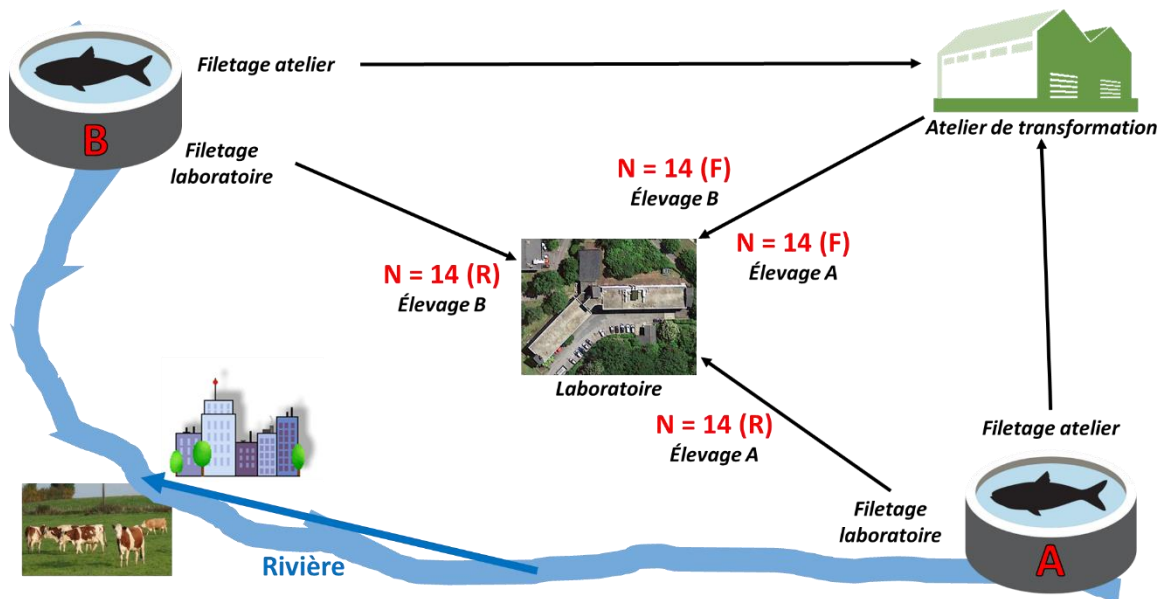


Figure 18 : Représentation schématique du plan de prélèvements.

Légendes : les lettres R et F (en anglais) = lettres de codage des échantillons des filets pour signifier l'origine « primaire » du microbiote du filet ; R : raceway = l'environnement (et pratique) d'élevage ; F : factory = l'environnement de transformation et l'environnement d'élevage.

A l'issue du filetage, quel que soit le lieu de réalisation, laboratoire ou usine de transformation, chaque paire de filets (droit et gauche) obtenue a été identifiée par le numéro et la lettre du poisson.

3.4 - Préparation des échantillons des filets

Le filetage au laboratoire a été conduit en fin de journée après retour des sites (élevage et atelier de transformation) selon le procédé illustré en Figure 19 : une première incision verticale de l'épine dorsale au ventre à environ 2 cm de la branchie ① suivie d'une incision horizontale le long de l'épine dorsale ②, une troisième incision verticale à environ 2 cm de la base de la nageoire caudale ③ et une dernière incision horizontale le long du ventre pour rejoindre la première incision ④. Le filet a ensuite été retiré en levant la chair le long de la cage thoracique sans percer le tube digestif ⑤. Tous les filets R de cette étude ont été levés par le même opérateur, dans des conditions stériles (sous PSM) afin de se mettre dans des conditions optimales de détection-récupération du microbiote « primaire » lié à l'environnement d'élevage.

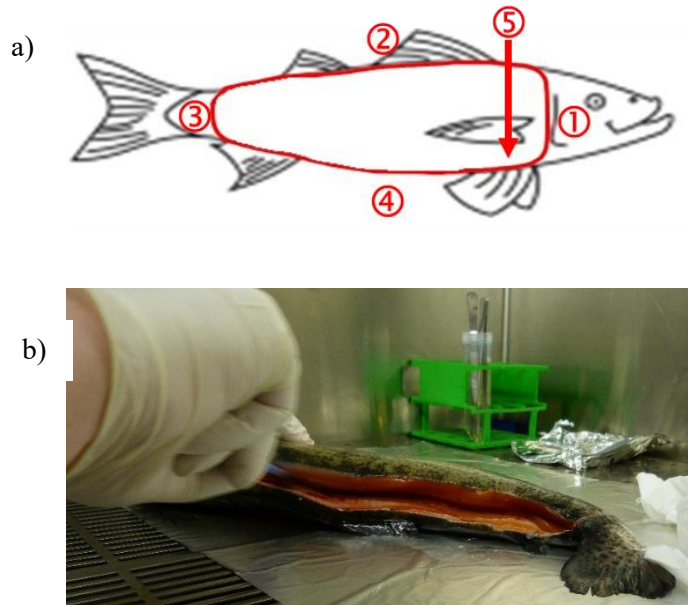


Figure 19 : a) Schéma des coupes réalisées pour la levée des filets, numérotées de ① à ⑤ dans l'ordre de leur réalisation et b) Photographie prise pendant le filetage au laboratoire.

Quel que soit le lieu du filetage, seul le filet gauche de la paire de filets obtenue pour chacun des poissons a été découpé en 3 morceaux d'au moins 30 grammes, appelés « échantillon » dans la suite de ce manuscrit, emballés individuellement sous-vide et stockés à -20°C . Les échantillons ont été identifiés avec le codage suivant : la lettre de l'élevage d'origine (A ou B), le numéro d'ordre de pêche du poisson (1 à 28) et la lettre de l'environnement « influençant le microbiote » (R ou F). Le filet droit a été conservé par congélation pour refaire des analyses si besoin. Ces 3 échantillons ont été engagés respectivement dans les analyses suivantes :

- Un pour la caractérisation des résistances phénotypiques aux antibiotiques par CMI de souches bactériennes d'intérêt isolées par des méthodes culturales, dont les résultats sont présentés Chapitre 4 ;
- Un pour l'extraction du microbiote bactérien et de son ADN pour la caractérisation génotypique par séquençage 16S et la recherche des gènes de résistance par Smartchip Realtime PCR System (Takara) dont les résultats sont présentés Chapitre 5 ;
- Un pour le dosage des résidus d'antibiotiques dont les résultats sont présentés Chapitre 5.

Chapitre 4 : Caractérisation phénotypique de la résistance aux antibiotiques des souches d'intérêt.

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre était de réaliser une caractérisation phénotypique de la résistance aux antibiotiques chez des genres bactériens considérés comme des « représentants » de flores d'intérêt en lien avec cette denrée qu'est le filet frais de poisson d'élevage.

4.1 - Identification des bactéries d'intérêt

Pour choisir nos bactéries d'intérêt, trois critères individuels de sélection ont été retenus : la pathogénicité pour le consommateur et/ou les animaux de production, un rôle dans l'acquisition et la transmission de gènes de résistance et un potentiel rôle d'altération de la denrée. Trois genres bactériens, remplissant chacun un ou plusieurs de ces critères, ont donc été retenus : *Listeria*, *Aeromonas* et *Pseudomonas*.

Le genre *Listeria* comprend notamment les espèces, *L. monocytogenes*, danger alimentaire et pathogène pour les animaux et *L. ivanovii*, pathogène pour les animaux. En tant que bactéries psychrotrophes, elles sont fréquemment identifiées parmi les flores bactériennes des environnements au sein des usines et ateliers de transformation, notamment dans les environnements de transformation des poissons (Autio et al., 1999; Chen et al., 2010b; Skowron et al., 2018) où elles peuvent contaminer les produits transformés (Chen et al., 2010b; Skowron et al., 2018; Wieczorek and Osek, 2017). La présence de *Listeria* spp. sur des filets frais de poisson a également été décrite, par exemple aux Etats-Unis (Chen et al., 2010b) et en Pologne (Skowron et al., 2018; Wieczorek and Osek, 2017), avec des prévalences entre 20 à 40 %. La présence de résistances aux antibiotiques a été décrite chez des souches de *Listeria* isolées de denrées poissons (Chen et al., 2010a; Skowron et al., 2018). Les souches isolées étaient résistantes au céfotaxime, clindamycine, oxytétracycline et tétracycline (Chen et al., 2010a) et à la pénicilline, ampicilline, méropénème, érythromycine et à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (Skowron et al., 2018).

Les bactéries du genre *Aeromonas* sont naturellement présentes dans les eaux douces et chez les poissons, chez qui elles peuvent être pathogènes (*A. salmonicida*, *A. hydrophila*). Chez les humains, l'espèce *A. hydrophila* a été rapportée en lien avec des cas d'intoxications alimentaires ayant pour origine des produits de la mer (Ünüvar, 2018) mais n'est pas à ce jour considérée comme un danger bactérien alimentaire avéré. Ces bactéries peuvent également acquérir et transmettre des gènes de résistance (Akinbowale et al., 2007; Saavedra et al., 2004; Schmidt et al., 2000) par le biais d'éléments génétiques mobiles (Bartkova et al., 2017; Ndi and Barton, 2011; Poole et al., 2006).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires, notamment présentes dans les eaux douces mais également dans les flores commensales des humains et des animaux. Certaines espèces ont un potentiel d'altération des denrées (*P. fluorescens* par exemple). Elles peuvent également être responsables d'infections opportunistes chez l'Homme (*P. aeruginosa*) et l'animal (*P. aeruginosa*, *P. putida*), mais n'ont pas été décrites comme agents responsables d'infections d'origine alimentaire. Elles sont particulièrement connues comme étant très résistantes et adaptables aux traitements antibiotiques, notamment *P. aeruginosa* grâce à des pompes à efflux (Köhler et al., 1997; Poole, 2004) et à des mutations et des transferts horizontaux de gènes (Kottara et al., 2018).

4.2 - Matériels et méthodes

Chacun des 56 échantillons de filets de poisson préparés et stockés pour cette analyse ont été décongelés pendant 14 à 16h à 6°C puis rincés selon le protocole mis au point précédemment et présenté dans le Chapitre 2. Il est à noter que dans ce chapitre, le terme « isolat » sera employé pour des colonies isolées « présomptives » mais dont l'identification n'est pas encore confirmée. Le terme « souche » concernera les isolats dont l'identification en tant que *Listeria*, *Aeromonas* ou *Pseudomonas* a été confirmée.

4.2.1 - Détection, isolement et identification des 3 genres bactériens

4.2.1.1 - *Listeria*

Pour la détection de *Listeria* spp., la première étape a consisté en un pré-enrichissement de 5 mL de la suspension de rinçage dilués au 1/5^e dans 45 mL de bouillon Fraser-Demi (ThermoFisher, France) et incubés pendant 48h à 30°C. La culture liquide obtenue a été ensuite inoculée sur deux boîtes de milieu gélosé OCLA (ThermoFisher, France), mises en incubation à 37°C pendant 48h. Ce milieu favorise le développement des espèces d'intérêt et contient des inhibiteurs bactériens (polymyxine B, acide nalidixique et chlorure de lithium) et fongiques (amphotéricine). La détection des colonies présomptives se fait grâce à un indicateur de couleur bleue (le X-glucoside clivé par la β -glucosidase bactérienne). Une colonie bleue sur milieu OCLA, ayant la forme de bacilles ou coccobacilles à coloration de Gram positive et à activité catalase positive a été considéré comme un isolat de *Listeria* présomptif. Chaque isolat a ensuite été repiqué sur une gélose BHI mise en incubation à 37°C pendant 24 à 48h. Les colonies obtenues ont été conservées dans 1 mL de bouillon BHI supplémenté de 20 % de glycérol et stockées à -80°C.

4.2.1.2 - *Pseudomonas*

La détection de *Pseudomonas* spp. a été réalisée selon la norme ISO 13720. Pour cela, 400 μ L de chaque suspension de rinçage ont été déposés sur deux géloses Cephalothine-Sodium Fusidate-

Cetrimide (CFC) incubées à 25°C pendant 48h. A l'issue de cette incubation, jusqu'à trois colonies par échantillon ont été prélevées, et leur profil après coloration de Gram et test d'oxydase a été déterminé. Toute colonie se développant sur milieu CFC, avec un phénotype de bacille à coloration de Gram négative et à activité oxydase positive a été considérée comme étant un isolat présumptif *Pseudomonas* spp. Chaque isolat a ensuite été repiqué sur une gélose BHI placée en incubation à 25°C pendant 24h. Les colonies obtenues ont été inoculées dans 1 mL de bouillon BHI supplémenté de 20 % de glycérol et stockées à -80°C.

La confirmation de l'appartenance au genre *Pseudomonas* des isolats a été réalisée par qPCR à l'aide des amorces Pse435F (5'-ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGG-3') et Pse449R (5'-ACACAGGAAATTCCACCACCC-3') ciblant les régions V3-V4 de l'ADNR 16S (Bergmark et al., 2012). Pour extraire l'ADN, les isolats ont été repiqués dans 10 mL de bouillon BHI et incubés à 30°C sous une agitation de 180 rpm pendant 16h. De la culture obtenue, 1 mL a été centrifugé à 8000 rpm pendant 5 minutes. Le culot a été suspendu dans 100 µL d'eau stérile et mis pendant 3 minutes au bain-marie à 95°C. Après centrifugation à 8000 rpm pendant 5 minutes, le surnageant a été récupéré et dilué au 1/100 dans de l'eau stérile. Pour la qPCR, le mix de réactifs était constitué de 10 µL de mix SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, France), 0,2 µL de chaque solution d'amorce à 50 µM, 4,6 µL d'eau milliQ stérile et 5 µL d'extrait d'ADN par réaction. L'amplification consistait en une première dénaturation à 98°C pendant 3 minutes, puis un cycle répété 39 fois comportant une étape de dénaturation à 98°C pendant 10 secondes et une étape d'hybridation/élongation à 60°C pendant 30 secondes. Chaque amplification par qPCR a été accompagnée d'un contrôle positif, l'ADN d'une souche de référence de *Pseudomonas fluorescens* CIP 69.13T, d'un contrôle négatif correspondant au mix de réactifs et d'un témoin où de l'eau milliQ stérile a été ajoutée au mix à la place de l'ADN.

4.2.1.3 - *Aeromonas*

Pour la détection d'*Aeromonas* spp., 400 µL de la suspension de rinçage ont étéensemencés sur 2 boîtes de pétri contenant le milieu gélosé GSP (Glutamate Starch Phenol red agar) mises en incubation pendant 48h à 22°C. Les colonies présumptives sont repérées par leur couleur jaune-orangé. Des tests

biochimiques sont ensuite mis en place, avec la recherche d'une activité catalase et oxydase, ainsi qu'une coloration de Gram puisque les *Aeromonas* sont des bacilles à coloration de Gram négative.

4.2.2 - Analyse CMI de *Pseudomonas* spp.

Les profils de résistance phénotypique des souches de *Pseudomonas* spp. ont été testés selon les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, 2016). Les antibiotiques ont été choisis pour représenter les principales classes d'antibiotiques en incluant les molécules d'importance clinique pour les traitements antibiotiques en pisciculture et certains antibiotiques essentiels en thérapeutique humaine, soit :

- Les 6 molécules ayant une AMM pour le traitement des infections bactériennes chez les poissons : le florfénicol, la fluméquine, l'acide oxolinique, l'oxytétracycline et l'association sulfadiazine-triméthoprim. En l'absence de critères d'interprétation pour l'association sulfadiazine-triméthoprim, la sulfadiazine a été remplacée par le sulfaméthoxazole pour la détection de résistances phénotypiques aux sulfamides.
- 4 molécules d'importance clinique en santé humaine, choisies selon l'existence de critères d'interprétation dans le référentiel CLSI M100, soit : la colistine, la pipéracilline, la gentamicine et la ceftazidime (connue pour être un antibiotique anti-*Pseudomonas*).
- L'azithromycine, choisie pour représenter les macrolides.

Le fournisseur des poudres d'antibiotiques était Sigma-Aldrich (France).

4.2.2.1 - Préparation des solutions d'antibiotiques

Chaque molécule ou association a été préparée en pesant selon la formule suivante :

$$P = V \times \frac{C}{T}$$

Avec V : Volume de solution à préparer (mL)

T : Titre en principe actif de la poudre (mg de principe actif / mg de produit)

C : Concentration souhaitée (µg/mL)

P : Poids (µg) d'antibiotique sous forme de poudre

Les solvants utilisés pour la préparation des solutions mères sont référencés dans le Tableau 7

La solution mère obtenue pour chaque molécule ou association de molécules a ensuite été diluée pour obtenir la concentration cible, correspondant à deux fois (solution 2X) la plus forte concentration testée.

Tableau 7 : Solvants utilisés pour la préparation des solutions mères d'antibiotique, d'après les recommandations du CLSI (2015).

Antibiotique	Solvant
Fluméquine	NaOH (0,1 M)
Acide Oxolinique	Eau + NaOH (1 M) goutte à goutte jusqu'à dilution
Sulfaméthoxazole	NaOH (2,5 M)
Triméthoprim	Eau + HCl (0,05 M)
Azithromycine	Ethanol 95 %
Florfenicol	
Ceftazidime	Carbonate de Sodium anhydre + Eau
Colistine	Eau
Gentamicine	
Oxytétracycline	Méthanol
Pipéracilline	

4.2.2.2 - Préparation des plaques de CMI

Les concentrations d'antibiotiques à tester ont été choisies d'après les recommandations du CSLI (2016) et selon les référentiels suivant :

- Le référentiel M100 pour les bactéries non-*Enterobacteriaceae*, incluant les *Pseudomonas* spp. non-*aeruginosa* pour la pipéracilline, ceftazidime, gentamicine, colistine et triméthoprim-sulfaméthoxazole.
- Le référentiel VET03 pour l'acide oxolinique, l'oxytétracycline et le florfenicol. Les valeurs sont données uniquement pour *Aeromonas salmonicida*. Ces concentrations ont donc été prises comme référence.

Aucune valeur de CMI n'a été trouvée pour l'azithromycine et la fluméquine. Les concentrations testées ont été choisies d'après Boss et al. (2016) qui ont observé des CMI à 32 µg/mL, 64 µg/mL et 128 µg/mL pour l'azithromycine vis-à-vis de *P. aeruginosa*, et d'après les concentrations de fluméquine testées par Scarano et al. (2018) pour la résistance de souches d'*Aeromonas* spp.

Dans une plaque 96 puits stériles, 100 µL des solutions 2X d'antibiotique, la molécule ou

l'association de molécules, ont été déposés dans le premier puit de chaque colonne. Cinquante μL de bouillon MH a ensuite été déposé dans les puits suivants, et les antibiotiques ont été dilués au demi en série du premier au dernier puit, afin d'atteindre les concentrations souhaitées, équivalent à deux fois les concentrations à tester, à raison de 50 μL de solution d'antibiotique par puit.

Tableau 8 : Antibiotiques et concentrations ($\mu\text{g/ml}$) testés pour les CMI des souches de *Pseudomonas* spp.

Puit	TC	OXA	FLR	T-S	FLM	COL	PIP	CFT	GEN	AZT	
A	64	8	128	64/1216	256	128	1024	512	256	1024	T-
B	32	4	64	32/608	128	64	512	256	128	512	T-
C	16	2	32	16/304	64	32	256	128	64	256	T+
D	8	1	16	8/152	32	16	128	64	32	128	T+
E	4	0,5	8	4/76	16	8	64	32	16	64	
F	2	0,25	4	2/38	8	4	32	16	8	32	
G	1	0,125	2	1/19	4	2	16	8	4	16	
H	0,5	0,0625	1	0,5/9,5	2	1	8	4	2	8	

Légende: OTC=oxytétracycline, OXA=acide oxolinique, FLR=florfenicol, T-S=triméthoprim-sulfaméthoxazole, FLM=fluméquine, COL=colistine, PIP=pipéracilline, CFT=ceftazidime, GEN=gentamicine, AZT=azithromycine.

4.2.2.3 - Préparation de l'inoculum, inoculation et incubation.

Les souches de *Pseudomonas* ont été repiquées sur géloses BHI placées en incubation à 25°C pendant 48h. Une suspension bactérienne dans 5 mL de bouillon Mueller-Hinton (MH) « *cation-adjusted* » (contenant 20 à 25 mg/L de Ca^{2+} et 10 à 12,5 mg/L de Mg^{2+}) dont la densité optique à 600 nm est comprise entre 0,08 et 0,1 (équivalent à 10^8 UFC/mL) a été réalisée puis diluée au 1/100 dans du bouillon MH pour obtenir un inoculum à une concentration de 10^6 UFC/mL. Cet inoculum a été réparti dans les puits de la plaque contenant les solutions d'antibiotiques, à raison de 50 μL par puit. De cette façon, l'inoculum et la suspension d'antibiotique ont été dilués deux fois. La concentration bactérienne dans chaque puit était de 5.10^5 UFC/mL, avec une tolérance comprise entre 2.10^5 UFC/mL à 8.10^5 UFC/mL. Cette concentration a été vérifiée en dénombrant chaque inoculum après dépôt sur milieu gélosé BHI et incubation à 25°C pendant 48h. Le plan de chaque plaque de CMI est présenté dans le Tableau 8. Deux puits « contrôle positif » (bouillon MH + inoculum bactérien) et deux puits « contrôle négatif » (bouillon MH seul) ont également été ajoutés pour chaque plaque. Celles-ci ont été scellées à l'aide d'un film de paraffine mises à incuber pendant 16 à 20h à 28°C, sous une agitation de 150 rpm.

4.2.2.4 - Contrôle qualité

La validation des analyses des CMI nécessite la mise en place d'un contrôle qualité, parallèlement à chaque série d'analyses de la CMI des souches testées. La souche contrôle qualité (appelée souche QC) retenue est la souche *Escherichia coli* ATCC 25922, conformément aux recommandations du CLSI, fournie par le laboratoire du Pr. Matthieu Eveillard (CHU Angers). Dans une plaque séparée, la souche QC a été inoculée de la même façon que les souches à tester, en contact des molécules ou association de molécules, aux concentrations choisies selon le référentiel (Tableau 9).

Tableau 9 : Molécules ou associations de molécules antibiotiques et concentrations testées ($\mu\text{g/mL}$) pour les CMI de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Puit	OTC	OXA	FLR	T-S	FLM	COL	PIP	CFT	GEN
A	4	0,25	8	0,5/9,5	1	2	4	0,5	1
B	2	0,125	4	0,25/4,75	0,5	1	2	0,25	0,5
C	1	0,0625	2	0,125/2,375	0,25	0,5	1	0,125	0,25
D	0,5	0,03	1		0,125	0,25	0,50	0,0625	0,13
E	0,25					0,13		0,0313	

Légende : OTC=oxytétracycline, OXA=acide oxolinique, FLR=florfénicol, T-S=triméthoprim-sulfaméthoxazole, FLM=fluméquine, COL=colistine, PIP=pipéracilline, CFT=ceftazidime, GEN=gentamicine.

La plaque a ensuite été scellée à l'aide d'un film de paraffine et mise à incuber pendant 16h à 37°C, sous une agitation de 150 rpm. La CMI des antibiotiques sur cette souche QC doit être située entre les valeurs présentées dans le Tableau 10. Si ce n'est pas le cas, la série de CMI est considérée comme invalide et doit être refaite.

Tableau 10 : Concentrations cible dans lesquelles doivent se trouver les CMI pour la souche contrôle qualité *Escherichia coli* ATCC 25922 (CLSI, 2015)

Antibiotique	Limites des CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	$\leq 0,5/9,5$
Ceftazidime	0,0625-0,5
Fluméquine	0,25-1
Gentamicine	0,25-1
Colistine	0,25-2
Oxytétracycline	0,5-4
Acide Oxolinique	0,625-0,25
Pipéracilline	1-4
Florfénicol	2-8

4.2.2.5 - Interprétation des résultats

Après incubation durant 24 heures, les CMI de chaque antibiotique des souches testées, correspondant à la concentration la plus faible d'antibiotique inhibant la croissance des bactéries, ont été déterminées. Les conditions de validations des résultats sont : contrôles validés sur la plaque (contrôles positifs présentant une croissance, contrôles négatifs sans croissance), CMI de la souche QC dans les concentrations ciblées, taille correcte de l'inoculum après dénombrement.

Tableau 11 : Critères d'interprétation des CMI selon le référentiel M100 du CLSI (2015) relatif à l'analyse de la résistance aux antibiotiques des bactéries non-Enterobacteriaceae

Antibiotique	Critères d'interprétation des CMI (CLSI 2015, M100)		
	S	I	R
Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	$\leq 2/38$	-	$\geq 4-76$
Colistine	≤ 2	4	≥ 8
Pipéracilline	≤ 16	32-64	≥ 128
Ceftazidime	≤ 8	16	≥ 32
Gentamicine	≤ 4	8	≥ 16

Les résultats de CMI ont ensuite été comparés aux valeurs données par le référentiel du CLSI pour *Pseudomonas* spp. lorsque celles-ci étaient disponibles (Tableau 11). Ces valeurs de breakpoints correspondent à des profils cliniques de sensibilité (S), niveau intermédiaires (I) ou de résistance (R) aux antibiotiques testés. Les profils de résistance ou sensibilité clinique aux antibiotiques testés ont été déterminés grâce à ces valeurs. Cela correspond, dans le cas des valeurs données par le CLSI, à la capacité ou nom des souches testées à résister à l'antibiotique aux concentrations utilisées en thérapeutique. Les valeurs de CMI obtenues pour chaque souche ont été regroupées dans des histogrammes à raison d'un graphique par antibiotique. Cette visualisation des données peut permettre de définir des cut-off, c'est-à-dire des valeurs délimitant une population dans un groupe phénotypique « sauvage » ou typique et « non-sauvage » ou atypique. Il est ainsi possible de déterminer des résistances atypiques à un antibiotique, sans pour autant que cette résistance soit d'importance clinique. La détermination des cut-off nécessite une analyse statistique des données mais il est également possible d'interpréter visuellement les résultats pour observer la formation de sous-population en fonction des valeurs de CMI.

Aucunes valeurs de référence n'étaient disponibles pour l'acide oxolinique, l'oxytétracycline, le florfenicol, la fluméquine et l'azithromycine. Nous avons donc décidé de déterminer lorsque c'était

possible des profils majoritaires de résistance ou de sensibilité à ces antibiotiques, pour ensuite pouvoir sélectionner les souches qui semblaient avoir un profil minoritaire. Dans les faits, cela se traduira par l'observation d'une répartition gaussienne des souches en fonction de la CMI de l'antibiotique pour ces souches et par l'observation potentielle de souches sortant de cette courbe de gausse. Pour l'analyse des résultats et dans la suite de ce chapitre, ces profils seront regroupés sous le terme « profils de non-sensibilité », englobant les résistances cliniques ou intermédiaires d'après les valeurs de référence du CLSI et les profils de résistance augmentée minoritaires par rapport à la tendance générale des souches analysées.

4.3 - Résultats et discussion

4.3.1 - *Listeria*

Aucune colonie présomptive du genre *Listeria* n'a été détectée sur les 56 échantillons testés. Cette absence de détection est cohérente avec les observations rapportées par Chen et al., (2010b) qui n'ont détecté que 2 isolats de *Listeria* sur 30 échantillons de peau de poisson-chat.

A l'issue des analyses microbiologiques, 4 échantillons du site A Raceway et un échantillon du site B Factory ont présenté des bacilles à coloration de Gram positif, à activité catalase positive et avec une coloration bleue sur milieu sélectif OCLA. 15 isolats issus de ces échantillons ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-ToF. Sept de ces isolats ont été identifiés comme étant *Cellulosimicrobium cellulans* (issus des échantillons A01R, A06R, A12R) et 8 *Microbacterium oxydans* (issus des échantillons : A12R, A13R, B13F). *C. cellulans* n'a été trouvé que dans l'élevage A. Ces deux espèces appartiennent à des genres dont certains représentants sont des organismes pathogènes opportunistes pour l'Homme (Petkar et al., 2011; Sharma et al., 2013). La présence de ces espèces n'est pas surprenante. En effet, certaines espèces du genre *Cellulosimicrobium* ont été isolées dans l'environnement (Yoon et al., 2007) et dans la vessie natatoire de truites arc-en-ciel (Villasante et al., 2017). La capacité de ce genre bactérien à se développer sur milieu ALOA a également été décrite (Angelidis et al., 2015). De même, *Microbacterium oxydans* a été précédemment isolé dans les sédiments d'un lac en Chine (Wang et al., 2016) et un autre représentant du genre, *M. paraoxydans*, a été isolé de prélèvements de foie de tilapias (Soto-Rodriguez et al., 2013). Des *Microbacterium* spp. ont été caractérisés dans le microbiote de la peau de vivaneaux (Larsen et al., 2013). De plus, sa capacité à croître sur milieu PALCAM, également sélectif des bactéries du genre *Listeria*, a été décrite (Stessl et al., 2009).

4.3.2 - *Aeromonas*

Aucun isolat présomptif d'*Aeromonas* n'a été détecté dans les échantillons de filets. Ce résultat est surprenant puisque des bactéries de ce genre ont été fréquemment détectées à partir de la peau de

poissons et/ou de filets : 30,6 % par Scarano et al. (2018) et 93 % des poissons prélevés dans des marchés (Hänninen et al., 1997) (Akinbowale et al., 2007; Schmidt et al., 2000). Néanmoins, la présence d'*Aeromonas* semble plus probablement être liée à une contamination d'environnement d'élevage puisqu'elle est souvent retrouvée dans le milieu aquatique (Ørmen and Østensvik, 2001). Or dans cette étude, seuls deux environnements d'élevage ont été testés. Enfin la période hivernale de réalisation de nos prélèvements a peut-être aussi influencé la survie ou la présence de ces bactéries.

4.3.3 - *Pseudomonas*

4.3.3.1 - Identification des isolats et confirmation de l'identification

La première identification phénotypique des *Pseudomonas* a permis la constitution d'une collection de 144 isolats présomptifs, soient des isolats poussant sur gélose CFC ayant une morphologie de bacilles Gram négatifs et oxydase positifs. Ces isolats provenaient de 54 échantillons dits « positifs », soient des échantillons dans lequel au moins un isolat a été observé. Lors de la remise en culture pour la qPCR, la présence de colonies présentant deux morphologies différentes a été observée pour 10 isolats présomptifs. Les deux types de colonies ont été testés par qPCR. Suite à cela, 125 des 154 isolats présomptifs ont été confirmés comme appartenant au genre *Pseudomonas* dont 54 provenaient d'échantillons de l'élevage A, (12 échantillons AR et 13 échantillons AF), 71 provenaient d'échantillons de l'élevage B (14 BR et 12 BF) (Tableau 12). Il est à noter que les 10 isolats présentant une morphologie de colonie différente sont également des souches de *Pseudomonas*. La prévalence des souches du genre *Pseudomonas* parmi nos échantillons est donc de 91,1 % (51/56), confirmant une forte prévalence de ce genre bactérien dans les poissons d'élevage et les eaux de rivière (Akinbowale et al., 2007; Gordon et al., 2007; Salgado-Miranda et al., 2010).

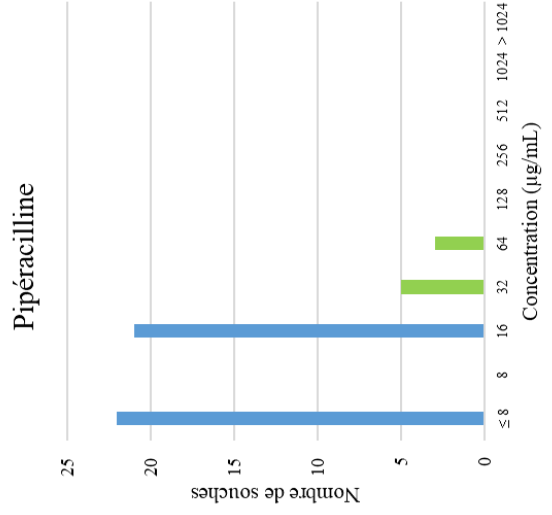
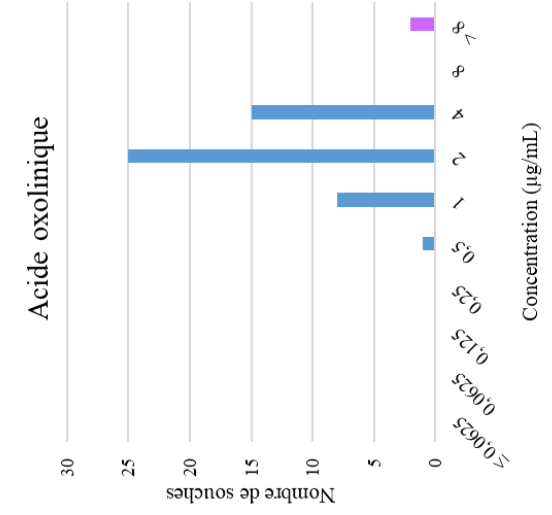
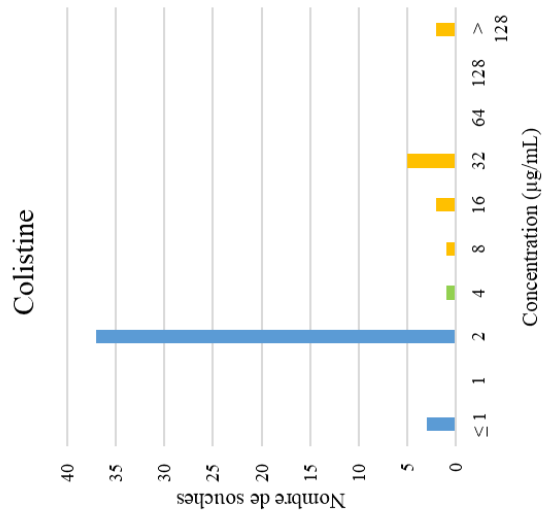
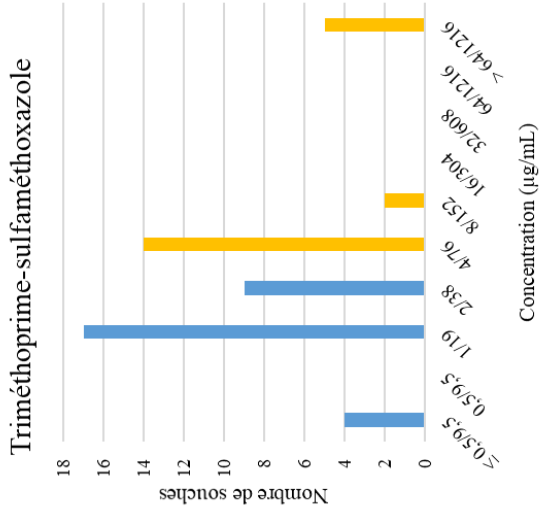
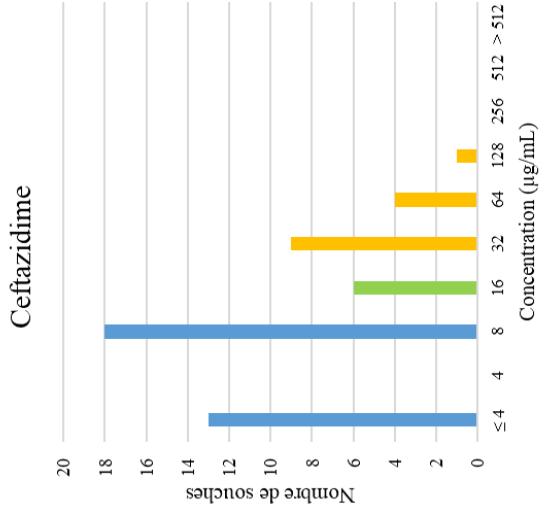
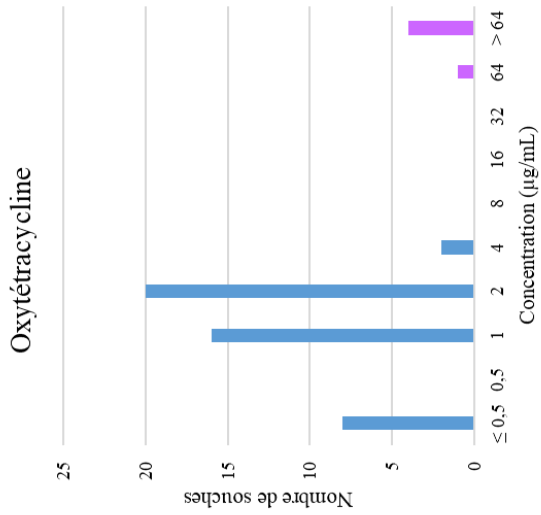
Tableau 12 : Nombre d'isolats de *Pseudomonas* spp. présomptifs, et confirmés, nombre d'échantillons positifs, en fonction de l'origine des échantillons

Origine		Identification présomptive				Confirmation par PCR			
		Isolats		Echantillons positifs		Souches		Echantillons positifs	
A	R	39	80	14	28	19	54	12	25
	F	41		14		35		13	
B	R	47	74	14	26	44	71	14	26
	F	27		12		27		12	
Total Echantillons R positifs		86		28		63		26	
Total Echantillons F positifs		68		26		62		25	
Total		154		54		125		51	

Légendes : PCR à l'aide des amorces *Pse435F* et *Pse449R* ciblant les régions V3-V4 de l'ADNR 16S. A et B représentent les identifiants des élevages prélevés, R et F représentent les conditions de transformations des filets (R = transformation au laboratoire, F = Transformation à l'usine)

4.3.3.2 - Analyse des profils de résistance aux antibiotiques

Parmi les isolats de *Pseudomonas* confirmés par PCR, une souche par échantillon positif (n =51 souches) choisie aléatoirement au sein des isolats de l'échantillon, a été mise en culture au contact d'antibiotiques à différentes concentrations pour évaluer les concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques de cette souche. Sur les 10 antibiotiques testés, il a été possible de déterminer des profils de résistance pour 6 d'entre eux (Figure 20). Les valeurs de breakpoint données par le CLSI dans le référentiel M100 ont permis d'observer des résistances intermédiaires ou des résistances cliniques pour 4 antibiotiques, soient pour la ceftazidime (6/51 intermédiaires, 11,76 % ; 15/51 résistantes, 27,45 %), l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole (21/51, 41,18 %), la colistine (1/51 intermédiaire, 1,96 % ; 10/51 résistantes, 19,61 %) et la pipéracilline (8/51 intermédiaires, 15,69 %). De plus, en l'absence de valeurs de référence pour certains antibiotiques vis-à-vis des *Pseudomonas*, l'examen visuel de la distribution des profils a permis d'observer des résistances potentielles, ou au moins augmentées par rapport aux autres souches, pour deux antibiotiques, l'oxytétracycline (5/51, 9,8 %) et l'acide oxolinique (2/51, 3,92 %).



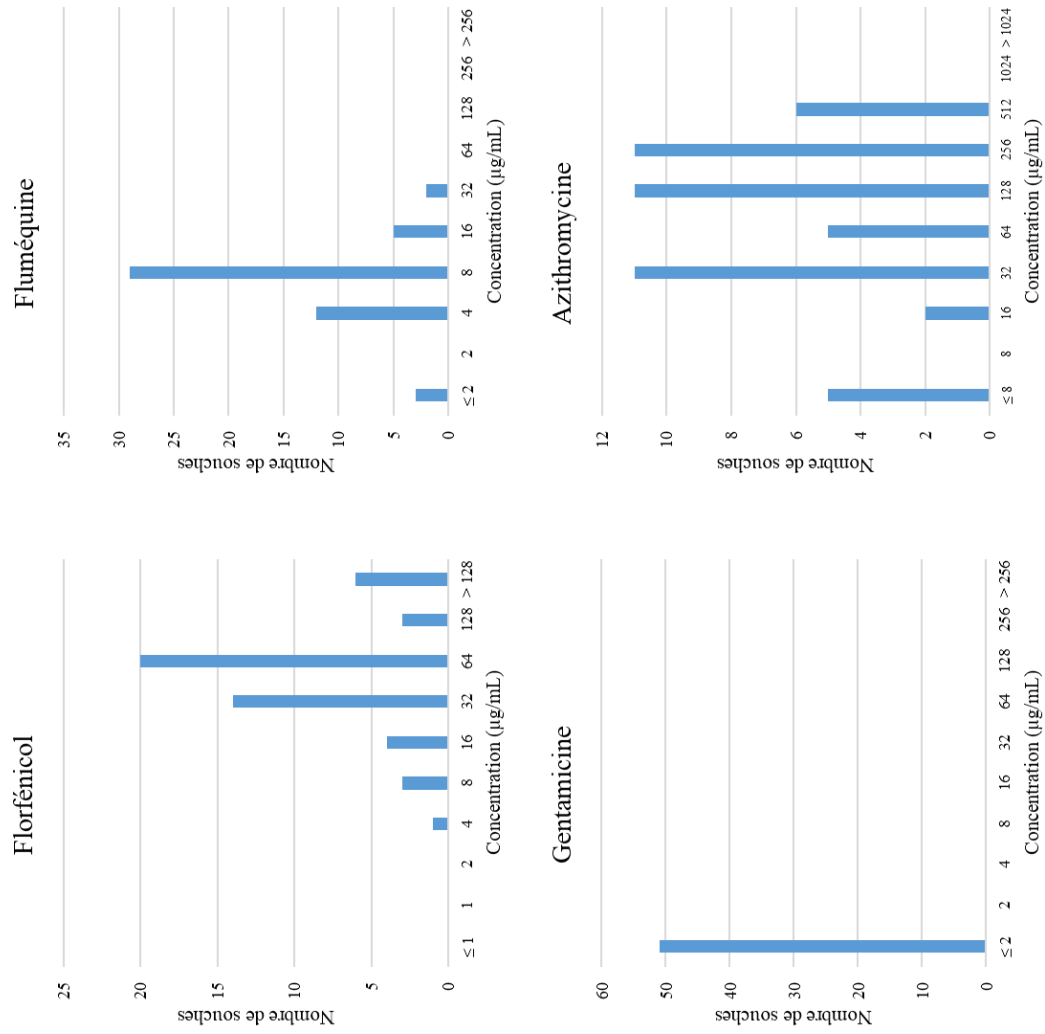


Figure 20 : Profils de CMI des antibiotiques vis-à-vis des souches de *Pseudomonas* testées

Les barres vertes correspondent à des profils de résistances intermédiaires, les barres jaunes correspondent à des profils de résistances cliniques et les barres violettes correspondent à des profils de résistance augmentées par rapport aux autres souches.

En tout, 37 souches présentaient un profil de « non-sensibilité » aux antibiotiques testées, soit des résistances cliniques, intermédiaires et/ou augmentées (Figure 21). Sur ces 37 souches, 30 étaient non-sensibles à 1 ou 2 antibiotiques. Deux souches ayant des profils de CMI similaires étaient résistantes à 5 antibiotiques (oxytétracycline, acide oxolinique, triméthoprime-sulfaméthoxazole, pipéracilline et ceftazidime) et étaient parmi les plus résistantes à 3 autres (florfénicol, fluméquine et azithromycine). Ces souches étaient issues des filets A03R et A14R de l'élevage A et filetés au laboratoire.

De précédentes études ont décrit de la résistance aux antibiotiques chez des souches de *Pseudomonas* issues de filet de poissons ou d'environnement d'aquaculture. Ainsi, la résistance de *Pseudomonas* au florfénicol a été décrite par Fernández-Alarcón et al. (2010) et Gordon et al., (2007). Dans cette dernière étude, étaient considérées comme résistantes les souches pour lesquelles la CMI du florfénicol était supérieure ou égale à 32 µg/mL. Dans notre cas, en prenant en compte ce critère, 43 souches sur 51 seraient considérées comme résistantes au florfénicol. La résistance de souches de *Pseudomonas* aux β-lactamines dans notre cas la pipéracilline ou la ceftazidime, a été décrite par Gordon et al., (2007) et Boss et al., (2016), cette dernière étude portant cependant sur *P. aeruginosa*. A l'instar des résultats que nous avons obtenus, Gordon *et al.* ont décrit l'expression de résistances à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole et à l'oxytétracycline, cette dernière résistance phénotypique ayant également été décrite par Miranda and Zemelman (2002).

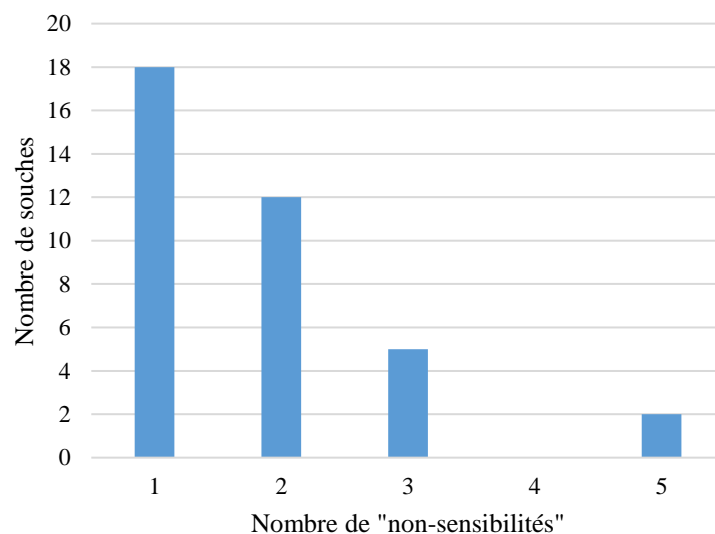


Figure 21 : Nombre de souches présentant de 1 à 5 profils de "non-sensibilité" aux antibiotiques testés.

Des résistances cliniques ou résistances augmentées ont été observées vis-à-vis d'antibiotiques utilisés en aquaculture, tels que le triméthoprim/sulfaméthoxazole, l'oxytétracycline et l'acide oxolinique, ce qui pourrait poser problème pour le traitement d'infections chez les poissons si les souches qui les portent sont pathogènes ou si les gènes sont transmissibles à d'autres espèces.

L'analyse des résistances phénotypiques des souches de *Pseudomonas* isolées devra être complétée d'une identification à l'espèce de ces souches. En effet, les critères d'interprétation des *Pseudomonas non-aeruginosa* ne sont pas valables pour les *Pseudomonas aeruginosa*, et l'identification de cette espèce parmi les isolats pourrait changer l'interprétation de ces résultats. L'identification microbiologique, biochimique et moléculaire des espèces de *Pseudomonas* manque de sensibilité et les espèces ne sont pas bien discriminées. Les analyses spectrales telles que le MALDI-ToF permettent d'obtenir une identification fiable mais dépendent de la banque de donnée utilisée pour l'analyse (Mulet et al., 2017).

Nous avons retenu trois genres bactériens d'intérêt pour l'étude des résistances phénotypiques, et comme nous l'avons vu, aucune souche des genres *Listeria* et *Aeromonas* n'a été isolée, rappelant les limites de la culture, mais aussi pouvant évoquer une prévalence de ces genres dans les bassins d'élevage de truites testés inférieure à 20 %.

Si les analyses phénotypiques conduites ont permis d'obtenir des profils des niveaux de la résistance exprimée aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas*, cette approche ciblée reste limitée. D'abord, elle ne permet de détecter que ce qui est recherché, et le nombre de cibles (espèces d'intérêt, nombre d'isolats et antibiotiques testés) qui pour des raisons de coût, de temps ou de moyens humains et techniques a été restreint. De plus, les profils détectés de potentielle résistance multiple des souches de *Pseudomonas* implique l'existence chez ces souches de plusieurs gènes de résistance qui composent le résistome des filets de poissons. Pour ces raisons, la mise en place des analyses génotypiques, qui seront maintenant présentées, doit permettre de caractériser un autre aspect de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries, à savoir la présence de gènes de résistance aux antibiotiques.

Chapitre 5 : Caractérisation génotypique de la résistance aux antibiotiques des communautés bactériennes et détection des résidus

L'objectif général de cette thèse étant d'avoir une caractérisation des profils de résistance aux antibiotiques des communautés bactériennes associées au filet de truite arc-en-ciel, une caractérisation des gènes de résistance aux antibiotiques était nécessaire. Nous avons souhaité pour cela recourir à la technologie Smartchip Realtime PCR (Takara), qui est une méthode de qPCR haut-débit, ciblant en une seule analyse un grand nombre de gènes sur plusieurs échantillons. Cette technologie Smartchip Realtime PCR (Takara), à défaut d'être exhaustive, permet de limiter le biais du nombre de cibles. En effet, elle permet de réaliser en parallèle 5184 réactions de PCR, réparties dans notre cas en 248 gènes de résistance recherchés dans 20 échantillons par analyse. Cependant, cette méthode moléculaire nécessite une quantité minimale d'ADN et nous devons connaître sa capacité de détection. Pour cela, nous devons d'abord quantifier la flore bactérienne des filets frais, supposée faible. De plus, et comme nous l'avons déjà précisé, la résistance aux antibiotiques dans une population de bactéries dont l'origine est majoritairement environnementale (l'eau de la rivière ou l'environnement de l'atelier de filetage) telle que celle des filets étudiés, est un événement potentiellement rare (Gordon et al., 2007; Muziasari et al., 2017). C'est pourquoi les capacités de détection de la qPCR haut-débit par la technologie Smartchip Realtime PCR (Takara) des ARG à partir des extraits d'ADN bactériens récupérés de filets rincés, devaient être testées avant une mise en œuvre sur l'ensemble de nos échantillons. Il a également fallu constituer la liste des gènes de résistance aux antibiotiques dont nous avons voulu rechercher la présence. Enfin, un prestataire a été choisi, avec lequel nous pouvions également échanger à propos de la technologie employée, de ses limites et capacités ainsi que de la méthode d'analyse des données obtenues. Ce prestataire retenu était la plateforme GEH « Génétique Environnementale et Humaine », située sur le campus de l'Université de Rennes 1.

Pour l'observation et la description des communautés bactériennes des échantillons dans nos 4 conditions (ferme A et ferme B, fileté au laboratoire ou à l'atelier) nous avons décidé de mettre en œuvre le séquençage haut-débit du gène de l'ADNR 16S avec comme prestataire, la société GenoScreen. Préalablement à la réalisation de ces analyses sur les 56 échantillons, il nous a fallu estimer la profondeur du séquençage selon la méthode mise au point par le prestataire et effectuer les éventuels ajustements nécessaires, par rapport aux extrêmes de variation de charges bactériennes des filets de poisson que nous aurons quantifiées.

En parallèle de l'analyse des gènes et des communautés bactériennes, nous avons souhaité déterminer le niveau de résidus antibiotiques dans les filets pour caractériser au mieux les profils de résistance. Les résidus d'antibiotiques dans nos échantillons ont été dosés par l'unité Analyse des Résidus et Contaminants du laboratoire Anses de Fougères, partenaire de ce projet. Ce laboratoire est Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les résidus d'antibiotiques et de colorants, et Laboratoire national de référence (LNR) pour les résidus de médicaments vétérinaires. Il a développé une méthode de détection et quantification des résidus d'antibiotiques dans les matrices alimentaires basées sur la technologie de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) (Dubreil et al., 2017).

Ce chapitre présentera donc dans un premier temps le travail de calibration qui a été conduit avant de réaliser les analyses génotypiques sur les 56 échantillons. Nous aborderons d'abord la calibration pour la mise en œuvre du séquençage de l'ADNR 16S des communautés bactériennes associées aux échantillons incluant la quantification de ces communautés, puis la calibration de la détection des gènes de résistance aux antibiotiques grâce à la technologie du SmartChip sera présentée. Dans un second temps et sous la forme d'un article soumis au journal *Frontiers in Microbiology* (soumise le 03/08/2020 sous le numéro 590902), nous présenterons et discuterons les résultats de ces analyses.

5.1 - Quantification du niveau moyen de la flore bactérienne des filets.

Les analyses haut-débit telles que le séquençage de l'ADNR 16S et la qPCR haut-débit nécessitent une concentration d'ADN initiale relativement importante. La société Genoscreen que nous avons choisie pour la caractérisation des communautés bactériennes par séquençage de l'ADNR 16S, recommande une concentration de 2,5 ng/μL d'ADN. De même, la plateforme GEH retenue pour la réalisation des analyses de PCR haut-débit recommandait une concentration de 10 ng/μL d'ADN. Cependant, les extraits d'ADN obtenus après rinçage des filets de truite contiennent potentiellement de l'ADN eucaryote appartenant au poisson, ce qui fausse la quantification de l'ADN. Nous avons donc dû établir la relation entre la charge bactérienne des échantillons et la validité des analyses réalisées. Afin de mettre en place des tests préliminaires permettant de valider la faisabilité des analyses moléculaires (séquençage et PCR haut-débit), la flore bactérienne des filets a été récupérée par rinçage mécanique et dénombrée par quantification du gène *tuf* dans les ADNs extraits de culots cellulaires après rinçage, tel que décrit dans le Chapitre 2 de ce manuscrit. Il a ainsi été possible d'évaluer la charge bactérienne moyenne d'un filet de truite arc en ciel. Les charges bactériennes des différents échantillons de poissons sont détaillées dans la Figure 22.

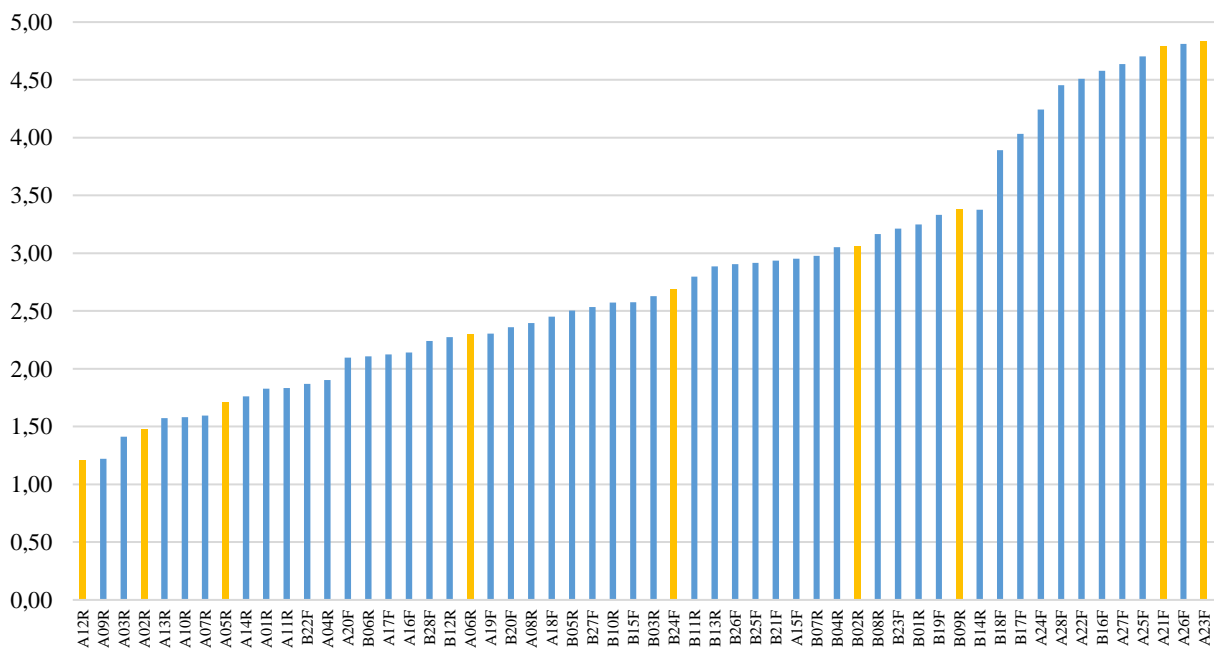


Figure 22 : Quantification de la flore bactérienne totale en log UFC/g des 56 échantillons, obtenue par quantification du gène *tuf*. Les histogrammes oranges correspondent aux échantillons choisis pour le test préliminaire de séquençage.

La charge bactérienne moyenne des échantillons des filets (chair plus peau) de truite arc-en-ciel est de 2,80 log UFC/g (Tableau 13). Mais une grande disparité de concentrations bactériennes, s'échelonnant entre 1,21 log UFC/g et 4,83 log UFC/g, a été observée. La charge bactérienne moyenne des échantillons issus des poissons AR (élevage A, Raceway) est significativement inférieure à celle des échantillons issus des poissons AF (élevage A, Factory) (p-value < 0,0001, t-test de Student). De même, les échantillons R (A et B confondus) sont significativement moins concentrés en bactéries que les échantillons F (p-value < 0,0001, t-test de Student). De façon cohérente, le filetage en atelier de transformation augmente la charge bactérienne. L'apport en bactéries peut être dû aux surfaces avec lesquelles les filets ont été en contact ou à des transferts de bactéries depuis des réservoirs, à cause du procédé de filetage lui-même. En effet, l'éviscération des poissons, faite par l'aspiration du tube digestif, peut entraîner un arrachage partiel et un écoulement de contenu du tractus digestif vers le filet, augmentant ainsi la charge bactérienne des échantillons.

Tableau 13 : Concentrations bactériennes moyennes et écart-types en fonction de l'origine des échantillons.

Origine des filets		Moyenne (log UFC/g)	Ecart-type	p-value
A	R	1,70	0,35	< 0,0001
	F	3,65	1,20	
B	R	2,86	0,40	0,5
	F	3,00	0,75	
A+B	R	2,28	0,69	< 0,0001
A+B	F	3,33	1,03	
Total		2,80	1,02	

A et B représentent les identifiants des élevages prélevés, R et F représentent les conditions de transformations des filets (R = transformation au laboratoire, F = Transformation à l'usine).

La faible charge bactérienne de certains échantillons pouvant poser problème pour les analyses haut-débit (PCR haut-débit et séquençage de l'ADNR 16S), ces échantillons faiblement concentrés ont été utilisés en priorité pour un séquençage test de l'ADNR 16S réalisé auprès du prestataire.

5.2 - Séquençage haut-débit de l'ADNR 16S

Comme dit précédemment, le séquençage haut-débit de l'ADNR 16S est une méthode nécessitant une quantité minimale d'ADN cible que nous n'étions pas certains d'obtenir pour chaque échantillon, étant donné la faible charge bactérienne de certains échantillons issus de la campagne de

prélèvement (Figure 22). Un premier séquençage a été mené sur une sélection d'échantillons selon le protocole du prestataire, la société GenoScreen. Ce projet pilote comprenait 10 séquençages soit 9 extraits d'ADN d'échantillons de filets de truite et un témoin d'extraction (tampons d'extractions de l'ADN), auquel a été ajouté un blanc et un témoin positif fourni par le prestataire.

5.2.1 - Matériels et Méthodes

5.2.1.1 - Origine et choix des échantillons

Une sélection de 9 extraits d'ADN parmi les échantillons quantifiés précédemment, a été réalisée de façon à évaluer la qualité du séquençage sur les communautés bactériennes d'échantillons possédant les plus fortes et les plus faibles concentrations bactériennes, ainsi que certains échantillons intermédiaires. Les extraits sélectionnés sont ceux présentés en jaune dans la Figure 22. A cette sélection d'échantillons a été ajouté un témoin d'extraction (TE) obtenu à partir des tampons du kit d'extraction d'ADN, avec un protocole d'extraction mis en œuvre sans culot cellulaire initial, pour contrôler la contamination due aux fragments d'ADN parasite du kit, le « kitome » (Stinson et al., 2019). Des contrôles internes positifs (communauté bactérienne artificielle) et négatifs (eau stérile) inhérents au protocole de routine du prestataire ont également été ajoutés.

5.2.1.2 - Séquençage

Les extraits sélectionnés ont été séquencés avec la technologie Illumina MiSeq 2x250pb. L'amplification et le séquençage, réalisés selon le protocole standard du prestataire, ainsi que le traitement et l'analyse bio-informatique des données obtenus, ont été réalisés tels que décrits dans l'article présenté plus tard dans ce chapitre. Les régions V3-V4 de l'ADNR 16S ont été séquencés selon le protocole de la société Genoscreen par la technologie Illumina MiSeq. Au cours de la préparation des bibliothèques, une double-purification de l'ADN et une concentration de l'ADN bactérien ont été réalisées.

5.2.1.3 - Analyse bio-informatique

L'analyse des séquences a été faite sur la plateforme FROGS (Escudié et al., 2018). Les séquences ont été « clusterisées » en OTU (Operational Taxonomic Units) grâce à la méthode SWARM (Mahé et al., 2014), et les clusters regroupant moins de 0,005 % des séquences ont été supprimées. L'affiliation taxonomique a été réalisée via NCBI blastn+ en confrontant les séquences à la banque de donnée Silva 16S rRNA (SSURef_132_SILVA) (Quast et al., 2013). Les clusters affiliés à l'ADN de la truite arc-en-ciel et les OTU qui n'ont pas été affiliées avec un taux d'identité ou de couverture supérieur à 97 % ont été éliminés.

5.2.2 - Résultats

Une double-purification a été nécessaire pour 6 sur 9 des échantillons, elle a permis d'optimiser le signal obtenu et d'obtenir un nombre de reads satisfaisant pour ces échantillons contenant beaucoup d'ADN eucaryote, correspondant à la matrice filet de truite. Le nombre de reads obtenus sont présentés Tableau 14. En conclusion du rapport d'analyse fourni par GenoScreen, le séquençage des bibliothèques d'amplicons ADNr 16S a permis d'obtenir un *run* de bonne qualité selon les critères du prestataire. Les ADN extraits des échantillons de filets de truite semblent être adaptés pour caractériser leur flore bactérienne.

La qualité du séquençage a été validée selon les critères déterminés par la société GenoScreen. Les séquences pleine longueur spécifiques étaient suffisantes en qualité et en nombre pour permettre la réalisation de l'affiliation taxonomique des données obtenues. Cependant, une analyse des affiliations taxonomiques de reads obtenus a été réalisée suite au retour du prestataire. Il est apparu qu'un grand nombre de reads dans chaque échantillon appartenait à plusieurs unités taxonomiques non affiliées. Les séquences de ces taxa ont été analysées grâce à l'outil BLAST® de NCBI. Elles correspondaient toutes à de l'ADN chromosomique de truite, et ne pouvaient donc pas être conservées. L'évaluation quantitative du séquençage a donc été refaite en ne prenant en compte que les reads correspondant à de l'ADN bactérien.

Tableau 14 : Concentration en ADN des extraits séquencés et nombre de reads ADNr 16S pleine longueur obtenues pour les 9 échantillons testés suite à l'étape d'assemblage, avant et après l'élimination des séquences correspondant à l'ADN du poisson.

Echantillon	Concentration en ADN (ng/μL)	Nombre de Reads assemblés	Nombre de Reads sans matrice
A23F	13,23	27249	25729
A21F	22,23	25261	21732
B09R	3,49	22041	10270
B02R	5,27	19758	4552
B24F	3,28	17845	3019
A06R	4,66	19348	6324
A05R	3,76	16914	4096
A12R	4,24	15870	2901
A02R	8,56	19911	9352
Témoin positif	17,30	27045	/
Témoin négatif	7,14	796	/
TE	5,63	390	/

Légende : Les cases grisées correspondent aux échantillons pour lesquels une double-purification a été nécessaire.

Après cet ajustement, la plupart des échantillons avaient perdu un grand nombre de reads, en particulier les échantillons contenant peu d'ADN bactérien initialement, tel que l'échantillon A12R (Tableau 15).

5.2.3 - Conclusions

Le séquençage des extraits d'ADN a été réalisé de façon satisfaisante en répondant aux critères qualité. En effet, la société Genoscreen a indiqué que le séquençage « a permis d'obtenir des données cohérentes avec les spécifications du fournisseur Illumina et dont la qualité est validée selon les critères déterminés par la société GenoScreen », et ce notamment grâce à la double purification et concentration de l'ADN réalisée. Néanmoins une attention particulière devra être portée aux échantillons possédant une faible charge bactérienne puisque la proportion d'ADN bactérien dans les extraits est vraisemblablement faible. La double purification peut permettre de réduire ce problème mais n'élimine pas la totalité des séquences affiliées à l'ADN de la truite qui représentaient respectivement 81,7 %, 53 % et 75,8 % du total des séquences obtenues pour les échantillons A12R, A02R et A05R dont les charges bactériennes étaient les plus faibles. Cela signifie qu'il pourrait être difficile de caractériser les communautés faiblement représentées dans les échantillons faiblement chargés, le nombre de séquences disponible ne permettant de caractériser que les communautés majoritaires. Il a néanmoins été décidé

suite à ce test de séquencer l'ensemble des échantillons en se reposant sur la répétition des échantillons pour une même condition (N = 14 par lot). L'option consistant à augmenter la quantité d'ADN en poolant les ADN des échantillons d'un même lot a été écartée pour conserver la capacité à observer une diversité inter-individuelle entre poissons, au sein de l'espèce truite arc-en-ciel, qui a été décrite (Lowrey et al., 2015) ainsi que chez d'autres espèces comme l'omble des fontaines (*Salvelinus fontinalis*) (Boutin et al., 2014), le vivaneau (*Sparus aurata*) et le bar commun (*Dicentrarchus labrax*) (Chiarello et al., 2015).

5.3 - Détection des gènes de résistance aux antibiotiques par PCR haut-débit

Les objectifs des tests réalisés ont été d'évaluer :

- Le seuil de détection de la technologie Smartchip, c'est-à-dire la quantité de flore bactérienne initiale nécessaire pour détecter les ARG s'ils sont présents ;
- La capacité de la technologie à détecter des gènes de résistance dont l'abondance relative est faible par rapport à une communauté majoritaire.

5.3.1 - Matériel et méthodes

5.3.1.1 - Détermination des ARG recherchés

Une liste de 248 paires de primers a été déterminée (Tableau S1 de l'article 2, décrit dans ce Chapitre). Cette liste inclut des primers sélectionnés à partir d'une liste publiée par Muziasari *et al.* (2017), et validés dans de précédents travaux (Looft et al., 2012; Muziasari et al., 2014; Pitkanen et al., 2011; Tamminen et al., 2011; Zhu et al., 2013), auxquels ont été ajoutés des primers amplifiants les gènes codant pour la résistance à la colistine *mcr-1* (Liu et al., 2016), *mcr-2* (Xavier et al., 2016), *mcr-3* (Yin et al., 2017), *mcr-4* (Carattoli et al., 2017) et *mcr-5* (Borowiak et al., 2017). La liste de primer définie pour notre projet comprenait au final 190 paires d'amorces ciblant des gènes codant pour des résistances à 9 familles d'antibiotiques : les aminosides, β -lactamines, colistine, fluoroquinolones, macrolides, phénicols, tétracyclines, triméthoprime et vancomycine. Les 58 autres paires ciblaient des

gènes codant pour des pompes à efflux et des gènes de multidrug resistance (n = 35), des gènes de résistances aux antiseptiques (n = 7), et à des peptides antibactériens (n = 10), ainsi que des gènes de ménage (n = 10).

5.3.1.2 - Sélection des souches contenant des gènes de résistances caractérisés, et préparation des inocula

Quatre souches bactériennes possédant un gène de résistance caractérisé (Tableau 15) ont été choisies comme marqueur bactérien. Ces souches d'origine clinique ont été isolées au cours des analyses médicales de routine et provenaient du CHU d'Angers. Leur gène de résistance a été identifié par PCR avant la réalisation de ces travaux.

Tableau 15 : Liste des souches bactériennes marqueuses utilisées et leur ARG caractérisé.

Souche bactérienne	ARG
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>vanA</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanB</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>mecA</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>mcr-1</i>

Ces souches marqueuses ont été inoculées sur les échantillons de filets de truite dans deux conditions de concentrations :

- Les quatre souches aux mêmes concentrations : de 10^8 à 10^4 UFC/mL dans l'inoculum ;
- Une souche marqueuse à forte concentration (10^8 UFC/ml), appelée et SMa (Souche Majoritaire), et les autres à faible concentration (10^4 UFC/ml), appelées Smi (Souche Minoritaire).

5.3.1.3 - Préparation des inocula

Pour chaque souche, à partir d'une culture pure sur milieu gélosé BHI, 2 à 3 colonies ont été repiquées dans 8 mL de bouillon BHI et mises à incuber à 37°C pendant 16h, ce qui a permis d'obtenir une suspension-mère d'environ 10^9 UFC/mL. La concentration de la suspension-mère a été contrôlée par dénombrement en diluant en série la suspension de façon décimale de -1 (dilution au 1/10) à -8 (dilution au 1/100 000 000) dans une solution saline (eau + 9 % NaCl), et en étalant 100 µL des dilutions -6, -7 et -8 sur des milieux gélosés BHI. Les colonies sur chaque boîte de pétri ont été dénombrées après incubation à 37°C pendant 24h.

Pour obtenir les inocula, deux méthodes ont été employées en fonction des questions auxquelles nous voulions répondre. Pour déterminer le seuil de détection de la méthode, des « suspensions homogènes » ont été préparées. Pour cela, 1 mL de chaque suspension-mères a été prélevé et dilué dans 6 mL de solution saline. La suspension finale avait donc un volume de 10 mL et contenait 10^8 UFC/mL des quatre souches marqueuses. Cette suspension fille a ensuite été diluée au 1/10 en série jusqu'à obtenir une gamme d'inoculation allant de 10^8 UFC/mL à 10^4 UFC/mL pour chaque souche présente dans l'inoculum.

En parallèle, des « suspensions non-homogènes » ont été préparées pour tester l'effet de l'abondance relative des souches. Chaque inoculum contenait une souche majoritaire et 3 souches minoritaires, avec une différence de 4 log UFC/mL entre les concentrations des souches majoritaires (SMa) et minoritaires (Smi). Pour cela, les suspension-mères des trois Smi ont été diluées quatre fois au 1/10 dans une solution saline, puis 1 mL de ces dilutions ont été dilués dans un unique tube contenant 6 mL de solution saline. A cette suspension a été ajouté 1 mL de la suspension-mère de la SMA. Chaque suspension non-homogène contenait donc 3 Smi à une concentration de 10^4 UFC/mL et une SMA à une concentration de 10^8 UFC/mL.

Les suspensions obtenues ont ensuite été centrifugées à 10 000 g pendant 3 minutes, puis les culots ont été re-suspendus dans 2,5 mL de solution saline, de façon à obtenir des inocula concentrés quatre fois par rapport aux suspensions.

5.3.1.4 - Inoculation des échantillons et récupération de l'ADN bactérien

Les filets de truite arc-en-ciel provenaient de poissons élevés à la station aquacole d'Oniris pour lesquels l'historique de traitement était parfaitement maîtrisé et ici sans aucun traitement. Les poissons ont été filetés et échantillonnés au laboratoire selon le protocole standard décrit dans le Chapitre 3. 250 μ L de chaque inoculum ont été vaporisés de façon homogène sur un échantillon. La concentration des bactéries marqueuses sur les échantillons s'échelonnait donc de 6,52 log UFC/g à 2,52 log UFC/g (Figure 23).

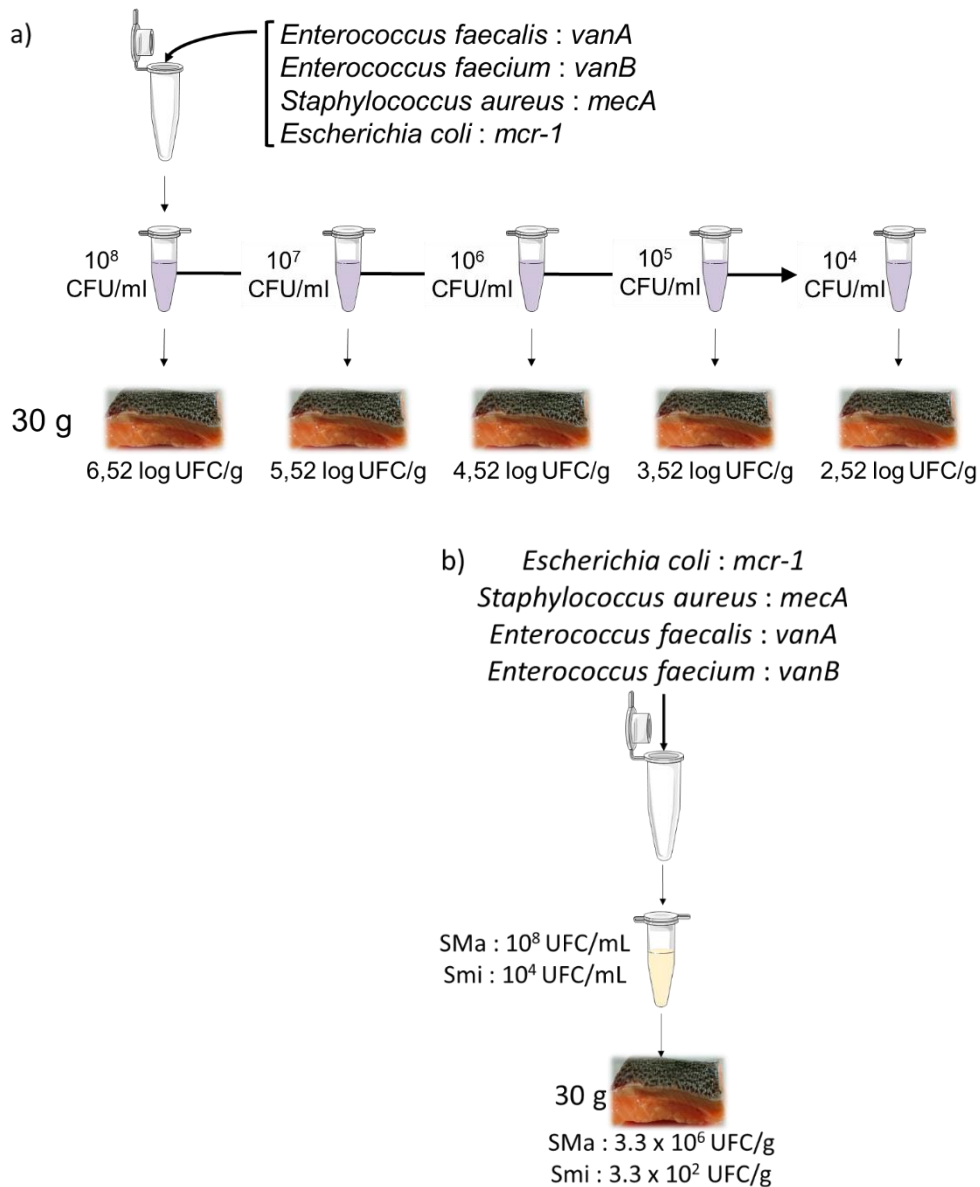


Figure 23 : Représentation schématique de l'inoculation des échantillons a) à l'aide des suspensions homogènes et b) à l'aide des suspensions non-homogènes.
 SMA = Souche Majoritaire ; SMI = Souche minoritaire

Après 15 minutes à température ambiante de contact de l'inoculum, l'échantillon a été rincé et l'ADN des culots cellulaires a été extrait selon le protocole décrit dans le Chapitre 2 de ce manuscrit.

5.3.1.5 - Détection des ARG par qPCR haut-débit.

Le détail de l'amplification, le matériel utilisé ainsi que les contrôles sont décrit dans l'article ci-après. L'ADN obtenu après extraction a été utilisé pour réaliser une qPCR haut-débit à l'aide de la technologie Smartchip Realtime PCR System de Takara. Cette technologie nous a permis de rechercher

248 gènes de résistance aux antibiotiques dans les échantillons grâce à la réalisation en parallèle de 5184 réactions de PCR dans un volume de 100 nL par réaction.

5.3.1.6 - Analyse des données et interprétation

Les courbes d'amplification et de fusion des gènes ont été analysées pour juger de la spécificité de l'amplification. D'après la bibliographie, une réaction est considérée comme positive si le gène est détecté à un cycle d'amplification (C_T pour « *Cycle threshold* ») inférieur à 27 (Muziasari et al., 2017; Zhu et al., 2013). Pour une meilleure visualisation des données, un code couleur a été affecté pour la présentation des résultats dans les tableaux, il correspond au niveau d'amplification des gènes. Un gradient de bleu, vert, puis jaune a été utilisé pour illustrer une concentration croissante du gène détecté. Une case blanche correspond à une absence d'amplification, ou à une amplification au-dessus du seuil de 27 C_T .

5.3.2 - Résultats et discussion

5.3.2.1 - Evaluation du seuil de détection

Lorsque la charge bactérienne des souches dont nous voulions détecter le gène de résistance était entre 3,52 et 6,52 log UFC/g, nous avons pu observer une amplification spécifique des gènes, décroissante avec la diminution de la charge bactérienne (Tableau 16). En attestent les valeurs de C_T d'abord faibles, indiquant une forte concentration initiale de la cible, puis en augmentation inversement proportionnelle à la concentration bactérienne, attestant une diminution de la concentration initiale du gène ciblé. En deçà d'une charge bactérienne de 3,52 log UFC par gramme de filet de truite, les valeurs de C_T correspondant à l'amplification des gènes cibles sont supérieures à 27 pour les gènes *mcr-1*, *mecA* et *vanB*, ce qui correspond à une amplification considérée comme non spécifique. De plus, aucune amplification n'a été observée pour le gène *vanA* à cette concentration. Cela signifie que dans nos conditions expérimentales de prélèvement (poissons frais filetés au laboratoire ou à l'atelier) et de récupération des bactéries à partir de la matrice, un gène peut ne pas être détecté si la concentration dans les filets des bactéries qui le portent est inférieure à 3,52 log UFC/g/

Tableau 16 : Abondance relative des gènes (seuil de détection fixée à $< 27C_T$) en fonction de la charge bactérienne dans les inocula et valeurs de C_T détectées.

ARG	Concentrations des bactéries résistantes (log UFC/g)				
	2,52	3,52	4,52	5,52	6,52
<i>mcr-1</i>	28.26	23,78	21,91	21,68	17,7
<i>mecA</i>	28.16	24,5	22,25	21,97	17,87
<i>vanA</i>	/	26,31	23,69	23,13	19,05
<i>vanB</i>	28.27	26,38	22,91	22,17	17,36

Faible concentration  Forte concentration


Ce seuil de détection est à prendre en compte puisqu'un gène présent à un faible nombre de copies pourrait ne pas être détecté. La non-détection d'un gène ne signifiera donc pas que ce gène est effectivement absent. Il est cependant intéressant de noter qu'au cours de cette analyse, d'autres ARG que ceux recherchés ont été amplifiés à des C_T inférieurs à 27, et ce même à des concentrations faibles de bactéries marqueuses (2,52 log UFC/g), tels que des gènes de résistance aux aminosides (*aacA*, *aadA1* et *aadE*), aux macrolides (*ermB* et *ermT*), aux tétracyclines (*tetL* et *tetM*) et des pompes à efflux (*acrR*, *acrB* et *tolC*). A cette concentration bactérienne, les C_T des gènes de résistances étaient compris entre 23,79 et 26,88. Des ARG potentiellement fortement représentés pourraient être détectés dans les échantillons ayant une faible charge bactérienne, à condition qu'un nombre suffisant de copies de ces gènes soient présents.

5.3.2.2 - Effet de l'abondance relative des souches

Les colonnes du tableau 18 présentent les 3 échantillons testés, chacun contenant un gène majoritaire (SMa) et 3 gènes minoritaires (Smi). Les lignes du tableau présentent les gènes de résistance recherchés dans les 3 échantillons. Les ARG des SMa restent bien détectés. En revanche, les gènes des Smi n'ont pas été détectés, ou à des valeurs de cycles correspondant à une amplification non spécifique (Tableau 17), ce qui est probablement dû au seuil de détection plutôt qu'à un masquage des Smi par les SMa étant données les concentrations bactériennes en souches minoritaires (2,52 log UFC/g).

Tableau 17 : Abondance relative des gènes (seuil de détection fixée à $< 27C_T$) et valeurs de C_T détectées

		ARG majoritaire		
		<i>mcr-1</i>	<i>mecA</i>	<i>vanA</i>
ARG recherchés	<i>mcr-1</i>	22,21	/	/
	<i>mecA</i>	27,88	16,19	28,81
	<i>vanA</i>	/	33,06	19,14
	<i>vanB</i>	/	/	/

Faible concentration  Forte concentration

Le code couleur correspond au niveau d'amplification des gènes. Les cases blanches correspondent à une absence d'amplification, ou à une amplification au-dessus du seuil de 27 Ct.

5.3.2.3 - Conclusion

Le seuil de détection de la méthode a été fixé à 3,52 log UFC/g. En dessous de ce seuil une absence de signal ne peut pas être associée avec certitude à une absence de gènes. L'intérêt de multiplier les échantillons pour chaque lot est d'autant plus grand (N = 14 dans notre cas), puisque cela pourrait permettre de détecter des gènes faiblement représentés dans la population bactérienne des poissons étudiés. En effet, plusieurs cas de figures peuvent se présenter. Si un gène est détecté, il sera possible de conclure qu'il est présent dans au moins 20 % des échantillons. Si un gène n'est pas détecté, il peut être effectivement absent, mais il peut également être présent soit dans moins de 20 % des échantillons, soit dans un trop faible nombre de copies pour être détecté.

5.4 - Préambule à l'article 2

Les données obtenues lors des tests de calibration des méthodes ont permis de confirmer la faisabilité des analyses, avec cependant une réserve concernant la quantité de bactéries sur les filets qui pourrait limiter la détection de certains gènes ou populations bactériennes. La combinaison des résultats moléculaires avec les dosages de résidus d'antibiotiques réalisés par le laboratoire Anses et les questionnaires soumis aux éleveurs devaient permettre d'obtenir une image des caractères de résistance aux antibiotiques associé aux filets de truite arc-en-ciel en fonction des conditions de prélèvements, et les facteurs qui l'influencent. Ces travaux sont présentés sous la forme du manuscrit de l'article révisé et soumis au journal *Frontiers in Microbiology* sous le numéro 590902.

5.5 - Antibiotic resistome and bacterial communities of farmed rainbow trout fillets (*Oncorhynchus mykiss*): Research Paper

Nicolas HELSENS^{1,2*}, Ségolène CALVEZ², Hervé PREVOST¹, Agnès BOUJU-ALBERT¹, Aurélien MAILLET¹, Albert ROSSERO¹, Dominique HURTAUD-PESSEL³, Monique ZAGOREC¹, Catherine MAGRAS^{1*}

¹INRAE, Oniris, SECALIM, 44300, Nantes, France

²INRAE, Oniris, BIOEPAR, 44300, Nantes, France

³ANSES Laboratoire de Fougères, Unité Analyse des Résidus et Contaminants, 35306, Fougères, France

Correspondence:

Nicolas HELSENS nicolas.helsens@oniris-nantes.fr

Catherine MAGRAS catherine.magras@oniris-nantes.fr

Keywords: Antimicrobial resistance genes, antibiotic residues, factory processing, raceway, fish fillet, resistome, bacterial communities.

Abstract

The rise of antibiotic resistance is not only a challenge for human and animal health treatments, but is also posing the risk of spreading among bacterial populations in foodstuffs. Farmed fish-related foodstuffs, the food of animal origin most consumed worldwide, are suspected to be a reservoir of antibiotic resistance genes and resistant bacterial hazards. However, scant research has been devoted to the possible sources of diversity in fresh fillet bacterial ecosystems (farm environment including rivers and practices, and factory environment). In this study bacterial communities and the antibiotic resistance genes of fresh rainbow trout fillet were described using amplicon sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene and high-throughput qPCR assay. The antibiotic residues were quantified using liquid chromatography/mass spectrometry methods. A total of 56 fillets (composed of muscle and skin tissue)

from fish raised on two farms on the same river were collected and processed under either factory or laboratory sterile filleting conditions. We observed a core-bacterial community profile on the fresh rainbow trout fillets, but the processing conditions of the fillets has a great influence on their mean bacterial load (3.38 ± 1.01 log CFU/g vs 2.29 ± 0.72 log CFU/g) and on the inter-individual diversity of the bacterial community. The bacterial communities were dominated by Gamma- and Alpha-proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, and Actinobacteria. The most prevalent genera were *Pseudomonas*, *Escherichia-Shigella*, *Chryseobacterium*, and *Carnobacterium*. Of the 73 antibiotic residues searched, only oxytetracycline residues were detected in 13/56 fillets, all below the European Union maximum residue limit (6.40 to 40.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Of the 248 antibiotic resistance genes searched, 17 were found to be present in at least 20% of the fish population (tetracycline resistance genes *tetM* and *tetV*, β -lactam resistance genes *bla_{DHA}* and *bla_{ACC}*, macrolide resistance gene *mphA*, vancomycin resistance genes *vanTG* and *vanWG* and multidrug-resistance genes *mdtE*, *mexF*, *vgaB* and *msrA*) at relatively low abundances calculated proportionally to the 16S rRNA gene.

Running Title: Antibiotic resistance in trout fillets

5.5.1 - Introduction

The rise of antibiotic resistance is not only a challenge for human and animal health treatments, but also is posing the risk of spreading among bacterial populations in foodstuffs (pathogen, commensal, spoilage bacteria...) (Woolhouse and Ward, 2013). Recent studies have demonstrated a diverse collection of antibiotic resistance genes maintained in environmental bacterial communities in a variety of ecosystems, including marine sediments (Yang et al., 2013), soils (D'Costa et al., 2006), fish farms (Cesare et al., 2012; Fernández-Alarcón et al., 2010; Ndi and Barton, 2011; Seyfried et al., 2010), processing environments (Chen et al., 2010a), and commercialized (supermarket and fish market) fish (Romero et al., 2017). This pool of genetic material, named the resistome (Wright, 2007), which provides the molecular functions for protecting bacteria against most classes of human clinically important antibiotics, also has been recently described in bacterial hazards from fish. Tetracycline

resistance profiles and the presence of antibiotic resistance genes have been observed in *Listeria* isolates from catfish fillets (Chen et al., 2010a) and *aadA*, *sull*, and *tet* genes have been found in *Aeromonas* spp. isolated from rainbow trout (gut, liver, skin, mucus, gills, and flesh) (Ndi and Barton, 2011). Fish foodstuffs have therefore been suspected of being antibiotic resistance gene reservoirs but the sources of contamination, such as food production chains and integrated processes (farming practices, environmental contaminations associated with farm environment, and slaughtering process) have rarely been considered.

Among the commonly consumed foodstuffs of animal origin, farmed fish have the lowest carbon footprint and the largest worldwide social and nutritional acceptability. Given the importance of the sector, aquaculture is likely to have a major antibiotic resistance-related public health impact. In 2018, the worldwide consumption of fish-related foodstuffs surpassed 20.5 kg per capita, and global aquaculture production reached as high as 82.1 million tons. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) accounted for over 848,000 tons of that production, a large part of which was produced in Western Europe (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020b). Farming practices and environments vary greatly around the world. They can strongly influence the resistome, particularly as animal disease treatments, growth promoters and disinfecting or decontaminating agents used in factory environments or on foodstuffs. In Europe, due to the regulatory prohibition of decontamination methods including antimicrobial substances (Regulation EC No 853/2004), the factory processing of food of animal origin does not seem to be a source of antimicrobial residues under any conditions. Furthermore, the control of antimicrobial residues is currently based on a risk assessment and the establishment of maximum residue limits. During this assessment, the effect of residues on human intestinal microbiota is taken into account but the effect of sub-inhibitory concentrations on the development of microbes on foodstuffs is not assessed, with the exception of milk products (Cerniglia and Kotarski, 2005).

A fresh rainbow trout fillet is a complex matrix (skin with mucus, muscles and a thin layer of adipose tissue) with a relatively low bacterial load (3 log CFU/g on average) (Helsens et al., 2020). Nevertheless, this bacterial ecosystem is the result of different sources of contamination. The mucus and the skin-associated bacterial ecosystem can be influenced during the breeding phase, by the breeding

practices and by the environment (ponds, river). During factory filleting, the sources of contamination are the digestive tract microbiota and the processing surfaces (Chytiri et al., 2004; Galié et al., 2018; González et al., 1999). Regarding the bacterial communities on the surface of fillets or on fish skin, most studies focused on the presence of human and fish pathogens (Castro-Escarpulli et al., 2003; Chen et al., 2018). The few data obtained on farmed rainbow trout show that skin microbiota is primarily composed of Proteobacteria (Gamma- and Alpha-proteobacteria) and Bacteroidetes (Lowrey et al., 2015; X. Zhang et al., 2018), with *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, and *Shewanella* genera being the most abundant (X. Zhang et al., 2018). The probable diversity of the fresh rainbow trout fillet bacterial ecosystem needs to be better described. This ecosystem could be subject to bacterial fluxes and, consequently, gene transfers, including the transfer of antibiotic resistance genes.

While the presence of antibiotic resistance genes is often reflected by the expression of a resistance phenotype, some genes may be unexpressed, yet still transferable. Such genes can be transferred to other bacteria, through mobile elements as class 1 integrons (Muziasari et al., 2017; Ndi and Barton, 2011) and transposases (Muziasari et al., 2017). It therefore would be interesting to investigate the entire resistome of a matrix or an environment. However, the use of standard microbiological methods alone is not adapted to the investigation of antibiotic resistance gene patterns in large food bacterial communities for several reasons as uncultivable state or the requirement of numerous conditions for detection. To avoid a limitation on the number of genes investigated, high-throughput qPCR assay enables the parallel investigation of a large number of genes and may provide useful data regarding the composition of a resistome associated with a matrix or an environment (Looft et al., 2012; Muziasari et al., 2017).

The objectives of this study were to describe the bacterial communities of fresh rainbow trout fillets using amplicon sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene and to describe the presence of antibiotic resistance genes by high-throughput qPCR, and to quantify antimicrobial residues using liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS/MS) methods. This combined approach allows an overall view of the antibiotic resistance profiles in one example of aquaculture-related foodstuffs.

5.5.2 - Material and Methods

5.5.2.1 - Sampling plan

Our sampling strategy sought to identify the conditions where the bacterial microbiota and the antibiotic resistance profiles of the fillets could be observed. These conditions were the fish farming environment (named the Raceway condition in the study) and the farming and factory environments combined (named the Factory condition in the study). The study also was designed to have the ability to detect a low-frequency event – the presence of antibiotic resistance genes – within a community of bacterial species which may itself be small (Gordon et al., 2007; Helsens et al., 2020; Muziasari et al., 2017). Published data regarding the occurrence of antibiotic resistance in specific pathogenic species and in the bacterial populations of an environment are available. However, the a priori occurrence of antibiotic resistance genes within a bacterial community associated with a fresh food matrix is difficult to determine. A compromise therefore had to be made between a sample size needed to detect an event with a 20% prevalence in a study population of 100 individuals or more and the economic and technical context of the study. Finally, a total of 56 fish/fillets (14 per sampling condition) were studied, according to the epidemiological guidelines provided by Cannon and Roe (1982).

Two rainbow trout farms (flow-through systems) located on the same river and processing their fish in the same factory were recruited on a voluntary basis (Figure 24). The first, farm A, is located at the headwaters of the river and produces 150 tons a year. The second, farm B, is located downstream from farm A and produces 250 tons a year. Two wastewater treatment facilities and an urban area were located between farm A and farm B. The fish of each farm were collected one week apart in January 2019. The sampled raceways each contained around 10,000 fish. The zootechnical characteristics of the fish from each farm are described in Figure 1. In parallel, a questionnaire was filled in by the farmers to gather information concerning the conditions in which the fish were bred (bacterial pathologies, antibiotic treatments, vaccinations, water supplying of the raceways, etc...).

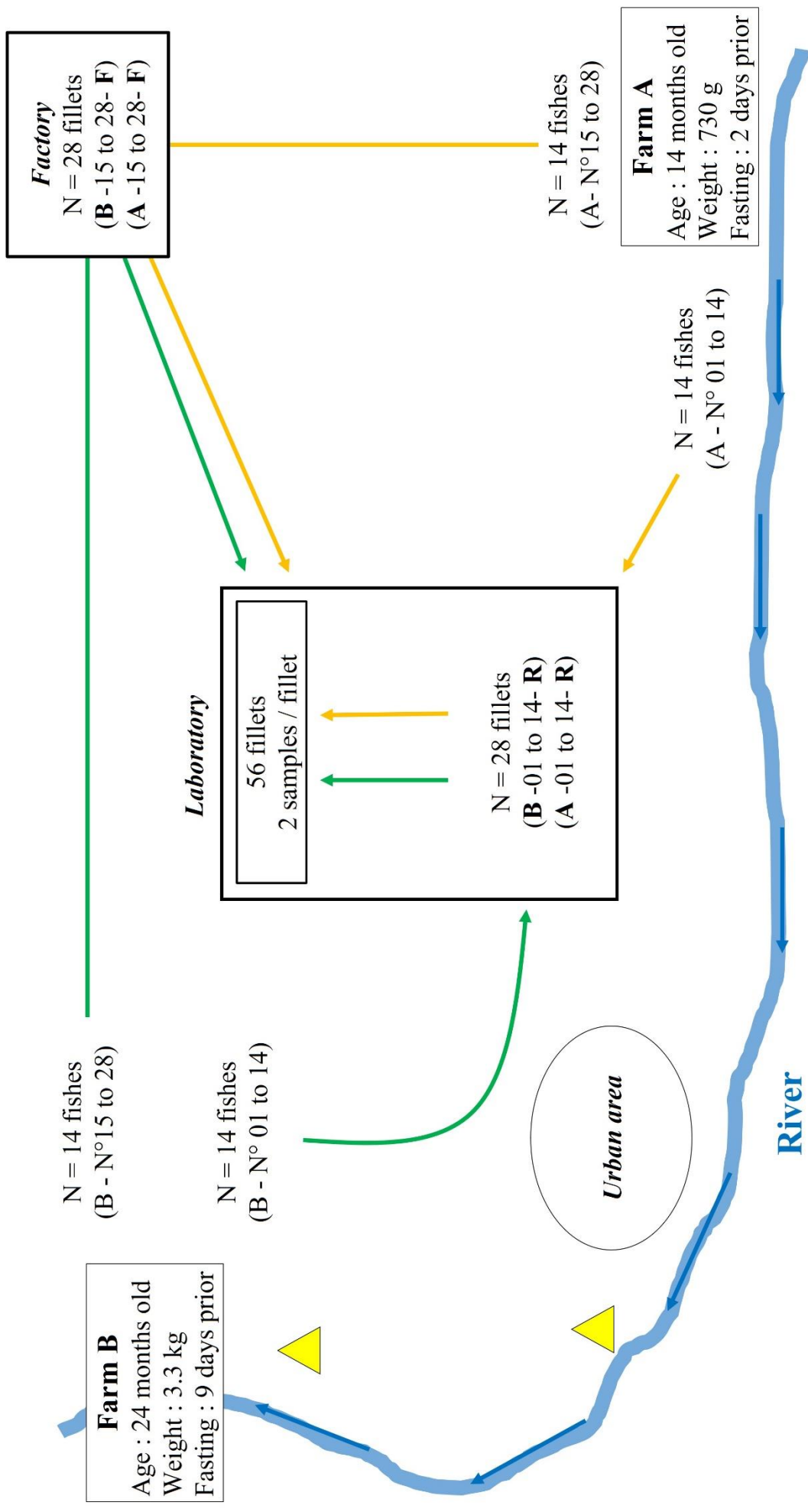


Figure 24 : Schematic representation of the sampling plan.

Location and zootechnical characteristics of both tested farms are indicated. Yellow (farm A) and green (farm B) arrows indicate fish sampling and filleting either in the factory or aseptically in the laboratory. Yellow triangles represent wastewater treatment plants and blue arrows represent the stream of the river.

On each farm, 28 fish ready to be processed were randomly sampled from a raceway, stunned according to animal welfare regulations (Council Regulation (EC) No 1099/2009) and stored on ice. Half (14 fish) were transformed in the processing factory within three hours following the sampling, where they were subjected to the operator's processing procedures – automatic slicing, gutting and filleting. The second half (14 fish) were placed in insulated boxes with ice, transported to the laboratory within six hours of handling, and filleted under sterile conditions. Each fillet was given an identification code such as "A11R", corresponding to the farm (A or B), the chronological order of sampling and filleting of the fish (01 to 28 for each farm) and the condition influencing the bacterial communities and antibiotic resistance genes (R for Raceway condition, reflecting the raceway environment and sterile filleting conditions in a laboratory, and F for Factory condition, reflecting the raceway and the factory environment with the usual factory processing conditions). From each fillet, two 30 g samples were cut, with flesh 1 -1.5 cm thick and a skin surface of about 20-25 cm². One portion was used for antibiotic residue analysis and the second for DNA extraction and analysis (antibiotic resistance gene -qPCR and amplicon sequencing). Each sample was stored at -20 °C until analysis.

5.5.2.2 - Analysis of antibiotic residues.

The physico-chemical characterization of antibiotic residues was conducted in two steps using liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS/MS) methods: a first screening analysis was implemented for all samples to detect positive samples, and in the case of the presence of an antibiotic, a second analysis was performed to quantify the identified substance with a specific method. For the first screening method, antibiotic residues were extracted and analyzed by liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS/MS) as previously described by Dubreil et al. (2017). Briefly, 2 g of a fillet sample were ground then extracted with 8 mL acetonitrile (Fisher Scientific, France), evaporated, then re-dissolved in 600 µL of 0.2 M ammonium acetate (Merck, Fontenay-sous-Bois, France), and injected into the LC-MS/MS system. The liquid chromatography was performed on a Shimadzu LC-20AD-XR system (Kyoto, Japan) fitted with a Waters Symmetry C18 column (150 x 3.9 mm, 5 µm) (Guyancourt, France) and connected to the Sciex API 5500 mass spectrometer (San Jose, CA, USA).

A panel of 73 antibiotics belonging to different families (including penicillins, cephalosporins,

sulfamides, tetracyclines, macrolides, cephalosporins, macrolides, quinolones, phenicols) were searched for using highly sensitive methods (Dubreil et al., 2017). For the present study, a second method was used for the quantification of tetracycline compound residues (*internal reference F/CHIM/SM/PTC/007*) as follows: 2 g of minced sample was extracted with 10 mL Mac Ilvaine / EDTA buffer, and mixed for 10 min. A deproteinization step was then carried out adding 1 mL trichloroacetic acid (Fisher Scientific, Illkirch, France) solution at 1 g/L. The extract was further purified using SPE clean-up with C18 Bond-Elut cartridge (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Tetracyclines were finally recovered with 1.2 mL of oxalic acid in methanol (Fisher Scientific, France). The final extract was diluted with 1.8 mL of water before injection into the LC-MS/MS system. These analyses were performed at the European Union Reference Laboratory (EU-RL) for antimicrobial and dye residues in food operating under the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES, Fougères, France).

5.5.2.3 - DNA extraction.

DNA extraction for amplicon sequencing and antibiotic resistance gene detection was performed as previously described (Helsens et al., 2020). Briefly, 30 g of a fillet sample were rinsed with 50 ml phosphate buffer saline (Interchim, Montluçon, France) and 5% Tween 80 (Sigma-Aldrich, MO, USA) in a stomacher bag with a 63- μ m porosity filter (BagPage 400 F, Interscience). After rinsing, the liquid phase was filtered through the stomacher bag membrane and centrifuged, and the bacterial pellet was stored at -20 °C until DNA extraction. DNA was extracted using the Dneasy® PowerFood® Microbial Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions, with added enzymatic and mechanical cell lysis steps. Afterwards, DNA was quantified using a N60 NanoPhotometer® (Implen, München, Germany) and then stored at -20 °C until use. As amplicon sequencing needs negative controls to exclude DNA contamination during extraction, mock extractions (fish fillet samples omitted) were also performed.

5.5.2.4 - Enumeration of bacterial counts by q-PCR targeting the *tuf* gene

To quantify the bacterial load of each sample, a bacterial enumeration was performed using a quantitative PCR targeting the *tuf* gene, as described by Tanaka et al. (2010). A quantitative *tuf* PCR kit for bacteria (Takara Bio, USA), using SYBR® green technology, was used. Quantitative PCR was performed with 5 µL of template DNA in a total volume of 25 µL. The reaction mix was composed according to the manufacturer's instructions. The amplification program included an initial denaturing step of 30 s at 95 °C followed by 35 cycles of 5 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. A negative control was included in each run. The amplification was achieved on a CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). All amplification reactions were run in triplicate. A positive *tuf* gene standard stock solution provided in the kit was used to generate a linear standard curve by plotting the C_T values versus 5×10^5 to 5×10^2 copies/reaction. This standard curve was used to calculate copies/reaction then copies/g (and CFU/g) (see Figure S1 for amplification data).

5.5.2.5 - Antibiotic resistance gene qPCR array

In France, the antibiotics authorized for the treatments of fish diseases are florfenicol, flumequine, oxolinic acid, oxytetracycline (OTC), sulphadiazine and trimethoprim. We primarily aimed to assess the presence of genes conferring resistances to these antibiotics, but we also included resistance genes for critically important antibiotics and human therapeutic antibiotics to avoid being limited by our choice of genes targeted. A set of 248 primer pairs (Table S1) was selected from a list of primers published by Muziasari et al., (2017) which were designed to target sequence diversity within a gene and had been validated in previous studies (Looft et al., 2012; Muziasari et al., 2014; Pitkanen et al., 2011; Tamminen et al., 2011; Zhu et al., 2013). To this list were added five primer pairs targeting colistin resistance genes *mcr-1* (Liu et al., 2016), *mcr-2* (Xavier et al., 2016), *mcr-3* (Yin et al., 2017), *mcr-4* (Carattoli et al., 2017) and *mcr-5* (Borowiak et al., 2017). The primer set used in this study contained 190 primer pairs specific to genes encoding resistance to the nine main antibiotic classes (aminoglycosides, beta-lactams, colistin, fluoroquinolones, macrolides, phenicols, tetracycline, trimethoprim and vancomycin) and 58 targeting genes encoding multidrug-resistance and efflux pumps

(N=35), resistance to antiseptics (N=7), antibacterial peptide resistance genes (N=10) and housekeeping genes (N=6). A negative control (no DNA) was added to each qPCR run.

The qPCR amplification was performed by the “Human and Environmental Genomics” Platform (Rennes, France), using the Takara SmartChip Real-time PCR system (Takara, USA) which runs a high-throughput, nanoliter-scale real-time PCR. The 5184-well plates with a reaction volume of 100 nl were filled with the SmartChip MultiSample NanoDispenser (Takara, USA). The SmartChip MyDesign Kit (Takara, USA) was used and the PCR cycling conditions were as follows: denaturation at 95 °C for 5 min followed by 42 cycles of a cycle including denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 60 °C for 30 s and elongation at 72 °C for 30 s. A final round of denaturation-annealing was performed. The specificity of amplification was assessed through the analysis of the melting curve of each PCR product. The detection limit of amplification was set at a threshold cycle (C_T) of 27 (Muziasari et al., 2017; Zhu et al., 2013). The relative abundance of each detected genes was calculated proportionally to the 16S rRNA gene in each sample using the $2^{-\Delta C_T}$ method, in which $\Delta C_T = (C_T \text{ detected gene} - C_T \text{ 16S rRNA gene})$.

5.5.2.6 - 16S rRNA gene sequencing and data processing.

To detect the bacterial communities, the V3-V4 amplicons of the 16S rRNA gene were sequenced. Control quality, PCR amplification, and sequencing were performed by Genoscreen (Lille, France) according to the Metabiote®v2.0 protocol. The 16S rRNA gene V3-V4 region was sequenced on an Illumina MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, USA) using the MiSeq Reagent Kit v3 (2 ×250 bp paired-end reads). Demultiplexing, merging of the reads and trimming of the barcodes and primers were performed by the sequencing provider. Data were imported into the FROGS (Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution) pipeline (Escudié et al., 2018). Denoising and clustering of the reads into Operational Taxonomic Units (OTUs) were performed using the SWARM method (Mahé et al., 2014). Sequences with an abundance < 0.005% to the total number of sequences in the entire dataset were removed. Taxonomy assignments were performed using NCBI blastn+ against the Silva 16S rRNA gene database (SSURef_132_SILVA) (Quast et al., 2013). Clusters affiliated to the matrix (rainbow trout) DNA and OTUs with a BLAST coverage or identity below 97% were removed.

5.5.2.7 - Statistical analysis.

The statistical analyses of the bacterial load of the fillets according to sampling conditions (farm A or B, Raceway or Factory) were realized using Student's t-tests on XLSTAT (v. 2019.2.2). A significant difference was expressed by a p-value below the 5% confidence interval.

The statistical analysis of the treated amplicon sequencing data, namely data analysis of the affiliated OTUs, α -diversity indices (number of observed OTUs, Chao1, Shannon, and Inverse-Simpson indices) and β -diversity indices (Jaccard and Bray-Curtis), were calculated in the R environment using the Phyloseq package (v. 1.20.0) (McMurdie and Holmes, 2013) including data visualization through multidimensional scaling on the FROGSSTAT tool. Permutational analysis of variance (PERMANOVA) statistical analysis were calculated using the Phyloseq package (v. 1.30.0) on R software (v. 3.6.2), in order to evaluate the significance of bacterial community differences. UpSet plot was used to assess shared OTUs depending on the farm localization and filleting condition (Lex et al., 2014). This plot was generated using UpSetR package (v. 1.4.0) (Conway et al., 2017) on R software (v. 3.6.2).

ANOVA with multiples comparisons were used to assessed farming and processing effects on genera relative abundances. *P*-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg correction (Benjamini and Hochberg, 1995). Tukey test was used as an ANOVA post-hoc test.

5.5.3 - Results

5.5.3.1 - Antibiotic residues assay.

Among the 73 antibiotic residues which could be quantified, none were detected in the rainbow trout fillets from farm A. Only OTC residues were detected in 13 out of the 28 fillets from farm B (Table 18). In the 13 OTC positive fillets, residues were detected at concentrations ranging from 5.84 to 40.20 µg/kg, thus below 100 µg/kg which is the maximum residue limit set for muscle-related foodstuffs in the European Union (Commission Regulation (EU) No 37/2010). According to the questionnaire we submitted, the batch from farm B underwent an OTC treatment which ended 27 weeks (192 days) before the sampling day.

Table 18 : Detection and quantification of antibiotic residues in the rainbow-trout fillets, depending on farm and filleting conditions.

Farm	Fillet		Antibiotic residues	
	Conditions of filleting	Sample number	Detection	Concentration (µg/kg)
A	^a R	01 to 14	- ^c	ND ^d
	^b F	15 to 28	-	ND
B	R	01, 03, 05, 06, 07, 10, 11, 12, 13	-	ND
		09		5.84
		04		6.40
		02	Oxytetracycline	30.10
		14		33.60
		08		40.20
		F	17, 20, 21, 24, 26, 27	-
		15		7.02
		19		7.37
		18		9.00
		22	Oxytetracycline	9.85
		25		12.60
		16		22.60
	23		31.20	
	28		33.90	

^a Raceway ^b Factory ^c Not detected. ^d Not determined as no antibiotic residue was detected.”

5.5.3.2 - Analysis of the fillet-related bacterial microbiota

a) Bacterial load of the fillets

The mean bacterial contamination of the samples, depending on farm (A/B) and filleting conditions (F/R), are shown in Table 19. For 3 samples (B06R, B12R and B22F), the amplification was not satisfactory and the data were not considered for calculation of the mean bacterial quantification. The mean of AF fillets bacterial counts was significantly higher than the mean counts of AR fillets (respectively, 3.65 ± 1.20 log CFU/g and 1.7 ± 0.35 log CFU/g, p-value < 0.0001). Conversely for farm B fillets, no significant difference was observed in the bacterial counts between the filleting conditions (2.97 ± 0.30 log CFU/g vs 3.09 ± 0.70 log CFU/g respectively). Comparison by farm source of fillets showed that there was a significant difference, with a higher bacterial load of fillets from farm B than those from farm A (p-value < 0.0001), as BR fillets had higher bacterial load than AR fillets (2.97 ± 0.3 log CFU/g vs 1.70 ± 0.35 log CFU/g). When combining the fillets from both farms, F fillets had higher bacterial load than R fillets (3.38 ± 1.01 log CFU/g vs 2.29 ± 0.72 log CFU/g, p-value < 0.0001).

Table 19 : Mean bacterial load of fillets quantified using the *tuf* gene-targeted qPCR, in log CFU/g.

Farm	R fillets			F fillets		
	N	Mean log CFU/g	SD	N	Mean log CFU/g	SD
A	14	1.70 ^{a,b}	0.35	14	3.65 ^a	1.20
B	12	2.97 ^b	0.30	13	3.09	0.70
A+B	26	2.29 ^c	0.72	27	3.38 ^c	1.01

^{a,b,c} different superscripts in a row or in a column indicate significant difference (pvalue < 0.0001)

b) Characterization of the bacterial communities.

A total of 1,030,580 sequences were obtained by amplicon sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene. After quality-checking, filtering and elimination of matrix-related (rainbow trout) reads and chimeras, a total of 330,473 reads were obtained. The samples with the lowest number of reads contained mainly rainbow trout related sequences, accounting for up to 96% of the reads, independently from the amount of DNA that could be extracted (Table 20). For some samples, rarefaction curves (Figure S2) displayed no asymptote, suggesting that the bacterial community characterization sometimes was limited by the sequence number. The number of reads per sample ranged

from 523 to 25,729 (Table 20). The abundance table is provided in Table S2. The sequences were classified into 203 OTUs affiliated with a 97% similarity level. We were able to identify 93 different genera. The rest of the OTUs were multi-affiliated at the genus level. Only 5 OTUs were identified at the species level: *Chryseobacterium jeonii*, *Patulibacter minatonensis*, *Roseimicrobium gellanilyticum*, *Vagococcus fessus*, and *Yimella radidis* (Table S2).

Table 20 : Number of reads, affiliated OTUs, and DNA concentration (ng/μL) in each sample.

Sample name	N° of Reads	N° of OTUs	DNA concentration (ng/μL)	Sample name	N° of Reads	N° of OTUs	DNA concentration (ng/μL)
A_Raceway				B_Raceway			
A11R	523	19	2.45	B06R	1360	20	8.6
A10R	758	20	12.95	B05R	2007	35	3.55
A09R	1193	22	1.88	B12R	2097	16	3.25
A01R	1711	21	4.52	B13R	2268	45	17.29
A03R	1734	23	3.2	B10R	2510	40	2.3
A07R	1765	20	2.71	B01R	2537	36	3.84
A14R	1836	18	3.86	B03R	3146	51	2.42
A08R	2658	33	1.47	B14R	3325	33	40.34
A12R	2901	17	4.24	B02R	4552	34	5.27
A04R	3740	32	5.67	B07R	4780	38	4.83
A05R	4096	29	3.76	B08R	5076	40	12.95
A13R	4948	44	0.44	B04R	6711	58	1.99
A06R	6324	30	4.66	B09R	10270	53	3.49
A02R	9352	20	8.56	B11R	16973	43	3.52
A_Factory				B_Factory			
A19F	707	25	31.64	B15F	970	32	43.23
A18F	1261	29	28.94	B21F	569	17	21.8
A16F	1578	23	6.4	B22F	1603	15	5.9
A20F	1887	29	1.56	B20F	1606	17	7.37
A17F	2127	25	8.08	B28F	1901	19	107.24
A15F	4040	53	12.51	B25F	2215	22	10.01
A24F	7199	22	5.04	B24F	3019	18	3.28
A22F	13018	30	36.49	B27F	3630	34	26.7
A25F	16249	24	35.73	B19F	3914	20	28.14
A27F	18149	28	83.564	B26F	4482	32	6.17
A26F	19400	28	27.72	B23F	7452	28	31.13
A28F	19608	20	98.916	B18F	7689	18	23
A21F	21732	32	22.32	B17F	11443	32	58.65
A23F	25729	29	13.23	B16F	16145	20	31.39

The bacterial communities of the fillets, regardless of the four sampling conditions (AR, AF, BR, BF), were globally dominated by Proteobacteria (71.96% of total sequences), mainly composed of

Gamma-proteobacteria (62.21%) and Alpha-proteobacteria (6.69%), Firmicutes (15.14%), Bacteroidetes (7.33%), and Actinobacteria (4.94%) classes. Figure 25 shows the cumulated histograms of the relative abundance (%), obtained through aggregation of all sequences obtained for the 14 samples in each condition. The dominant phyla in each condition are shown in Figure 25A and the dominant genera in each condition are shown in Figure 25B. On farm A, the bacterial populations of the AR fillets were dominated by Gamma-proteobacteria (59.88%) represented by *Escherichia-Shigella* (39.87%), *Verticia* (5.98%), *Acinetobacter* (4.80%), and *Pseudomonas* (3.92%), and by Alpha-proteobacteria (24.98%) represented by an unknown genus belonging to the *Rickettsiaceae* family (7.84%) and *Sphingomonas* (7.83%). Bacteroidetes accounted for 4.97% of the bacterial populations and were represented by *Hymenobacter* (2.33%) and *Pedobacter* (1.53%). Actinobacteria accounted for 4.36% of the bacterial populations and were represented by *Rhodococcus* as the dominant genus of this phylum, and Firmicutes accounted for 3.53%. After factory-processing, AF fillets also were dominated by Gamma-proteobacteria, accounting for 96.19% of the bacterial populations and represented by *Pseudomonas* (70.82%), *Stenotrophomonas* (21.26%) and *Escherichia-Shigella* (2.91%), and by Alpha-proteobacteria, accounting for 1.78% of the bacterial populations.

On farm B, the bacterial populations of the BR fillets were dominated by Gamma-proteobacteria (45.90%) represented by *Escherichia-Shigella* (25.47%), *Acinetobacter* (5.63%), and *Pseudomonas* (4.70%), and by Alpha-proteobacteria (*Sphingomonas*, 4.42%). Bacteroidetes accounted for 28.02% of the bacterial populations and were mostly represented by *Chryseobacterium* (27.14%). Actinobacteria (12.98%) were represented by *Arthrobacter* (6.29%). After factory-processing, the bacterial populations of the BF fillets were dominated by Firmicutes (67.41%) represented by *Carnobacterium* (66.38%), then by Proteobacteria (25.88%) represented by *Escherichia-Shigella* (14.31%) and *Sphingomonas* (2.73%). The last two phyla detected were Bacteroidetes (3.44%) represented by *Chryseobacterium* (1.97%), and Actinobacteria (2.93%) represented by *Arthrobacter* (1.03%).

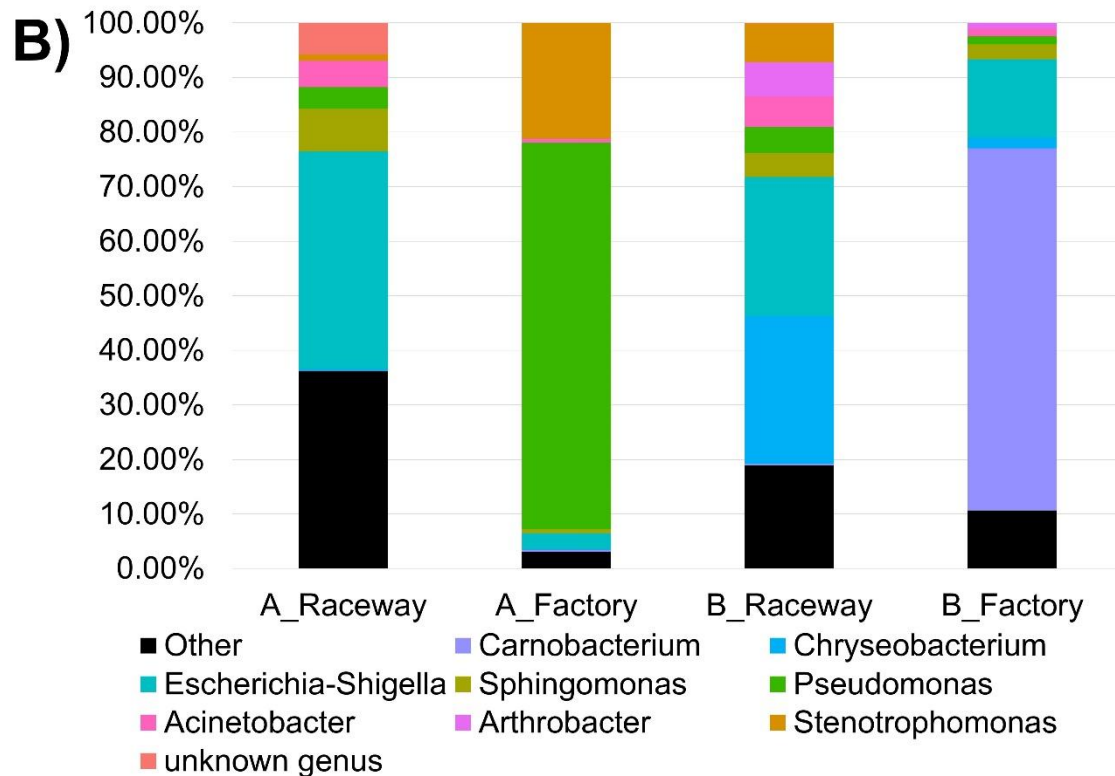
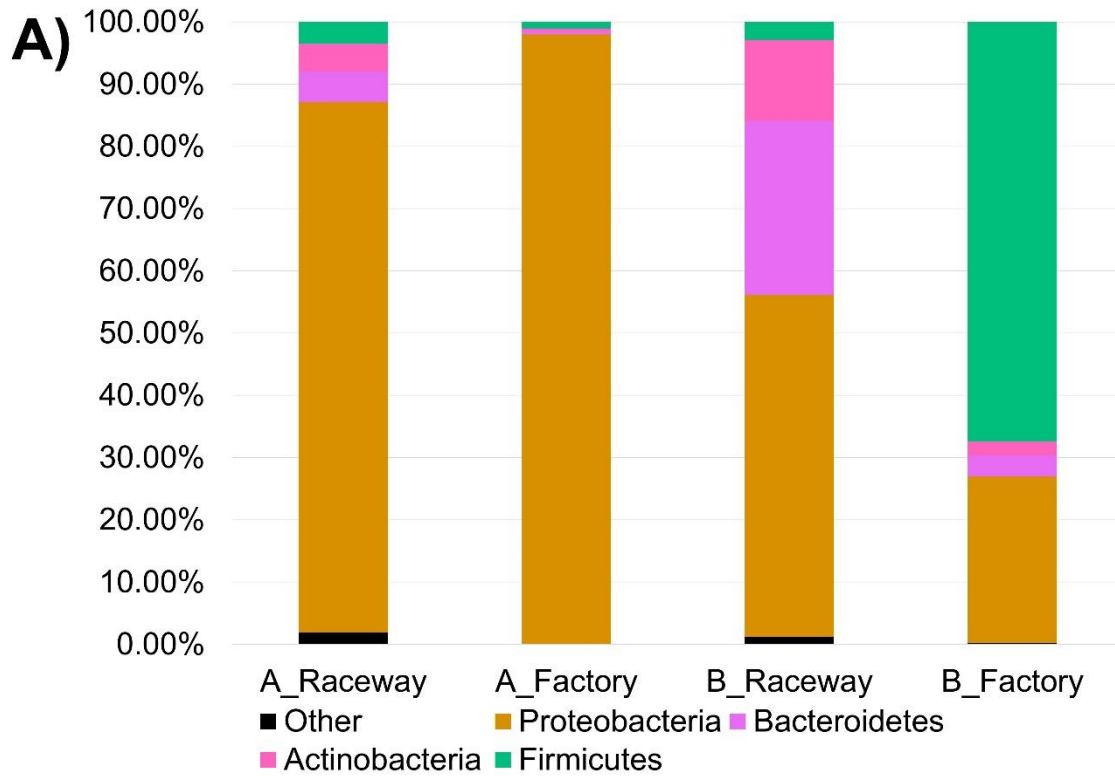


Figure 25 : Cumulated histograms of the relative abundance (%) of the bacterial communities belonging to the most abundant A) Phyla and B) genera on fresh rainbow-trout fillets, depending on the farm and filleting conditions.

Each histogram represents the sequences summed from the 14 fillets in each condition.

Although the bacterial microbiota of fillets from the same sampling condition were dominated by similar bacterial communities, OTUs had various relative abundances from one fillet to another (Figure 26).

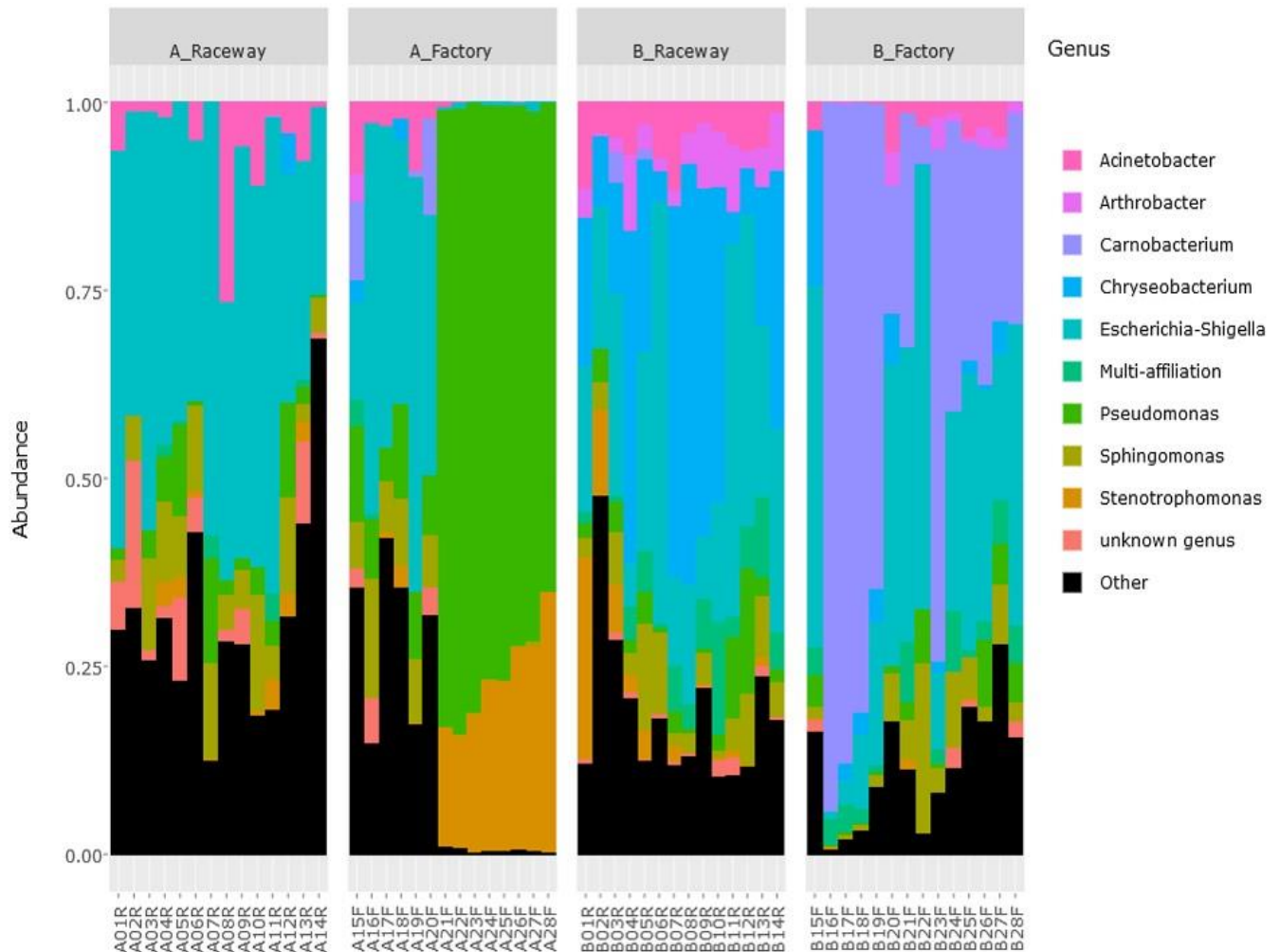


Figure 26 : Relative abundance of the most abundant genera (top 10) on fresh rainbow-trout fillets, depending on the farm and filleting conditions. Each histogram represents a single fillet.

The BR fillets harbored a larger amount of observed OTUs than fillets sampled from farm A (Figure 27). The Chao1 and Observed OTUs indices were similar for three out of four batches, indicating a good description of the bacterial communities. The upper Chao1 index values from the BR fillets suggested that a large amount of OTUs were possibly not detected in the fillets. The Shannon indices indicate that the factory-processed fillets (F) had a lower evenness of sequence repartition than the laboratory-processed fillets (R), regardless of the sampled farm. This suggests that the communities

from the factory-processed fillets (F) were dominated by few taxa with a high relative abundance, namely *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* in fillets originating from farm A and *Carnobacterium* in fillets originating from farm B. The Inverse-Simpson indices displayed the same tendency and confirmed this observation (Figure 27).

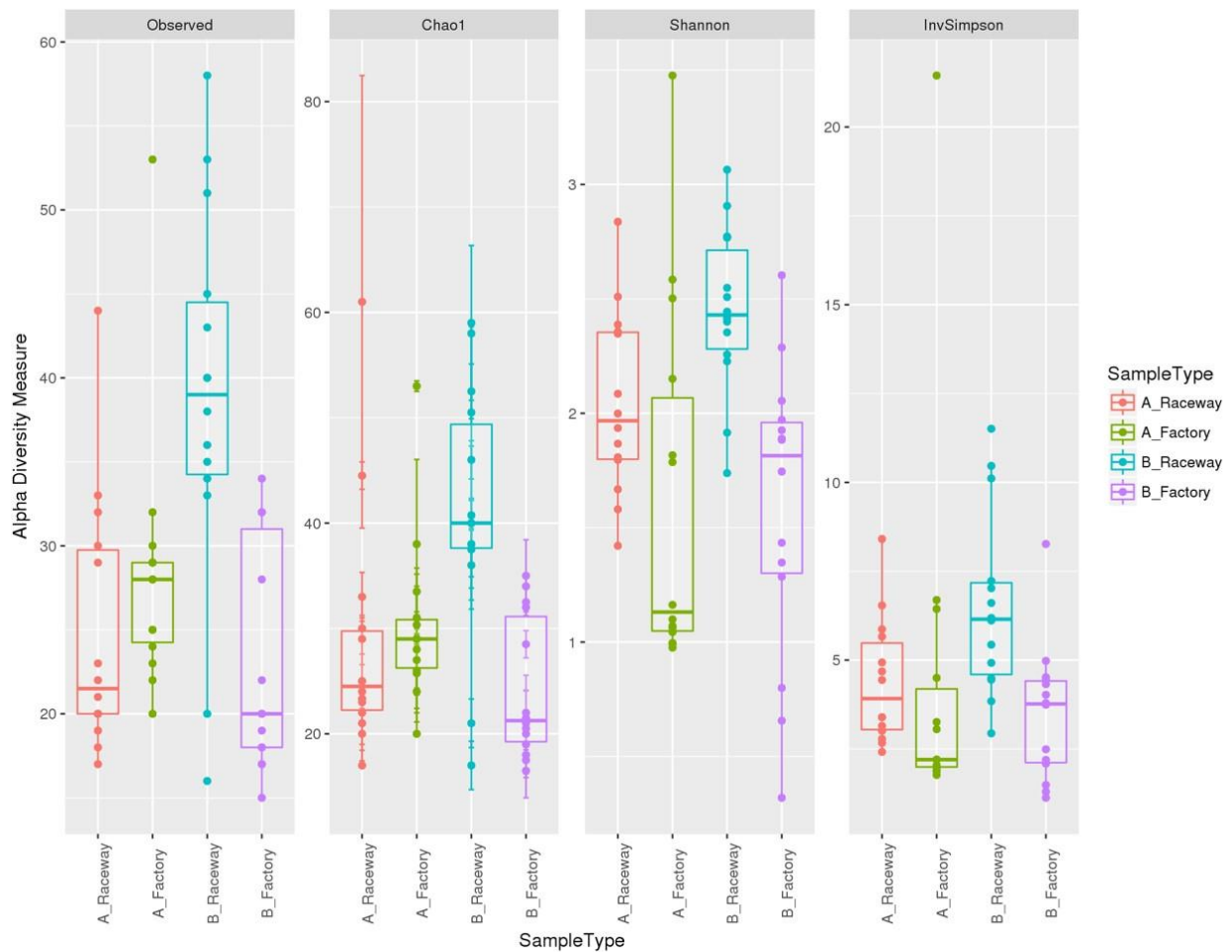


Figure 27 : α -diversity indices with boxplots for all samples depending on the farm and filleting conditions. Each dot represents a single fillet.

The MDS visualization of the data showed slight bacterial community differences between fillets from farm A and farm B, and a separation regarding the filleting procedure. Moreover, the MDS highlights a potential common bacterial community structure (Figure 28A). Furthermore, PERMANOVA analysis based on Jaccard dissimilarity showed that the bacterial community structures were significantly different (p value < 0.0001) regarding the different conditions (farm A or B, laboratory

or factory-filleting).

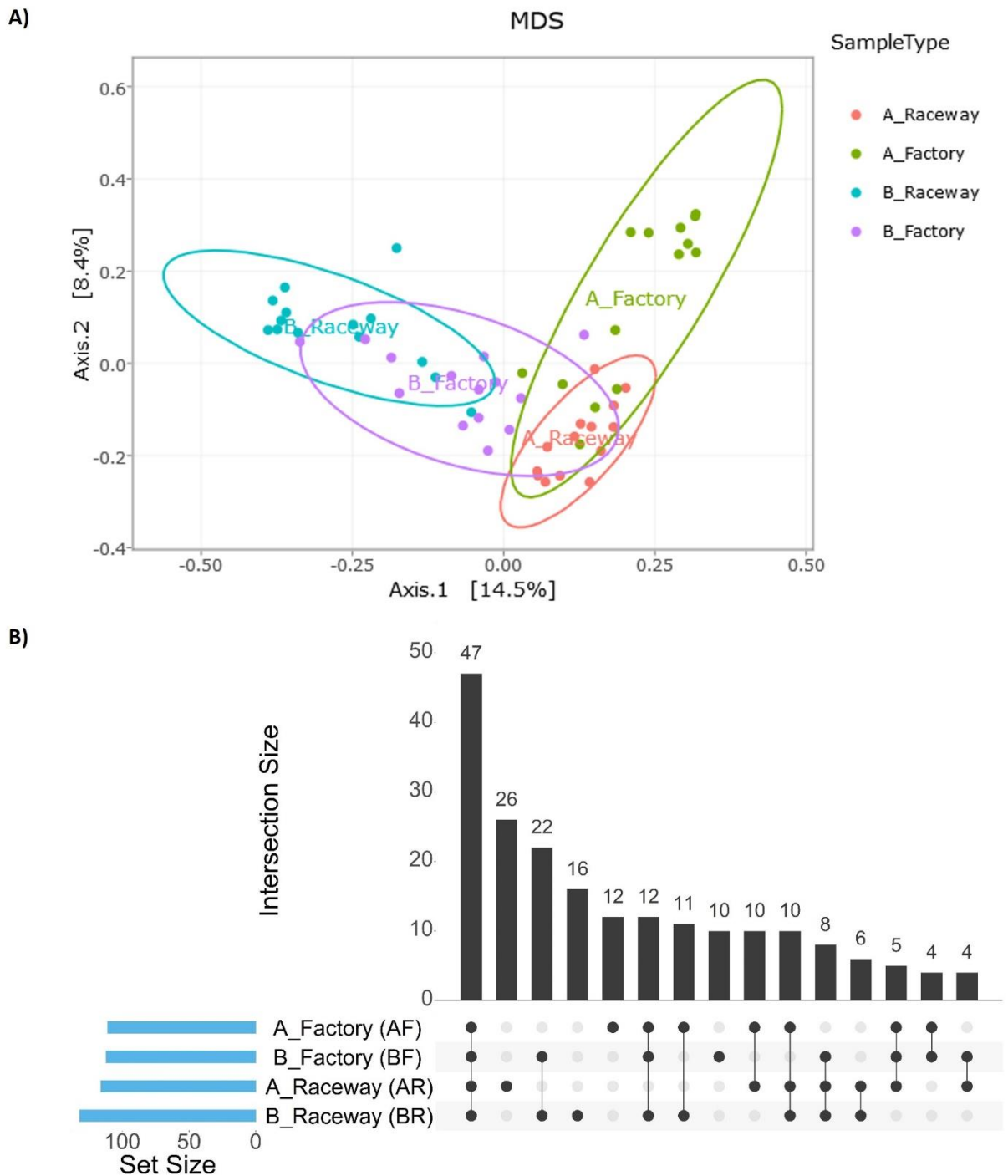
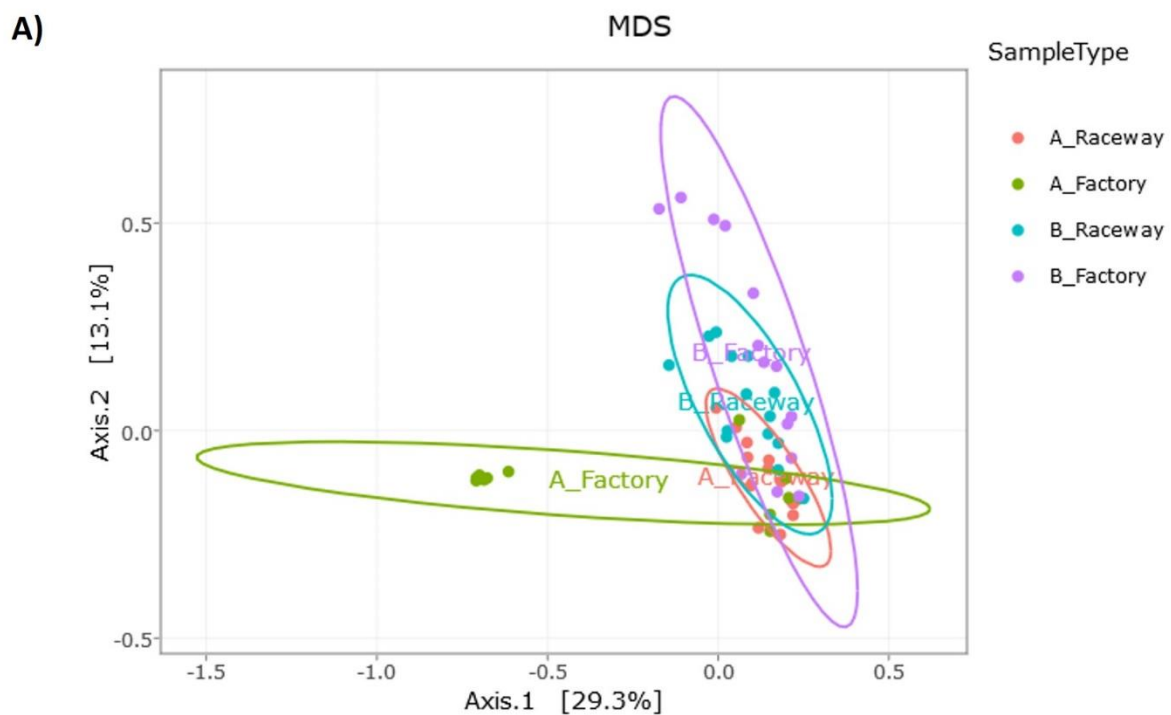


Figure 28 : A) Visualization of the impact of the farm and filleting conditions on the bacterial community structures of the fillets through MDS distribution of the samples' β -diversity according to the Jaccard dissimilarity. Each dot represents a single fillet. B) UpSet plot showing the intersection of OTUs depending on the farm localization and/or filleting condition. Blue bars in the left panel display the total number of OTUs per condition. The number of OTUs detected in one to four conditions is shown as barplots.

UpSet diagram showing OTUs intersection (Figure 28B) showed that out of the 203 affiliated OTUs, 47 were common to all conditions. OTUs specific to each conditions were also observed. Indeed,

26 OTUs were present only in the AR fillets, 16 only in the BR fillets, 12 only in the AF fillets and 10 only in the BF fillets. Furthermore, 22 OTUs were found only in fillets from farm B (BR and BF fillets), and 10 were found only in fillets from farm A (AR and AF fillets). Finally, 6 OTUs were specific to AR and BR fillets, and 4 were specific to the AF and BF fillets. The MDS visualization of the data based on the Bray-Curtis dissimilarity also showed that the bacterial community were differentially abundant depending on the conditions. PERMANOVA analysis confirmed this observation (pvalue < 0.0001). In fact, the factory processing impacted the evenness observed, as *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* were significantly more abundant in AF fillets (pvalue < 0.0001), and *Carnobacterium* were significantly more abundant in BF fillets (pvalue < 0.0001) (Figure 29A). In fact, most of the fillets were closely related and some factory-processed fillets (F) appeared to separate from the main cluster (Figure 29B).



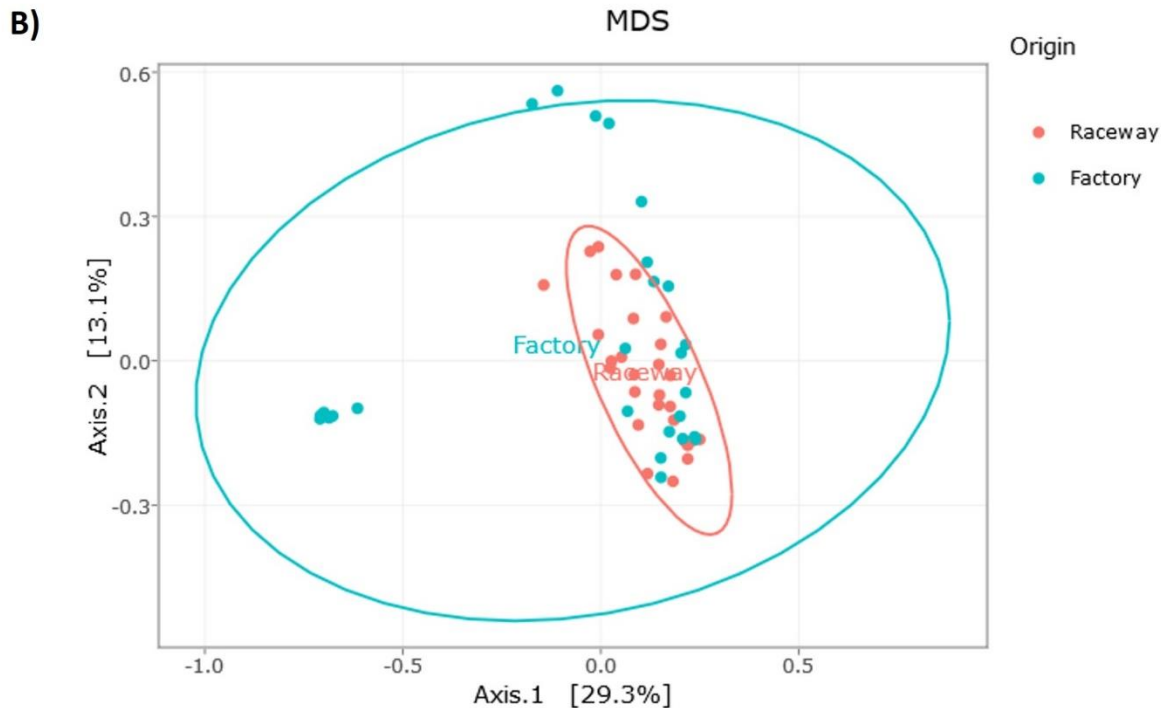


Figure 29 : Visualization of the impact of A) the farm and filleting conditions (Bray-Curtis dissimilarity); and of B) the impact of the filleting conditions alone (Farm A and B combined, Bray-Curtis dissimilarity), through MDS distribution of the samples' β -diversity. Each dot represents a single fillet.

5.5.3.3 - Detection of antibiotic resistance genes.

The Smartchip Real-time PCR assays showed the presence of 11 antibiotic resistance genes out of the 248 tested, detected in 17/56 fillets, each fillet possessing one or two antibiotic resistance genes (Figure 30). The detected genes included β -lactam (*bla_{DHA}*, *bla_{ACC}*), tetracycline (*tetV* and *tetM*), macrolides (*mphA*), vancomycin (*vanTG* and *vanWG*) resistance genes and genes coding for multidrug-resistance or efflux pumps (*mdtE*, *msrA*, *mexF*, and *vgaB*). Among the 28 fillets originating from farm A, only six carried one or two detectable resistance genes, three from AR fillets and three from AF fillets. Concerning the AR fillets in which resistance genes were detected, one carried *msrA*, one *bla_{DHA}* and one carried both *msrA* and *tetV*, with relative abundances between 2×10^{-1} and 8×10^{-3} compared to the 16S rRNA gene. All three positive AF fillets carried two antibiotic resistance genes (two harbored *mdtE* and *mexF* and one harbored *mexF* and *mphA*), with relative abundances between 8×10^{-3} and 3.2×10^{-4} compared to the 16S rRNA gene. Thus overall, six different antibiotic resistance genes were detected in fillets originating from farm A. Eleven fillets from farm B harbored antibiotic resistance genes. Ten carried one detectable gene (*vanTG*, *vanWG*, *vgaB*, *mexF*, *tetV*, or *bla_{ACC}*) and one carried two (*tetV* and

bla_{ACC}). Concerning the BR fillets, four carried one detectable resistance gene and one carried two. In addition, six BF fillets harbored either *tetM*, *mdtE*, or *msrA*. Relative abundances of the genes varied from 2×10^{-1} to 3.2×10^{-4} compared to the 16S rRNA gene copies. Overall, nine different antibiotic resistance genes were detected in fillets sampled from farm B. In the fillets B16F, B19F and B23F carrying a tetracycline resistance gene, OTC residues were also detected. In the fillets A07R, B02R, B06R, B14R, B17F, and B18F, OTC residues along with another resistance gene were detected.

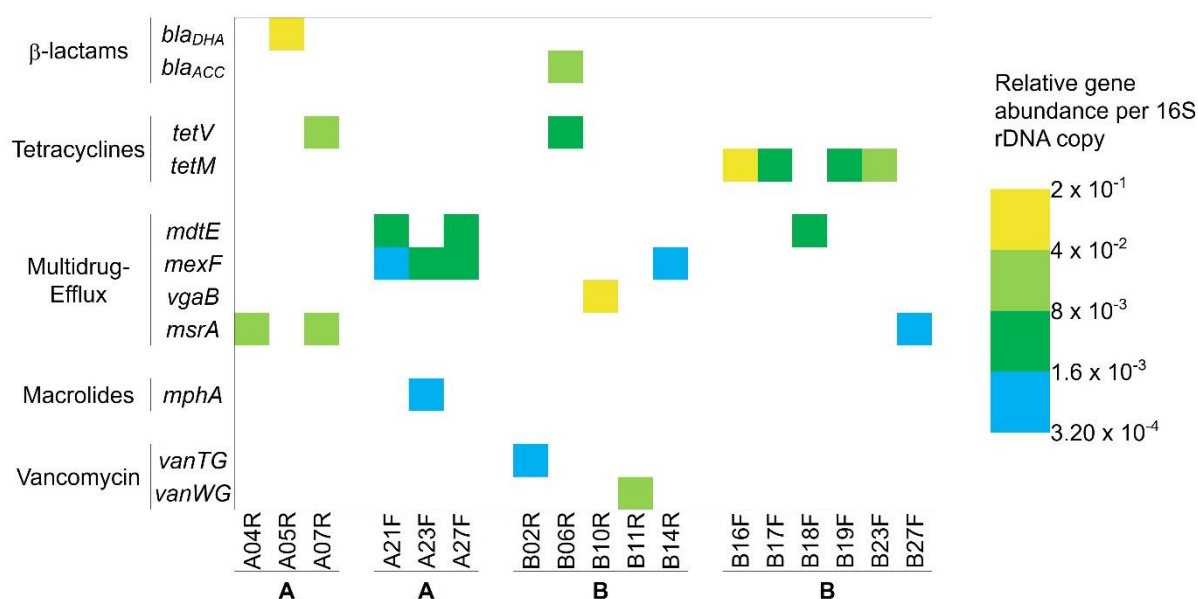


Figure 30 : Antibiotic resistance genes detected and their relative abundance per 16S rDNA copy in the rainbow-trout fillets.

Gene names are indicated on the left panel and samples at the bottom. Colored boxes indicate antibiotic resistance genes detected, with color scale ranging from blue (lowest abundance) to yellow (highest abundance), representing the relative abundance of the genes compared to the 16S rRNA gene.

The multidimensional scaling (MDS) distribution of the bacterial community profiles, displaying the Bray-Curtis index and regarding the presence or absence of a detected antibiotic resistance gene is shown on Figure 31. Most of the samples appear to share similar communities, regardless of the absence or presence of a detected resistance gene. The five samples on the lower part of the figure (samples B16F, B17F, B18F, B19F and B23F) had both a distinct bacterial community structure and a detectable antibiotic resistance gene. Those samples were the factory-processed samples from farm B displaying a higher *Carnobacterium* abundance. Similarly, among the samples on the left part of the figure (A21F, A23F, and A27F) had a distinct bacterial community structure, namely a higher

Pseudomonas abundance, and two detectable resistance genes. However, the other samples with a different bacterial community structure, namely samples A22F, A24F, A25F, A26F and A28F, also displayed a higher *Pseudomonas* abundance but did not carry a detectable resistance gene.

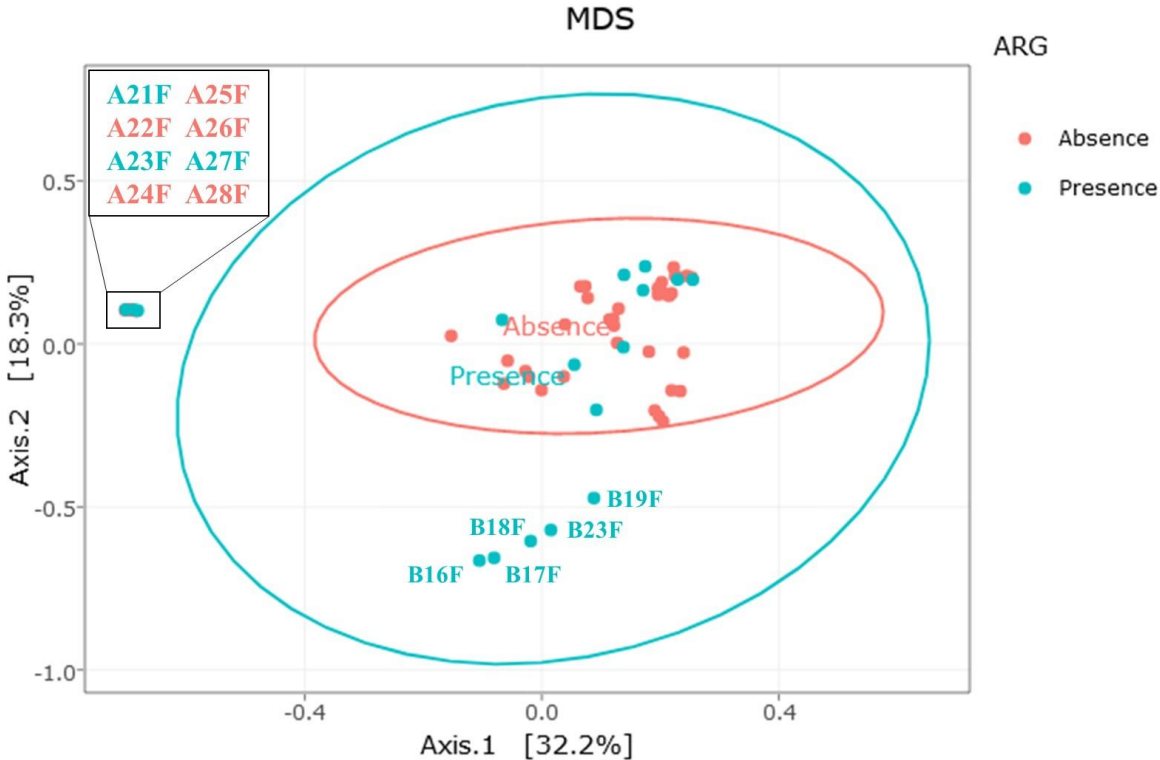


Figure 31 : Relationship between the presence (blue dots) or absence (red dots) of antibiotic resistance genes and bacterial communities. MDS distribution is based on the Bray-Curtis dissimilarity index of β -diversity. Each dot represents a single fillet.

5.5.4 - Discussion

We hypothesized that the laboratory-processed fillets (R) carried a bacterial microbiota that mainly reflected the fish's farming environment (raceway environment and breeding practices), whereas the factory-processed fillets (F) additionally encompassed contaminations originating from the factory and filleting process. Indeed, Giatsis et al. (2015) observed a correlation between the bacterial communities from water and tilapia larvae gut, and Sullam et al. (2012) showed as well that the rearing environment shaped the gut microbiota in fish. We observed that the bacterial communities of the raceway fillets from both farms were dominated by Proteobacteria and Bacteroidetes. This was consistent with the findings of Zhang et al. (2018a) and Lowrey et al. (2015), who both described the skin-associated bacterial communities of rainbow trout to be dominated by Proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes. Gamma-proteobacteria was the most represented class, probably due to the high prevalence of *Escherichia-Shigella* and *Pseudomonas*. However, Boutin et al. (2014), described Alpha-proteobacteria to be the most represented class in the skin bacterial microbiota of brook char (*Salvelinus fontinalis*), another river water trout belonging to the same subfamily as the rainbow trout (Salmoninae). The most prevalent genera in AR and BR fillets were *Escherichia-Shigella*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and an unknown genus belonging to the *Rickettsiaceae* family. The genus *Shigella* is commonly associated with waterborne diseases (Cabral, 2010) and the genus *Escherichia* is a marker of fecal contamination (Harwood et al., 2014). A contamination of the fish by the river environment thus could explain their presence on the fillets from both farms. *Sphingomonas* species also are commonly found in water (Koskinen et al., 2000) and have been described in influent and tanks from salmon farms (Miranda and Zemelman, 2002). River water also can host *Acinetobacter* species (Doughari et al., 2011), which have been described in the intestinal content of rainbow trout (Guardabassi et al., 1999). Finally, *Pseudomonas* species are found in the skin-associated microbiota of rainbow trout (X. Zhang et al., 2018) and in aquaculture water (Fernández-Alarcón et al., 2010). In the findings of Zhang et al., the genera *Chryseobacterium*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* also were among the most represented genera, as well as an unidentified *Rickettsiaceae*.

The AR and BR fillets had communities with various relative abundances depending on the

farm. We considered: i) the age of the fish (14 months old or 26 months old), ii) the geographical position of the farm (upstream or downstream from urban areas and wastewater treatment plants) and, iii) the fasting time before sampling (2 days or 9 days) to explain these variations. The bacterial microbiota is known to be influenced by the age of the host during the first months of development (Z. Zhang et al., 2018). However, as far as we know no data are available regarding a change during the adult stage of farmed fish. The fillets from farm B had a higher relative abundance of *Chryseobacterium* and *Arthrobacter*. *Arthrobacter* spp. are commonly found in soil and wastewater effluents (Gobbetti and Rizzello, 2014), and *Chryseobacterium* spp. have also been described in soils (Benmalek et al., 2010) and from several fresh water systems (Loch and Faisal, 2015). Both genera could be more abundant in the BR fillets because of the presence of urban areas and wastewater treatment plants upstream from farm B. Such settlements may promote the enrichment and diversification of the bacterial microbiota of the rainbow trout fillets, as expressed by the higher α -diversity indices displayed by the BR fillets. The fasting time also could be a variation factor, as it has been described to increase the bacterial diversity in tilapia gut microbiota (Kohl et al., 2014). The Bacteroidetes phylum in the gut microbiota of seabass increased after eight days of fasting whereas the Flavobacteriales order (encompassing the *Chryseobacterium* genus) decreased after fasting (Xia et al., 2014). These results did not correlate with our findings. While we indeed observed an increase of Bacteroidetes, it was due to *Chryseobacterium* species.

Our α -diversity analysis showed a core-bacterial community shared by the fillets from all four conditions (47 OTUs), to which can be added 24 more OTUs shared by AR and BR fillets, constituting 71 OTUs present in AR and BR fillets. As this fillets were processed in sterile conditions, we can hypothesize that these 71 OTUs represent the native microbiota of fish fillets. Out of them, 49 were Proteobacteria (28 Gammaproteobacteria and 21 Alphaproteobacteria), 8 were Firmicutes (6 Bacilli and 2 Clostridia) and 8 were Actinobacteria. Condition-specific OTUs, each accounting for less than 400 cumulated reads, were observed in either AR (26 specific OTUs) or BR (16 specific OTUs) fillets. We observed that factory processing increased the bacterial load of the fillets and modified the structuration of the bacterial communities. Twenty-six OTUs were detected only in factory-processed fillets (AF, BF or both), compared to laboratory-processed ones. Nevertheless, each of them accounted for 500

cumulated reads. This is consistent with the finding of Møretro et al. (2016) who described that the genera contaminating salmon fillets most likely originate from fish and environmental water. Actually, since no dominant OTU was detected in factory-processed fillets only, we concluded that the factory processing impacted the evenness more than the richness of the bacterial communities. This impact was different in the AF and the BF fillets, suggesting that different events could contribute to this modification.

A sudden shift appeared between fillets A20F and A21F (Figure 26). As samples were numbered in chronological order of processing, it is possible that an event occurred during the processing of fillet A20F. This shift was characterized by a dominance of *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas*, two genera previously isolated from conveyor belts in salmon-processing plants (Langsrud et al., 2016). As bacteria from processing surfaces can be transferred to the fillets (Møretro et al., 2016), our findings may thus result from a factory environment contamination originating from previous fish. The gutting process of the fish also could be the cause of this shift. In fact, both genera have been isolated from rainbow trout intestinal tracts (Wong et al., 2013). It is therefore possible that the shift we observed was due to conveyor and then fillet contamination by intestinal content. Concerning the fillets from farm B, we observed a higher abundance of *Carnobacterium* in factory-processed fillets, compared to the laboratory-processed ones. This genus has previously been isolated from conveyor belts (Langsrud et al., 2016). *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* are known as contaminant of food from animal origin including fish. They are also well adapted to gut and harbor adhesion capacity (Iskandar et al., 2017). It is therefore possible that fish processing resulted in an accumulation of *Carnobacterium* on the processing surfaces. This would be consistent with the findings of Chaillou et al. (2015) and Møretro et al. (2016) who both described the bacterial communities of processed salmon fillets to be of both environmental and animal origins. It has to be noticed that fillets from farm A and B were processed on a different day, which could explain why we observed different contaminations.

We detected 11 different antibiotic resistance genes (*bla_{DHA}*, *bla_{ACC}*, *tetV*, *tetM*, *mdtE*, *mexF*, *vanTG*, *vanWG*, *vgaB*, *msrA* and *mphA*) in 17/56 fillets (Figure 30). In fillets originating from farm A, six different resistance genes were detected (*mphA*, *bla_{DHA}*, *tetV*, *mdtE*, *mexF*, and *msrA*), in higher relative abundance in AR fillets than in AF fillets. In fillets originating from farm B, nine different

resistance genes were detected (*bla_{ACC}*, *tetV*, *tetM*, *vanTG*, *vanWG*, *mdtE*, *mexF*, *msrA*, and *vgaB*). The higher number of resistance genes in fillets from farm B could be explained by the presence of wastewater treatment plants between the two farms. Indeed, effluents from such plants have been described to increase the prevalence of antibiotic resistance genes and antibiotic resistant bacteria in rivers (Gordon et al., 2007; Rowe et al., 2016). Some of these genes have been described in aquatic and fish-related bacteria. *bla_{DHA}* has been described in river sediments (Dang et al., 2017), *bla_{ACC}* in *Aeromonas* spp. strains isolated from urban wastewater treatment plants (Piotrowska et al., 2017), and *tetM* in *Listeria innocua* isolated from catfish fillets and processing environments (Chen et al., 2010a). *mphA* has been found in wastewater treatment plants, *vgaB* has been described in *Clostridium perfringens* isolates from water samples in South Africa (Fourie et al., 2019), and *msrA* in an *Enterococcus faecium* strain isolated from ready-to-eat raw fish (Hammad et al., 2014) and in the intestinal content of a farmed rainbow trout (Muziasari et al., 2017).

The spread of antibiotic resistance genes in the environment is a major issue. Some of the genes observed in this study could be associated with plasmids or mobile genetic elements, as previously shown for *mphA* (Su et al., 2020), *bla_{DHA}* (Barnaud et al., 1998), *msrA* (Ross et al., 1990), *tetM* (Fiedler et al., 2016), *vgaB* (Schwarz et al., 2015), and the *vanG* operon (Du et al., 2019).

Regarding the bacteria harboring the detected antibiotic resistance genes, Su et al. (2015) could correlate bacterial communities of sewage sludge and antibiotic resistome, as they observed up to 120 antibiotic resistance genes per sample. However, in our study fewer resistance genes detected in only a low number of fillets prevented us from performing such a statistical analysis. The fillets in which a resistance gene was detected did not clearly share a particular bacterial community profile. However, two outgroups were observed among the samples with antibiotic resistance genes. One included five samples dominated by *Carnobacterium*, with four positive for *tetM*. This resistance gene has previously been described in *Carnobacterium* species (Li and Wang, 2010). The second outgroup included 8 samples dominated by *Pseudomonas*, out of which three exhibited *mexF*, a gene conferring multidrug resistance to *Pseudomonas aeruginosa* (Köhler et al., 1997). Two of them also harbored *mdtE* and one harbored *mphA*. Those data may suggest that the afore mentioned antibiotic resistance genes could be carried by *Carnobacterium* in BF fillets or *Pseudomonas* in AF fillets.

We quantified OTC residues only at low concentrations (below 100 µg/kg) and in fillets from farm B. This was consistent with an OTC treatment applied to the fish 192 days prior to the sampling, thus respecting the mandatory withdrawal period between the treatments and slaughtering (500 degree-days), and complying with the maximum OTC residue limit. We hypothesized that antibiotic residues persisted in the sediments of the raceway and caused a low continuous exposure of the fish. This is consistent with previous data on the persistence of antibiotic in sediments. In marine sediments, OTC has a half-life of 151 to over 300 days, depending on the depth of sampling (Hektoen et al., 1995). We detected in five fillets the tetracycline resistance genes tetM or tetV, which as we above suggested could be carried by *Carnobacterium*. It is also possible that these genes were selected or spread among the bacterial communities due to the OTC treatment. The other genes, unrelated to antibiotic treatment history, could be naturally present in the bacteria or selected by anterior undocumented antibiotic pressure in the environment, then transferred to the fish-associated bacterial communities. The presence of resistance genes unrelated to selective pressure has indeed been documented (Looft et al., 2012). The detection of antibiotic resistance genes depends greatly on their copy number.

Our sampling plan based on the Cannon and Roe (1982) epidemiological guidelines, was dedicated to observe an event (presence of an antibiotic resistance gene or a bacterial population) whose prevalence in the entire raceway population was 20%, with 95% confidence. Thus, the detection of antibiotic resistance genes on one or more fillets per batch enabled to assess they had a prevalence of at least 20% in the entire fish raceway population. We detected only a few genes which displayed high C_T values (between 24 and 27), revealing their presence at low concentrations in the DNA extracts of the fillets. We cannot exclude the presence of other genes present at very low copy number or low prevalence in the population, that we may not have been able to detect.

To conclude, we were able to observe the existence of a shared bacterial community on the fresh rainbow trout fillets. We also observed bacterial community variations depending on the farm localization or processing conditions. These variations were due to low abundance OTUs. We hypothesized that the microbiota of fresh farmed rainbow trout fillets is most likely shaped by the river environment, which was common to both farms. In our case, it did not seem to be strongly influenced by the effluents from human activities (urban areas, wastewater treatment plants) localized between farm A and B. The OTU

evenness variations we observed in factory-processed fillets might result from surface contaminations during the filleting process. The presence of antibiotic resistance genes seems to be influenced by the farming environment, including farming practices and river effluents. Further studies would be necessary to assess the phenotypic antibiotic resistance expressed by some species or genera of interest. The correlation of this phenotypic expression to genotypic features could provide complementary insights into the resistance potential of the bacterial communities on the rainbow trout fillets.

5.5.5 - Data Availability Statement

The sequencing data have been deposited on the European Nucleotide Archive under the bioproject PRJEB38652. Samples accession numbers vary from SAMEA6871722 to SAMEA6871749 and from SAMEA6873338 to SAMEA6873365.

5.6 - Ce qu'il faut retenir

Ces travaux nous ont permis de décrire les communautés bactériennes associées au filet frais de truite arc-en-ciel, ce qui n'avait été que rarement fait précédemment. Le microbiote bactérien des filets de truite arc-en-ciel est principalement composé de Proteobacteria, de Bacteroidetes et d'Actinobacteria. Des Firmicutes ont été détectées en grande quantité dans les échantillons de la ferme B filetés en atelier. Ce microbiote bactérien est, d'une part, composé d'un « core » commun de taxa communs aux filets issus des deux fermes. Il contient également des OTU spécifiques aux conditions d'élevage, ce qui implique que l'emplacement des élevages a eu une influence significative sur la richesse des communautés bactériennes des poissons. Cette diversité due aux conditions d'élevage est néanmoins créée par des taxa minoritaires, faiblement représentés. D'autre part, ce microbiote subit une influence secondaire de l'environnement de transformation qui le modifie et introduit une diversité significative entre les lots d'échantillons suivant le jour où ils ont été transformés à l'atelier.

Onze gènes ont été détectés, conférant des résistances au β -lactamines, tétracyclines, macrolides, vancomycine, et codant pour des pompes à efflux ou conférant des multirésistances, dans 17 échantillons différents sur 56 échantillons analysés. Nous avons également décrit la présence de

résidus d'oxytétracycline en lien avec les traitements appliqués aux poissons, et qui ont probablement participé à constituer le résistome des filets analysés. Cela implique que le résistome des denrées alimentaires d'origine animale fraîche est principalement impacté par les conditions d'élevage, et l'environnement d'élevage joue un rôle probable dans sa formation puisque les échantillons issus de la ferme B, en amont de laquelle se trouvent une ville et des stations d'épuration, possédaient plus de gènes de résistance aux antibiotiques. D'une façon générale cependant, peu de gènes de résistance aux antibiotiques ont été détectés, et ceux-ci étaient faiblement représentés. De plus, les résidus d'oxytétracycline ont tous été détectés à des concentrations inférieures aux LMR (100 µg/kg), ce qui est cohérent avec le respect du temps d'attente (300 degré-jours).

Cette première description des gènes de résistance aux antibiotiques des filets de truite arc-en-ciel frais, associé aux communautés bactériennes et aux résidus d'antibiotiques, permet d'obtenir une première image du niveau de résistance des bactéries associées aux denrées d'origine animale. Elle constitue un premier pas vers l'évaluation du risque pour le consommateur représenté par la présence des bactéries résistantes aux antibiotiques et de gènes de résistance aux antibiotiques sur l'exemple de denrée qu'est le filet de truite arc-en-ciel.

Chapitre 6 : Evolution des gènes de résistance aux antibiotiques et des communautés bactériennes sous l'effet d'un vieillissement des filets.

Les données obtenues par les méthodes haut-débit sur les échantillons terrain ont montré une charge bactérienne moyenne faible et peu de gènes détectés. Il est donc possible que les gènes de résistance soient sous-détectés dans une étude sur des filets frais. Aussi cette étude complémentaire a visé à comparer l'évolution des communautés et des gènes après un enrichissement de la flore de filets suite à un vieillissement au froid et sous vide. Dans le cadre d'une étude portant sur la sécurité des aliments, l'analyse d'échantillons de filet frais prêt à être consommé correspond mieux à la réalité de la chaîne de production, mais cette étude visait à exacerber l'amplification de la flore bactérienne par le vieillissement des filets afin de détecter autant que possible les gènes de résistance présents.

6.1 - Matériel et méthodes

Trois poissons élevés à la station aquacole expérimentale d'Oniris fonctionnant sur l'eau du réseau public, dans des conditions de maîtrise des traitements antibiotiques, ont été prélevés. Les échantillons (2 échantillons de 30 g pour chacun des trois filets), les extractions du microbiote et de son ADN ont été obtenus selon le protocole développé dans le Chapitre 2. Pour chacun des 3 filets, un échantillon, identifié respectivement NCF1, NCF2 et NCF3, a été traité immédiatement « en frais ». Le deuxième a été emballé sous-vide et vieilli pendant 2 jours à 8°C puis pendant 6 jours à 4°C (échantillons identifiés NCS1, NCS2 et NCS3). L'emballage sous vide a été retenu afin d'éviter toute contamination croisée lors du vieillissement. Les analyses de PCR haut-débit, de détection des gènes de résistance et de séquençage de l'ADNr 16S, ont été menées telles que décrites dans le Chapitre 5 de ce manuscrit.

6.2 - Résultats et discussion

6.2.1.1 - Caractérisation du microbiote

La charge bactérienne aérobie mésophile cultivable reste similaire à celle observée sur les échantillons terrain, avec un niveau moyen de 3,69 log UFC/g (respectivement 3,56 ; 3,91 et 3,61 log UFC/g). Après le vieillissement, elle passe à 8,09 log UFC/g (respectivement 8,66 ; 1,69 et 7,93 log UFC/g). Cette très forte charge bactérienne était accompagnée d'un délitement des filets dont la chair se détachait de la peau. Dans la réalité de la commercialisation des filets, une telle charge bactérienne et altération de la denrée conduisent à son retrait du circuit de la consommation humaine.

L'analyse des séquences obtenues à partir des échantillons a permis d'obtenir :

- pour les échantillons frais, respectivement pour NCF1, NCF2 et NCF3 : 17362, 7190 et 30230 reads.
- pour les échantillons vieillis, respectivement NCS1, NCS2 et NCS3 : 27232, 26273 et 31288 reads.

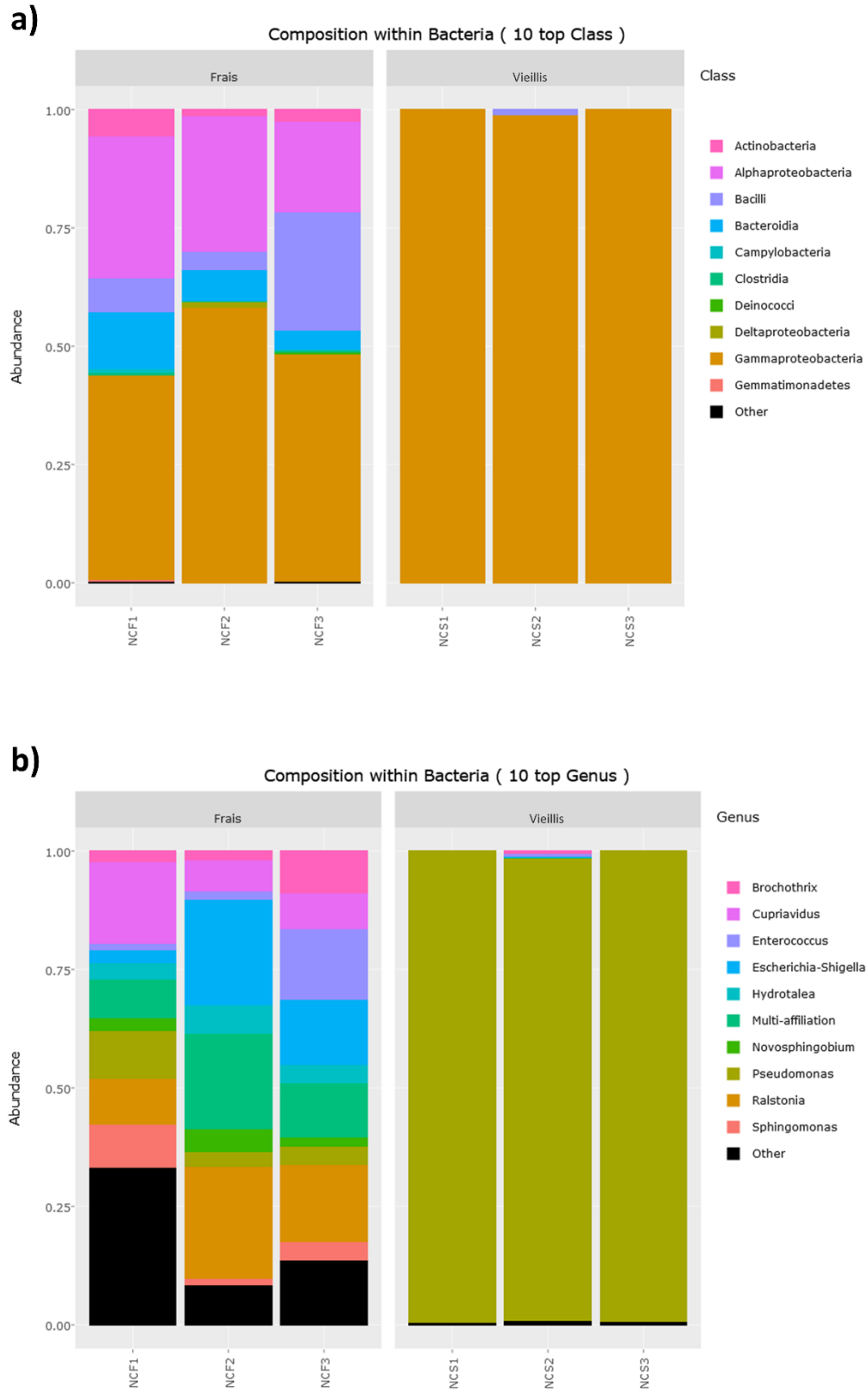


Figure 32 : Composition taxonomique des échantillons frais (NCF1, 2 et 3) et vieillis (NCS1, 2 et 3) au niveau a) de la Classe, b) du Genre.

Les échantillons frais étaient principalement composés de Gammaproteobacteria, notamment *Ralstonia*, *Escherichia-Shigella*, *Cupriavidus* et *Pseudomonas*, d'Alphaproteobacteria, principalement *Sphingomonas* et *Novosphingobium*, de Bacilli représentées par *Brochothrix* et *Enterococcus* (Figure 32 a) et b)). Ces données sont en accord avec des résultats obtenus précédemment (Lowrey et al., 2015; X. Zhang et al., 2018) ainsi qu'avec les structures de communautés bactériennes associées aux filets frais décrites dans le Chapitre 5 de ce manuscrit. Les échantillons vieillis étaient presque exclusivement composés de Gammaproteobacteria, et majoritairement des bactéries du genre *Pseudomonas* (entre 97,7 et 99,8 % des communautés présentes, en abondance relative). Cela a entraîné de très fortes variations d' α -diversité observée (Figure 33). Les échantillons vieillis (en bleu sur la figure) possédaient moins de communautés bactériennes différentes (indice « Observed ») et l'abondance des différentes communautés était très déséquilibrée (indice de Shannon), ce qui signifie qu'un genre bactérien, dans ce cas les *Pseudomonas*, dominaient très fortement les communautés bactériennes. Cette observation diverge avec les résultats de Chaillou et ses collaborateurs (2015) qui ont observé que les communautés bactériennes de filets de saumon, altérés pendant une durée et à des températures similaires, étaient dominées par *B. thermosphacta*, *C. divergens*, *C. maltaromaticum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactococcus piscium* et *Photobacterium phosphoreum*. Cette différence peut s'expliquer par la différence de l'espèce animale (saumon versus truite arc-en-ciel), les différences de filetage (industriel vs stérilement au laboratoire) et surtout par les différentes conditions de vieillissement mise en jeu. En effet, pour l'étude citée le vieillissement a été conduit sur des produits emballés sous atmosphère modifiée, contenant 50 % de N₂ et 50 % de CO₂. Il est évident que le mode de conservation a une influence sur le développement de certaines flores. Dans notre étude, les conditions d'atmosphère liées au sous-vide, de froid positif sont très favorables à la croissance des *Pseudomonas* spp., qui ont de ce fait masqué ou empêché le développement des autres genres bactériens. Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* peuvent se développer à des températures basses (Donnarumma et al., 2010) et l'environnement créé lors de la mise sous vide des filets a permis leur croissance.

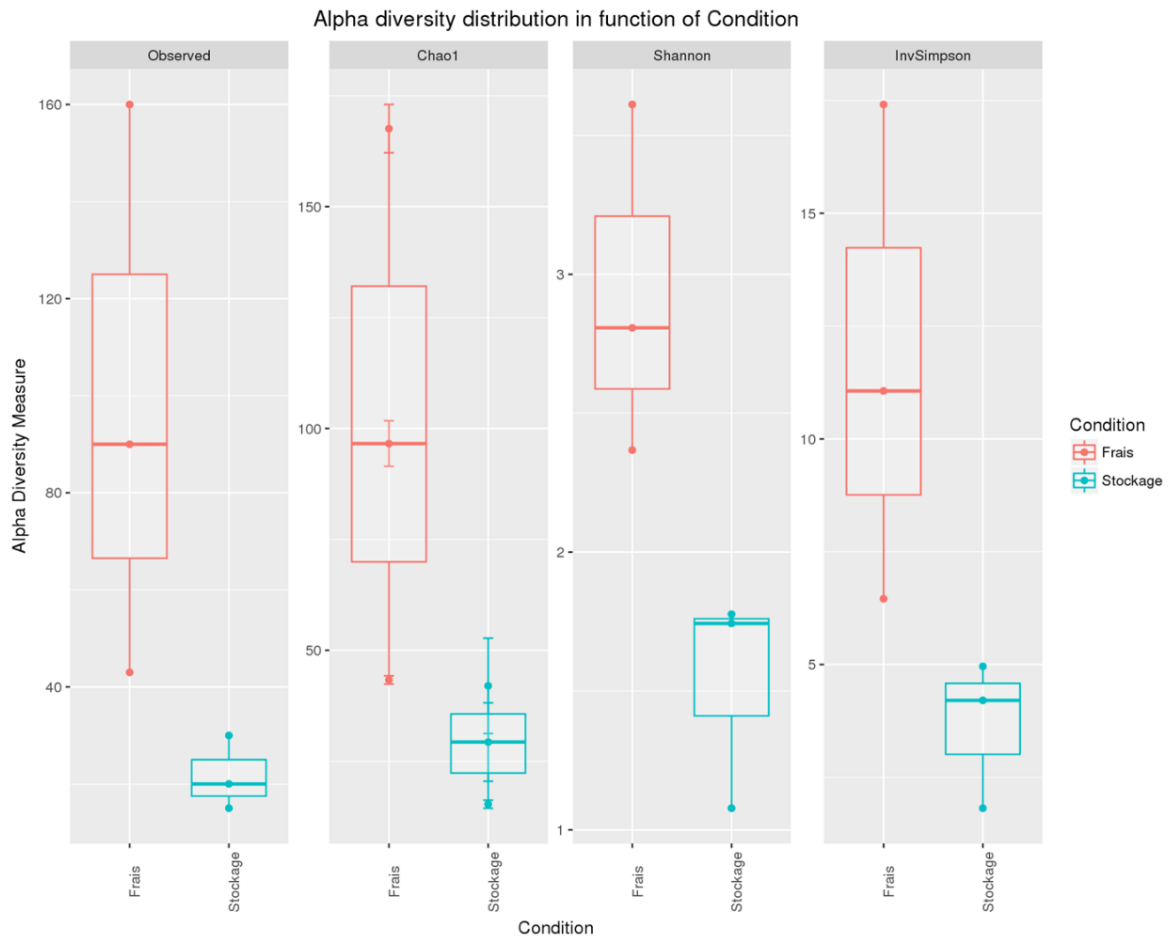


Figure 33 : α -diversité des échantillons en fonction de leur condition (frais ou vieillis).

6.2.1.2 - Caractérisation des gènes de résistance aux antibiotiques.

Dans les 3 échantillons frais, seuls deux gènes de résistance ont été détectés : *msrA* et *vanTG*. Le gène *msrA* code pour une protéine protégeant le ribosome des bactéries, principalement décrite chez les *Staphylococcus* (Schmitz et al., 2000) et conférant des résistances à plusieurs familles d'antibiotiques tels que les tétracyclines, macrolides et phénicolés. Le gène *vanTG* correspond au gène *vanT* dans l'opéron *vanG* codant pour une résistance aux glycopeptides dont la vancomycine (McKessar et al., 2000; Meziane-Cherif et al., 2015). Les autres gènes de l'opéron n'ont cependant pas été détectés. Ces deux gènes ont été également retrouvés dans les échantillons terrain (voir Chapitre 4). Cela pose la question de l'origine de ces gènes, puisque les poissons n'ont pas été élevés dans les conditions d'élevage classique d'une ferme piscicole. En effet, les poissons prélevés pour cette étude provenaient de la station aquacole d'Oniris, alimentée par le réseau d'eau courante de la ville. Il est possible que ces gènes soient d'origine environnementale et viennent de l'eau qui alimentait les bassins, sans lien avec

une pression antibiotique, et qu'ils appartiennent à un résistome « constitutif » de l'environnement aquatique. Il est également possible que le microbiote bactérien commensal de la peau des poissons possède naturellement ces gènes de résistance aux antibiotiques.

Après vieillissement, au total, 37 gènes différents ont été détectés :

- Des gènes codant pour les résistances suivantes : aux aminosides (*aacA*, *aacC*, *aadA1*, *aadA2*, *strB*, *sat4*), aux β -lactamines (*ampC*, *penA*), aux macrolides (*ermB*, *ermT*, *mphA*, *mphC*, *pikr2*, *vgb*), au chloramphénicol (*cmlA1*), aux sulfonamides (*sulI*), et à la tétracycline (*tetB*, *tetC*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *tetV*).
- Le gène *vanT* de l'opéron *vanG* mais pas les 6 autres gènes de l'opéron.
- Des gènes codant pour des résistances aux antiseptiques et autres antimicrobiens (*qacEAI*, *qacH*, *bacA*) et le gène de protection ribosomale *msrA*.
- En lien avec les pompes à efflux : plusieurs gènes codant pour des sous-unités de pompes à efflux dont les gènes *acrA*, *acrB* et *tolC* codant pour les trois sous-unités de la pompe à efflux AcrAB-tolC ; le gène *acrF*, analogue au gène *acrB* ; d'autres gènes codant pour des sous-unités, tels que les gènes *mexE* et *mexF* (mais pas *oprN*) et *oprJ* (mais pas *mexC* et *mexD*) ; les gènes *emrD* et *ttgA* codant pour des pompes composées d'une seule protéine.
- Les gènes *tetR* et *acrR*, codant pour des répresseurs, respectivement des gènes de résistance à la tétracycline et de la pompe AcrAB-tolC.

Parmi ces gènes certains confèrent des résistances à des antibiotiques utilisés en aquaculture (en rouge dans le tableau). Ces gènes, s'ils sont portés par des bactéries pathogènes, peuvent engendrer des résistances à des traitements en cas d'infection : le gène *sulI* code pour une résistance aux sulfonamides dont la sulfadiazine, les gènes *tetB*, *tetC*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetS* et *tetV* codent pour des résistances aux tétracyclines dont l'oxytétracycline et les gènes *acrA*, *acrB*, *acrF*, *tolC*, *mexE*, *mexF* et *oprJ* codent pour des sous-unités de pompes à efflux exportant notamment les phénicolés et les tétracyclines, et le gène *msrA* est responsable de la protection du ribosome conférant des résistances aux tétracyclines et aux phénicolés.

Le très fort développement de *Pseudomonas* dans ces échantillons peut expliquer l'augmentation du nombre de gènes de résistance détectés. En effet ce genre bactérien est connu pour

posséder un grand nombre de gènes de résistance aux antibiotiques (Kottara et al., 2018; Miranda and Zemelman, 2002). Il est possible que les souches porteuses de ces gènes, faiblement représentées dans les filets frais, aient trouvé dans le vieillissement les conditions favorables à leur développement. En effet, la caractérisation phénotypique de la résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas* que nous avons isolées (Chapitre 4) a montré des profils de résistance cliniques ou augmentées à l’oxytétracycline (4 de ces souches), au triméthopime-sulfaméthoxazole (16 souches) et aux fortes CMI du florfénicol (9 souches, CMI \geq 128 $\mu\text{g/mL}$), correspondant à certains gènes détectés au cours de cette analyse.

Tableau 21 : Charge bactérienne moyenne quantifiée par le dénombrement de la flore aérobie mésophile et gènes de résistance aux antibiotiques détectés dans les échantillons frais (3) et vieillis (3). Les gènes notés en rouge correspondent à des résistances aux antibiotiques utilisés/autorisés en aquaculture.

Condition	Dénombrement log UFC/g (SD)	Nombre d'échantillons positifs (au moins un gène détecté)	Gènes de résistance détectés
Frais	3,69 (\pm 0,19)	3/3	<i>msrA</i> , <i>vanTG</i>
Vieillis	8,09 (\pm 0,51)	3/3	<p>Résistance aux antibiotiques : <i>aacA</i>, <i>aacC</i>, <i>aadA1</i>, <i>aadA2</i>, <i>ampC</i>, <i>bacA</i>, <i>cmlA1</i>, <i>ermB</i>, <i>ermT</i>, <i>mphA</i>, <i>mphC</i>, <i>msrA</i>, <i>penA</i>, <i>pikR2</i>, <i>qacEA1</i>, <i>qacH</i>, <i>sat4</i>, <i>strB</i>, <i>sull</i>, <i>tetB</i>, <i>tetC</i>, <i>tetK</i>, <i>tetL</i>, <i>tetM</i>, <i>tetS</i>, <i>tetV</i>, <i>vanTG</i>, <i>vgb</i></p> <p>Efflux : <i>acrAB-tolC</i>, <i>acrF</i>, <i>emrD</i>, <i>mexEF</i>, <i>oprJ</i>, <i>ttgA</i></p>

6.1 - Ce qu’il faut retenir

Le vieillissement expérimental des échantillons permet d’augmenter le nombre de gènes de résistance détectés, et de voir l’évolution du microbiote du filet de truite arc-en-ciel selon ces conditions de vieillissement. En effet, une forte proportion des communautés bactériennes, telles que *Ralstonia*, *Escherichia-Shigella*, *Cupriavidus* ou *Enterococcus*, se trouvent « masquées » par le très fort développement du genre *Pseudomonas*. Ce vieillissement permet de suggérer un rôle, qui pourrait être prépondérant, du genre *Pseudomonas* dans les profils des gènes de résistance des communautés

bactériennes associées au filet de truite arc-en-ciel. Il est cependant à rappeler que ce vieillissement n'a pas de réalité « commerciale » ni sanitaire, car le filet frais est une denrée très périssable à courte DLC. Si ces souches de *Pseudomonas* potentiellement porteuses de ces gènes de résistance semblent en faible nombre sur les filets en état de « fraîcheur » compatible avec une commercialisation, le risque de transfert de leurs gènes de résistance à d'autres flores bactériennes du microbiote du filet de truite arc-en-ciel durant une conservation prolongée ou au sein du tube digestif du consommateur mériterait d'être étudié.

Discussion générale

Le résistome, défini comme l'ensemble des gènes de résistance aux antibiotiques d'un microbiote bactérien (Wright, 2007) est un élément très peu étudié notamment pour les denrées alimentaires, telles que le filet de truite arc-en-ciel ou d'autres filets de poissons frais. En effet, beaucoup d'études portent sur la résistance phénotypique ou la présence d'un nombre limité de gènes de résistances aux antibiotiques recherchés chez des bactéries pathogènes ou dans des écosystèmes associés à l'élevage de poissons. Peu de travaux portent sur la denrée ou l'environnement d'élevage et de transformation en tant que réservoir de gènes de résistance, en s'intéressant au résistome de ces écosystèmes dans leur globalité. De plus, la mise en relation des données d'antibiorésistance avec d'autres données telles que la présence de résidus d'antibiotiques (Xiong et al., 2015) ou la structure des communautés bactériennes (Su et al., 2015) est rarement réalisée, même en dehors du cadre de l'étude de l'antibiorésistance dans les aliments. Concernant la caractérisation des communautés bactériennes, un grand nombre d'études portent sur des produits transformés ou sur des bactéries pathogènes ciblées dans certaines denrées, il est cependant difficile de trouver des données bibliographiques portant sur l'ensemble des flores présentes sur la matière première, c'est-à-dire dans notre cas le filet frais (peau plus chair du poisson). De plus, les différentes données obtenues sont difficilement comparables en raison des réglementations et pratiques d'élevage différentes dans les pays d'origine des études réalisées. Finalement, les méthodes d'analyse du résistome et des communautés bactériennes sont variées et les données obtenues ainsi que leur significativité dépendent grandement de la nature de l'échantillon, du plan d'échantillonnage et des méthodes de traitement des échantillons.

Dans cette étude nous avons choisi de caractériser à la fois le microbiote bactérien des filets, dans ses aspects quantitatifs, avec la charge bactérienne, et qualitatifs, avec la composition des genres bactériens et le profil de résistance, en explorant des facteurs liés aux environnements d'élevage et de transformation des poissons en denrée « filet frais », qui peuvent être à l'origine de variations. L'originalité de cette étude repose dans l'association de plusieurs descripteurs : les gènes de résistance, les résidus d'antibiotiques et des profils phénotypiques de résistance aux antibiotiques. Le choix méthodologique consistant à déterminer une méthode de récupération des bactéries, leur ADN et un plan

d'échantillonnage nous a permis de caractériser une matrice complexe et paucimicrobienne ($2,28 \pm 0,69$ log UFC/g) et de montrer que la présence de caractères de résistance aux antibiotiques – gènes, résidus, souches résistantes – est un évènement relativement faible sur nos effectifs étudiés (56 échantillons issus des fermes et 3 échantillons issus de la station aquacole).

Grâce à la méthode de récupération des bactéries retenue (le rinçage mécanique) et aux tests de calibration réalisés, nous avons pu récupérer suffisamment d'ADN bactérien, caractériser les communautés bactériennes et une partie du résistome des filets. Les échantillons des truites issues des deux fermes A et B ont montré des profils de communautés bactériennes comparables. Les conditions dans lesquelles ces échantillons ont été préparés (filetage stérile au laboratoire, pas d'éviscération) suggèrent que ces communautés proviennent essentiellement de la peau de la truite, puisque ses muscles sont stériles. Il est possible que l'eau de la rivière soit un des facteurs influençant la structure des communautés bactériennes, associées à la peau des poissons, que nous avons observée. Une telle influence de l'eau des bassins d'élevage sur le microbiote intestinal des poissons a été déjà décrite (Giatsis et al., 2015; Sullam et al., 2012b), ce qui pourrait expliquer cette similarité entre les échantillons des deux fermes.

La transformation des filets en atelier, où les poissons sont éviscérés et filetés mécaniquement, a induit une modification de la diversité des communautés bactériennes sur certains filets. En effet, les communautés de ces filets étaient fortement dominées par des genres bactériens, certes présents mais peu abondants au stade de l'élevage (*Pseudomonas* et *Stenotrophomonas* pour les truites de la ferme A et *Carnobacterium* pour les truites de la ferme B). La capacité de ces genres bactériens à coloniser le tractus digestif des animaux (Iskandar et al., 2017; Wong et al., 2013) et leur présence sur les tapis convoyeurs d'un atelier de transformation de saumons (Langsrud et al., 2016) suggèrent que cette contamination secondaire provenait d'un transfert des communautés suite à un évènement survenu lors de l'éviscération des poissons (écoulement du contenu digestif par exemple...), ou d'un contact avec les tapis de l'atelier de transformation, eux-mêmes contaminés par un lot de poissons précédent. En effet, Møretrø et al. (2016) ont décrit une augmentation de la prévalence de *Pseudomonas* spp. dans les filets de saumons transformés en atelier, par rapport à des filets transformés stérilement en laboratoire. Dans une étude publiée en 2015, Chaillou et al. ont observé que le microbiote bactérien de filets de saumon

transformés en atelier était principalement d'origine environnementale. Pour le cas des truites de la ferme A, du fait de notre numérotation dans l'ordre chronologique de traitement des truites, nos observations étayaient la contamination suite à une erreur d'éviscération sur une des truites du lot.

Le microbiote des filets semble constitué d'un core-microbiote de la truite, ce qui correspond aux observations rapportées par Møretro et al., (2016). Les variations observées dans la diversité des communautés sont qualitatives puisque l'origine géographique des poissons semble avoir un impact significatif sur la richesse des échantillons. Cette diversité qualitative est néanmoins causée par la présence différentielle de genres faiblement représentés (< 500 séquences obtenues pour chaque genre), et les genres majoritairement représentés sont présents sur tous les échantillons. Des variations quantitatives ont également été observées, exprimées par un changement d'abondances relatives des communautés observées, en fonction de l'origine des poissons mais également de l'étape de filetage en atelier qui peut être à l'origine d'évènements ponctuels pouvant modifier la structure des communautés bactériennes de ces filets de truite.

Nous avons mis en évidence la présence d'un faible nombre de gènes de résistance aux antibiotiques dans la flore bactérienne des filets. Au total sur les 248 gènes recherchés, 8 gènes de résistance aux antibiotiques ont été détectés, ainsi que les gènes *mdtE* et *mexF* codant pour des sous-unités de pompes à efflux dont la surexpression (non évaluée dans ces travaux), est responsables de résistance aux antibiotiques, et le gène *vgaB* codant pour une pompe à efflux. Ces gènes, conférant des résistances aux β -lactamines, tétracyclines, macrolides, vancomycine, ont été détectés dans 17 échantillons différents sur 56 échantillons analysés. Ils étaient présents en faible nombre de copies, comme l'atteste les valeurs hautes de cycle de détection (C_T) associées. Les gènes *tetV* et *tetM* ont été détectés dans les échantillons issus de la ferme B, dont les poissons avaient été traités par l'oxytétracycline. D'autres gènes ont été détectés, conférant des résistances à des molécules avec lesquelles nous ne savons pas si les bactéries ont été en contact. D'une façon générale, le nombre d'échantillons dans lequel au moins un gène a été détecté, ainsi que le nombre de gènes différents détectés sont plus grands dans la ferme B. Il est donc possible que l'environnement et les conditions d'élevage dans cette ferme soient sources d'enrichissement du résistome, par l'application de traitements

antibiotiques ou par l'effet des effluents ayant augmenté le niveau d'exposition de l'élevage. Le faible nombre de gènes détectés (11 en tout sur 248) peut s'expliquer par le seuil d'amplification fixé à 27 C_T que nous avons appliqué. Ce seuil a été choisi d'après la bibliographie (Muziasari et al., 2017; Zhu et al., 2013), mais pourrait être trop restrictif pour la détection de gènes dans une flore bactérienne faiblement concentrée telle que celle que nous avons étudiée.

A ce stade, nous avons supposé que l'eau de la rivière alimentant la ferme pouvait avoir une influence sur le microbiote bactérien des filets. Dans cette situation hypothétique, les bactéries présentes dans l'eau participeraient à constituer la communauté bactérienne des filets, et les effluents des activités humaines (ville, station d'épuration par exemple) participeraient à enrichir leur résistome. Cependant, les analyses comparatives des filets frais et des filets vieillis ont apporté d'autres éléments de réponse. En effet, ces filets étaient issus de truites élevées à la station aquacole d'Oniris, dans des bassins alimentés par l'eau du réseau de distribution urbain qui avait subi donc plus de traitements d'épuration que l'eau de la rivière alimentant les bassins des fermes A et B. Ils contenaient des communautés bactériennes principalement composées d'Alphaproteobacteria et Gammaproteobacteria, de Bacilli et de Bacteroidia, avec la présence d'*Escherichia-Shigella* et de *Pseudomonas* parmi les genres les plus représentés, ce qui correspond aux communautés bactériennes observées dans les filets issus des fermes A et B. Les deux gènes de résistance détectés (*msrA* et *vanTG*) avaient également été détectés dans les échantillons issus des fermes A et B. Il est donc possible d'une part que les truites arc-en-ciel possèdent un microbiote bactérien cutané spécifique natif, insensible aux variations des conditions d'élevage, tel qu'il en a été décrit par Wong et ses collaborateurs en 2013 pour le microbiote intestinal. D'autre part, ce microbiote pourrait posséder naturellement un certain nombre de gènes de résistance. Ces gènes pourraient par exemple être portés par les Actinobacteria, dont la présence dans les échantillons a été observée qu'elle que soit leur origine. Les bactéries appartenant à cette famille possèdent des gènes leur conférant des mécanismes d'auto-résistance, soit des résistances aux antibiotiques qu'elles produisent naturellement, parmi lesquels des gènes de résistance à la vancomycine appartenant au cluster *vanHAX* (Stegmann et al., 2015). La question du rôle des conditions et de l'environnement d'élevage sur l'apparition de gènes de résistance aux antibiotiques reste néanmoins posée.

La caractérisation phénotypique de la résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas* isolées des filets a permis d'observer des profils de non-sensibilité aux antibiotiques testés. Cependant, il n'a pas été observé de correspondance claire entre la présence de gènes de résistance aux antibiotiques et l'observation de ces profils de résistance. Cela suggère que les gènes de résistance portés par les souches de *Pseudomonas* isolées étaient présents en trop faible quantité pour être détectés. Une analyse des gènes de résistance associés aux phénotypes de résistance observés permettrait de mieux connaître les caractères génotypiques des résistances exprimées et l'association, à cette analyse, de la recherche d'éléments génétiques mobiles permettrait d'évaluer le risque de transfert de ces résistances.

Comme dit précédemment, l'analyse par PCR haut-débit des gènes de résistance dans les filets frais a permis de détecter peu de gènes, présents en faible abondance. Etant données les limites liées à la capacité de détection des méthodes, nous avons voulu connaître l'évolution des profils de résistance aux antibiotiques et des communautés bactériennes de filets de poisson après un test de vieillissement. Nous avons voulu amplifier le plus possible la quantité de gènes détectables, et pensions que le vieillissement des filets augmenterait la charge bactérienne globale des filets en favorisant le développement de certaines communautés bactériennes, ce qui augmenterait le nombre de copies des gènes de résistance qu'elles portent et faciliterait la détection de ces derniers. Le vieillissement des filets a effectivement fait augmenter significativement leur charge bactérienne, et les conditions appliquées ont favorisé le développement du genre *Pseudomonas*, qui comptait pour plus de 90 % de la communauté bactérienne de ces filets vieillissants. Il a bien été possible de détecter un plus grand nombre de gènes de résistance aux antibiotiques (37 différents). On peut penser que ces gènes étaient majoritairement portés par les *Pseudomonas* qui ont pu se développer pendant le vieillissement. En effet par exemple, les gènes *mexE* et *mexF* détectés dans les filets ont été retrouvés chez *Pseudomonas* spp. (Köhler et al., 1997), de même que les gènes *msrA* (Ojo et al., 2006), *tetC* (Duman et al., 2019) et *sul1*, *sul2* et *aadA1* (Romero et al., 2017). De plus, des résistances phénotypiques à l'oxytétracycline, à la ceftazidime, à la piperacilline et au triméthoprime-sulfaméthoxazole ont été observées dans les souches de *Pseudomonas* isolées des échantillons des élevages A et B, qui correspondent aux résistances conférées par les gènes détectés dans les filets vieillissants.

La détection de ces gènes dans les filets vieilliss pose la question du risque associé à leur présence dans les communautés bactériennes des denrées alimentaires. Il est tentant de penser que les gènes présents dans les filets frais sont trop faiblement représentés pour être détectés et donc que les méthodes choisies pour cette analyse ne sont pas assez précises pour les caractériser. Cependant, plusieurs questions restent en suspens. Tout d'abord, nous ne savons pas si les gènes, présents dans les filets frais en faible quantité, pourraient être associés à un risque pour les consommateurs, puisqu'aucun critère quantitatif, ni aucune étude à notre connaissance n'associe une quantité de gènes et un risque de transmission ou d'infection, à l'image de ce qui existe pour les critères microbiologiques associés au niveau de présence « tolérable » de bactéries pathogènes sur les denrées alimentaires. De plus, il est important de noter que bien que les étapes de transformation, de vente et de stockage fassent vieillir les filets, le protocole que nous avons appliqué visait à exacerber au maximum le nombre de gènes de résistance détectables pour être aussi proche que possible de l'exhaustivité. Il n'était donc pas représentatif d'un vieillissement des filets appliqué dans le cadre d'une consommation normale. Il serait cependant intéressant d'évaluer les profils de résistance aux antibiotiques et le risque de transmissions de gènes de résistance des bactéries associées à des filets de poissons vieilliss dans des conditions normales, c'est-à-dire des conditions dans lesquelles des filets vieilliss peuvent être consommés, après un stockage au réfrigérateur par exemple dans la limite de la date limite de consommation. Il serait ainsi possible d'évaluer une exposition des consommateurs à des bactéries possédant des gènes de résistance en quantité détectable, et un risque de transmission de ces gènes à leur microbiote intestinal.

Le rôle déjà connu des *Pseudomonas* dans le risque de transmission de résistance aux antibiotiques et leur maintien dans les écosystèmes, est ici également suggéré. Nous avons observé la présence d'un certain nombre de souches exprimant des résistances phénotypiques aux antibiotiques testés, certaines souches possédant de surcroît plusieurs profils de non-sensibilité aux antibiotiques. Ce genre bactérien a été retrouvé dans la plupart des échantillons testés, et nous avons vu son abondance augmenter très fortement lors du test de vieillissement des échantillons, en même temps que l'augmentation du nombre de gènes de résistance aux antibiotiques. Ces observations combinées appellent à étudier le potentiel des souches que nous avons isolées à transférer leurs gènes de résistances dans les communautés bactériennes associées aux filets de truite arc-en-ciel. Pour cette première

caractérisation, nous avons pris la décision de ne pas rechercher la présence d'éléments génétiques mobiles dans le résistome des échantillons pour nous concentrer dans un premier temps sur la présence ou l'absence des gènes de résistance. La recherche d'éléments génétiques mobiles dans les souches de *Pseudomonas* isolées pourrait permettre de mieux évaluer leurs profils de résistance aux antibiotiques.

Compte tenu de l'importance économique croissante de la filière aquacole, de la place supposée des denrées d'origine aquacole et des données que nous avons collectées, il pourrait être intéressant voire nécessaire d'établir des plans de surveillance dans cette filière. La forte prévalence dans les échantillons analysés des bactéries du genre *Pseudomonas* et leur rôle dans la résistance aux antibiotiques pourraient en faire un candidat d'intérêt comme bactéries sentinelles dans un plan de surveillance. Les bactéries sentinelles sont des souches bactériennes dont le niveau de résistance aux antibiotiques est représentatif du niveau de résistance des bactéries associées à un environnement. De telles bactéries existent dans les filières bovine, porcine et aviaire, où les niveaux de résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli* et *Enterococcus faecium* sont surveillés. Les bactéries du genre *Pseudomonas* pourraient aussi être utilisées pour l'évaluation longitudinale de l'évolution du niveau des résistances aux antibiotiques des bactéries associées aux filets de poissons frais.

En conclusion, cette étude qui associe différents descripteurs (résidus d'antibiotiques, analyses phénotypiques et génotypiques) a permis d'obtenir une première caractérisation globale des profils de résistance aux antibiotiques des communautés bactériennes des filets frais de truite arc-en-ciel. Nous avons mis en évidence un microbiote bactérien pour ces filets de truite arc-en-ciel dont la structure ne semble pas ou très peu influencée par l'environnement d'élevage, et qui est susceptible de posséder des gènes de résistances aux antibiotiques de façon native. Néanmoins, le microbiote bactérien des poissons et leur résistome sont susceptibles d'évoluer en fonction de la saison (Diwan et al., 2018; Naviner et al., 2006) ou de l'origine géographique (d'autres rivières, pays d'origine...). Enfin, la recherche d'autres gènes de résistance, d'éléments mobiles et l'analyse de différents genres bactériens d'intérêt, tels que des bactéries appartenant à la famille des Actinobacteria, permettrait de compléter l'image obtenue et de mieux évaluer l'exposition des consommateurs à la présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans les filets de poissons ainsi que le risque de transfert de ces gènes à leur microbiote intestinal.

Références

- Abraham, E.P., Chain, E., 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin [1]. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/146837a0>
- Abraham, S., Jordan, D., Wong, H.S., Johnson, J.R., Toleman, M.A., Wakeham, D.L., Gordon, D.M., Turnidge, J.D., Mollinger, J.L., Gibson, J.S., Trott, D.J., 2015. First detection of extended-spectrum cephalosporin- and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in Australian food-producing animals. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 3, 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.08.002>
- Akinbowale, O.L., Peng, H., Grant, P., Barton, M.D., 2007. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.03.012>
- Albrich, W.C., Monnet, D.L., Harbarth, S., 2004. Antibiotic Selection Pressure and Resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 514–517. <https://doi.org/10.3201/eid1003.030252>
- Allen, H.K., 2014. Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. *Curr. Opin. Microbiol.* 19, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.001>
- Alnajrani, M., Hanlon, K., English, A., Fermin, K., Brashears, M.M., Echeverry, A., 2018. Comparing the Recovery of Indicator Microorganisms from Beef Trimmings Using Swabbing, Rinsing, and Grinding Methodologies. *Meat Muscle Biol.* 2, 139. <https://doi.org/10.22175/mmb2017.09.0047>
- Anderson, M.E., Huff, H.E., Naumann, H.D., Marshall, R.T., Damare, J., Johnston, R., Pratt, M., 1987. Evaluation of Swab and Tissue Excision Methods for Recovering Microorganisms from Washed and Sanitized Beef Carcasses1,2. *J. Food Prot.* 50, 741–743. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-50.9.741>
- Angelidis, A.S., Kalamaki, M.S., Georgiadou, S.S., 2015. Identification of non-*Listeria* spp. bacterial isolates yielding a β -d-glucosidase-positive phenotype on Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti (ALOA). *Int. J. Food Microbiol.* 193, 114–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.022>
- Anses, 2019a. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2018.
- Anses, 2019b. Résapath - Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2018. Lyon et Ploufragan-Plouzané-Niort, France.
- Austin, B., 2006. The bacterial microflora of fish, revised. *ScientificWorldJournal.* 6, 931–945. <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.181>
- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjöberg, A.M., Aarnisalo, K., Björkroth, J., Mattila-Sandholm, T., Korkeala, H., 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 150–155. <https://doi.org/10.1128/aem.65.1.150-155.1999>
- Avens, J.S., Miller, B.F., 1970. Quantifying bacteria on poultry carcass skin. *Poult. Sci.* 49, 1309–1315. <https://doi.org/10.3382/ps.0491309>
- Barnaud, G., Arlet, G., Verdet, C., Gaillot, O., Lagrange, P.H., Philippon, A., 1998. *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible β -lactamase (DHA-1) with an *ampR* gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2352–2358. <https://doi.org/10.1128/aac.42.9.2352>
- Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Préveaux, A., Valière, S., Bouchez, O., Hunault, G., Simoneau, P., Jacquesa, M.A., 2015. Emergence shapes the structure of the seed microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1257–1266. <https://doi.org/10.1128/AEM.03722-14>
- Bartkova, S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F.M., Dalsgaard, I., 2017. Epidemiology of Danish *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* in fish farms using whole genome sequencing. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02411>
- Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N., Guédon, G., 2014. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: Evolution and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12058>

- Benhamed, S., Guardiola, F.A., Mars, M., Esteban, M.Á., 2014. Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. *Vet. Microbiol.* 171, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.008>
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57, 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Benmalek, Y., Cayol, J.L., Bouanane, N.A., Hacene, H., Fauque, G., Fardeau, M.L., 2010. *Chryseobacterium solincola* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1876–1880. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.008631-0>
- Bennett, P.M., 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria, in: *British Journal of Pharmacology*. Wiley-Blackwell, p. S347. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607>
- Bergmark, L., Poulsen, P.H.B., Al-Soud, W.A., Norman, A., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., 2012. Assessment of the specificity of *Burkholderia* and *Pseudomonas* qPCR assays for detection of these genera in soil using 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 333, 77–84. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02601.x>
- Biemer, J.J., 1973. Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Ann. Clin. Lab. Sci.*
- Blatny, J.M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H.C., Haugan, K., Valla, S., 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 370–379. <https://doi.org/10.1128/aem.63.2.370-379.1997>
- Bloom, D.E., Cafiero, E., Jané-Llopis, E., Abrahams-Gessel, S., Bloom, L.R., Fathima, S., Feigl, A.B., Gaziano, T., Hamandi, A., Mowafi, M., Pandya, A., Prettnner, K., Rosenberg, L., Seligman, B., Stein, A.Z., Weinstein, C., 2011. The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases. Program on the Global Demography of Aging.
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J.A., Hendriksen, R.S., Szabo, I., Malorny, B., 2017. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 3317–3324. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx327>
- Bortolaia, V., Kaas, R.S., Ruppe, E., Roberts, M.C., Schwarz, S., Philippon, A., Allesoe, R.L., Rebelo, A.R., Florensa, A.F., Cattoir, V., Fagelhauer, L., Coppens, J., Xavier, B.B., Malhotra-kumar, S., Westh, H., Losch, S., Olkkola, S., Wiczorek, K., Amaro, A., Clemente, L., Ragimbeau, C., Lund, O., Aarestrup, F.M., 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- Boss, R., Overesch, G., Baumgartner, A., 2016. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, enterococci, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* from raw fish and seafood imported into Switzerland. *J. Food Prot.* 79, 1240–1246. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-463>
- Boutin, S., Sauvage, C., Bernatchez, L., Audet, C., Derome, N., 2014. Inter individual variations of the fish skin microbiota: Host genetics basis of mutualism? *PLoS One* 9, e102649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102649>
- Briet, A., Helsen, N., Delannoy, S., Debuiche, S., Brisabois, A., Midelet, G., Granier, S.A., 2018. NDM-1-producing *Vibrio parahaemolyticus* isolated from imported seafood. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 2578–2579. <https://doi.org/10.1093/jac/dky200>
- Budiati, T., Rusul, G., Wan-Abdullah, W.N., Arip, Y.M., Ahmad, R., Thong, K.L., 2013. Prevalence, antibiotic resistance and plasmid profiling of *Salmonella* in catfish (*Clarias gariepinus*) and tilapia (*Tilapia mossambica*) obtained from wet markets and ponds in Malaysia. *Aquaculture* 372–375, 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.003>
- Cabral, J.P.S., 2010. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>
- Calvez, S., Gantelet, H., Blanc, G., Douet, D.G., Daniel, P., 2014. *Yersinia ruckeri* biotypes 1 and 2 in France: Presence and antibiotic susceptibility. *Dis. Aquat. Organ.* 109, 117–126. <https://doi.org/10.3354/dao02725>
- Cannon, R.M., Roe, R.T., 1982. Livestock disease surveys . A field manual for veterinarians. Bureau of Rural Science, Department of Primary Industry. Australian Government Pub. Service, Canberra, Australia.

- Cantas, L., Shah, S.Q.A., Cavaco, L.M., Manaia, C.M., Walsh, F., Popowska, M., Garelick, H., Bürgmann, H., Sørum, H., 2013. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front. Microbiol.* 4, 96. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00096>
- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzotti, G., Magistrali, C.F., 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance* 22. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589>
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M.V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F.M., Hasman, H., 2014. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- Castro-Escarpulli, G., Figueras, M.J., Aguilera-Arreola, G., Soler, L., Fernández-Rendón, E., Aparicio, G.O., Guarro, J., Chacón, M.R., 2003. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 41–49. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00393-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00393-8)
- Cerniglia, C.E., Kotarski, S., 2005. Approaches in the safety evaluations of veterinary antimicrobial agents in food to determine the effects on the human intestinal microflora. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 28, 3–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00595.x>
- Cesare, A. Di, Vignaroli, C., Luna, G.M., Pasquaroli, S., Biavasco, F., 2012. Antibiotic-resistant enterococci in seawater and sediments from a coastal fish farm. *Microb. Drug Resist.* 18, 502–509. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0204>
- Chaillou, S., Chaulot-Talmon, A., Caekebeke, H., Cardinal, M., Christieans, S., Denis, C., Hélène Desmonts, M., Dousset, X., Feurer, C., Hamon, E., Joffraud, J.J., La Carbona, S., Leroi, F., Leroy, S., Lorre, S., Macé, S., Pilet, M.F., Prévost, H., Rivollier, M., Roux, D., Talon, R., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M.C., 2015. Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *ISME J.* 9, 1105–1118. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.202>
- Chen, B.Y., Pyla, R., Kim, T.J., Silva, J.L., Jung, Y.S., 2010a. Antibiotic resistance in *Listeria* species isolated from catfish fillets and processing environment. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 626–632. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02843.x>
- Chen, B.Y., Pyla, R., Kim, T.J., Silva, J.L., Jung, Y.S., 2010b. Prevalence and contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in catfish processing environment and fresh fillets. *Food Microbiol.* 27, 645–652. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.02.007>
- Chen, M., Cheng, J., Wu, Q., Zhang, J., Chen, Y., Xue, L., Lei, T., Zeng, H., Wu, S., Ye, Q., Bai, J., Wang, J., 2018. Occurrence, antibiotic resistance, and population diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh aquatic products in China. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02215>
- Chiarello, M., Villéger, S., Bouvier, C., Bettarel, Y., Bouvier, T., 2015. High diversity of skin-associated bacterial communities of marine fishes is promoted by their high variability among body parts, individuals and species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv061>
- Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G., 2004. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Food Microbiol.* 21, 157–165. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00059-5)
- Conway, J.R., Lex, A., Gehlenborg, N., 2017. UpSetR: An R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* 33, 2938–2940. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx364>
- D’Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., Wright, G.D., 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science* (80-.). 311, 374–377. <https://doi.org/10.1126/science.1120800>
- Dang, B., Mao, D., Xu, Y., Luo, Y., 2017. Conjugative multi-resistant plasmids in Haihe River and their impacts on the abundance and spatial distribution of antibiotic resistance genes. *Water Res.* 111, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.12.046>
- Dang, S.T.T., Petersen, A., Van Truong, D., Chu, H.T.T., Dalsgaard, A., 2011. Impact of medicated feed on the development of antimicrobial resistance in bacteria at integrated pig-fish farms in Vietnam. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4494–4498. <https://doi.org/10.1128/AEM.02975-10>

- Delcour, A.H., 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1794, 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
- Dewailly, É., Ayotte, P., Lucas, M., Blanchet, C., 2007. Risk and benefits from consuming salmon and trout: A Canadian perspective. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1343–1348. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.01.010>
- Diler, Ö., Altun, S., Çalikuşu, F., Diler, A., 2000. A Study on Qualitative and Quantitative Bacterial Flora of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Living in Different Fish Farms. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 24, 251–259.
- Diwan, V., Hanna, N., Purohit, M., Chandran, S., Riggi, E., Parashar, V., Tamhankar, A.J., Stålsby Lundborg, C., 2018. Seasonal variations in water-quality, antibiotic residues, resistant bacteria and antibiotic resistance genes of *Escherichia coli* isolates from water and sediments of the Kshipra River in Central India. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15, 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijerph15061281>
- Donnarumma, G., Buommino, E., Fusco, A., Paoletti, I., Auricchio, L., Tufano, M.A., 2010. Effect of temperature on the shift of *Pseudomonas fluorescens* from an environmental microorganism to a potential human pathogen. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 23, 227–234. <https://doi.org/10.1177/039463201002300120>
- Doublet, B., Boyd, D., Mulvey, M.R., Cloeckert, A., 2005. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Mol. Microbiol.* 55, 1911–1924. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04520.x>
- Doughari, H.J., Ndakidemi, P.A., Human, I.S., Benade, S., 2011. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An overview. *Microbes Environ.* 26, 101–112. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10179>
- Drancourt, M., 2016. Antiquité de la résistance aux antibiotiques. *J. des Anti-Infectieux.* <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2016.03.002>
- Du, F., Lv, X., Duan, D., Wang, L., Huang, J., 2019. Characterization of a Linezolid- and Vancomycin-Resistant *Streptococcus suis* Isolate That Harbors *optrA* and *vanG* Operons. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02026>
- Dubreil, E., Gautier, S., Fourmond, M.P., Bessiral, M., Gaugain, M., Verdon, E., Pessel, D., 2017. Validation approach for a fast and simple targeted screening method for 75 antibiotics in meat and aquaculture products using LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 34, 453–468. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1230278>
- Duman, M., Saticioglu, I.B., Altun, S., 2019. Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of fecal contaminants and spoilage bacteria that emerge in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms. *Biosci. Microbiota, Food Heal.* 38, 41–48. <https://doi.org/10.12938/bmfh.18-007>
- EFSA, 2020. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018, EFSA Journal. Wiley-Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6007>
- EFSA, 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* 16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- Escudíe, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Fernández-Alarcón, C., Miranda, C.D., Singer, R.S., López, Y., Rojas, R., Bello, H., Domínguez, M., González-Rocha, G., 2010. Detection of the *floR* gene in a diversity of florfenicol resistant gram-negative bacilli from freshwater salmon farms in Chile. *Zoonoses Public Health* 57, 181–188. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01243.x>
- Fiedler, S., Bender, J.K., Klare, I., Halbedel, S., Grohmann, E., Szewzyk, U., Werner, G., 2016. Tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecium* is mediated by an upregulation of plasmid-encoded tetracycline determinants *tet(L)* and *tet(M)*. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 871–881. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv420>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020a. Antimicrobial Resistance in Food.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020b. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020, The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>

- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics., Rome. Italy.
- Fosse, J., Laroche, M., Rossero, A., Fédérighi, M., Seegers, H., Magras, C., 2006. Recovery methods for detection and quantification of *Campylobacter* depend on meat matrices and bacteriological or PCR tools. *J. Food Prot.* 69, 2100–2106. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.9.2100>
- Fourie, J.C.J., Sanko, T.J., Bezuidenhout, C.C., Mienie, C., Adeleke, R.A., 2019. Draft Genome Sequences of Potentially Pathogenic *Clostridium perfringens* Strains from Environmental Surface Water in the North West Province of South Africa . *Microbiol. Resour. Announc.* 8. <https://doi.org/10.1128/mra.00407-19>
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., Toussaint, A., 2005. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E.M., Villar, C.J., Lombó, F., 2018. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Front. Microbiol.* 9, 898. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>
- Gao, P., Mao, D., Luo, Y., Wang, L., Xu, B., Xu, L., 2012. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Res.* 46, 2355–2364. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.004>
- Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Heilig, H., Benvenuti, G., Verreth, J., Verdegem, M., 2015. The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Sci. Rep.* 5, 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep18206>
- GILL, C.O., 1979. Intrinsic Bacteria in Meat. *J. Appl. Bacteriol.* 47, 367–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1979.tb01196.x>
- Gill, C.O., Badoni, M., 2005. Recovery of bacteria from poultry carcasses by rinsing, swabbing or excision of skin. *Food Microbiol.* 22, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.04.005>
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., Zhu, Y.G., 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J.* 9, 1269–1279. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>
- Gobbetti, M., Rizzello, C.G., 2014. Arthrobacter, in: *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition.* Elsevier Inc., pp. 69–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00009-4>
- González, C.J., López-Díaz, T.M., García-López, M.L., Prieto, M., Otero, A., 1999. Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*), and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Food Prot.* 62, 1270–1277. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.11.1270>
- Gordon, L., Cloeckert, A., Doublet, B., Schwarz, S., Bouju-albert, A., Ganière, J.P., Le bris, H., Le flèche-matéos, A., Giraud, E., 2008. Complete sequence of the *floR*-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 65–71. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn166>
- Gordon, L., Giraud, E., Ganière, J.P., Armand, F., Bouju-Albert, A., De La Cotte, N., Mangion, C., Le Bris, H., 2007. Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1167–1176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03138.x>
- Guardabassi, L., Dalsgaard, A., Olsen, J.E., 1999. Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *J. Appl. Microbiol.* 87, 659–667. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00905.x>
- Hammack, T.S., Valentin-Bon, I.E., Jacobson, A.P., Andrews, W.H., 2004. Relative effectiveness of the Bacteriological Analytical Manual method for the recovery of *Salmonella* from whole cantaloupes and cantaloupe rinses with selected preenrichment media and rapid methods. *J. Food Prot.* 67, 870–877. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.5.870>
- Hammad, A.M., Shimamoto, Toshi, Shimamoto, Tadashi, 2014. Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *Food Microbiol.* 38, 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.010>
- Hänninen, M.L., Oivanen, P., Hirvelä-Koski, V., 1997. *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 17–26. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01163-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01163-4)
- Harwood, V.J., Staley, C., Badgley, B.D., Borges, K., Korajkic, A., 2014. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: Relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1111/1574->

- Hektoen, H., Berge, J.A., Hormazabal, V., Yndestad, M., 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133, 175–184. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00310-K](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00310-K)
- Helsens, N., Calvez, S., Bouju-Albert, A., Rossero, A., Prévost, H., Magras, C., 2020. Comparison of stomaching versus rinsing, for recovering bacterial communities from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) filets. *J. Food Prot.* <https://doi.org/10.4315/JFP-20-037>
- Hoa, T.T.T., Nakayama, T., Huyen, H.M., Harada, K., Hinenoya, A., Phuong, N.T., Yamamoto, Y., 2020. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* harbouring sul and mcr-1 genes isolates from fish gut contents in the Mekong Delta, Vietnam. *Lett. Appl. Microbiol.* 71, 78–85. <https://doi.org/10.1111/lam.13222>
- Hombach, M., Courvalin, P., Böttger, E.C., 2014. Validation of antibiotic susceptibility testing guidelines in a routine clinical microbiology laboratory exemplifies general key challenges in setting clinical breakpoints. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3921–3926. <https://doi.org/10.1128/AAC.02489-13>
- Ishida, Y., Ahmed, A.M., Mahfouz, N.B., Kimura, T., El-Khodery, S.A., Moawad, A.A., Shimamoto, T., 2010. Molecular analysis of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 727–734. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0538>
- Iskandar, C.F., Borges, F., Taminiau, B., Daube, G., Zagorec, M., Remenant, B., Leisner, J.J., Hansen, M.A., Sørensen, S.J., Mangavel, C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A.M., 2017. Comparative genomic analysis reveals ecological differentiation in the genus *Carnobacterium*. *Front. Microbiol.* 8, 357. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00357>
- Jia, J., Guan, Y., Cheng, M., Chen, H., He, J., Wang, S., Wang, Z., 2018. Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistance genes in Ba River, China. *Sci. Total Environ.* 642, 1136–1144. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.149>
- Kennedy, D.A., Read, A.F., 2017. Why does drug resistance readily evolve but vaccine resistance does not? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284, 20162562. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2562>
- Kohl, K.D., Amaya, J., Passemont, C.A., Dearing, M.D., Mccue, M.D., 2014. Unique and shared responses of the gut microbiota to prolonged fasting: A comparative study across five classes of vertebrate hosts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90, 883–894. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12442>
- Köhler, T., Michéa-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L.K., Pechère, J.C., 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 23, 345–354. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.2281594.x>
- Koskinen, R., Tali-Vehmas, Kämpfer, P., Laurikkala, M., Tsitko, I., Kostyal, E., Atroshi, F., Salkinoja-Salonen, M., 2000. Characterization of Sphingomonas isolates from Finnish and Swedish drinking water distribution systems. *J. Appl. Microbiol.* 89, 687–696. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01167.x>
- Kottara, A., Hall, J.P.J., Harrison, E., Brockhurst, M.A., 2018. Variable plasmid fitness effects and mobile genetic element dynamics across *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix172>
- Kovalevskaya, N.P., 2002. Mobile gene cassettes and integrons. *Mol. Biol.* 36, 196–201. <https://doi.org/10.1023/A:1015361704475>
- Lagier, J.C., Dubourg, G., Million, M., Cadoret, F., Bilen, M., Fenollar, F., Lévassieur, A., Rolain, J.M., Fournier, P.E., Raoult, D., 2018. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 540–550. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0041-0>
- Lambert, P.A., 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 92, 46S-54S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.7.x>
- Langsrud, S., Moen, B., Møretrø, T., Løype, M., Heir, E., 2016. Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon-processing plants. *J. Appl. Microbiol.* 120, 366–378. <https://doi.org/10.1111/jam.13013>
- Larsen, A., Tao, Z., Bullard, S.A., Arias, C.R., 2013. Diversity of the skin microbiota of fishes: Evidence for host species specificity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 483–494. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12136>
- Lex, A., Gehlenborg, N., Strobel, H., Vuillemot, R., Pfister, H., 2014. UpSet: Visualization of

- intersecting sets. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 20, 1983–1992. <https://doi.org/10.1109/TVCG.2014.2346248>
- Li, X., Wang, H.H., 2010. Tetracycline resistance associated with commensal bacteria from representative ready-to-consume deli and restaurant foods, *Journal of Food Protection.* <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.10.1841>
- Liu, X., Zhang, Y., Li, D., Luo, Y., 2017. Characterization of the microbiota in lightly salted bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillets stored at 4 °C. *Food Microbiol.* 62, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.007>
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H., Shen, J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Loch, T.P., Faisal, M., 2015. Emerging flavobacterial infections in fish: A review. *J. Adv. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.10.009>
- Lokesh, J., Kiron, V., 2016. Transition from freshwater to seawater reshapes the skin-associated microbiota of Atlantic salmon. *Sci. Rep.* 6, 19707. <https://doi.org/10.1038/srep19707>
- Looft, T., Johnson, T.A., Allen, H.K., Bayles, D.O., Alt, D.P., Stedtfeld, R.D., Sul, W.J., Stedtfeld, T.M., Chai, B., Cole, J.R., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M., Stanton, T.B., 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 1691–1696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120238109>
- Lopatek, M., Wieczorek, K., Osek, J., 2015. Prevalence and antimicrobial resistance of *vibrio parahaemolyticus* isolated from raw shellfish in Poland. *J. Food Prot.* 78, 1029–1033. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-437>
- Lowrey, L., Woodhams, D.C., Tacchi, L., Salinas, I., 2015. Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6915–6925. <https://doi.org/10.1128/AEM.01826-15>
- Lulijwa, R., Rupia, E.J., Alfaro, A.C., 2019. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Rev. Aquac.* 12, 640–663. <https://doi.org/10.1111/raq.12344>
- Macé, S., Cornet, J., Chevalier, F., Cardinal, M., Pilet, M.F., Dousset, X., Joffraud, J.J., 2012. Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR-TTGE. *Food Microbiol.* 30, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.013>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: Robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2014, e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>
- McArthur, A.G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M.A., Baylay, A.J., Bhullar, K., Canova, M.J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A.M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M.R., O'Brien, J.S., Pawlowski, A.C., Piddock, L.J.V., Spanogiannopoulos, P., Sutherland, A.D., Tang, I., Taylor, P.L., Thaker, M., Wang, W., Yan, M., Yu, T., Wright, G.D., 2013. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3348–3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
- McClintock, B., 1953. Induction of Instability at Selected Loci in Maize. *Genetics* 38, 579–99.
- McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A.C., Clifford, R., Hinkle, M., Whitman, T., Lesho, E., Schaecher, K.E., 2016. *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *blaCTX-M* on a novel *IncF* plasmid: First report of *mcr-1* in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* <https://doi.org/10.1128/AAC.01103-16>
- McKessar, S.J., Berry, A.M., Bell, J.M., Turnidge, J.D., Paton, J.C., 2000. Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3224–3228. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.11.3224-3228.2000>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Meziane-Cherif, D., Stogios, P.J., Evdokimova, E., Egorova, O., Savchenko, A., Courvalin, P., 2015.

- Structural and functional adaptation of vancomycin resistance vanS serine racemases. *MBio* 6, e00806. <https://doi.org/10.1128/mBio.00806-15>
- Michel, C., Kerouault, B., Martin, C., 2003. Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: Comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1008–1015. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02093.x>
- Miranda, C.D., Zemelman, R., 2002. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture* 212, 31–47. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00124-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00124-2)
- Mørseth, T., Moen, B., Heir, E., Hansen, A., Langsrud, S., 2016. Contamination of salmon fillets and processing plants with spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 237, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.016>
- Moura, A., Soares, M., Pereira, C., Leitão, N., Henriques, I., Correia, A., 2009. INTEGRALL: A database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics* 25, 1096–1098. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp105>
- Mulet, M., Gomila, M., Ramírez, A., Cardew, S., Moore, E.R.B., Lalucat, J., García-Valdés, E., 2017. Uncommonly isolated clinical *Pseudomonas*: identification and phylogenetic assignation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 351–359. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2808-4>
- Mullany, P., 2014. Functional metagenomics for the investigation of antibiotic resistance. *Virulence* 5, 443–447. <https://doi.org/10.4161/viru.28196>
- Muziasari, W.I., Managaki, S., Pärnänen, K., Karkman, A., Lyra, C., Tamminen, M., Suzuki, S., 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, e92702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092702>
- Muziasari, W.I., Pitkänen, L.K., Sørum, H., Stedtfeld, R.D., Tiedje, J.M., Virta, M., 2017. The resistome of farmed fish feces contributes to the enrichment of antibiotic resistance genes in sediments below baltic sea fish farms. *Front. Microbiol.* 7, 2137. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02137>
- Naviner, M., Giraud, E., Le Bris, H., Armand, F., Mangion, C., Ganière, J.P., 2006. Seasonal variability of intestinal microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), with a particular attention to *Aeromonas* spp. as candidate indicator of antimicrobial resistance. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)*. 157, 597–602.
- Ndi, O.L., Barton, M.D., 2011. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J. Fish Dis.* 34, 589–599. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01272.x>
- Nedoluh, P.C., Owens, S., Russek-Cohen, E., Westhoff, D.C., 2001. Effect of sampling method on the representative recovery of microorganisms from the surfaces of aquacultured finfish. *J. Food Prot.* 64, 1515–1520. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.10.1515>
- Neilson, J.W., Jordan, F.L., Maier, R.M., 2013. Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *J. Microbiol. Methods* 92, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.12.021>
- Nishino, K., Latifi, T., Groisman, E.A., 2006. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 59, 126–141. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04940.x>
- Niskanen, A., Pohja, M.S., 1977. Comparative Studies on the Sampling and Investigation of Microbial Contamination of Surfaces by the Contact Plate and Swab Methods. *J. Appl. Bacteriol.* 42, 53–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1977.tb00669.x>
- Novais, C., Campos, J., Freitas, A.R., Barros, M., Silveira, E., Coque, T.M., Antunes, P., Peixe, L., 2018. Water supply and feed as sources of antimicrobial-resistant *Enterococcus* spp. in aquacultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Portugal. *Sci. Total Environ.* 625, 1102–1112. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.265>
- Ojo, K.K., Striplin, M.J., Ulep, C.C., Close, N.S., Zittle, J., Luis, H., Bernardo, M., Leitao, J., Roberts, M.C., 2006. *Staphylococcus* efflux *msr(A)* gene characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1089–1091. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.3.1089-1091.2006>
- Okyere, A., Bishoff, D., Oyaro, M.O., Ajami, N.J., Darkoh, C., 2018. Analysis of Fish Commonly Sold in Local Supermarkets Reveals the Presence of Pathogenic and Multidrug-Resistant Bacterial

- Communities. Microbiol. Insights 11, 117863611878692. <https://doi.org/10.1177/1178636118786925>
- Ørmen, O., Østensvik, O., 2001. The occurrence of aerolysin-positive *Aeromonas* spp. and their cytotoxicity in Norwegian water sources. J. Appl. Microbiol. 90, 797–802. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01309.x>
- Pan, X.S., Yague, G., Fisher, L.M., 2001. Quinolone resistance mutations in *Streptococcus pneumoniae* gyrA and parC proteins: Mechanistic insights into quinolone action from enzymatic analysis, intracellular levels, and phenotypes of wild-type and mutant proteins. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 3140–3147. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.11.3140-3147.2001>
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R., 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons: Review article. FEMS Microbiol. Rev. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x>
- Petkar, H., Li, A., Bunce, N., Duffy, K., Malnick, H., Shah, J.J., 2011. *Cellulosimicrobium funkei*: First report of infection in a nonimmunocompromised patient and useful phenotypic tests for differentiation from *Cellulosimicrobium cellulans* and *Cellulosimicrobium terreum*. J. Clin. Microbiol. 49, 1175–1178. <https://doi.org/10.1128/JCM.01103-10>
- Piotrowska, M., Przygodzinska, D., Matyjewicz, K., Popowska, M., 2017. Occurrence and variety of β -lactamase genes among *Aeromonas* spp. isolated from Urban Wastewater treatment plant. Front. Microbiol. 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00863>
- Pitkanen, L.K., Tamminen, M., Hynninen, A., Karkman, A., Corander, J., Kotilainen, A., Virta, M., 2011. Fish farming affects the abundance and diversity of the mercury resistance gene *merA* in marine sediments. Microbes Environ. 26, 205–211. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME11119>
- Poirier, S., Rué, O., Peguilhan, R., Coeuret, G., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M.C., Loux, V., Chaillou, S., 2018. Deciphering intra-species bacterial diversity of meat and seafood spoilage microbiota using *gyrB* amplicon sequencing: A comparative analysis with 16S rDNA V3-V4 amplicon sequencing. PLoS One 13, e0204629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204629>
- Poole, K., 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. Clin. Microbiol. Infect. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00763.x>
- Poole, T.L., Callaway, T.R., Bischoff, K.M., Warnes, C.E., Nisbet, D.J., 2006. Macrolide inactivation gene cluster *mphA-mrx-mphR* adjacent to a class 1 integron in *Aeromonas hydrophila* isolated from a diarrhoeic pig in Oklahoma. J. Antimicrob. Chemother. 57, 31–38. <https://doi.org/10.1093/jac/dki421>
- Psifidi, A., Dovas, C.I., Bramis, G., Lazou, T., Russel, C.L., Arsenos, G., Banos, G., 2015. Comparison of Eleven Methods for Genomic DNA Extraction Suitable for Large-Scale Whole-Genome Genotyping and Long-Term DNA Banking Using Blood Samples. PLoS One 10, e0115960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115960>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 41. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Reygaert, W., 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): molecular aspects of antimicrobial resistance and virulence., Clinical laboratory science: journal of the American Society for Medical Technology.
- Rizzi, E., Lari, M., Gigli, E., De Bellis, G., Caramelli, D., 2012. Ancient DNA studies: New perspectives on old samples. Genet. Sel. Evol. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-44-21>
- Roberts, A.P., Johanesen, P.A., Lyras, D., Mullany, P., Rood, J.I., 2001. Comparison of Tn5397 from *Clostridium difficile*, Tn916 from *Enterococcus faecalis* and the CW459tet(M) element from *Clostridium perfringens* shows that they have similar conjugation regions but different insertion and excision modules. Microbiology 147, 1243–1251. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-5-1243>
- Romero, J.L., Grande Burgos, M.J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., Lucas, R., 2017. Resistance to Antibiotics, Biocides, Preservatives and Metals in Bacteria Isolated from Seafoods: Co-Selection of Strains Resistant or Tolerant to Different Classes of Compounds. Front. Microbiol. 8, 1650. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01650>
- Ross, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J., Baumberg, S., Wootton, J.C., 1990. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport

- super-gene family. *Mol. Microbiol.* 4, 1207–1214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00696.x>
- Rosser, S.J., Alfa, M.J., Hoban, S., Kennedy, J., Harding, G.K., 1999. E test versus agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of viridans group streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 37, 26–30. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.1.26-30.1999>
- Rouger, A., Remenant, B., Prévost, H., Zagorec, M., 2017. A method to isolate bacterial communities and characterize ecosystems from food products: Validation and utilization in as a reproducible chicken meat model. *Int. J. Food Microbiol.* 247, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.028>
- Rowe, W., Maskell, D.J., Pearce, G.P., Verner-Jeffreys, D.W., Baker-Austin, C., Ryan, J.J., 2016. Comparative metagenomics reveals a diverse range of antimicrobial resistance genes in effluents entering a river catchment. *Water Sci. Technol.* 73, 1541–1549. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.634>
- Rubens, C.E., McNeill, W.F., Farrar, W.E., 1979. Transposable plasmid deoxyribonucleic acid sequence in *Pseudomonas aeruginosa* which mediates resistance to gentamicin and four other antimicrobial agents, *Journal of Bacteriology.* <https://doi.org/10.1128/jb.139.3.877-882.1979>
- Saavedra, M.J., Guedes-Novais, S., Alves, A., Rema, P., Tacão, M., Correia, A., Martínez-Murcia, A., 2004. Resistance to β -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. Microbiol.* 7, 207–211. <https://doi.org/10.2436/im.v7i3.9472>
- Salgado-Miranda, C., Palomares, E., Jurado, M., Marín, A., Vega, F., Soriano-Vargas, E., 2010. Isolation and distribution of bacterial flora in farmed rainbow trout from Mexico. *J. Aquat. Anim. Health* 22, 244–247. <https://doi.org/10.1577/H09-004.1>
- Salo, S., Laine, A., Alanko, T., Sjöberg, A.-M., Writanen, G., Guðbjörnsdóttir, B., Jessen, B., Langsrud, S., Lindquist, K., Lundén, J., Mäki, M., Nerbrink, E., Niclasen, Ó., Tuominen, P., Tuompo, H., Vatunen, E., Woivalin, A., 2000. Validation of the Microbiological Methods Hygicult Dipslide, Contact Plate, and Swabbing in Surface Hygiene Control: A Nordic Collaborative Study. *J. AOAC Int.* 83, 1357–1366. <https://doi.org/10.1093/jaoac/83.6.1357>
- Sarlin, L.L., Barnhart, E.T., Caldwell, D.J., Moore, R.W., Byrd, J.A., Caldwell, D.Y., Corrier, D.E., Deloach, J.R., Hargis, B.M., 1998. Evaluation of Alternative Sampling Methods for *Salmonella* Critical Control Point Determination at Broiler Processing. *Poult. Sci.* 77, 1253–1257. <https://doi.org/10.1093/ps/77.8.1253>
- Scarano, C., Piras, F., Viridis, S., Ziino, G., Nuvoloni, R., Dalmasso, A., De Santis, E.P.L., Spanu, C., 2018. Antibiotic resistance of *Aeromonas* ssp. strains isolated from *Sparus aurata* reared in Italian mariculture farms. *Int. J. Food Microbiol.* 284, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.033>
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K., Larsen, J.L., 2000. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four danish rainbow trout farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4908–4915. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4908-4915.2000>
- Schmitz, F.J., Sadurski, R., Kray, A., Boos, M., Geisel, R., Koöhrer, K., Verhoef, J., Fluit, A.C., 2000. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 891–894. <https://doi.org/10.1093/jac/45.6.891>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Schwarz, S., Shen, J., Wendlandt, S., Feßler, A.T., Wang, Y., Kadlec, K., Wu, C.-M., 2015. Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance in *Staphylococci* and Other Firmicutes, in: *Plasmids*. ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 421–444. <https://doi.org/10.1128/9781555818982.ch22>
- Seyfried, E.E., Newton, R.J., Rubert IV, K.F., Pedersen, J.A., McMahan, K.D., 2010. Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture facilities with varying use of oxytetracycline. *Microb. Ecol.* 59, 799–807. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9624-7>
- Sharma, P., Diene, S.M., Thibeaut, S., Bittar, F., Roux, V., Gomez, C., Reynaud-Gaubert, M., Rolain, J.M., 2013. Phenotypic and genotypic properties of *Microbacterium yannicii*, a recently described multidrug resistant bacterium isolated from a lung transplanted patient with cystic fibrosis in France. *BMC Microbiol.* 13, 97. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-97>

- Shen, Z., Wang, Y., Shen, Y., Shen, J., Wu, C., 2016. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect. Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00061-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00061-X)
- Shephard, K.L., 1994. Functions for fish mucus. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4, 401–429. <https://doi.org/10.1007/BF00042888>
- Skowron, K., Kwiecińska-Piróg, J., Grudlewska, K., Świeca, A., Paluszak, Z., Bauza-Kaszewska, J., Walecka-Zacharska, E., Gospodarek-Komkowska, E., 2018. The occurrence, transmission, virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fish processing plant. *Int. J. Food Microbiol.* 282, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.011>
- Soriano-Lerma, A., Pérez-Carrasco, V., Sánchez-Marañón, M., Ortiz-González, M., Sánchez-Martín, V., Gijón, J., Navarro-Mari, J.M., García-Salcedo, J.A., Soriano, M., 2020. Influence of 16S rRNA target region on the outcome of microbiome studies in soil and saliva samples. *Sci. Rep.* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70141-8>
- Soto-Rodriguez, S.A., Cabanillas-Ramos, J., Alcaraz, U., Gomez-Gil, B., Romalde, J.L., 2013. Identification and virulence of *Aeromonas dhakensis*, *Pseudomonas mosselii* and *Microbacterium paraoxydans* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultivated in Mexico. *J. Appl. Microbiol.* 115, 654–662. <https://doi.org/10.1111/jam.12280>
- Spencer, S., Chung, J., Thompson, M., Piedra, P.A., Jewell, A., Avadhanula, V., Mei, M., Jackson, M.L., Meece, J., Sundaram, M., Belongia, E.A., Cross, R., Johnson, E., Bullotta, A., Rinaldo, C., Gaglani, M., Murthy, K., Clipper, L., Berman, L., Flannery, B., 2016. Factors associated with real-time RT-PCR cycle threshold values among medically attended influenza episodes. *J. Med. Virol.* 88, 719–723. <https://doi.org/10.1002/jmv.24373>
- Stegmann, E., Frasch, H.J., Kilian, R., Pozzi, R., 2015. Self-resistance mechanisms of actinomycetes producing lipid II-targeting antibiotics. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.12.015>
- Stessl, B., Luf, W., Wagner, M., Schoder, D., 2009. Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 106, 651–659. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04039.x>
- Stinson, L.F., Keelan, J.A., Payne, M.S., 2019. Identification and removal of contaminating microbial DNA from PCR reagents: impact on low-biomass microbiome analyses. *Lett. Appl. Microbiol.* 68, 2–8. <https://doi.org/10.1111/lam.13091>
- Su, J.Q., Wei, B., Ou-Yang, W.Y., Huang, F.Y., Zhao, Y., Xu, H.J., Zhu, Y.G., 2015. Antibiotic Resistome and Its Association with Bacterial Communities during Sewage Sludge Composting. *Environ. Sci. Technol.* 49, 7356–7363. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01012>
- Su, Z., Li, A., Chen, J., Huang, B., Mu, Q., Chen, L., Wen, D., 2020. Wastewater discharge drives ARGs spread in the coastal area: A case study in Hangzhou Bay, China. *Mar. Pollut. Bull.* 151, 110856. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110856>
- Sullam, K.E., Essinger, S.D., Lozupone, C.A., O'Connor, M.P., Rosen, G.L., Knight, R., Kilham, S.S., Russell, J.A., 2012a. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: A meta-analysis. *Mol. Ecol.* 21, 3363–3378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x>
- Sullam, K.E., Essinger, S.D., Lozupone, C.A., O'Connor, M.P., Rosen, G.L., Knight, R., Kilham, S.S., Russell, J.A., 2012b. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: A meta-analysis. *Mol. Ecol.* 21, 3363–3378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x>
- Tamminen, M., Karkman, A., Lõhmus, A., Muziasari, W.I., Takasu, H., Wada, S., Suzuki, S., Virta, M., 2011. Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure. *Environ. Sci. Technol.* 45, 386–391. <https://doi.org/10.1021/es102725n>
- Tanaka, Y., Takahashi, H., Simidu, U., Kimura, B.O.N., 2010. Design of a new universal real-time PCR system targeting the *tuf* gene for the enumeration of bacterial counts in food. *J. Food Prot.* 73, 670–679. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.4.670>
- Tarnecki, A.M., Patterson, W.F., Arias, C.R., 2016. Microbiota of wild-caught Red Snapper *Lutjanus campechanus*. *BMC Microbiol.* 16, 245. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0864-7>
- Teo, J.W.P., Tan, T.M.C., Poh, C.L., 2002. Genetic determinants of tetracycline resistance in *Vibrio harveyi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1038–1045. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.4.1038-1045.2002>

- The Review on Antimicrobial Resistance (Chaired by Jim O'Neill), 2016. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations.
- Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F., 2012. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb. Inform. Exp.* 2, 3. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>
- Ünüvar, S., 2018. Microbial Foodborne Diseases, in: *Foodborne Diseases*. Elsevier Inc., pp. 1–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00001-4>
- Villasante, A., Ramirez, C., Catalán, N., Romero, J., 2017. First report of swim bladder-associated microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Microbes Environ.* 32, 386–389. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17071>
- Vos, M., Quince, C., Pijl, A.S., de Hollander, M., Kowalchuk, G.A., 2012. A comparison of *rpoB* and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030600>
- Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., Zong, Z., 2020. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 508–516. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1732231>
- Wang, C., Silva, J.L., 1999. Prevalence and characteristics of *Aeromonas* species isolated from processed channel catfish. *J. Food Prot.* 62, 30–34. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.1.30>
- Wang, F.H., Qiao, M., Su, J.Q., Chen, Z., Zhou, X., Zhu, Y.G., 2014. High throughput profiling of antibiotic resistance genes in urban park soils with reclaimed water irrigation. *Environ. Sci. Technol.* 48, 9079–9085. <https://doi.org/10.1021/es502615e>
- Wang, L., Li, Y., Niu, L., Dai, Y., Wu, Y., Wang, Q., 2016. Isolation and growth kinetics of a novel phenol-degrading bacterium *Microbacterium oxydans* from the sediment of Taihu Lake (China). *Water Sci. Technol.* 73, 1882–1890. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.036>
- Waseem, H., Jameel, S., Ali, J., Ur Rehman, H.S., Tauseef, I., Farooq, U., Jamal, A., Ali, M.I., 2019. Contributions and challenges of high throughput qPCR for determining antimicrobial resistance in the environment: A critical review. *Molecules* 24, 163. <https://doi.org/10.3390/molecules24010163>
- Webb, H.E., Granier, S.A., Marault, M., Millemann, Y., den Bakker, H.C., Nightingale, K.K., Bugarel, M., Ison, S.A., Scott, H.M., Loneragan, G.H., 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect. Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00538-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00538-1)
- Weisblum, B., 1998. Macrolide resistance. *Drug Resist. Updat.* [https://doi.org/10.1016/S1368-7646\(98\)80212-4](https://doi.org/10.1016/S1368-7646(98)80212-4)
- Wieczorek, K., Osek, J., 2017. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and smoked fish in Poland. *Food Microbiol.* 64, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.022>
- Wong, S., Waldrop, T., Summerfelt, S., Davidson, J., Barrows, F., Kenney, B.B., Welch, T., Wiens, G.D., Snekvik, K., Rawls, J.F., Good, C., 2013. Aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess a large core intestinal microbiota that is resistant to variation in diet and rearing density. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4974–4984. <https://doi.org/10.1128/AEM.00924-13>
- Woolhouse, M., Ward, M., Van Bunnik, B., Farrar, J., 2015. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0083>
- Woolhouse, M.E.J., Ward, M.J., 2013. Sources of antimicrobial resistance. *Science* (80-.). 341, 1460–1461. <https://doi.org/10.1126/science.1243444>
- World Health Organisation, 2019. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 6th Revision 2018, <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-Eng.Pdf?Ua=1>.
- World Health Organisation, 2005. Containing antimicrobial resistance, World Health Organization Geneva. Geneva: World Health Organization. <https://doi.org/10.2471/BLT.10.084236>
- Wright, G.D., 2010. Q&A: Antibiotic resistance: Where does it come from and what can we do about it? *BMC Biol.* 8, 123. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123>
- Wright, G.D., 2007. The antibiotic resistome: The nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro1614>
- Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhai, R., Malhotra-Kumar, Surbhi, Butaye, P., Goossens, H., Malhotra-Kumar, S., 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance* 21, 6–11. [162](https://doi.org/10.2807/1560-</p>
</div>
<div data-bbox=)

- Xia, J.H., Lin, G., Fu, G.H., Wan, Z.Y., Lee, M., Wang, L., Liu, X.J., Yue, G.H., 2014. The intestinal microbiome of fish under starvation. *BMC Genomics* 15, 266. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-266>
- Xiong, W., Sun, Y., Zhang, T., Ding, X., Li, Y., Wang, M., Zeng, Z., 2015. Antibiotics, Antibiotic Resistance Genes, and Bacterial Community Composition in Fresh Water Aquaculture Environment in China. *Microb. Ecol.* 70, 425–432. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0583-x>
- Yang, J., Wang, C., Shu, C., Liu, L., Geng, J., Hu, S., Feng, J., 2013. Marine Sediment Bacteria Harbor Antibiotic Resistance Genes Highly Similar to Those Found in Human Pathogens. *Microb. Ecol.* 65, 975–981. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0187-2>
- Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., Zhang, R., Walsh, T.R., Shen, J., Wang, Y., 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.00543-17>
- Yoon, E.J., Courvalin, P., Grillot-Courvalin, C., 2013. RND-type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: Major role for AdeABC overexpression and adeS mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2989–2995. <https://doi.org/10.1128/AAC.02556-12>
- Yoon, J.H., Kang, S.J., Schumann, P., Oh, T.K., 2007. *Cellulosimicrobium terreum* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2493–2497. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64889-0>
- Yousfi, K., Touati, A., Lefebvre, B., Garneau, P., Brahmi, S., Gharout-Sait, A., Harel, J., Bekal, S., 2019. Characterization of multidrug-resistant Gram-negative bacilli isolated from hospitals effluents: first report of a *bla* *OXA-48* -like in *Klebsiella oxytoca*, Algeria. *Brazilian J. Microbiol.* 50, 175–183. <https://doi.org/10.1007/s42770-018-0010-9>
- Zhang, X., Ding, L., Yu, Y., Kong, W., Yin, Y., Huang, Z., Zhang, Xuezheng, Xu, Z., 2018. The Change of Teleost Skin Commensal Microbiota Is Associated With Skin Mucosal Transcriptomic Responses During Parasitic Infection by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Front. Immunol.* 9, 2972. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02972>
- Zhang, Z., Li, D., Refaey, M.M., Xu, W., Tang, R., Li, L., 2018. Host age affects the development of southern catfish gut bacterial community divergent from that in the food and rearing water. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00495>
- Zhu, Y.G., Johnson, T.A., Su, J.Q., Qiao, M., Guo, G.X., Stedtfeld, R.D., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M., 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 3435–3440. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222743110>

Valorisation des travaux réalisés

Articles scientifiques :

Helsens, N., Calvez, S., Bouju-Albert, A., Rossero, A., Prévost H., Magras, C. **2020**. Stomaching or rinsing, how to better recover bacterial communities from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets? *Journal of Food Protection*. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-037>

Helsens, N., Calvez, S., Prévost H., Bouju-Albert, Maillet, A., Rossero, A., Hurtaud-Pessel, D., Zagorec, M., Magras, C. Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Communities of Farmed Rainbow Trout Fillets (*Oncorhynchus mykiss*). *Frontiers in Microbiology*, **Révisé le 04/11/2020 (ID 590902)**

Communications orales :

Helsens N., Calvez S., Bouju-Albert A., Rossero A., Prévost H., Magras C. « The Antibiotic Resistome Of Farmed Rainbow-Trout Filets Using Smartchip Real-Time PCR. », International Association of Food Protection European 2018 Conference, Nantes, France, 2019

Helsens N., Calvez S., Bouju-Albert A., Rossero A., Prévost H., Magras C. « Antimicrobial Resistance In The Bacterial Communities Of The Rainbow Trout Filet? », 19th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Porto, Portugal, 2019.

Helsens N., Calvez S., Bouju-Albert A., Rossero A., Prévost H., Magras C. « Etude Du Resistome Du Filet De Truite Arc En Ciel – Etape 1 : Faisabilité Méthodologique ? », Journées de la Recherche Française Piscicole, Paris, France, 2019.

Helsens N., Calvez S., Bouju-Albert A., Bessiral M., Gautier S., Rossero A., Prévost H., Hurtaud-Pessel D., Magras C. « Antimicrobial Resistance in the Bacterial Communities of the Rainbow-Trout Filet », Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale EGAAL, Rennes, France, 2019

Communications affichées :

Helsens N., Calvez S., Bouju-Albert A., Rossero A., Prévost H., Magras C. « Foodresistome: Meeting the need to evaluate a bacterial DNA extraction protocol from a rainbow trout filet », International FoodMicro 2018 Conference, Berlin, Germany, 2018.

Helsens N., Calvez S., Bouju-Albert A., Bessiral M., Gautier S., Rossero A., Prévost H., Hurtaud-Pessel D., Magras C. « Antimicrobial Resistance in the Bacterial Communities of the Rainbow-Trout Filet », Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment, Tours, France, 2019

Pangga G., Helsens N., Bouju-Albert A., Rossero A., Prévost H., Eveillard M., Calvez S., Magras C. "Etude phénotypique (identification et antibiorésistance) de la flore *Listeria* dans la matrice filet frais de poisson". Journées de la Recherche Française Piscicole. Paris, France. 2019 July 2-3.

Annexes

Annexe I : Questionnaire soumis aux éleveurs lors de la campagne de prélèvements

Fiche de renseignement du site de prélèvement

Caractérisation des communautés bactériennes et des gènes de résistance aux antibiotiques dans le filet de truite Arc-en-Ciel.

Motivation pour l'étude

L'acquisition de résistances aux antibiotiques par les bactéries est un phénomène en augmentation, ayant des impacts sanitaires et économiques de plus en plus importants. Face à ce risque croissant, la question se pose de la place de la denrée alimentaire comme source de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques. La filière aquacole peut notamment être considérée comme une interface entre l'environnement et le consommateur, puisque les bassins d'élevage sont exposés aux éléments présents en amont, dans les eaux des rivières qui les alimentent. Il semble donc intéressant d'avoir une « image » du niveau d'antibiorésistance des bactéries présentes sur les filets de poissons issus d'un même lot à deux étapes du processus de production : à la fin du processus d'élevage et après l'étape de filetage. Le poisson sera ainsi considéré comme un témoin des environnements, de production et de transformation.

Objectif de l'étude

Le projet vise à :

- Caractériser les communautés bactériennes constituant le microbiote du filet de truite arc-en-ciel aux 2 étapes du processus ciblées (fin de production et transformation). Cette étape portera notamment sur *Listeria monocytogenes* de façon à évaluer leur présence potentielle après le filetage, dans les ateliers de transformation,

- Rechercher la présence ou non de gènes de résistance aux antibiotiques dans ce microbiote,
- Détecter des résistances exprimées aux antibiotiques (CMI) dans trois espèces bactériennes d'intérêt (risque alimentaire, pathogène animal et espèce altérante).
- Doser des résidus d'antibiotiques pour notamment observer si les temps d'attente fixés entre un traitement antibiotique et l'abattage des poissons sont adaptés pour passer sous les seuils de Limite Maximale de Résidus. Ces temps d'attentes sont généralement forfaitaires et peuvent ne pas tenir compte des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des molécules utilisées. Cette étape visera également à détecter des résidus d'antibiotiques issus d'autres pratiques (médecine humaine, autres élevages) qui pourraient impacter la production aquacole.

Méthodes utilisées

Nous avons prévu de prélever par élevage 14 poissons du même lot et de réaliser ces prélèvements dans deux élevages, et ce à la fin du processus d'élevage. Nous avons également prévu de prélever 14 filets levés en atelier provenant des mêmes lots. Les analyses seront réalisées à partir de ces prélèvements, ce qui nécessitera l'extraction de l'ADN bactérien à partir des filets, la recherche de gènes de résistance, le dosage chimique de résidus d'antibiotiques et la recherche d'espèces bactériennes d'intérêt. Les données seront anonymes et traitées de façon confidentielle.

Contact

N'hésitez pas à nous contacter pour toutes questions ou remarques avant ou après notre rencontre. D'avance merci beaucoup pour votre participation.

Ségolène Calvez (segolene.calvez@oniris-nantes.fr) et Nicolas Helsens (nicolas.helsens@oniris-nantes.fr)

Les données suivantes seront anonymes et codées

Structure

Nom	
Adresse	
Numéro de téléphone	
Site web	
Code d'analyse (renseigné par le laboratoire)	
Alimentation en eau (source, rivière, forage...), précisez le nom de la source d'alimentation en eau	
Présence d'autres piscicultures sur la rivière	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Si oui, lesquels <input type="checkbox"/> En amont : <input type="checkbox"/> En aval :

Production

Espèces présentes sur le site de prélèvement	
Catégories	<input type="checkbox"/> Géniteurs <input type="checkbox"/> Œufs <input type="checkbox"/> Alevins <input type="checkbox"/> Juvéniles <input type="checkbox"/> Adultes
Origine (nom et adresse) pour chaque catégorie	Œufs : Alevins / truitelles :
Nombre de bassins par catégorie sur le site de prélèvement	<input type="checkbox"/> Alevins : <input type="checkbox"/> Juvéniles : <input type="checkbox"/> Adultes :

Gestion sanitaire et Historique de la prévention

Vétérinaire traitant habituel	
Suivi d'un protocole HACCP	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Si oui, sur quels dangers ? :
Nettoyage des bassins	Fréquence : Méthode : Date du dernier nettoyage du bassin dans lequel les poissons sont prélevés :
Vaccination des lots	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Si oui, lesquels ? :

Historique des maladies

Bactérioses (Précisez le nombre d'épisodes cliniques)	<input type="checkbox"/> Yersiniose <input type="checkbox"/> Flavobactériose <input type="checkbox"/> Furunculose <input type="checkbox"/> Autres (préciser) :
Traitements antibiotiques (Préciser la date, l'antibiotique et la durée du traitement Si possible, fournir une copie de la/des prescription(s))	Yersiniose : Flavobactériose : Furunculose : Autre, précisez :
Autres maladies	Viroses, précisez : Parasitoses, précisez

Remarques

Evènements notables sur la période d'élevage des poissons prélevés (ex : sécheresse, crue, pollution etc...) :

**Annexe 2 : Liste des gènes de résistance aux antibiotiques recherchés,
séquence des amorces et fonction des gènes**

Primer Name	Sequence (5' → 3')
16S-01 R	GGGTTGCGCTCGTTGC
16S-01 F	ATGGYTGTCTGTCAGCTCGTG
16S-02 R	CCTACGGGAGGCAGCAG
16S-02 F	ATTACCGCGGCTGCTGGC
aac(6')-I F	GACCGGATTAAGGCCGATG
aac(6')-I R	CTTGCCTTGATATTCAGTTTTTATAACCA
aac(6')-Ib-01 F	GTTTGAGAGGCAAGGTACCGTAA
aac(6')-Ib-01 R	GAATGCCTGGCGTGTTTGA
aac(6')-Ib-02 F	CGTCGCCGAGCAACTTG
aac(6')-Ib-02 R	CGGTACCTTGCTCTCAAACC
aac(6')-Ib-03 F	AGAAGCACGCCGACACTT
aac(6')-Ib-03 R	GCTCTCCATTCAGCATTGCA
aac(6')-II F	CGACCCGACTCCGAACAA
aac(6')-II R	GCACGAATCCTGCCTTCTCA
aacA F	AGAGCCTTGGAAGATGAAGTTT
aacA R	TTGATCCATACCATAGACTATCTCATCA
aacC F	CGTCACTTATTCGATGCCCTTAC
aacC R	GTCGGGCGCGGCATA
aacC2 F	ACGGCATTCTCGATTGCTTT
aacC2 R	CCGAGCTTCACGTAAGCATT
aadA-01 F	GTTGTGCACGACGACATCATT
aadA-01 R	GGCTCGAAGATACCTGCAAGAA
aadA-02 F	CGAGATTCTCCGCGCTGTA
aadA-02 R	GCTGCCATTCTCCAAATTGC
aadA1 F	AGCTAAGCGCGAACTGCAAT
aadA1 R	TGGCTCGAAGATACCTGCAA
aadA2-01 F	ACGGCTCCGACAGTGGAT
aadA2-01 R	GGCCACAGTAACCAACAAATCA
aadA2-02 F	CTTGTCGTGCATGACGACATC
aadA2-02 R	TCGAAGATACCCGCAAGAATG

aadA2-03 F	CAATGACATTCTTGCGGGTATC
aadA2-03 R	GACCTACCAAGGCAACGCTATG
aadA5-01 F	ATCACGATCTTGCGATTTTGCT
aadA5-01 R	CTGCGGATGGGCCTAGAAG
aadA5-02 F	GTTCTTGCTCTTGCTCGCATT
aadA5-02 R	GATGCTCGGCAGGCAAAC
aadA9-01 F	CGCGGCAAGCCTATCTTG
aadA9-01 R	CAAATCAGCGACCGCAGACT
aadA9-02 F	GGATGCACGCTTGATGAA
aadA9-02 R	CCTCTAGCGGCCGGAGTATT
aadD F	CCGACAACATTTCTACCATCCTT
aadD R	ACCGAAGCGCTCGTCGTATA
aadE F	TACCTTATTGCCCTTGGAAGAGTTA
aadE R	GGAACTATGTCCCTTTTAATTCTACAATCT
acrA-01 F	CAACGATCGGACGGGTTC
acrA-01 R	TGGCGATGCCACCGTACT
acrA-02 F	GGTCTATCACCTACGCGCTATC
acrA-02 R	GCGCGCACGAACATAACC
acrA-04 F	TACTTTGCGCGCCATCTTC
acrA-04 R	CGTGCGGAACGAACAT
acrA-05 F	CGTGCGGAACGAACA
acrA-05 R	ACTTTGCGCGCCATCTTC
acrB-01 F	AGTCGGTGTTCGCCGTTAAC
acrB-01 R	CAAGGAAACGAACGCAATACC
acrB-02 F	TGGTAGTGGGCGTCATTAACAC
acrB-02 R	GGCAACGTAATCCGAAATATCC
acrF F	GCGGCCAGGCACAAAA
acrF R	TACGCTCTTCCCACGGTTTC
acrR-01 F	GCGCTGGAGACACGACAAC
acrR-01 R	GCCTTGCTGCGAGAACAAA
acrR-02 F	GATGATACCCCCTGCTGTGAGA
acrR-02 R	ACCAAACAAGAAGCGCAAGAA
adeA F	CAGTTCGAGCGCCTATTTCTG
adeA R	CGCCCTGACCGACCAAT
ampC-02 F	GCAGCACGCCCCGTAA
ampC-02 R	TGTACCCATGATGCGCGTACT

ampC-03 F	AACAAAAGATCCCCGGTATGG
ampC-03 R	ACGCCCGTAAATGTTTTGCT
aph F	TTTCAGCAAGTGGATCATGTTAAAAT
aph R	CCAAGCTGTTTCCACTGTTTTTC
aphA1 F	TGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCA
aphA1 R	CCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAA
aphA3-01 F	AAAAGCCC GAAGAGGAACTTG
aphA3-01 R	CATCTTTCACAAAGATGTTGCTGTCT
aphA3-02 F	CGGAATTGAAAAAACTGATCGAA
aphA3-02 R	ATACCGGCTGTCCGTCATTT
bacA-02 F	TCCACGACACGATTAAGTCATTG
bacA-02 R	CGGCTCTTTCGGCTTCAG
bla1 F	GCAAGTTGAAGCGAAAGAAAAGA
bla1 R	TACCAGTATCAATCGCATATACACCTAA
blaACC F	CACACAGCTGATGGCTTATCTAAAA
blaACC R	AATAAACGCGATGGGTTCCA
blaCMY F	CCGCGGCGAAATTAAGC
blaCMY R	GCCACTGTTTGCCTGTCAGTT
blaCMY2-01 F	AAAGCCTCAT GGGTGCATAAA
blaCMY2-01 R	ATAGCTTTTGTTGCCAGCATCA
blaCMY2-02 F	GCGAGCAGCCTGAAGCA
blaCMY2-02 R	CGGATGGGCTTGTCTCTT
blaCTX-M-01 F	GGAGGCGTGACGGCTTTT
blaCTX-M-01 R	TTCAGTGCGATCCAGACGAA
blaCTX-M-02 F	GCCGCGGTGCTGAAGA
blaCTX-M-02 R	ATCGGATTATAGTTAACCAGGTCAGATTT
blaCTX-M-05 F	GCGATAACGTGGCGATGAAT
blaCTX-M-05 R	GTCGAGACGGAACGTTTCGT
blaDHA F	TGGCCGCAGCAGAAAGA
blaDHA R	CCGTTTATGCACCCAGGAA
blaGES F	GCAATGTGCTCAACGTTCAAG
blaGES R	GTGCCCTGAGTCAATTCCTTCAAAG
blaIMP-01 F	AACACGGTTTGGTGGTTCTTGTA
blaIMP-01 R	GCGCTCCACAAACCAATTG
blaIMP-02 F	AAGGCAGCATTCCTCTCATTTT
blaIMP-02 R	GGATAGATCGAGAATTAAGCCACTCT

blaIMP-03 F	GGAATAGAGTGGCTTAATTC
blaIMP-03 R	GGTTTAACAAAACAACCACC
blaKPC-02 F	CAGCTCATTCAAGGGCTTTC
blaKPC-02 R	GGCGGCGTTATCACTGTATT
blaKPC-03 F	GCCGCCGTGCAATACAGT
blaKPC-03 R	GCCGCCCAACTCCTTCA
blaL1 F	CACCGGGTTACCAGCTGAAG
blaL1 R	GCGAAGCTGCGCTTGTAGTC
blaMOX/blaCMY F	CTATGTCAATGTGCCGAAGCA
blaMOX/blaCMY R	GGCTTGTCTCTTTTCGAATAGC
blaOCH F	GCGGACTTGCGCCGTAT
blaOCH R	TTTTCTGCTCGGCCATGAG
blaOKP F	GCCGCCATCACCATGAG
blaOKP R	GGTGACGTTGTCACCGATCTG
blaOXA1/blaOXA30 F	CGGATGGTTTGAAGGGTTTATTAT
blaOXA1/blaOXA30 R	TCTTGGCTTTTATGCTTGATGTAA
blaOXA10-01 F	CGCAATTATCGGCCTAGAAACT
blaOXA10-01 R	TTGGCTTTCGGTCCCATTT
blaOXA58 F	GCAATTGCCTTTTAAACCTGA
blaOXA58 R	CTGCCTTTTCAACAAAACCC
blaOXY F	CGTTCAGGCGGCAGGTT
blaOXY R	GCCGCGATATAAGATTTGAGAATT
blaPSE F	TTGTGACCTATCCCCTGTAATAGAA
blaPSE R	TGCGAAGCACGCATCATC
blaROB F	GCAAAGGCATGACGATTGC
blaROB R	CGCGCTGTTGTCGCTAAA
blaSHV-01 F	TCCCATGATGAGCACCTTTAAA
blaSHV-01 R	TTCGTCACCGGCATCCA
blaSHV-02 F	CTTTCCCATGATGAGCACCTTT
blaSHV-02 R	TCCTGCTGGCGATAGTGGAT
blaSHV-03 F	GCGTTATTTTCGCCTGTGTA
blaSHV-03 R	AGGTGCTCATCATGGGAAAG
blaSME F	AACGGCTTCATTTTTGTTTAG
blaSME R	GCTTCCGCAATAGTTTTATCA
blaTLA F	ACACTTTGCCATTGCTGTTTATGT
blaTLA R	TGCAAATTTTCGGCAATAATCTTT

blaVEB F	CCCGATGCAAAGCGTTATG
blaVEB R	GAAAGATTCCCTTTATCTATCTCAGACAA
blaVIM F	GCACTTCTCGCGGAGATTG
blaVIM R	CGACGGTGATGCGTACGTT
blaZ F	GGAGATAAAGTAACAAATCCAGTTAGATATGA
blaZ R	TGCTTAATTTCCATTTGCGATAAG
catA1 F	GGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATT
catA1 R	CACCTTGTCGCTTGCGTATA
catB3 F	GCACTCGATGCCTTCCAAAA
catB3 R	AGAGCCGATCCAAACGTCAT
cepA F	AGTTGCGCAGAACAGTCCTCTT
cepA R	TCGTATCTTGCCCGTCGATAAT
cfiA F	GCAGCGTTGCTGGACACA
cfiA R	GTTCCGGATAAACGTGGTGA
cfr F	GCAAAATTCAGAGCAAGTTACGAA
cfr R	AAAATGACTCCCAACCTGCTTTAT
cfxA F	TCATTCTCGTTCAAGTTTTCAGA
cfxA R	TGCAGCACCAAGAGGAGATGT
cmeA F	GCAGCAAAGAAGAAGCACCAA
cmeA R	AGCAGGGTAAGTAAACTAAGTGGTAAATCT
cmlA1-01 F	TAGGAAGCATCGGAACGTTGAT
cmlA1-01 R	CAGACCGAGCACGACTGTTG
cmlA1-02 F	AGGAAGCATCGGAACGTTGA
cmlA1-02 R	ACAGACCGAGCACGACTGTTG
cmlA5 F	GCGCTCTTCGAGGATTCG
cmlA5 R	CCGCCAAGCAGAAGTAGAC
cmx(A) F	GCGATCGCCATCCTCTGT
cmx(A) R	TCGACACGGAGCCTTGGT
dfrA1-01 F	GGAATGGCCCTGATATTCCA
dfrA1-01 R	AGTCTTGCGTCCAACCAACAG
dfrA1-02 F	TTCAGGTGGTGGGGAGATATAC
dfrA1-02 R	TTAGAGGCGAAGTCTTGGGTAA
dfrA12 F	CCTCTACCGAACCGTCACACA
dfrA12 R	GCGACAGCGTTGAAACAACACTAC
disul F	TCATCTGCCAAACTCGTCGTTA
disul R	GTCAAAGAACGCCGCAATGT

emrD F	CTCAGCAGTATGGTGGTAAGCATT
emrD R	ACCAGGCGCCGAAGAAC
ereA F	CCTGTGGTACGGAGAATTCATGT
ereA R	ACCGCATTCGCTTTGCTT
ereB F	GCTTTATTTACAGGAGGCGGAAT
ereB R	TTTTAAATGCCACAGCACAGAATC
ermA-01 F	TTGAGAAGGGATTTGCGAAAAG
ermA-01 R	ATATCCATCTCCACCATTAATAGTAAACC
ermA-02 F	ACATTTTACCAAGGAACTTGTGGAA
ermA-02 R	GTGGCATGACATAAACCTTCATCA
ermB F	TAAAGGGCATTTAACGACGAAACT
ermB R	TTTATACCTCTGTTTGTAGGGAATTGAA
ermC F	TTTGAAATCGGCTCAGGAAAA
ermC R	ATGGTCTATTTCAATGGCAGTTACG
ermF F	CAGCTTTGGTTGAACATTTACGAA
ermF R	AAATTCCTAAAATCACAACCGACAA
ermJ/ermD F	GGACTCGGCAATGGTCAGAA
ermJ/ermD R	CCCCGAAACGCAATATAATGTT
ermK-01 F	GTTTGATATTGGCATTGTCAGAGAAA
ermK-01 R	ACCATTGCCGAGTCCACTTT
ermK-02 F	GAGCCGCAAGCCCCTTT
ermK-02 R	GTGTTTCATTTGACGCGGAGTAA
ermT-01 F	GTTCACTAGCACTATTTTTAATGACAGAAGT
ermT-01 R	GAAGGGTGTCTTTTTAATACAATTAACGA
ermT-02 F	GTAAAATCCCTAGAGAATACTTTCATCCA
ermT-02 R	TGAGTGATATTTTTGAAGGGTGTCTT
ermX F	GCTCAGTGGTCCCCATGGT
ermX R	ATCCCCCGTCAACGTTT
fabK F	TTTCAGCTCAGCACTTTGGTCAT
fabK R	AAGGCATCTTTTTCAGCCAGTTC
floR-01 F	ATTGTCTTCACGGTGTCCGTTA
floR-01 R	CCGCGATGTCGTGCAACT
fosX F	GATTAAGCCATATCACTTTAATTGTGAAAG
fosX R	TCTCCTTCCATAATGCAAATCCA
gapA F	CCGTTGAAGTGAAAGACGGTC
gapA R	AACCACTTTCTTCGCACCAGC

imiR F	CCGGACTAGAGCTTCATGTAAGC
imiR R	CCCACGCGGTACTCTTGTAAG
lmrA-01 F	TTCAGATGCAATGGCGTTTG
lmrA-01 R	ATAATCGGGAACATAATGAGCATAACTAC
lnuA-01 F	TGACGCTCAACACACTCAAAAA
lnuA-01 R	TTCATGCTTAAGTTCCATACGTGAA
lnuA-02 F	AGAATGAAAAAGAAGCTGAGCTTCTT
lnuA-02 R	AAGGTGGCAATTACGTTTTTCAAA
lnuB-01 F	TGAACATAATCCCCTCGTTTAAAGAT
lnuB-01 R	TAATTGCCCTGTTTCATCGTAAATAA
lnuB-02 F	AAAGGAGAAGGTGACCAATACTCTGA
lnuB-02 R	GGAGCTACGTCAAACAACCAGTT
lnuC F	TGGTCAATATAACAGATGTAAACCAGATTT
lnuC R	CACCCCAGCCACCATCAA
marR-01 F	GCGGCGTACTGGTGAAGCTA
marR-01 R	TGCCCTGGTCGTTGATGA
marR-02 F	TCTGGCGTTAGCTTCACCAGTAC
marR-02 R	GTGCAAAGGCTGGATCGAA
marR-03 F	GCTGTTGATGACATTGCTCACA
marR-03 R	CGGCGTACTGGTGAAGCTAAC
mcr-1 F	CGGTCAGTCCGTTTGTTT
mcr-1 R	CTTGGTCGGTCTGTAGGG
mcr-2 F	TGTTGCTTGTGCCGATTGGA
mcr-2 R	AGATGGTATTGTTGGTTGCTG
mcr-3 F	TTGGCACTGTATTTTGCATTT
mcr-3 R	TTAACGAAATTGGCTGGAACA
mcr-4 F	ATTGGGATAGTCGCCTTTTT
mcr-4 R	TTACAGCCAGAATCATTATCA
mcr-5 F	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC
mcr-5 R	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG
mdet11 F	ATACAGCAGTGGATATTGGTTTAATTGT
mdet11 R	TGCATAAGGTGAATGTTCCATGA
mdtE/yhiU F	CGTCGGCGCACTCGTT
mdtE/yhiU R	TCCAGACGTTGTACGGTAACCA
mdtF F	CCACCATCGGGCTTTCC
mdtF R	CCCTTCTTTCTGCATCATCTCA

mecA F	GGTTACGGACAAGGTGAAATACTGAT
mecA R	TGTCTTTTAATAAGTGAGGTGCGTTAATA
mefA F	CCGTAGCATTGGAACAGCTTTT
mefA R	AAACGGAGTATAAGAGTGCTGCAA
mexB F	CTGGAGATCGACGACGAGAAG
mexB R	GAAATCGTTGACGTAGCTGGAA
mexE F	GGTCAGCACCGACAAGGTCTAC
mexE R	AGCTCGACGTACTTGAGGAACAC
mexF F	CCGCGAGAAGGCCAAGA
mexF R	TTGAGTTCGGCGGTGATGA
mphA-01 F	CTGACGCGCTCCGTGTT
mphA-01 R	GGTGGTGCATGGCGATCT
mphA-02 F	TGATGACCCTGCCATCGA
mphA-02 R	TTCGCGAGCCCCCTTTC
mphB F	CGCAGCGCTTGATCTTGTAG
mphB R	TTACTGCATCCATACGCTGCTT
mphC F	CGTTTGAAGTACCGAATTGGAAA
mphC R	GCTGCGGGTTTGCCTGTA
msrA F	CTGCTAACACAAGTACGATTCCAAAT
msrA R	TCAAGTAAAGTTGTCTTACCTACACCATT
msrC-01 F	TCAGACCGGATCGGTTGTC
msrC-01 R	CCTATTTTTTGGAGTCTTCTCTCTAATGTT
msrC-02 F	GAATCACTTGTCGCGAGTTTGTT
msrC-02 R	CGTACACAACGGTTTCGTCAGA
mtrC-01 F	GGACGGGAAGATGGTCAA
mtrC-01 R	CGTAGCGTTCCGGTTCGAT
mtrD-01 F	TGCGCGTAGTCGTTTCATCTC
mtrD-01 R	CGTTCCAATTCCTGATGATTG
mtrD-02 F	GGTCGGCACGCTCTTGTC
mtrD-02 R	TGAAGAATTTGCGCACCCTAC
mtrD-03 F	CCGCCAAGCCGATATAGACA
mtrD-03 R	GGCCGGGTTGCCAAA
ndm F	GGCCACACCAGTGACAATATCA
ndm R	CAGGCAGCCACCAAAAGC
nimE F	TGCGCCAAGATAGGGCATA
nimE R	GTCGTGAATTCGGCAGGTTTA

nisB-01 F	GGGAGAGTTGCCGATGTTGTA
nisB-01 R	AGCCACTCGTTAAAGGGCAAT
nisB-02 F	CGGTTGAACGGCGTGAA
nisB-02 R	TTTCCACCCAGGTTTGCTACTATT
oleC F	CCCGGAGTCGATGTTCGA
oleC R	GCCGAAGACGTACACGAACAG
oprD F	ATGAAGTGGAGCGCCATTG
oprD R	GGCCACGGCGAACTGA
oprJ F	ACGAGAGTGGCGTCGACAA
oprJ R	AAGGCGATCTCGTTGAGGAA
penA F	AGACGGTAACGTATAACTTTTTGAAAGA
penA R	GCGTGTAGCCGGCAATG
pikR1 F	TCGACATGCGTGACGAGATT
pikR1 R	CCGCGAATTAGGCCAGAA
pikR2 F	TCGTGGGCCAGGTGAAGA
pikR2 R	TTCCCCTTGCCGGTGAA
pmrA F	TTTGCAGGTTTTGTTCTAATGC
pmrA R	GCAGAGCCTGATTTCTCCTTTG
pncA F	GCAATCGAGGCGGTGTTT
pncA R	TTGCCGAGCCAATTCA
qac-02 F	GGAGATTTAGCTCATGTAGCTGAAGAA
qac-02 R	AAGCTGTTTTATCCCCGTAGCTTTA
qacA F	TGGCAATAGGAGCTATGGTGTTT
qacA R	AAGGTAACACTATTTTCGGTCCAAATC
qacEΔ1-01 F	TCGCAACATCCGCATTAATA
qacEΔ1-01 R	ATGGATTTCAGAACCAGAGAAAGAAA
qacEΔ1-02 F	CCCCTTCGCGGTTGT
qacEΔ1-02 R	CGACCAGACTGCATAAGCAACA
qacH-01 F	GTGGCAGCTATCGCTTGGAT
qacH-01 R	CCAACGAACGCCACAA
qacH-03 F	GTCGGTGTTGCTTATGCAGTCT
qacH-03 R	CAACCAGGCAATGGCTGTAA
qnrA F	AGGATTTCTCACGCCAGGATT
qnrA R	CCGCTTCAATGAACTGCAA
qnrB F	GCGACGTTTCAGTGGTTCAGA
qnrB R	GCTGCTCGCCAGTCGAA

rarD-01 F	GCGGGTGTGGTCACTACGAT
rarD-01 R	AGCGTTGGGCCGATATACTG
rarD-02 F	TGACGCATCGCGTGATCT
rarD-02 R	AAATTTTCTGTGGCGTCTGAATC
rpoB F	CGAACATCGGTCTGATCAACTC
rpoB R	GTTGCATGTTTCGCACCCAT
sat4 F	GAATGGGCAAAGCATAAAAACTTG
sat4 R	CCGATTTTGAAACCACAATTATGATA
spcN-01 F	AAAAGTTCGATGAAACACGCCTAT
spcN-01 R	TCCAGTGGTAGTCCCCGAATC
speA F	GCAAGAGGTATTTGCTCAACAAGA
speA R	CAGGGTCACCCTCATAAAGAAAA
str F	AATGAGTTTTGGAGTGTCTCAACGTA
str R	AATCAAAACCCCTATTAAAGCCAAT
strB F	GCTCGGTTCGTGAGAACAATCT
strB R	CAATTTTCGGTCGCCTGGTAGT
sul1-01 F	CAGCGCTATGCGCTCAAG
sul1-01 R	ATCCCGCTGCGCTGAGT
sul1-02 F	TCCGATGGAGGCCGGTATCTGG
sul1-02 R	CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG
sul1-03 F	GCCGATGAGATCAGACGTATTG
sul1-03 R	CGCATAGCGCTGGGTTTC
tet(32) F	CCATTACTTCGGACAACGGTAGA
tet(32) R	CAATCTCTGTGAGGGCATTTAACA
tet(35) F	ACCCCATGACGTACCTGTAGAGA
tet(35) R	CAACCCACACTGGCTACCAGTT
tet(37) F	GAGAACGTTGAAAAGGTGGTGAA
tet(37) R	AACCAAGCCTGGATCAGTCTCA
tet(38) F	TTAATGTGGCGGTATCTGTAGGTATT
tet(38) R	TTGCTGGGAAATTTAATGCTTT
tetA-01 F	GCTGTTTGTCTGCCGAAA
tetA-01 R	GGTTAAGTTCCTTGAACGCAAACCT
tetA-02 F	CTCACCAGCCTGACCTCGAT
tetA-02 R	CACGTTGTTATAGAAGCCGCATAG
tetB-01 F	AGTGCGCTTTGGATGCTGTA
tetB-01 R	AGCCCCAGTAGCTCCTGTGA

tetB-02 F	GCCCAGTGCTGTTGTTGTCAT
tetB-02 R	TGAAAGCAAACGGCCTAAATACA
tetC-01 F	CATATCGCAATACATGCGAAAAA
tetC-01 R	AAAGCCGCGGTAAATAGCAA
tetC-02 F	ACTGGTAAGGTAAACGCCATTGTC
tetC-02 R	ATGCATAAACCAGCCATTGAGTAAG
tetC-03 F	TGCGTTGATGCAATTTCTATGC
tetC-03 R	GGAATGGTGCATGCAAGGAG
tetD-01 F	TGCCGCGTTTTGATTACACA
tetD-01 R	CACCAGTGATCCCGGAGATAA
tetD-02 F	TGTCATCGCGCTGGTGATT
tetD-02 R	CATCCGCTTCCGGGAGAT
tetD-03 F	CTGGACGCGATGGGAATT
tetD-03 R	TCCGCTTCCGGGAGATATT
tetE F	TTGGCGCTGTATGCAATGAT
tetE R	CGACGACCTATGCGATCTGA
tetG-01 F	TCAACCATTGCCGATTCGA
tetG-01 R	TGGCCCGGCAATCATG
tetG-02 F	CATCAGCGCCGGTCTTATG
tetG-02 R	CCCCATGTAGCCGAACCA
tetH F	TTTGGGTCATCTTACCAGCATTAA
tetH R	TTGCGCATTATCATCGACAGA
tetJ F	GGGTGCCGCATTAGATTACCT
tetJ R	TCGTCCAATGTAGAGCATCCATA
tetK F	CAGCAGTCATTGGAAAATTATCTGATTATA
tetK R	CCTTGTAACCTACCAAAAATCAAATA
tetL-02 F	ATGGTTGTAGTTGCGCGCTATAT
tetL-02 R	ATCGCTGGACCGACTCCTT
tetM-01 F	CATCATAGACACGCCAGGACATAT
tetM-01 R	CGCCATCTTTTGCAGAAATCA
tetM-02 F	TAATATTGGAGTTTTAGCTCATGTTGATG
tetM-02 R	CCTCTCTGACGTTCTAAAAGCGTATTAT
tetM-03 F	GCAATTCTACTGATTTCTGC
tetM-03 R	CTGTTTGATTACAATTTCCGC
tetO-01 F	ATGTGGATACTACAACGCATGAGATT
tetO-01 R	TGCCTCCACATGATATTTTTCCT

tetO-02 F	CAACATTAACGGAAAGTTTATTGTATACCA
tetO-02 R	TTGACGCTCCAAATTCATTGTATC
tetQ F	CGCCTCAGAAGTAAGTTCATACACTAAG
tetQ R	TCGTTTCATGCGGATATTATCAGAAT
tetR-03 F	CGCGATGGAGCAAAAAGTACAT
tetR-03 R	AGTGAAAAACCTTGTTGGCATAAAA
tetS F	TTAAGGACAAACTTTCTGACGACATC
tetS R	TGTCTCCCATTGTTCTGGTTCA
tetT F	CCATATAGAGGTTCCACCAAATCC
tetT R	TGACCCTATTGGTAGTGGTTCTATTG
tetU-01 F	GTGGCAAAGCAACGGATTG
tetU-01 R	TGCGGGCTTGCAAAACTATC
tetU-02 F	AACAGCGGGTTAAGTGTGCAA
tetU-02 R	ATGGTATCATTTCAGTTTTCCGACAAT
tetV F	GCGGGAACGACGATGTATATC
tetV R	CCGCTATCTCACGACCATGAT
tetW F	ATGAACATTCCCACCGTTATCTTT
tetW R	ATATCGGCGGAGAGCTTATCC
tetX F	AAATTTGTTACCGACACGGAAGTT
tetX R	CATAGCTGAAAAAATCCAGGACAGTT
tolC-01 F	GGCCGAGAACCTGATGCA
tolC-01 R	AGACTTACGCAATTCCGGGTTA
tolC-02 F	CAGGCAGAGAACCTGATGCA
tolC-02 R	CGCAATTCCGGGTTGCT
tolC-03 F	GCCAGGCAGAGAACCTGATG
tolC-03 R	CGCAATTCCGGGTTGCT
trfA F	ACGAAGAAATGGTTGTCCTGTTC
trfA R	CGTCAGCTTGCGGTACTTCTC
ttgA F	ACGCCAATGCCAAACGATT
ttgA R	GTCACGGCGCAGCTTGA
uidA F	AACCACGCGTCTGTTGACTG
uidA R	CCCGGTTGCCAGAGGTG
vanA F	AAAAGGCTCTGAAAACGCAGTTAT
vanA R	CGGCCGTTATCTTGTA AAAACAT
vanB-01 F	TTGTGCGCGAAGTGGATCA
vanB-01 R	AGCCTTTTTCCGGCTCGTT

vanB-02 F	CCGGTCGAGGAACGAAATC
vanB-02 R	TCCTCCTGCAAAAAAAGATCAAC
vanC-02 F	CCTGCCACAATCGATCGTT
vanC-02 R	CGGCTTCATTCGGCTTGATA
vanC1 F	AGGCGATAGCGGGTATTGAA
vanC1 R	CAATCGTCAATTGCTCATTTC
vanC2/vanC3 F	TTGACTGTCCGGTGCTTGTGA
vanC2/vanC3 R	TCAATCGTTTCAGGCAATGG
vanD F	CAGAGGAACATAATGTTTCGATAAAATCT
vanD R	GCCGGATTTTGTGATTCCAA
vanG F	ATTTGAATTGGCAGGTATACAGGTTA
vanG R	TGATTTGTCTTTGTCCATACATAATGC
vanHB F	GAGGTTTCCGAGGCGACAA
vanHB R	CTCTCGGCGGCAGTCGTAT
vanHD F	GTGGCCGATTATACCGTCATG
vanHD R	CGCAGGTCATTCAGGCAAT
vanRA-01 F	CCCTTACTCCCACCGAGTTTT
vanRA-01 R	TTCGTGCGCCCATATCTCAT
vanRB F	GCCCTGTCCGATGACGAA
vanRB R	TTACATAGTCGTCTGCCTCTGCAT
vanRC F	TGCGGGAAAACTGAACGA
vanRC R	CCCCCATAACGGTTTTGATTA
vanRC4 F	AGTGCTTTGGCTTATCTCGAAAA
vanRC4 R	TCCGGCAGCATCACATCTAA
vanRD F	TTATAATGGCAAGGATGACTAAAGT
vanRD R	CGTCTACATCCGGAAGCATGA
vanSA F	CGCGTCATGCTTTCAAATTC
vanSA R	TCCGCAGAAAGCTCAATTTGTT
vanSC-01 F	ATCAACTGCGGGAGAAAAGTCT
vanSC-01 R	TCCGCTGTTCCGCTTCTT
vanSE F	TGGCCGAAGAAGCAGGAA
vanSE R	CAATAATACTCGTCAAAGGAGTTCTCA
vanTC-01 F	CACACGCATTTTTTCCCATCTAG
vanTC-01 R	CAGCCAACAGATCATCAAAACAA
vanTG F	CGTGTAGCCGTTCCGTTCTT
vanTG R	CGGCATTACAGGTATATCTGGAAA

vanWB F	CGGACAAAGATACCCCCTATAAAG
vanWB R	AAATAGTAAATTGCTCATCTGGCACAT
vanWG F	ACATTTTCATTTTGGCAGCTTGTAC
vanWG R	CCGCCATAAGAGCCTACAATCT
vanXA F	CGCTAAATATGCCACTTGGGATA
vanXA R	TCAAAAGCGATTCAGCCAACCT
vanXB F	AGGCACAAAATCGAAGATGCTT
vanXB R	GGGTATGGCTCATCAATCAACTT
vanYB F	GGCTAAAGCGGAAGCAGAAA
vanYB R	GATATCCACAGCAAGACCAAGCT
vanYD-01 F	AAGGCGATACCCTGACTGTCA
vanYD-01 R	ATTGCCGGACGGAAGCA
vatB-01 F	GGAAAAAGCAACTCCATCTCTTGA
vatB-01 R	TCCTGGCATAACAGTAACATTCTGA
vatC-01 F	CGGAAATTGGGAACGATGTT
vatC-01 R	GCAATAATAGCCCCGTTTCCTA
vatD F	TGCAATAGTAGCTGCTAATTCTGTTGTT
vatD R	TGTTTTATTTTCGTTAGCAGGATTTCC
vatE F	GACCGTCCTACCAGGCGTAA
vatE R	TTGGATTGCCACCGACAATT
vgaA-02 F	GACGGGTATTGTGGAAAGCAA
vgaA-02 R	TTTCCTGTACCATTAGATCCGATAATT
vgaB-01 F	TAAAAGAGAATAAGGCGCAAGGA
vgaB-01 R	TGTTTAGTAGCATGTTGCATTTTCC
vgb-02 F	CCACGATGGCTGCCTTTG
vgb-02 R	GGCCATGCAGGACGGATAT
vgbB-01 F	CAGCCGATTCTGGTCCTT
vgbB-01 R	TACGATCTCCATTCAATTGGGTAAA
yceE/mdtG-01 F	TGGCACAAAATATCTGGCAGTT
yceE/mdtG-01 R	TTGTGTGGCGATAAGAGCATTAG
yceL/mdtH-01 F	TCGGGATGGTGGGCAAT
yceL/mdtH-01 R	CGATAACCGAGCCGATGTAGA
yyaR F	CCGTTGCAAGAAGATTATAGAAAAAA
yyaR R	CAAGCATAAGACCGCATAAATGAT

Titre : Caractérisation des communautés bactériennes et des profils de résistance aux antibiotiques dans le filet de truite arc-en-ciel

Mots clés : Résistance aux antibiotiques, communautés bactériennes, résidus d'antibiotiques, filet de poisson, profils de résistance

Résumé : Les aliments d'origine animale joueraient un rôle dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques. Le filet frais de poissons d'élevage, dont la consommation est en forte progression, est soumis à des contaminations par les environnements d'élevage et de transformation pouvant influencer son profil de résistance. Cette première caractérisation du profil de résistance du microbiote du filet de truite arc-en-ciel prend en compte différentes situations pouvant faire varier l'exposition des filets. Le microbiote bactérien et son profil de résistance aux antibiotiques d'un panel de 56 échantillons collectés sur sites ont été décrits après que les méthodes d'extraction adaptées à cette matrice complexe et à un niveau de contamination faible aient été calibrées. Si le microbiote constitutif de la truite arc-en-ciel est similaire entre les échantillons, le processus

de filetage apparaît comme un facteur de diversité des communautés. Des gènes de résistance ont été détectés en faible nombre dans les filets frais avec une prévalence de 20% ou plus dans la population de poissons du bassin. Leur nature semble être influencée par les traitements antibiotiques antérieurs dont les résidus ont été détectés. Des souches de *Pseudomonas* ont été isolées, dont certaines présentaient des multirésistances. Le vieillissement des filets voit augmenter le nombre de gènes détectés et l'abondance de bactéries du genre *Pseudomonas*. Cela pose la question du risque présenté par ces gènes présents mais non détectés dans les filets frais, et de la transmission de déterminants de la résistance aux antibiotiques à d'autres environnements comme le microbiote intestinal du consommateur.

Title: Characterization of the bacterial communities and antimicrobial resistance profiles in the rainbow trout fillet

Keywords: Antimicrobial resistance, bacterial communities, antibiotic residues, fish fillet, resistance profiles

Abstract: Food of animal origin could play a role in the spreading of antimicrobial resistance. The consumption of fresh farmed fish fillets is increasing, and they can be contaminated by the farming and processing environments, which can modify their antimicrobial resistance profiles. This study is a first characterization of the antimicrobial resistance profiles of the rainbow trout fillet bacterial microbiota. Various situations were considered to study the evolution of the fillets exposure. The bacterial microbiota and antimicrobial resistance profile of 56 farm-collected samples were described after a calibration of recovery and analyses methods adapted to this complex matrix with low contamination levels. The bacterial microbiota is similar between samples

but the processing step seems to be a diversity factor for the bacterial communities. A low number of antimicrobial resistance genes have been detected with a prevalence of 20% or more in the fish raceway population. They seem to be influenced by the previous antibiotic treatments whose residues were detected. *Pseudomonas* strains also have been isolated and some harboured multidrug resistance. Spoilage of the fillets increases the amount of detected antimicrobial resistance genes and the abundance of *Pseudomonas*. This may present a risk as some genes were present but undetected in fresh fillets, which can transfer such genes to other environments such as the consumers' intestinal microbiota.