



HAL
open science

Vaccination contre la furunculose à *Aeromonas salmonicida* chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) : état des lieux et facteurs impactant son efficacité

Sloann Marie

► **To cite this version:**

Sloann Marie. Vaccination contre la furunculose à *Aeromonas salmonicida* chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) : état des lieux et facteurs impactant son efficacité. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. dumas-04021518

HAL Id: dumas-04021518

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04021518>

Submitted on 9 Mar 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNEE 2022 - Thèse n°.100

**VACCINATION CONTRE LA FURONCULOSE A
AEROMONAS SALMONICIDA CHEZ LA TRUITE ARC-EN-
CIEL (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) : ETAT DES LIEUX ET
FACTEURS IMPACTANT SON EFFICACITE**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

le 21 Novembre 2022

par

Sloann, Cindy, Cathy MARIE

Sous la direction de

Ségoène CALVEZ

et

Emmanuelle MOREAU

Président du jury : Madame Nathalie RUVOEN, Professeure à Oniris

Membres du jury : Madame Ségoène CALVEZ, Maître de Conférence à Oniris

Madame Emmanuelle MOREAU, Professeure à Oniris

Monsieur François BEAUDEAU, Professeur à Oniris

Membres invités : Monsieur Hubert GANTELET, Directeur Recherche et Développement, CEVA Biovac

ANNEE 2022 - Thèse n°.100

**VACCINATION CONTRE LA FURONCULOSE A
AEROMONAS SALMONICIDA CHEZ LA TRUITE ARC-EN-
CIEL (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) : ETAT DES LIEUX ET
FACTEURS IMPACTANT SON EFFICACITE**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

le 21 Novembre 2022

par

Sloann, Cindy, Cathy MARIE

Sous la direction de

Ségoène CALVEZ

et

Emmanuelle MOREAU

Président du jury : Madame Nathalie RUVOEN, Professeure à Oniris

Membres du jury : Madame Ségoène CALVEZ, Maître de Conférence à Oniris

Madame Emmanuelle MOREAU, Professeure à Oniris

Monsieur François BEAUDEAU, Professeur à Oniris

Membres invités : Monsieur Hubert GANTELET, Directeur Recherche et Développement, CEVA Biovac

Département **BPSA** Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment

Responsable : Emmanuel JAFFRES – Adjointe : Frédérique NGUYEN

Nutrition et Endocrinologie		
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (CERC) Martine KAMMERER (PR émérite)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Lionel MARTIGNAT (Pr) Julie HERVE (MC HDR) Grégoire MIGNOT (MC)	Adélie SALIN (CERC)
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Jérôme ABADIE (MC)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Pathologie générale, microbiologie et immunologie		
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC) Florence TEXIER (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (MC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC)	Emmanuel JAFFRES (MC) Mathilde MOSSER (mc) Boris MISERY (MC) Raouf TAREB (MC)
PACENV = VET1	Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG)	

Département **SAESP** Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique

Responsable : Raphaël GUATTEO – Adjoint : Jean-Michel CAPPELIER

Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr) Lucile MARTIN (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Ségolène CALVEZ (MC HDR) Aurélien MADOUASSE (MC) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) François MEURENS (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Léa LOISEL (CERC) Kenny OBERLE (MC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Christophe CHARTIER (Pr) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (CERC) Bruno LE BIZEC (Pr) Marie-France PILET (Pr)	Fanny RENOIS-MEURENS (MC HDR) Sofia STRUBBIA (MC)

Département DSC Sciences cliniques		
Responsable : Catherine IBISCH – Adjoint : Marion FUSELLIE		
Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC) Margarida RIBEIRO DA SILVA NEUNLIST (MC)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (MC HDR)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Gwénola TOUZOT-JOURDE (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)	
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (MC HDR) Catherine IBISCH (MC) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) François FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (MC HDR) Lamia BRIAND (MC HDR)
Département GPA Génie des procédés alimentaires		
Responsable : Sébastien CURET-PLOQUIN – Adjointe : Vanessa JURY		
Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (MC HDR) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
Département MSC Management, statistiques et communication		
Responsable : Samira ROUSSELIERE – Adjointe : Véronique CARIOU		
Mathématiques, statistiques, informatique	El Mostafa QANNARI (Pr émérite) Chantal THORIN (Pr Ag) Evelyne VIGNEAU (Pr)	Véronique CARIOU (MC HDR) Philippe COURCOUX (MC) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC)	Sibylle DUCHAINE (MC) Sonia MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GOYLER (Ens. Cont.) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

Pr Ag : Professeur Agrégé, Pr : Professeur, MC : Maître de Conférence, MCC : MC contractuel,
PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole,
HDR : Habilité à Diriger des Recherches, CERC : Chargé d'Enseignement et de Recherche Contractuel, Ens.
Cont. : Enseignant Contractuel

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- Nom et prénoms de l'auteur : Sloann Cindy Cathy MARIE
- Année de soutenance : 2022
- Titre de la thèse : Vaccination contre la furonculose à *Aeromonas salmonicida* chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) : état des lieux et facteurs impactant son efficacité
- Intitulé du diplôme : Thèse de doctorat vétérinaire
- Université de soutenance : Faculté de Médecine de Nantes
- Ecole de soutenance : Oniris, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes Atlantique
- Nombre de pages : 155 p.

Table des matières

TABLE DES FIGURES	13
TABLEAUX	14
TABLE DES ANNEXES	14
LISTE DES ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION GENERALE	17
PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	20
I-FILIERE PISCICOLE EN FRANCE ET DANS LE MONDE	20
A- <i>La filière aquacole dans le monde</i>	20
1-Historique.....	20
2-Pays producteurs	21
3-Espèces produites	21
4-Une problématique en lien avec la production aquacole : l'antibiorésistance	22
4.1- Utilisation des antibiotiques en élevage et résidus antibiotiques	22
4.2- Utilisation des antibiotiques en élevage et sélection de gènes de résistance.....	23
B- <i>Zootecnie des élevages truiticoles français</i>	23
1-Reproduction et obtention de lots spécifiques	23
1.1-Formation de lots unisexes femelles	24
1.2-Formation de lots d'animaux triploïdes	24
2-Ecloserie et alevinage.....	24
3-Grossissement.....	24
C- <i>L'élevage de truites arc-en-ciel en France : évolution du marché</i>	25
D- <i>Principales maladies bactériennes et virales de la truite arc-en-ciel en France</i>	26
II- LA VACCINATION CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL	27
A- <i>Généralités sur le système immunitaire des poissons Téléostéens</i>	27
1 - Anatomie de la truite arc-en-ciel : les organes de l'immunité	27
1.1-Thymus.....	27
1.2- Rein	27
1.3- Rate	28
1.4- MALT	28
2- Les effecteurs de l'immunité.....	29
2.1- Immunité innée	29
2.1.1 - Barrières épithéliales et mucus	29
2.1.2 -Cellules de l'immunité innée	30
2.1.3 -Molécules de l'immunité innée	30
2.1.3.1- Le système du complément.....	30
2.1.3.2- Les cytokines.....	31
2.2- Immunité adaptative	31
2.2.1- Cellules dendritiques	32
2.2.2 - Lymphocytes B et anticorps.....	32
2.2.3- Lymphocytes T.....	33
2.2.4- Notion de mémoire immunologique chez les poissons Téléostéens.....	33
B- <i>La vaccination, une application de l'immunité</i>	34
1-Généralités sur la vaccination	34
2-Les modalités de vaccination chez les poissons	34
2.1- La vaccination par injection.....	34
2.2- La vaccination par balnéation.....	35
2.3- La vaccination par voie orale.....	35
3- Les différents types de vaccins	36
3.1- Les vaccins inertes	36
3.1.1- Les vaccins inactivés	36
3.1.2- Les vaccins sous-unitaires.....	36

3.1.3- Les vaccins à acides nucléiques	37
3.2- Les vaccins vivants.....	37
3.2.1- Les vaccins vivants atténués	37
3.2.2- Les vaccins vectorisés	38
3.3- Les adjuvants	38
4- Vaccins utilisés chez la truite arc-en-ciel	38
4.1- Vaccins commerciaux	38
4.2- Autovaccins	39
III- LA FURONCULOSE A <i>AEROMONAS SALMONICIDA</i>	39
A- <i>Agent pathogène et facteurs de virulence chez les Salmonidés</i>	39
1- L'agent bactérien de la furunculose	39
2- Facteurs de virulence	40
2.1- La couche S (<i>A-layer</i>)	40
2.2- Le LPS.....	40
2.3- Système de sécrétion de type III	40
2.4- Produits extracellulaires	41
2.5- Biofilm et quorum sensing	42
2.6- Antibiorésistance d' <i>Aeromonas salmonicida</i>	43
B- <i>La maladie : la furunculose</i>	43
1- Epidémiologie	43
2- Transmission	43
3- Expression clinique.....	44
4- Réponse immunitaire de l'animal	46
5- Diagnostic et traitement	46
C- <i>La vaccination contre la furunculose : enjeux</i>	47
1- Les moyens de vaccination disponibles	47
1.1- Utilisation de vaccins commerciaux importés : exemple de l'Alphaject 3000	47
1.2- Utilisation d'un auto-vaccin	47
2- Enjeux de la vaccination contre la furunculose	47
2.1- Limiter les pertes économiques pour l'éleveur	47
2.2- Limiter l'apparition d'antibiorésistances	48
IV- CONCLUSION	48

PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE..... 50

I – OBJECTIFS	50
A- <i>Recensement des pratiques de vaccination sur le terrain</i>	50
B- <i>Evaluation de l'efficacité vaccinale des différentes voies d'administration dans le temps</i>	50
C- <i>Evaluation de l'efficacité vaccinale de protocoles utilisant des rappels</i>	51
II – EVALUATION DES PRATIQUES VACCINALES DES VETERINAIRES ET DES ELEVEURS.....	51
A- <i>Matériels et méthodes</i>	51
1- Réalisation des questionnaires	51
2- Forme et contenu des questionnaires	51
3- Transmission des questionnaires	52
4- Analyse des questionnaires.....	52
B- <i>Résultats</i>	53
1- Questionnaire à destination des éleveurs.....	53
1.1- Profil des éleveurs	53
1.2- Profil des élevages.....	54
1.3- La furunculose au sein des élevages piscicoles	56
1.4- La vaccination contre la furunculose au sein des élevages	57
2- Questionnaire à destination des vétérinaires	59
2.1- Profil des vétérinaires.....	59
2.2- Protocoles vaccinaux utilisés par les vétérinaires	61
C- <i>Discussion et conclusion</i>	61
1- Biais d'échantillonnage	61
2- La furunculose dans les élevages	62
3- Les protocoles vaccinaux utilisés.....	62

3.1- La vaccination en élevage.....	62
3.2- Protocoles de primovaccination.....	63
3.2.1- Animaux vaccinés	63
3.2.2- Vaccins utilisés.....	63
3.2.3- Formes d'administrations utilisées.....	63
3.2.4- Période de vaccination	64
3.3- Rappels vaccinaux	65
3.3.1- Utilisation des rappels vaccinaux.....	65
3.3.2- Durée entre rappel et primovaccination	65
3.3.3- Voies d'administration.....	66
3.4- Satisfaction des éleveurs et vétérinaires.....	66
4-Conclusion.....	66
III – ETUDE EXPERIMENTALE DE L'EFFICACITE VACCINALE CONTRE <i>A. SALMONICIDA</i> CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL	67
A- <i>Matériels et méthodes</i>	67
1-Matériel d'étude nécessaire à l'expérimentation	68
1.1-Animaux utilisés	68
1.2-Maintenance des animaux	69
1.3-Souche d' <i>Aeromonas salmonicida</i> utilisée et culture.....	69
1.4-Préparation de la souche bactérienne pour le challenge infectieux	69
1.5-Préparation des autovaccins contre <i>Aeromonas salmonicida</i>	70
1.5.1- Vaccin par voie intrapéritonéale	70
1.5.2- Vaccin par balnéation	70
1.5.3- Vaccin par voie orale	70
2-Déroulé de l'expérimentation	71
2.1- Allotement et primovaccination des animaux (S0)	71
2.2- Efficacité vaccinale par voie d'administration : premier challenge infectieux (S12 à S14).....	73
2.2.1- Réallotement	73
2.2.2- Challenge infectieux 3 mois (1425 degrés.jour) après primovaccination	74
2.2.3- Second challenge infectieux 2470 degrés.jour (6 mois) après primovaccination (S21 à S23)	75
2.3.1- Rappels vaccinaux (S10)	75
2.3.2 – Réallotement et réalisation du challenge infectieux.....	76
2.4- Suivi de la mortalité et démarche nécropsique.....	77
2.5- Suivi de la production d'anticorps sanguins anti-Ass	78
3-Traitement et analyse des données récoltées	79
3.1- Analyse du poids au cours du temps	79
3.2- Comparaison de moyenne et ELISA.....	79
3.3- Analyse de survie.....	80
3.4- Régression logistique binomiale et signes cliniques.....	80
B- <i>Résultats</i>	82
1-Mortalité hors challenge infectieux	82
2-Adhérences intrapéritonéales chez les animaux vaccinés par voie intrapéritonéale	83
3-Evolution du poids des animaux au cours du temps.....	83
4-Evolution de la quantité d'anticorps sanguins des animaux au cours du temps.....	86
5-Premier challenge infectieux : comparaison de l'efficacité vaccinale entre les voies d'administration	87
5.1- Mortalité	87
5.1.1- Effet du challenge infectieux sur la mortalité	87
5.1.2- Effet de la voie d'administration du vaccin sur la mortalité	88
5.2- Expression clinique et diagnostic de furunculose.....	90
5.2.1- Expression de signes cliniques de furunculose selon les lots	90
5.2.2- Signes cliniques et diagnostic de certitude chez les animaux morts et vivants	91
6-Second challenge infectieux : comparaison de l'efficacité vaccinale de protocoles avec et sans rappel vaccinal	93
6.1- Effet du challenge infectieux sur la mortalité.....	93
6.2- Effet du protocole vaccinal appliqué sur la mortalité	94
C- <i>Discussion</i>	95
1-Innocuité vaccinale	95
1.1-Mortalité hors challenge infectieux et traitement antibiotique.....	95
1.2-Poids des animaux en fonction de la voie d'administration du vaccin et adhérences	96
2-Efficacité vaccinale	97

2.1- Niveau de protection et durée en fonction de la voie d'administration	97
2.1.1-Injection intrapéritonéale.....	97
2.1.2- Voie orale	98
2.1.3- Balnéation	99
2.1.4- Intérêt de rappels vaccinaux.....	100
2.2-Portage d' <i>Aeromonas salmonicida</i> dans le mucus	101
3-Biais expérimentaux.....	102
3.1- Second challenge infectieux et hypoxie	102
3.2- Puissance statistique	102
3.3- Hétérogénéité des lots	103
D- <i>Conclusion</i>	104
CONCLUSION GENERALE.....	106
BIBLIOGRAPHIE	108

Table des figures

Figure 1 : Evolution de la production annuelle du milieu aquacole entre 1950 et 2018	20
Figure 2 : Carte de la production aquacole en 2011.....	21
Figure 3 : Évolution de l'utilisation des antibiotiques des pays producteurs de saumon depuis 1985	22
Figure 4 : Evolution de la consommation de truite fumée des foyers français entre 2009 et 2018	25
Figure 5 : Localisation anatomique du thymus chez la truite arc-en-ciel.....	27
Figure 6 : Dissection d'une truite arc-en-ciel de 65g	29
Figure 7 : Vaccination intrapéritonéale chez de jeunes saumons Atlantique	35
Figure 8 : système de sécrétion de type III.....	41
Figure 9 : Représentation de la formation d'un biofilm bactérien	42
Figure 10 : Exemples de lésions visibles lors de furunculose aiguë sur des ombles de fontaine	44
Figure 11 : Furoncles sur des ombles de fontaine lors de forme chronique de furunculose	45
Figure 12 : Lésion diffuse de nécrose hépatique chez une truite arc-en-ciel	45
Figure 13 : Répartition des âges des éleveurs interrogés.....	53
Figure 14 : Répartition de l'ancienneté des éleveurs interrogés dans le milieu piscicole	53
Figure 15 : Répartition géographique des élevages piscicoles de l'étude	54
Figure 16 : Volume des élevages piscicoles de l'étude (en m ³)	54
Figure 17 : Chargement des élevages piscicoles de l'étude (en kg/m ³)	54
Figure 18 : Production annuelle des élevages interrogés (en tonnes)	55
Figure 19 : Répartition des animaux élevés par les pisciculteurs interrogés en fonction de leur ploïdie	55
Figure 20 : Catégories d'animaux élevés sur les différents sites de l'étude	56
Figure 21 : Répartition des cas de furunculose en fonction de l'année	56
Figure 22 : Répartition des cas de furunculose en fonction du mois	56
Figure 23 : Age des vétérinaires interrogés	59
Figure 24 : Durée de carrière des vétérinaires interrogés	59
Figure 25 : Part de la pisciculture dans le domaine d'activité des vétérinaires interrogés	59
Figure 26 : Répartition géographique de l'exercice des vétérinaires interrogés.....	59
Figure 27 : Déroulement global de l'expérimentation	68
Figure 28 : Disposition de la salle 1 lors de la primovaccination.	72
Figure 29 : Dispositif de contention utilisé lors de la réalisation de l'injection intrapéritonéale	72
Figure 30 : Réalisation de la vaccination par balnéation.....	73
Figure 31 : Disposition de la salle 3 lors du premier challenge infectieux	73
Figure 32 : Synthèse des mouvements des différents lots de truite entre la salle 1 et la salle 3	74
Figure 33 : Furoncles à différents stades observés chez les truites infectées par <i>Aeromonas salmonicida</i>	75
Figure 34 : Disposition de la salle 1 lors du rappel vaccinal.....	76
Figure 35 : Disposition de la salle 3 lors du second challenge infectieux.....	77
Figure 36 : Pétéchies sur la paroi abdominale et le foie de truites infectées par <i>Aeromonas salmonicida</i>	77
Figure 37 : Culture d' <i>Aeromonas salmonicida</i> sur prélèvement de rein et de rate.....	78
Figure 38 : Adhérences intrapéritonéales chez un individu vacciné par injection intrapéritonéale	83
Figure 39 : Evolution du poids des animaux par lot (primovacciné uniquement) en fonction du temps	84
Figure 40 : Courbes de régression linéaire du poids en fonction du temps (primovacciné uniquement).....	85
Figure 41 : Courbes de régression linéaire du poids en fonction du temps (avec et sans rappel vaccinal).....	85
Figure 42 : Evolution de la densité optique chez les lots utilisés lors du premier challenge infectieux	86
Figure 43 : Evolution de la densité optique chez les lots utilisés lors du second challenge infectieux	87
Figure 44 : Probabilité de survie des animaux utilisés lors du premier challenge infectieux.....	89
Figure 45 : Probabilité de survie des animaux utilisés lors du second challenge infectieux	94

Tableaux

Tableau 1 : Résumé des différents protocoles vaccinaux utilisés par les éleveurs de l'étude.....	58
Tableau 2 : Résumé des protocoles vaccinaux utilisés par les vétérinaires piscicoles interrogés	60
Tableau 3 : Nombre de morts dus à <i>Flavobacterium</i> spp. hors période de challenge infectieux	82
Tableau 4 : Répartition des adhérences dans les lots concernés.....	83
Tableau 5 : Mortalité observée pendant le premier challenge en fonction des lots	88
Tableau 6 : Expression de signes cliniques de furunculose en fonction des lots.....	90
Tableau 7 : Odd Ratios de l'expression de signes cliniques en fonction du lot.	91
Tableau 8 : Expression de signes cliniques et résultats de bactériologie chez les animaux morts par lot.....	91
Tableau 9 : Comparaison des résultats bactériologiques et des signes cliniques	92
Tableau 10 : Mortalité observée pendant le second challenge en fonction des lots	93
Tableau 11 : Odd Ratios de la mortalité en fonction du lot, avec le lot NV-C2 comme référence.....	94
Tableau 12 : Odd Ratios de la mortalité en fonction du lot, avec le lot IP-C2 comme référence	95

Table des annexes

Annexe 1 : Liste des vaccins commerciaux disponibles pour poissons osseux (Shefat 2018).....	120
Annexe 2 : Questionnaire à destination des vétérinaires.....	121
Annexe 3 : Questionnaire à destination des éleveurs truiticoles.....	125
Annexe 4 : Autorisation de projet pour la manipulation expérimentale.....	130
Annexe 5 : Composition de l'aliment utilisé pendant la manipulation expérimentale.....	131
Annexe 6 : Ordonnance de prescription des autovaccins utilisés.....	133
Annexe 7 : Protocole ELISA utilisé pour la détermination des titres en anticorps anti-Ass.....	134
Annexe 8 : Exemple de fiche de suivi de mortalité utilisée lors des challenges infectieux.....	137
Annexe 9 : Exemple de fiche de suivi des résultats d'autopsie.....	138
Annexe 10 : Fiche d'évaluation des lésions et signes cliniques.....	139
Annexe 11 : Analyses statistiques du poids des animaux.....	147
Annexe 12 : Analyses statistiques de la densité optique obtenue après ELISA.....	149
Annexe 13 : Analyses statistiques de la mortalité après le premier challenge infectieux.....	151
Annexe 14 : Analyses statistiques de la mortalité après le second challenge infectieux.....	153

Liste des abréviations

AMM	: Autorisation de Mise sur le Marché
ANSES	: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
APPIFish	: Antibiotic Resistance Pathogenicity Infectiology in Fish
Ass	: <i>Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida</i>
Baln	: Balnéation
BCR	: B-Cell Receptor
C1 / C2	: Challenge infectieux 1 / Challenge infectieux 2
CABI	: Centre for Agriculture and Bioscience International
CIPA	: Comité Interprofessionnel des Produits de l'Aquaculture
CMH	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DO	: Densité Optique
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
GALT	: Gut Associated Lymphoid Tissue
GIALT	: Gill Associated Lymphoid Tissue
GMQ	: Gain Moyen Quotidien
HPRA	: Health Products Regulatory Authority
Ig	: Immunoglobuline
IL	: Interleukine
ILT	: Interbranchial Lymphoid Tissue
INRAE	: Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
IP	: Intrapéritonéale
LPS	: LipoPolySaccharide
MALT	: Mucosa Associated Lymphoid Tissue
NALT	: Nasal Associated Lymphoid Tissue
NHI	: Nécrose Hématopoïétique Infectieuse
NK	: Natural Killer (cells)
NR	: Non Renseigné
NV	: Non Vacciné
NVNC	: Non Vacciné Non Challengé
PAMP	: Pathogen Associated Molecular Pattern
PEIMA	: Pisciculture Expérimentale INRAE des Monts d'Arrée
PRR	: Pattern Recognition Receptor
QCM	: Question à Choix Multiples
QROC	: Question à Réponse Ouverte Courte
RAIZO	: Réseau d'Alerte et d'Information ZOosanitaire
SALT	: Skin Associated Lymphoid Tissue
SHV	: Septicémie Hémostatique Virale
SNGTV	: Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires
TCR	: T Cell Receptor
TLR	: Toll-Like Receptor
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
UFC	: Unité Formant Colonie
VO	: Voie Orale
WHO	: World Health Organization

Introduction générale

L'élevage de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) en France s'inscrit dans le cadre d'une augmentation globale de la production mondiale de produits issus de l'aquaculture et de la pisciculture. En effet la demande de produits aquatiques (que cela soit des produits animaux ou végétaux) est en augmentation depuis plusieurs années. Cependant, les ressources halieutiques ne sont pas illimitées, et la production de produits aquatiques issus de la pêche stagne, voire baisse en même temps que cette demande augmente. L'aquaculture est donc une réponse à cette demande (FAO (Food And Agriculture Organization of the United Nations) 2020).

Cependant, l'élevage truiticole français ne suit pas cette tendance de croissance et reste limité par les directives environnementales, dont la Directive Cadre sur l'Eau qui prévoit de limiter les quantités d'eau dérivées à des fins d'élevage, cadrer davantage la gestion des rejets et assurer la présence d'une continuité écologique pour les espèces sauvages. Ce durcissement réglementaire fait que le nombre de productions truiticoles a diminué de 20% entre 1997 et 2007 (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation 2017a).

À ce contexte peu favorable au développement de l'activité piscicole s'ajoutent d'autres difficultés pour les éleveurs, et notamment la gestion des maladies au sein de l'élevage. Cette gestion est d'autant plus importante en production truiticole française, les élevages étant fréquemment en contact direct avec les cours d'eau, favorisant la dissémination de maladies en amont comme en aval. Le contrôle des maladies au sein d'un élevage, que cela soit à des fins de prévention ou lors d'un épisode clinique, passe par deux volets : celui des mesures sanitaires et celui des mesures médicales. Les mesures sanitaires sont essentiellement des mesures d'hygiène, comme le lavage et la désinfection des bassins entre chaque lot, ou encore le retrait des animaux morts ou moribonds lors d'un épisode de maladie. Les mesures médicales, quant à elles, sont majoritairement représentées par la vaccination et l'antibiothérapie. Cependant une des particularités du secteur piscicole français est que le nombre de spécialités antibiotiques et de vaccins commerciaux disposant d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en France reste très limité : éleveurs et vétérinaires possèdent alors une très faible marge de manœuvre dans la gestion des maladies, notamment bactériennes. Par exemple, il n'existe pas de vaccins commerciaux disponibles avec AMM en France contre certaines maladies pourtant fréquentes en élevage, comme la furonculose (ANSES 2022).

La furonculose est néanmoins une maladie qui inquiète de plus en plus en élevage. Cette maladie se rencontre en effet préférentiellement en été, lorsque les animaux sont soumis aux stress de l'augmentation de la température de l'eau et de la diminution de l'oxygène dissous dans celle-ci. Or, les truites arc-en-ciel élevées aujourd'hui sont de plus en plus grosses, afin de fournir le marché en filets et en produits fumés (CIPA (Comité Interprofessionnel des Produits de l'Aquaculture) 2020). Ces animaux restent plus de deux ans sur le site de production (contre 10-12 mois pour une truite portion) et connaissent donc plusieurs étés : ils sont ainsi davantage exposés à cette maladie.

Les éleveurs ont alors le plus souvent recours à des auto-vaccins ou à l'utilisation de vaccins commerciaux importés afin de gérer leurs épisodes de furonculose, sans qu'il n'y ait de protocole clair concernant l'utilisation de ces vaccins chez la truite. L'immunité apportée par ces vaccins étant perçue

comme courte, des rappels vaccinaux sont souvent utilisés sur les animaux à cycle de production long, sans consensus sur le moment du rappel par rapport à la primovaccination. De plus, les autovaccins contre *Aeromonas salmonicida* sont fréquemment considérés sur le terrain comme manquant d'efficacité. Pourtant, cette vaccination sera très certainement davantage utilisée dans les années à venir, notamment dans une volonté de réduction d'utilisation des antibiotiques avec la continuité du plan Ecoantibio 2.

Le travail de thèse présenté s'inscrit dans cette démarche de recherche de protocole vaccinal moins empirique et cherche à mettre en évidence l'efficacité d'un autovaccin contre *Aeromonas salmonicida*, utilisé sous ses différentes voies d'administration.

Une première partie de synthèse bibliographique nous permettra d'aborder quelques généralités sur la production aquacole mondiale et le fonctionnement de l'élevage truiticole français intégré à l'évolution du marché des produits aquacoles. Nous nous intéresserons par la suite à la vaccination chez les poissons osseux et à sa capacité à répondre à certaines problématiques soulevées dans le premier point avant de nous concentrer davantage sur la furunculose à *Aeromonas salmonicida* et sa gestion actuelle par vaccination.

L'étude expérimentale, à laquelle la seconde partie de ce manuscrit est dédiée, s'intéresse à l'efficacité de la vaccination de la truite arc-en-ciel contre la furunculose. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de différents protocoles vaccinaux incluant l'évaluation de différentes voies d'administration (injection intrapéritonéale, voie orale et balnéation) aux alentours de 1425 (3 mois à 16 °C) et 2470 degrés.jours (6 mois à 16 °C) après la vaccination. L'élaboration du protocole de cette manipulation se base sur un questionnaire réalisé au préalable auprès des éleveurs et des vétérinaires aquacoles, pour permettre de connaître les pratiques actuelles de vaccination dans les élevages.

Partie I : synthèse bibliographique

I-Filière piscicole en France et dans le monde

A- La filière aquacole dans le monde

1- Historique

La consommation de poissons et de produits de la mer est en augmentation depuis maintenant plusieurs décennies, avec une croissance moyenne de +3,1% par an entre 1961 et 2017. Cet attrait pour cette source protéique est beaucoup plus marqué que pour les autres protéines d'origine animale, qui présentent une croissance de +2,1% par an sur la même période (FAO (Food And Agriculture Organization of the United Nations) 2020). Cependant, l'épuisement des ressources halieutiques se fait ressentir et, depuis les années 1980, le tonnage de captures par les pêcheries est sur le déclin (Teletchea 2019). Pour contrer cette baisse de produits d'origine sauvage et répondre à la demande, l'aquaculture s'est développée dans de nombreuses régions du monde, jusqu'à couvrir la moitié du tonnage totale des produits aquacoles en 2018, avec 114,5 millions de tonnes en poids vif (cf. **Figure 1**). Ce secteur continue d'ailleurs de croître, avec une croissance moyenne de production de +5,3% par an sur la période de 2001-2018 (FAO (Food And Agriculture Organization of the United Nations) 2020). En France, tous les secteurs piscicoles ne suivent pas cette tendance : à titre d'exemple, le nombre d'exploitations élevant des Salmonidés (en majorité de la truite arc-en-ciel) a diminué de 20% entre 1997 et 2007. Cette baisse d'exploitations est en partie en lien avec le durcissement des règles environnementales lié à la nouvelle Directive Cadre sur l'Eau en 2000 (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation 2017a).

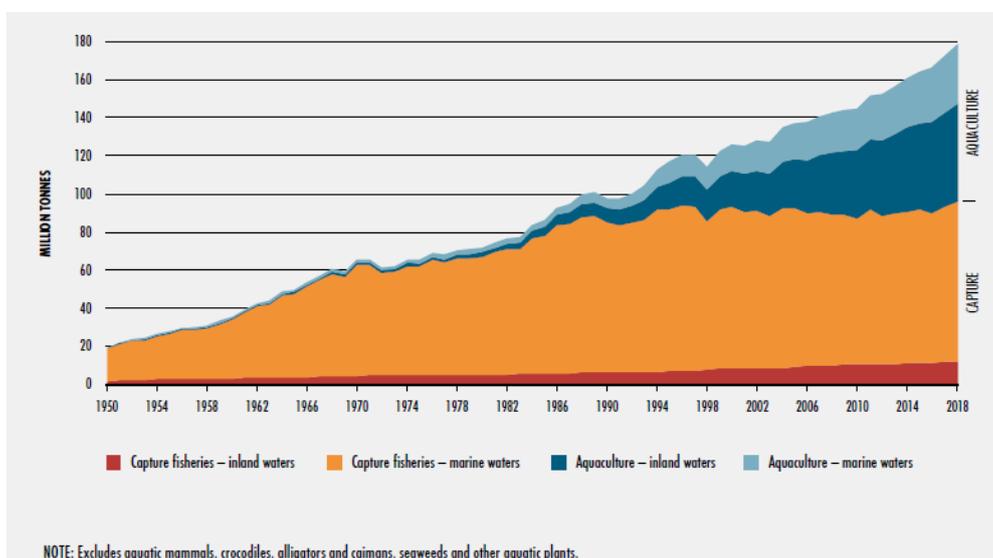


Figure 1 : Evolution de la production annuelle du milieu aquacole entre 1950 et 2018 (FAO (Food And Agriculture Organization of the United Nations) 2020)

2- Pays producteurs

L'aquaculture est une pratique mondiale mais il existe de grandes divergences entre régions géographiques. Ainsi, l'Asie représente 92% (dont 39% pour la Chine seule) de la production mondiale de produits aquacoles (algues comprises), faisant de ce continent le leader mondial (cf. **Figure 2**). Les autres producteurs mondiaux importants sont la Norvège et le Chili grâce à leur production de saumon Atlantique (*Salmo salar*), ainsi que l'Égypte, grand producteur de tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*). Les pays Africains et Sud-Américains sont en plein essor, avec des croissances dépassant celles des pays Asiatiques (Naylor et al. 2021).

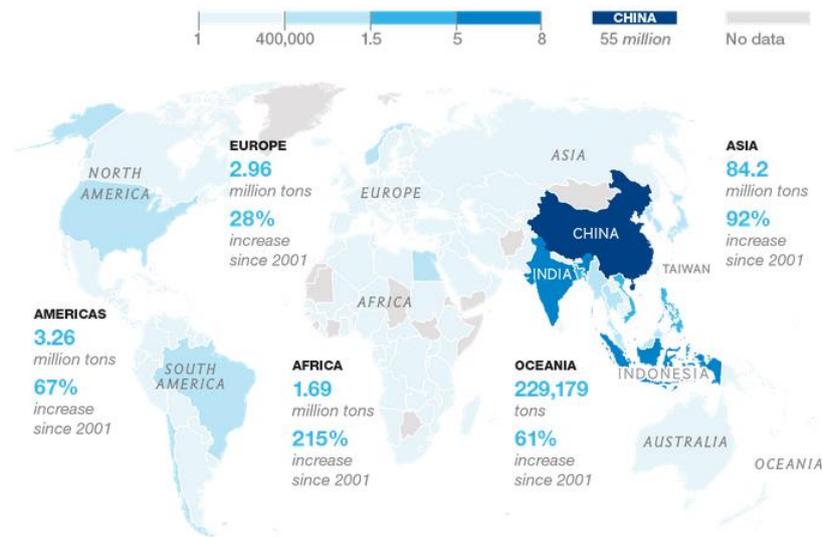


Figure 2: Carte de la production aquacole en 2011 (en tonnes)(Bourne 2019)

3- Espèces produites

Il est difficile de quantifier le nombre exact d'espèces élevées dans la filière aquacole, à cause du manque de données des pratiques de certains pays, mais également du fait de l'élevage croissant d'espèces hybrides. Cependant, il a été recensé 622 espèces (toutes espèces) élevées dans le monde en 2018. Cette diversité est à nuancer, certaines espèces étant bien plus dominantes que d'autres : en effet, 20 espèces de poissons osseux représentent à elles seules 84% de la production mondiale. Parmi ces espèces, la carpe Amour (*Ctenopharyngodon idellus*) et la carpe argentée (*Hypophthalmichthys molitrix*) représentent 20% de la production totale. Ces deux espèces sont majoritairement produites en Asie, et servent en partie à la consommation domestique mais également à l'export (FAO 2020; Naylor et al. 2021). Le saumon Atlantique (*Salmo salar*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ne représentent, quant à eux, que 6% de la production mondiale. Malgré leur faible poids dans la proportion des espèces élevées, les Salmonidés restent tout de même des espèces à forte valeur ajoutée (FAO 2020). Dans les domaines de la crustaculture et de la conchyliculture, les espèces dominantes sont respectivement la crevette à pattes blanches (*Penaeus vannamei*) et l'huître (*Crassostrea spp.*) qui représentent 52,9% et 29,5% du tonnage total en crustacés et en mollusques.

4- Une problématique en lien avec la production aquacole : l'antibiorésistance

4.1- Utilisation des antibiotiques en élevage et résidus antibiotiques

Le développement et l'intensification de l'élevage piscicole va de pair avec des densités d'animaux plus élevées au sein des systèmes d'élevage, ainsi que l'apparition plus fréquente de maladies au sein de ceux-ci. La Norvège, après une forte utilisation d'antibiotiques dans les années 1980 à 1990, a connu une diminution drastique de l'usage des antibiotiques en élevage de saumon, grâce à l'emploi généralisé de la vaccination (WHO (World Health Organization) 2015). Le Chili, second producteur mondial de saumon, ne suit néanmoins pas cette tendance (cf. **Figure 3**) et montre des difficultés à gérer ses épisodes récurrents de Piscirickettsiose (*Piscirickettsia salmonis*) par la vaccination (Henriksson et al. 2018). En 2019, le Chili a de ce fait utilisé 334,1 g de florfénicol pour une tonne de saumon produit afin de gérer cette maladie pouvant conduire à de fortes mortalités. A titre comparatif, la Norvège utilisait 0,154 g/tonne de florfénicol en 2016 (Lozano-Muñoz et al. 2021).

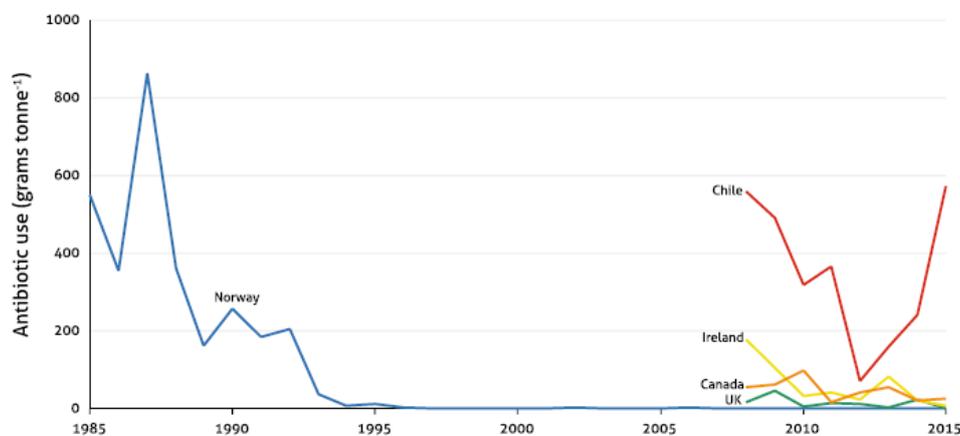


Figure 3: Évolution de l'utilisation des antibiotiques (en g/tonne produite) des pays producteurs de saumon depuis 1985 (Henriksson et al. 2018)

Des résidus de ces antibiotiques (très fréquemment distribués par l'alimentation) peuvent alors se retrouver dans l'environnement via les matières fécales des animaux, ou les restes alimentaires. Des traces de fluméquine et de florfénicol ont ainsi été retrouvées dans des particules en suspension dans l'eau entre 6 mois et 1 an après utilisation dans des élevages de saumon au Chili. De très faibles quantités, quasiment indétectables, sont retrouvées dans les sédiments (Jara et al. 2021). Des résultats contradictoires ont été trouvés en eau douce en France, sur une rivière bretonne comportant quatre élevages piscicoles sur ses berges : on ne retrouvait quasiment aucune trace d'antibiotique dans l'eau ni dans les sédiments de la rivière. Cependant, des quantités non négligeables d'antibiotiques pouvaient être retrouvées dans des bryophytes (ici, des mousses aquatiques) en aval des élevages piscicoles (Pouliquen et al. 2009). L'ensemble de ces résultats reste cependant à nuancer, notamment pour ceux obtenus en eau douce : la faible contamination parfois observée peut en effet provenir d'élevages d'animaux terrestres. De même, les concentrations des sédiments en antibiotiques dépendent de beaucoup de variables (nature des sédiments, courants, quantité de restes alimentaires...) et sont donc difficiles à interpréter (Capone et al. 1996; Pouliquen et al. 2009).

4.2- Utilisation des antibiotiques en élevage et sélection de gènes de résistance

Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être naturellement présents chez les populations bactériennes vivant dans les sédiments, sans qu'il n'y ait nécessairement d'exposition préalable aux antibiotiques : on parle alors de résistance naturelle. Cela pourrait s'expliquer par une augmentation du fitness des bactéries possédant ces gènes, augmentant ainsi leur survie dans l'environnement (Muziasari et al. 2016). Cependant, il a été démontré que la proportion de gènes de résistance (qu'elle soit unique ou multiple) en amont et en aval d'élevages piscicoles est statistiquement différente : les populations bactériennes étudiées présentent en effet davantage de gènes de résistance en aval des élevages (Schmidt et al. 2000).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cet enrichissement en gènes de résistance dans l'environnement proche des élevages piscicoles. Les gènes d'antibiorésistance peuvent provenir d'espèces bactériennes du tube digestif des animaux traités. En effet, le milieu intestinal, du fait de sa richesse en microorganismes et du contact direct avec l'antibiotique, représente un milieu très favorable à la sélection de souches résistantes. Les bactéries du tube digestif se retrouvent ensuite dans le milieu aquatique après élimination des matières fécales et contribuent donc à augmenter le nombre de gènes de résistance dans le milieu (Miranda et al. 2018). Les résidus antibiotiques, même présents en faible quantité, peuvent induire la sélection de gènes de résistance dans l'environnement par pression de sélection : des concentrations inférieures aux concentrations minimales inhibitrices favorisent en effet les transferts horizontaux de gènes (Muziasari et al. 2016). Enfin, une dernière hypothèse possible serait une co-sélection des gènes de résistance par rapport à d'autres éléments, tels les métaux lourds (Liebert et al. 1999).

Le milieu aquatique et les sédiments font office de réservoir pour les gènes de résistance aux antibiotiques. Ce milieu n'est pas séparé physiquement du milieu terrestre, et des échanges de gènes peuvent tout à fait avoir lieu entre des bactéries telluriques et aquatiques, d'origine animale ou humaine. Les profils de résistance des bactéries retrouvées dans les sédiments et ceux de bactéries pathogènes en médecine humaine, de par leurs nombreuses similitudes, étayent cette hypothèse (Yang et al. 2013).

B- Zootechnie des élevages truiticoles français

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est une espèce de Salmonidés considérée aujourd'hui comme domestiquée. En effet, toutes les étapes de son cycle de vie sont maîtrisées par l'Homme, de la reproduction au grossissement. Des programmes de sélection sont maintenant réalisés sur cette espèce, et les truites domestiquées n'ont plus la même expression génique que leurs homologues sauvages (Teletchea 2019). L'élevage de truites arc-en-ciel se divise en plusieurs étapes correspondant au cycle de vie de cette espèce.

1- Reproduction et obtention de lots spécifiques

La période de reproduction de la truite arc-en-ciel se déroule entre novembre et janvier. Cette période peut cependant être avancée de Mai à Juillet par gestion de la photopériode sur les reproducteurs (Lucas 2018). Les ovocytes ainsi que la laitance sont récupérés manuellement avant d'être mis en contact pour fécondation. Les œufs fécondés ainsi obtenus sont désinfectés et traités contre les champignons avant de passer en éclosion.

Les animaux débutent leur maturité sexuelle pendant leur deuxième année pour les mâles et leur troisième année pour les femelles. Cette maturité sexuelle utilise en partie l'énergie dédiée à la formation de la masse musculaire et entraîne donc une baisse de croissance des animaux (Lucas 2018). Cette dernière est un problème lors de l'élevage d'animaux destinés à la consommation.

Pour contrer cette baisse de croissance chez les animaux diploïdes, il existe deux stratégies distinctes en termes de reproduction.

1.1- Formation de lots unisexes femelles

Les femelles ayant une maturité sexuelle plus tardive, l'obtention de lots contenant uniquement des femelles permettra un élevage plus long des animaux avant la perte de croissance liée à la reproduction. Les lots unisexes femelles passent par l'obtention de truites « néo-mâles », c'est-à-dire des truites avec un caryotype XX mais exprimant un phénotype mâle et produisant de la laitance. Les truites néo-mâles sont produites en donnant une alimentation contenant de la méthyltestostérone pendant 70 jours au stade alevin. Les femelles du lot d'alevins alimentées de cette façon développeront des testicules fonctionnels mais pas de conduit permettant d'excréter le sperme. Les néo-mâles seront donc sacrifiés à l'âge de deux ou trois ans afin de récupérer la semence, qui sera utilisée sur des ovocytes. Les embryons ainsi obtenus seront tous des femelles de caryotype XX (Lucas 2018). Toutes les truites ayant été en contact avec le traitement hormonal seront sacrifiées et ne rentreront pas dans la production.

1.2- Formation de lots d'animaux triploïdes

Les animaux triploïdes, de caryotype XXX ou XXY, sont obtenus après fécondation de gamètes provenant de géniteurs diploïdes classiques. Les œufs sont soumis à un choc thermique ou hyperbare juste après fécondation, ce qui permet d'empêcher l'éjection du second globule polaire de l'ovocyte. Les animaux triploïdes ainsi obtenus sont stériles et n'auront pas de maturité sexuelle. Ils bénéficient d'une meilleure croissance sur les cycles d'élevage longs par rapport aux animaux diploïdes, mais peuvent parfois présenter des difformités, par exemple au niveau des mâchoires (Lucas 2018; Weber et al. 2014).

2- *Ecloserie et alevinage*

L'incubation et l'alevinage sont les stades les plus fragiles du cycle de vie de la truite arc-en-ciel et nécessitent des conditions environnementales très contrôlées (température, qualité de l'eau...). Les alevins étant très facilement stressés, ces étapes se déroulent avec le moins de lumière possible (Lucas 2018). L'incubation, du stade embryonnaire jusqu'à la résorption du sac vitellin après éclosion dure en moyenne 640 degrés.jour (soit environ 53 jours à 12 °C). Les alevins sont ensuite nourris en bassins en intérieur jusqu'à atteindre entre 1 et 10 g avant d'intégrer les bassins de grossissement, à l'extérieur (CIPA 2022).

3- *Grossissement*

Le grossissement des animaux se passe en bassins extérieurs. Les élevages de truites sont le plus souvent des élevages en milieu ouvert : l'eau arrive de la rivière et y repart après un passage sur des bacs de décantation. Les paramètres de l'eau sont ainsi très tributaires de la rivière et de la saison (surtout l'oxygène et la température). Les truites sont des animaux robustes mais restant sensibles à quelques paramètres spécifiques : ces salmonidés ont en effet besoin d'une eau très oxygénée (optimum à 9-10 mg/L) et fraîche (14-16°C). Bien qu'une action sur la température de l'eau soit peu

réalisable en pratique, l'oxygénation de l'eau reste possible et est très utile lorsque l'oxygène dissous dans l'eau s'amointrit, particulièrement en été lorsque les températures augmentent.

Les truites restent dans ces bassins de grossissement jusqu'à obtention du poids d'abattage souhaité. On distingue alors des lots de production de truites portions (200-300 g), de truites destinées à la production de filets et de darnes (1-2 kg) et de très grandes truites destinées au fumage (plus de 2,5 kg) (CIPA 2021). Des tris de poissons sont très fréquemment réalisés, permettant d'homogénéiser les tailles des animaux dans les bassins.

C- L'élevage de truites arc-en-ciel en France : évolution du marché

La France était, en 2019, le premier producteur Européen de truites arc-en-ciel devant l'Italie et le Danemark, avec 39 500 tonnes produites. Bien que des élevages soient présents sur l'ensemble de la France, les régions Hauts de France, Bretagne et Nouvelle Aquitaine totalisent à elles seules 70 % de la production en métropole (CIPA 2021).

La consommation de truites en France est très populaire et se fait majoritairement sous forme de poisson frais (truites portions, darnes, filets) et fumé. La truite arc-en-ciel représente la quatrième espèce de poisson la plus achetée en frais en 2020, derrière le saumon, le lieu noir et le cabillaud, avec 6000 tonnes vendues. La truite fumée représente également une part importante de marché, avec 6400 tonnes vendues en 2020 (FranceAgriMer 2020). Comme nous pouvons le voir avec la **Figure 4**, la consommation de filets et de truite fumée est en plein essor, ce qui conduit à l'élevage d'animaux plus gros sur les sites de production pour répondre aux besoins du marché.

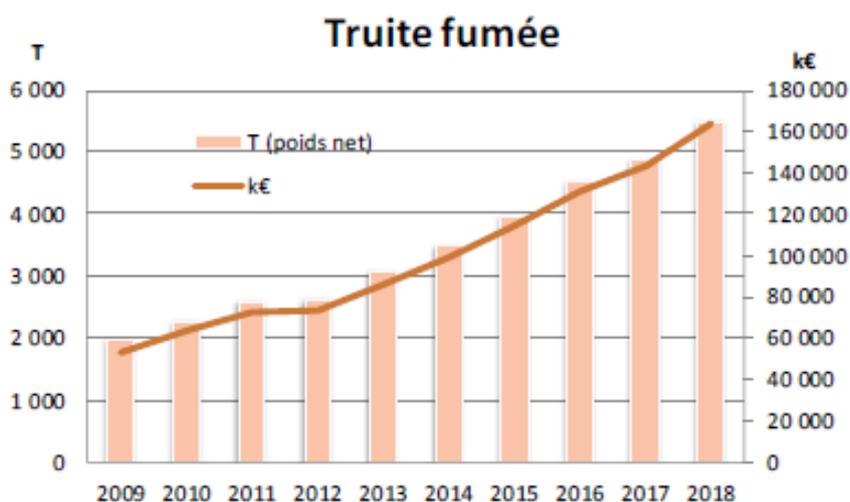


Figure 4: Evolution de la consommation de truite fumée des foyers français entre 2009 et 2018(CIPA 2020)

Le cycle d'élevage de la truite arc-en-ciel devient de plus en plus long, passant de 12 mois pour obtenir une truite portion de 250g à plus de 2 ans pour obtenir un animal de 2,5 kg pour fumage (CIPA 2022). Cet allongement de la durée de production n'est pas sans risque, les animaux subissent alors un stress lié à l'élevage (tri, manipulation...) plus long et sont plus à risque de développer certaines maladies, comme la furonculose, car plus longtemps en contact avec l'environnement extérieur.

D- Principales maladies bactériennes et virales de la truite arc-en-ciel en France

La truite arc-en-ciel peut être affectée par de nombreuses maladies, qu'elles soient bactériennes ou virales. Il existe également des maladies d'origine parasitaire, qui ne seront pas abordées ici.

Les principales maladies d'origine virale affectant la truite arc-en-ciel en France sont la Septicémie Hémorragique Virale (SHV) et la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (NHI). Ces deux maladies sont causées par des rhabdovirus et provoquent des mortalités pouvant aller jusqu'à 100% chez les jeunes animaux (Hadfield 2021). Ces deux maladies sont des maladies réglementées et sont soumises à déclaration. Néanmoins, depuis 2021, elles ne sont plus obligatoirement soumises à un plan d'éradication, même si la surveillance et la prévention sont toujours obligatoires (Parlement Européen 2021). Une autre maladie virale fréquemment retrouvée chez les jeunes truites est la nécrose pancréatique infectieuse, dont l'origine est un birnavirus. Le virus provoque une septicémie, pouvant conduire à des mortalités quasi-totales dans les lots affectés (Hadfield 2021). Il n'existe pas de traitement pour les maladies d'origine virale, et leur maîtrise passe par la mise en place de plan de surveillance, de classification et de règles dans les échanges/ventes d'animaux vivants.

Les maladies bactériennes sont également communes en élevage. Parmi celles-ci, les plus fréquemment retrouvées sont la yersiniose (*Yersinia ruckeri*), la flavobactériose (*Flavobacterium psychrophilum*), la furunculose (*Aeromonas salmonicida*) et la maladie de la fraise, certainement provoquée par une Rickettsie non identifiée actuellement. Mis à part certaines expressions cliniques particulières comme les furoncles lors de la forme chronique de la furunculose, ces maladies provoquent peu de signes pathognomoniques et leur diagnostic est donc essentiellement réalisé en laboratoire (Lucas 2018; Hadfield 2021). Le traitement de ces maladies se fait principalement par utilisation de molécules antibiotiques, par balnéation ou par voie orale.

Il existe plusieurs méthodes pour prévenir l'apparition de maladies en élevage. L'hygiène est un pilier de cette prévention. Par exemple, la gestion des bassins d'élevage en système « tout plein-tout vide » permet le lavage et la désinfection des bassins entre chaque lot, réduisant ainsi la pression sanitaire sur les animaux. Le traitement de l'eau, par filtration mécanique et biologique, est également possible, et est particulièrement utilisé lors de l'élevage des alevins, un des stades les plus fragiles de la truite (Lucas 2018). L'emploi de rayonnement ultraviolet, associé à cette filtration, permet également de réduire la quantité d'agents pathogènes potentiellement présent dans l'eau. Cependant, le traitement de l'eau est complexe à réaliser en système d'élevage ouvert, comme cela est le cas dans la plupart des élevages truiticoles français.

La vaccination, qui permet aux animaux de développer une immunité contre un agent pathogène d'intérêt, permet de limiter les signes cliniques de la maladie dans l'élevage. Cependant, elle n'empêche pas la transmission de l'agent pathogène, et doit être complétée par les mesures sanitaires abordées précédemment.

La vaccination et ses principes seront plus amplement détaillés dans la partie suivante.

II- La vaccination chez la Truite arc-en-ciel

A- Généralités sur le système immunitaire des poissons Téléostéens

1 - Anatomie de la truite arc-en-ciel : les organes de l'immunité

L'organisation du système immunitaire de la truite arc-en-ciel et, a fortiori, de l'ensemble des poissons Téléostéens, présente quelques différences par rapport à celui des Mammifères, en particulier au niveau de l'anatomie. Les cellules effectrices de l'immunité restent cependant similaires à celles observées chez les Mammifères, et on retrouve des organes lymphoïdes primaires et secondaires. Les nœuds lymphatiques sont cependant absents chez les poissons, malgré la présence de vaisseaux lymphatiques drainant les tissus (Levraud & Boudinot 2009).

1.1-Thymus

Le thymus est un organe pair, composé de deux parties situées de chaque côté de la tête, sous la partie haute de chaque opercule (cf. **Figure 5**). Le thymus est anatomiquement proche du pharynx et donc de son épithélium, qui est une zone d'entrée importante des agents pathogènes dans l'organisme. Chez la truite arc-en-ciel, contrairement à d'autres poissons osseux, il ne possède pas de différenciation entre cortex et médulla (Bowden et al. 2005).

Chez les Téléostéens, cet organe possède également la même fonction que celle observée chez les Mammifères : le rôle d'organe lymphoïde primaire, via la production et la maturation des lymphocytes T. De ce fait, on y retrouve des cellules similaires comme les macrophages, qui permettent de phagocyter les lymphocytes en apoptose dirigés contre des antigènes du soi, ce qui évite donc leur stimulation (Bowden et al. 2005). Les thymocytes, quant à eux, donneront les lymphocytes T après maturation. Le développement du thymus, ainsi que du rein, est très précoce dans la vie de la truite, si bien que ces deux organes sont considérés comme fonctionnels avant même l'éclosion (Uribe et al. 2011; Zapata et al. 2006). Chez les poissons Téléostéens d'eau douce, il s'agit d'ailleurs du premier organe à présenter un tissu lymphoïde lors de l'ontogénèse (Zapata et al. 2006).



Figure 5 : Localisation anatomique du thymus chez la truite arc-en-ciel

1.2- Rein

Le rein est, chez les poissons osseux, divisé en 2 parties : le rein antérieur, situé juste derrière la tête de l'animal et représentant environ 20% de l'organe, et le rein postérieur (ou rein moyen) collé à la face ventrale de la colonne vertébrale (Levraud & Boudinot 2009). La **Figure 6** illustre cette position anatomique. Le rein antérieur a le même rôle que la moelle osseuse hématopoïétique des

Mammifères (absente chez les poissons) : il est le siège de la production des leucocytes autres que les lymphocytes T. C'est donc un organe lymphoïde primaire, de la même façon que le thymus. Ce rôle se retrouve à l'histologie : le rein antérieur est dépourvu de néphrons et contient un riche tissu hématopoïétique (en plus d'un tissu endocrine similaire à la glande surrénale des Mammifères) (Zwollo et al. 2005 ; Whyte 2007).

Le rein postérieur est composé principalement de néphrons mais représente également (avec la rate) l'organe lymphoïde secondaire le plus important chez la truite (Levraud & Boudinot 2009). Certaines études montrent une grande différence dans la maturité des cellules immunitaires entre le rein antérieur et postérieur, et supposent qu'il existe un gradient de maturation cranio-caudal. Cette hypothèse reste cependant à démontrer (Zwollo et al. 2005). La grande quantité de mélanomacrophages présents dans le rein antérieur, de par leur capacité de rétention des antigènes, aide à l'établissement de la mémoire immunologique (Rønneseth et al. 2007)

1.3- Rate

La rate est, contrairement au rein, un organe lymphoïde uniquement secondaire et ne possède aucune cellule hématopoïétique ou de centre prolifératif (Levraud & Boudinot 2009). Sa position anatomique est illustrée par la **Figure 6**. Histologiquement, la rate est composée de structures appelées ellipsoïdes : ce sont des capillaires issus des artérioles spléniques possédant un endothélium épais et entourés de mélanomacrophages, ayant un rôle dans la phagocytose des érythrocytes ; et de tissu lymphoïde (Ali et al. 2014 ; Uribe et al. 2011). Le tissu de la rate a majoritairement pour rôle la présentation des antigènes pour initiation de la réponse immunitaire adaptative, mais également dans la mémoire immunologique de l'animal de la même façon que le rein (Ali et al. 2014 ; Uribe et al. 2011 ; Rønneseth et al. 2007).

1.4- MALT

Le MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) est un ensemble de tissus lymphoïdes secondaires en association avec les muqueuses du poisson. Il se divise en GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue), SALT (Skin-Associated Lymphoid Tissue), GIALT (Gill-Associated Lymphoid Tissue) et NALT (Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue). Ce tissu est particulièrement important chez les Téléostéens, étant donné l'exposition accru aux agents pathogènes dans le milieu de vie, comparativement aux vertébrés terrestres (Levraud & Boudinot 2009). Cela est d'autant plus vrai pour les branchies, qui sont un système ouvert en contact constant avec le milieu sans filtration fine de celui-ci.

Le MALT est, chez les poissons osseux, un ensemble de cellules immunitaires disséminées le long des muqueuses, mais sans organisation comme on pourrait la retrouver dans les plaques de Peyer intestinales des Mammifères (Levraud & Boudinot 2009). Une exception existe cependant chez le saumon Atlantique (*Salmo salar*), avec son ILT (Interbranchial Lymphoid Tissue), qui montre une certaine organisation à l'histologie. Il s'agit pour le moment de la seule exception connue (Salinas 2015).

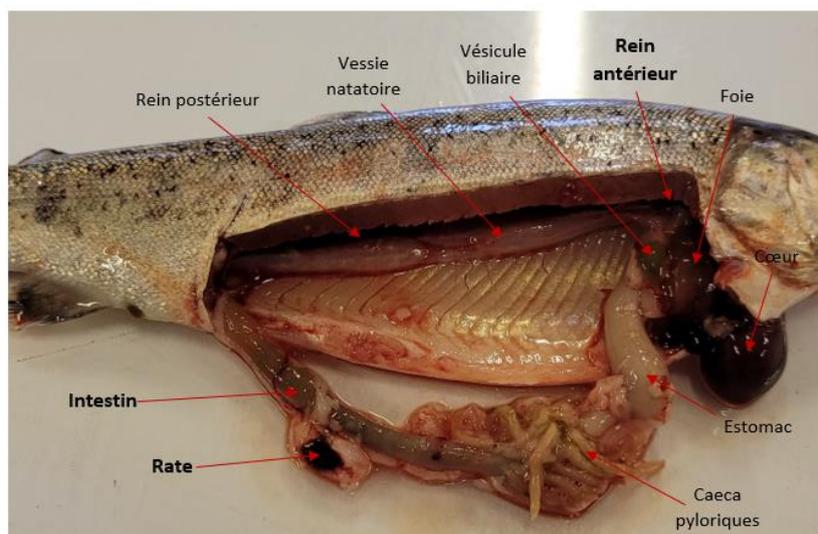


Figure 6: Dissection d'une truite arc-en-ciel de 65g. Les organes de l'immunité sont affichés en gras.

2- Les effecteurs de l'immunité

2.1- Immunité innée

2.1.1 - Barrières épithéliales et mucus

Les principales voies d'entrée des agents pathogènes, en contact avec l'eau du milieu, sont tapissées d'*epithelia*, offrant ainsi une barrière entre les fluides de l'animal et les fluides du milieu extérieur. Cela passe notamment par la continuité de l'épithélium, via les jonctions cellulaires entre les différentes cellules épithéliales (et ce, pour chaque couche de l'épithélium) (Jutfelt 2011).

En plus de cet obstacle physique, d'autres moyens de défense existent également : pour un agent pathogène entrant par le système digestif du poisson, celui-ci doit survivre à l'acidité naturelle de l'estomac, au péristaltisme, ou encore aux nombreuses bactéries commensales tapissant le tube digestif, avec qui il entre alors en compétition pour occuper l'espace et pour l'utilisation des nutriments (Jutfelt 2011).

Le mucus sécrété par les différents *epithelia* (que cela soit au niveau de la peau, des branchies ou du tube digestif), possède également un rôle très important dans la protection face aux agents pathogènes : il protège l'épithélium sous-jacent d'éventuelles abrasions qui représenteraient des portes d'entrée pour virus, bactéries et champignons. Sa viscosité, assurée par sa richesse en mucine, offre également une barrière directe aux agents pathogènes qui s'ajoute à l'effet barrière de l'épithélium (Jutfelt 2011). La composition du mucus permet également une protection chimique contre les agents pathogènes : il contient notamment des peptides antimicrobiens, des molécules du complément, des acides gras ou encore des enzymes et d'autres molécules à propriétés antimicrobiennes telle la transferrine (Dash et al. 2018; Subramanian et al. 2007 ; Ong et al. 2006; Uribe et al. 2011).

2.1.2 -Cellules de l'immunité innée

Les cellules immunitaires des poissons sont très similaires (tant dans leur morphologie que dans leurs fonctions) à celles des vertébrés plus évolués : on retrouve des monocytes et macrophages mais aussi des granulocytes (éosinophiles, neutrophiles...) (Levraud & Boudinot 2009).

Les macrophages sont les cellules phagocytaires les plus représentées chez les téléostéens, et servent tant dans un contexte immunitaire (présentation de l'antigène et activation des lymphocytes T) que dans un contexte de nettoyage de débris cellulaires (ou à la phagocytose des érythrocytes, dans la rate). Cela s'explique notamment par le fait qu'il s'agit du type de cellule myéloïde le plus ancien parmi les Vertébrés, mais également par le fait que la phagocytose est un procédé peu influencé par la température (Levraud & Boudinot 2009, Uribe et al. 2011). On retrouve les macrophages dans les différentes couches des épithéliums, ainsi que dans la *lamina propria* (Jutfelt 2011), ce qui renforce l'effet barrière apporté par ces *epithelia*. Les mélano-macrophages représentent une sous-catégorie de ces cellules : ils forment des agrégats autour des vaisseaux sanguins, et servent notamment à la phagocytose et au stockage de divers pigments, comme la mélanine, la lipofuschine ou encore l'hémossidérine, expliquant leur forte pigmentation (Agius & Roberts 2003). Ces cellules sont également capables de phagocyter des débris cellulaires, y compris des cellules infectées ou des bactéries (Steinel & Bolnick 2017)

Les polynucléaires sont également de plusieurs types, et on retrouve *a minima* des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles chez les poissons. Ces cellules remplissent leur rôle classique de phagocytes ainsi que de dégranulation : après liaison entre la surface cellulaire et l'agent pathogène, l'exocytose des granules du neutrophile conduiront à l'explosion oxydative, via la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (peroxydes, radicaux libres...) et autres (Magnadottir 2010).

Ces cellules immunitaires fonctionnent via un système de reconnaissance entre des récepteurs présents à leur surface, les PRR (Pattern Recognition Receptors) et des motifs présents à la surface des bactéries ou dans le milieu, les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Cette liaison du récepteur à sa cible conduit à la transduction d'un signal intracellulaire via les TLR (Toll-Like Receptors), des récepteurs très conservés au sein du vivant, puis à la synthèse de molécules lançant le processus d'inflammation (Whyte 2007).

2.1.3 -Molécules de l'immunité innée

2.1.3.1- Le système du complément

Le système du complément est très développé chez les poissons Téléostéens et reconnaît même davantage d'agents pathogènes que celui des Mammifères (Levraud & Boudinot 2009). Cela pourrait s'expliquer en partie par sa grande efficacité à des températures faibles, de l'ordre de 15-25 °C, ce qui en fait un système très efficace chez des animaux poïkilothermes. Le complément peut même rester efficace à des températures de 0-4°C, et participe grandement à l'importance du système immunitaire innée par rapport au système adaptatif chez les poissons osseux (Whyte 2007).

Il peut être activé de 3 façons différentes : la voie classique, initiée par les complexes immuns antigène-anticorps, la voie alterne, initiée directement par les agents pathogènes et la voie des lectines, initiée par la liaison entre un complexe protéique et des lectines des membranes bactériennes. La voie alterne serait, chez les poissons, la voie majoritaire (Uribe et al. 2011).

Lors d'une infection bactérienne, notamment à Gram négatif, l'activation du système du complément par contact avec le LPS entraîne la production de la molécule C5a, qui est une molécule chimiotactique attirant les macrophages et les granulocytes neutrophiles (Uribe et al. 2011). En plus de cette capacité d'attraction de cellules immunitaires, la cascade du complément aboutit, comme chez les Mammifères, à la formation d'un complexe d'attaque membranaire, et donc à la lyse des bactéries ciblées (Whyte 2007).

2.1.3.2- Les cytokines

Les cytokines sont des molécules de nature protéique, de petite taille et jouent le rôle de signaux entre les cellules. Elles sont sécrétées notamment dans le cadre de l'immunité, en réponse à un stimulus. Malgré quelques difficultés à caractériser les cytokines présentes chez les poissons Téléostéens, il apparaît que toutes les familles de cytokines sont représentées (Levraud & Boudinot 2009; Whyte 2007).

Les interleukines (IL) et leurs homologues sont présents chez les poissons osseux, y compris chez la truite arc-en-ciel. Ces molécules ont principalement un rôle de régulation positive ou négative du système immunitaire (Whyte 2007). Parmi certaines interleukines identifiées chez les poissons, on retrouve, à titre d'exemple, l'IL-1 β , l'IL-8 ou encore l'IL-6. Leurs rôles peuvent être multiples : ainsi, l'IL-8 possède, en plus de son activité pro-inflammatoire, une activité antimicrobienne (Sáenz-Martínez et al. 2021). L'IL-6, quant à elle, régulerait positivement les phases aigües de l'immunité, ainsi que la différenciation cellulaire des leucocytes (Zante et al. 2015).

Le TNF (Tumor Necrosis Factor) est un des principaux activateurs des macrophages chez les poissons téléostéens (Uribe et al. 2011), mais également un facteur clé du début de l'inflammation (Raida, Buchmann 2009). Alors qu'on retrouve deux types de TNF chez les Mammifères (- α et - β), il apparaît que les TNF des poissons téléostéens sont plus proches des TNF- α des Mammifères. La présence d'un unique type de TNF impliquerait un rôle plus polyvalent des TNF- α chez les Téléostéens que chez les vertébrés plus évolués (Whyte 2007).

Les chimiokines sont des molécules sécrétées par plusieurs types cellulaires, notamment les cellules dendritiques et les macrophages présents dans le tissu infecté, et servent à recruter les cellules immunitaires et à les guider vers le site d'entrée du pathogène. Elles ont également un rôle dans le passage de l'immunité innée à l'immunité acquise, en permettant aux cellules dendritiques présentatrices d'antigène d'arriver jusqu'aux tissus lymphoïdes (Whyte 2007).

2.2- Immunité adaptative

Les poissons Téléostéens présentent une immunité adaptative moins développée et essentielle que leur immunité innée : l'absence d'immunité adaptative chez certains individus mutés en laboratoire ne semble pas porter préjudice aux animaux, qui s'élèvent relativement facilement en animalerie. Néanmoins, ils restent la première branche de Vertébrés possédant une immunité innée et acquise (Tongsri et al. 2020), et possèdent tous les éléments cellulaires pour sa mise en œuvre (Levraud & Boudinot 2009). Une explication plausible du manque d'efficacité et de répondeur de l'immunité adaptative face à l'immunité innée reste la nature poïkilotherme des poissons, et leur vie dans une eau froide (comparativement à la température d'un animal homéotherme), la température étant un frein aux divisions cellulaires.

2.2.1- Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques représentent un lien nécessaire au passage d'une immunité innée à une immunité adaptative. En effet, ces cellules de l'immunité innée présentent certains antigènes des agents pathogènes qu'elles ont phagocytés et les présentent ensuite aux lymphocytes T naïfs. Leur présence a longtemps été suspectée chez les poissons, avec la découverte du marqueur cellulaire CD83, marqueur typique des cellules dendritiques chez les Mammifères (Collet 2014). Les cellules dendritiques des poissons osseux ont été montrées comme similaires à celles des Mammifères : elles présentent une structure arborescente leur permettant de capter et phagocyter des particules virales ou bactériennes, ont une capacité de migration d'un tissu à un autre et sont stimulables avec des molécules se liant aux TLR (Bassity & Clark 2012).

Les cellules dendritiques sont présentes au niveau des barrières muqueuses : elles ont été identifiées au niveau des branchies, de la peau, et également dans la *lamina propria* intestinale. Les populations cellulaires intestinales semblent cependant plus immatures que leurs homologues de la peau et des branchies. Des études supplémentaires sur l'interaction entre cellules dendritiques et lymphocytes naïfs au niveau de cet épithélium semblent donc nécessaires (Soletto et al. 2019).

2.2.2 - Lymphocytes B et anticorps

Les lymphocytes B sont des cellules immunitaires capables de se différencier, après prolifération, en plasmocytes et de sécréter des anticorps. Elles possèdent des immunoglobulines à leur surface (les BCR : B-Cell Receptors) capables de se lier à des antigènes, qu'ils soient viraux ou bactériens. Chez les poissons Téléostéens, ces cellules possèdent également des capacités de phagocytose et de lyse des bactéries : ce sont donc des cellules polyvalentes, tant dans l'immunité innée qu'acquise (Li et al. 2006). Aucune commutation isotypique n'a jamais été observée chez les poissons, et même si les lymphocytes B subissent un phénomène d'hypermutation somatique, l'affinité des anticorps reste relativement faible par rapport à celle des anticorps de Mammifères (Levraud & Boudinot 2009).

Les anticorps des poissons Téléostéens sont différents de ceux rencontrés chez les Mammifères : en effet, jusqu'à présent, seules trois chaînes lourdes ont été identifiées (μ , δ et τ donnant respectivement IgM, IgD et IgT), ainsi que quatre chaînes légères (κ , λ , σ et σ -2).

Les immunoglobulines M (IgM) sont, de la même façon que chez les Vertébrés plus évolués, exprimées sous une forme monomérique à la surface des lymphocytes ainsi que sous une forme polymérique (plus exactement un tétramère) dans le sérum. La forme tétramérique est la forme la plus représentée dans le sérum des poissons et tient sa configuration à la présence de ponts disulfures au sein des sous-unités ainsi qu'entre elles. Cette forme a également la particularité d'activer de façon plus efficace la voie classique du complément, par rapport à la forme monomérique (Uribe et al. 2011).

Les immunoglobulines D (IgD) sont des immunoglobulines monomériques présentes quasi-exclusivement à la surface des lymphocytes sécrétant des IgM, conjointement avec d'autres IgM présentes sur la membrane cellulaire (Levraud & Boudinot 2009). La truite arc-en-ciel est une exception et présente des lymphocytes sécrétant uniquement des IgD (Pettinello & Dooley 2014). Le rôle de ces immunoglobulines reste flou, mais des essais avec des IgD de poisson-chat suggèrent une interaction avec des récepteurs à la surface des granulocytes basophiles induisant la sécrétion de molécules pro-inflammatoires, antimicrobiennes et stimulant la prolifération de lymphocytes B (Pettinello & Dooley 2014).

Les immunoglobulines T (IgT) sont les derniers isotypes découverts chez les Téléostéens. De par leur faible proportion dans le sérum (sous forme monomérique), mais leur omniprésence au niveau des muqueuses (sous forme polymérique, sans liaison covalente), ils s'apparentent aux immunoglobulines A des Mammifères sur le plan fonctionnel. On retrouve des IgT au niveau de la lumière intestinale, où ils sont transportés via l'action de récepteurs spécifiques, ainsi qu'au niveau du MALT (Pettinello & Dooley 2014). Elles représentent la clé de voûte de l'immunité adaptative au vu du contact constant et prononcé des muqueuses (en particulier les branchies et les voies nasales) avec l'environnement, et pourraient engendrer une immunité systémique en plus d'une immunité locale (Dong et al. 2020).

2.2.3- Lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des lymphocytes ayant mûri dans le thymus, et sont responsables de la composante cellulaire de l'immunité spécifique. De la même façon que chez les Vertébrés plus évolués, on reconnaît deux sous-populations de lymphocytes T : les lymphocytes cytotoxiques, exprimant l'équivalent du marqueur CD8 et induisant l'apoptose des cellules infectées par des bactéries ou des virus, et les lymphocytes auxiliaires exprimant le marqueur CD4, permettant de réguler l'immunité adaptative. Ces cellules possèdent toutes des récepteurs TCR (T-Cell Receptors) à leur surface. Ces récepteurs sont capables de se lier à des antigènes présentés par diverses cellules via leur CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) et d'induire diverses actions via la cascade de transduction. Il convient de noter que les poissons Téléostéens et les Elasmobranches (une branche des poissons cartilagineux comprenant les raies et les requins) sont les premiers Vertébrés à présenter des molécules de CMH et de TCR sur les cellules (Uribe et al. 2011). Les lymphocytes T sont présents, tout comme les lymphocytes B, dans la majorité des organes de l'immunité, mais également au niveau des interfaces avec l'environnement aquatique, dont la peau.

2.2.4- Notion de mémoire immunologique chez les poissons Téléostéens

Comme vu précédemment, l'immunité des Poissons osseux est complexe et plus primitive que celle des Vertébrés plus évolués. Il reste beaucoup à apprendre sur son fonctionnement et, malgré l'efficacité des vaccins et leur large utilisation en système de production, il y a toujours de nombreux flous sur la notion de mémoire immunologique chez ces animaux. Son existence a cependant été démontrée : les poissons osseux présentent une réponse immunitaire plus forte après une première exposition à l'agent pathogène cible. De même, des sujets naïfs à qui l'on a injecté les cellules immunitaires d'animaux ayant déjà rencontré l'agent pathogène répondront mieux et plus rapidement à une infection par ce même agent que des sujets naïfs n'ayant reçu aucune cellule. L'immunité post-vaccinale dure cependant moins longtemps chez les Téléostéens que chez les Mammifères. Cette mémoire passerait par les lymphocytes T et B, mais les macrophages et les cellules NK auraient également une fonction dans l'établissement de celle-ci. Plus particulièrement, les agrégats de mélanomacrophages possèdent une capacité de rétention d'antigènes : des antigènes d'*Aeromonas hydrophila* ont ainsi été retrouvés un an après infection dans ces agrégats chez la carpe commune *Cyprinus carpio* (Lamers, De Haas 1985). L'ensemble des mécanismes conduisant à la mémoire immunologique reste cependant à déterminer (Stosik et al. 2021 ; Yamaguchi et al. 2019).

B- La vaccination, une application de l'immunité

1- Généralités sur la vaccination

La vaccination est un principe consistant à stimuler l'immunité adaptative (cellulaire et humorale), ainsi que la mémoire immunitaire, de l'animal cible en lui présentant des antigènes via l'agent infectieux sous une forme moins voire non pathogène ou des composants de cet agent. Chez les Mammifères (et en particulier chez l'homme), la composante humorale de l'immunité post-vaccinale est davantage connue que la composante cellulaire. A la suite d'une première stimulation des lymphocytes T et B par le vaccin, un processus de mémoire immunologique se met en place, permettant à l'organisme vacciné de répondre plus rapidement et plus efficacement lors d'une infection par l'agent infectieux sous forme pathogène. Celui-ci passe par l'induction de cellules mémoires et de plasmocytes à longue durée de vie (Carcelin et al. 2018).

Contrairement aux espèces homéothermes, la température est un point crucial lors de la vaccination des poissons : en effet, la réponse immunitaire (en particulier l'immunité adaptative) des poïkilothermes est plus lente à se mettre en place à faible température. La prise vaccinale sera ainsi plus efficace au plus près de l'optimum thermique de l'espèce vaccinée, mais restera plus longue chez les espèces d'eau froide que chez les espèces d'eau chaude (Sommerset et al. 2005). De même, une vaccination réalisée à l'optimum thermique permettra une réponse plus rapide et efficace lors d'une infection en eau plus froide (Hoare et al. 2017).

La vaccination des poissons d'élevage est un phénomène relativement récent. En effet, le premier vaccin commercial date de 1976 : il s'agissait d'un vaccin commercialisé aux Etats-Unis contre la yersiniose à *Yersinia ruckeri* chez les Salmonidés (Gudding & Van Muiswinkel 2013). Aujourd'hui, il existe 34 vaccins commerciaux disponibles dans le monde (cf. **Annexe 1**), dont 19 concernent au moins une espèce de salmonidés (Shefat 2018).

2- Les modalités de vaccination chez les poissons

2.1- La vaccination par injection

La vaccination par injection est la voie se rapprochant le plus des vaccins majoritairement utilisés chez les Mammifères. Les animaux sont anesthésiés avant d'être manipulés individuellement pour l'injection intrapéritonéale, qui se fait crânialement par rapport à l'orifice urogénital (cf. **Figure 7**). Cette méthode est lourde de manipulations et nécessite un matériel spécifique. Elle n'est pas sans risque pour le manipulateur, qui peut se piquer et s'injecter l'antigène par inadvertance. Enfin, c'est une méthode stressante pour les poissons, ce qui peut impacter négativement les défenses immunitaires. Afin de limiter les manipulations humaines, des machines à injecter ont été mises au point. Ces machines ont des degrés d'automatisation variables : certaines réalisent elles-mêmes l'injection alors que d'autres ne font que présenter convenablement le poisson à l'opérateur la réalisant.

Les injections intramusculaires ou sous-cutanées sont également possibles, mais peu utilisées en pratique de par les pertes économiques liées aux réactions vaccinales au point d'injection (les animaux sont déclassés et considérés comme non consommables à l'abattoir) (Quentel et al. 2007). Ces réactions peuvent néanmoins se retrouver aussi avec les injections intrapéritonéales : on peut alors retrouver des lésions au point d'injection, des granulomes intrapéritonéaux, des adhérences ou encore de la mélanose (Midtlyng et al. 1996 ; Poppe & Breck 1997). Afin de réduire les injections, et donc les

manipulations, il est possible de mettre plusieurs valences au sein d'un même vaccin. Des essais ont montré qu'un vaccin expérimental contenant 5 valences entraînait la même protection chez la truite arc-en-ciel que lorsque les animaux étaient vaccinés avec des vaccins mono ou bivalents (Marana et al. 2019).



Figure 7: Vaccination intrapéritonéale chez de jeunes saumons Atlantique (*Salmo salar*). Les animaux ont été au préalable anesthésiés (Somerset et al. 2005).

2.2- La vaccination par balnéation

Cette méthode est la plus facilement utilisable pour les larves et les alevins. Elle consiste à baigner les animaux pendant un temps donné dans un bac contenant la solution vaccinale, à une concentration précise et connue. L'entrée de l'agent vaccinal se fait alors principalement par les branchies, mais aussi par la peau ainsi que par la muqueuse nasopharyngée. Comme vu précédemment, ces zones sont bordées par du tissu lymphoïde, le MALT. Bien que les animaux doivent également être manipulés pour réaliser cette vaccination, des processus semi-automatiques voire automatiques existent de nos jours, réduisant ainsi la pénibilité de cette tâche.

Des méthodes par immersion dans un liquide hyper-osmotique, permettant une entrée rapide de l'agent vaccinal dans le sang, étaient auparavant utilisées mais ont été abandonnées étant donné les effets néfastes observés sur les branchies des poissons (Quentel et al. 2007). Une alternative possible, à mi-chemin entre la balnéation et l'injection, est l'utilisation de patchs solubles contenant des microaiguilles chargées d'antigènes. Ces microaiguilles créent de petites lésions sur la peau du poisson et permettent l'entrée du vaccin. L'utilisation de cette méthode montre des résultats prometteurs et similaires à ceux obtenus après une vaccination par injection (Yun et al. 2020). Cette nouvelle méthode a néanmoins des limites : la charge de travail nécessaire est similaire à la vaccination par injection intrapéritonéale, et nécessite la manipulation individuelle d'animaux de taille suffisante.

2.3- La vaccination par voie orale

Le vaccin est directement incorporé dans l'aliment des animaux. A la prise alimentaire, l'agent vaccinal entre en contact avec le GALT présent au niveau des intestins. Contrairement aux deux autres méthodes, celle-ci n'implique aucune manipulation des animaux et donc aucun stress. Elle est également facilement réalisable par l'éleveur et ne nécessite pas de main d'œuvre supplémentaire ou de temps dédié à cette activité. Cependant, cette voie de vaccination reste bien moins efficace que

l'injection intrapéritonéale ou la balnéation, du fait de la destruction des antigènes dans le tube digestif (Sommerset et al. 2005). Cette fragilité des antigènes peut cependant être contrée par l'encapsulation de ces derniers (en utilisant des biofilms, des artémies ou des composés dérivés d'algues), ce qui permet de les protéger de l'acidité stomacale (Mutoloki et al. 2015). En plus de la dégradation des antigènes par le milieu stomacal acide, le tube digestif est un milieu tolérogène : les antigènes n'induiront pas forcément de réponse immunitaire (Mutoloki et al. 2015). Ceci est encore plus vrai chez les jeunes animaux (Embregts & Forlenza 2016) Enfin, il existe également un biais entre les animaux : chaque animal n'ingère pas la même quantité de nourriture et la quantité d'antigène ingérée par animal reste difficilement quantifiable. De la même façon, la manière qu'a l'opérateur d'incorporer le vaccin à l'aliment peut rendre la disponibilité de celui-ci hétérogène : en effet, si le vaccin est aspergé (lorsqu'il est sous forme liquide) ou mélangé à de l'huile et à l'aliment (lorsqu'il est sous forme de poudre), il peut ne pas se répartir uniformément sur la nourriture si le mélange est mal réalisé (Mutoloki et al. 2015).

3- Les différents types de vaccins

3.1- Les vaccins inertes

3.1.1- Les vaccins inactivés

Les vaccins inactivés sont composés d'agents pathogènes, principalement bactériens, inactivés par des processus physiques comme la chaleur ou le formol (Carcelin et al. 2018). L'agent vaccinal perd donc ses capacités infectantes ou de réplication chez l'animal vacciné. Ces vaccins sont souvent complétés par des adjuvants, afin d'augmenter leur efficacité immunogène. Chez les poissons, ils sont principalement utilisés en injection ou par balnéation contre des agents pathogènes bactériens. Le premier vaccin commercialisé en pisciculture était un vaccin inactivé contre la yersiniose à *Yersinia ruckeri*. Les vaccins inactivés restent aujourd'hui les plus utilisés en production piscicole contre les maladies bactériennes (Ma et al. 2019). Des essais ont eu lieu pour vacciner les animaux contre des virus en utilisant des vaccins inactivés, mais les vaccins produits avaient malheureusement un coût de production trop élevé (Quentel et al. 2007).

3.1.2- Les vaccins sous-unitaires

Les vaccins sous-unitaires sont des vaccins produits via des cultures bactériennes génétiquement modifiées (avec des recombinants portant l'ADN de l'antigène) permettant la production d'antigène pur, directement administré à l'animal (Quentel et al. 2007). Ils peuvent également être produits directement par l'agent pathogène d'intérêt puis être purifiés afin d'être utilisables pour la confection des vaccins (Ma et al. 2019). Ces vaccins sous-unitaires ne peuvent pas se répliquer dans l'hôte ou chez la faune sauvage : ils sont donc une alternative intéressante aux vaccins vivants atténués cités dans le paragraphe II.B.3.2.1. La réponse immunitaire suivant leur administration a cependant tendance à être plus faible qu'un vaccin inactivé ou vivant. Ces vaccins nécessitent donc fréquemment l'emploi d'adjuvants. Il existe plusieurs vaccins commerciaux utilisant ce procédé, dont un vaccin contre la nécrose pancréatique infectieuse en Norvège. Du fait d'un coût de production parfois élevé, les vaccins sous-unitaires ont du mal à se développer dans le secteur de la pisciculture, où la valeur individuelle des animaux est parfois trop basse (selon l'espèce) pour justifier leur utilisation (Ma et al. 2019).

3.1.3- Les vaccins à acides nucléiques

Les vaccins à ADN sont des vaccins permettant d'obtenir uniquement l'antigène d'intérêt. Le vaccin est composé, en général, de plasmides bactériens contenant de l'ADN viral (servant de promoteur) et de l'ADN codant pour l'antigène d'intérêt (Ringø et al. 2014). L'ADN, une fois injecté à l'animal, entrera dans ses cellules et permettra la production de l'antigène qui, étant reconnu comme n'appartenant pas au soi, sera présenté sur les molécules du CMH. Un vaccin à ADN existe au Canada, afin de protéger les élevages de saumon de l'Atlantique contre la maladie du pancréas (causée par un alphavirus) (Adams 2019). Des essais ont été réalisés chez la truite arc-en-ciel et ont montré l'efficacité de ces vaccins à induire une réponse immunitaire contre les virus de la septicémie hémorragique virale, de la nécrose hématopoïétique infectieuse ou encore de la nécrose pancréatique infectieuse (Puente-Marin et al. 2019; Xu et al. 2017).

Les vaccins à ARNm (ARN messenger) sont également en plein développement. Ils consistent à injecter de l'ARNm codant pour les antigènes d'intérêt. L'ARN, une fois entré dans les cellules de l'animal vacciné, sera directement traduit et induira la formation des protéines antigéniques de l'agent pathogène contre lequel on cherche à protéger l'animal. Ces vaccins sont considérés comme plus sûrs que les vaccins à ADN du fait de l'impossibilité de l'ARN à s'insérer dans le génome et de la dégradation rapide de cette molécule dans la cellule (Ma et al. 2019). Néanmoins, la dégradation facile de cette molécule ainsi que son instabilité ont été pendant longtemps des limites à son utilisation pour la vaccination. Plusieurs améliorations ont cependant été mises en place, notamment une augmentation de la stabilité de la molécule, et des vaccins de cette catégorie sont dorénavant utilisables. Ainsi, les premiers vaccins contre le virus SARS-CoV2, responsable de la pandémie COVID de 2019, sont des vaccins à ARNm (Park et al. 2021). Même s'il n'existe pour l'instant aucun vaccin à ARN commercialisé en médecine vétérinaire, cette piste reste très prometteuse pour certaines maladies, comme la fièvre aphteuse ou la rage (Le et al. 2022) et on peut penser que cette technologie se déploiera en aquaculture dans les prochaines années.

3.2- Les vaccins vivants

3.2.1- Les vaccins vivants atténués

Les vaccins vivants atténués sont en majorité des vaccins protégeant contre des virus. Les souches atténuées sont obtenues soit via une souche mutante non virulente, soit par passage successif de l'agent sur des cultures cellulaires. Des manipulations génétiques permettant la délétion de gènes aboutissent également à l'obtention de souches atténuées. Des chercheurs ont ainsi réussi à obtenir des souches d'*Edwardsiella ictaluri* atténuées par délétion d'un gène codant pour un composant du système de sécrétion de type 6 de la bactérie (Kordon et al. 2019). L'agent atténué ainsi injecté mime l'infection par une souche sauvage, colonise l'organisme de l'animal et induit donc une réponse immunitaire. Ce type de vaccination a aussi l'avantage d'induire une réponse immunitaire cytotoxique protectrice contre les agents infectieux intra-cellulaires. Cependant, étant donné sa multiplication dans l'organisme, l'agent vaccinal (qu'il soit viral ou bactérien) peut tout à fait retrouver un certain pouvoir pathogène et engendrer une maladie, ou encore se répandre dans l'environnement. Ces caractéristiques font que les vaccins vivants atténués sont peu utilisés en pisciculture, les systèmes de production actuels étant rarement fermés (Quentel et al. 2007). Il existe cependant un vaccin vivant contre l'edwardsielliose (*Edwardsiella ictaluri*), utilisé aux Etats-Unis chez le barbu de rivière *Ictalurus*

punctatus, ainsi qu'un vaccin vivant contre l'herpesvirose de la carpe en Israël (Adams 2019; Kordon et al. 2019; Bergmann et al. 2020).

3.2.2- Les vaccins vectorisés

Les vaccins vectorisés permettent, via l'utilisation d'un vecteur bactérien ou viral portant le gène de l'antigène d'intérêt, de mimer une infection sans utiliser l'agent pathogène contre lequel on cherche à vacciner. Ils sont donc une alternative intéressante aux vaccins vivants atténués. Les vaccins vectorisés les plus communs sont basés sur le génome d'un alphavirus, un virus à ARN, qui leur confère la capacité de se répliquer dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ce système de réplication intracellulaire permet donc d'avoir une grande quantité d'antigène synthétisée à partir d'une faible quantité de virus injectée. L'existence d'un alphavirus chez les Salmonidés (le virus de la maladie du pancréas) semblable aux alphavirus utilisés pour la confection des vaccins à ARN à destination des Mammifères ouvre les portes à l'utilisation de vaccins de ce type en milieu piscicole (Ma et al. 2019).

3.3- Les adjuvants

Les adjuvants sont des substances permettant d'amplifier la réponse vaccinale, en augmentant notamment la réponse immunitaire innée, voire de réduire la quantité d'antigènes et le nombre de doses nécessaires (Carcelin et al. 2018). On distingue les adjuvants jouant directement sur la présentation de l'antigène (en augmentant le temps de diffusion de l'antigène par exemple) et les adjuvants stimulant le système immunitaire parallèlement à la reconnaissance de l'antigène. Ces co-stimulations permettent *in fine* de moduler et d'amplifier la réponse immunitaire après présentation de l'antigène (Adams 2016). Parmi les adjuvants rencontrés dans les vaccins pour les truites arc-en-ciel, on trouve par exemple le Montanide ISA-763 A, un adjuvant huileux augmentant l'efficacité et la stabilité de la préparation vaccinale, dans le vaccin ICHTIOVAC-LG contre la lactococcose de la truite (ANSES 2022; Adams 2016). L'utilisation d'adjuvants peut néanmoins provoquer des effets secondaires chez les animaux vaccinés, d'autant plus lorsque le vaccin est sous forme injectable : on retrouve fréquemment des adhérences, des pigmentations ou des granulomes au sein de l'abdomen ou encore des réactions locales au point d'injection. Ces lésions sont plus fréquemment retrouvées lors de l'emploi d'adjuvants huileux (Noia et al. 2014).

4- Vaccins utilisés chez la truite arc-en-ciel

4.1- Vaccins commerciaux

En France, il existe six vaccins avec AMM pour la truite arc-en-ciel. Tous ces vaccins sont des vaccins inactivés, et ils concernent tous des maladies bactériennes : trois vaccins protègent contre *Yersinia ruckeri*, l'agent étiologique de la maladie de la bouche rouge, deux autres concernent *Vibrio anguillarum* (sérotypes I et II) et le dernier protège contre *Lactococcus garvieae*. Ce dernier est d'ailleurs le seul vaccin adjuvé parmi les vaccins disponibles en France pour la truite arc-en-ciel. Ces trois valences existent sous forme injectable (par voie intra-péritonéale), mais seules les valences vibriose et yersiniose peuvent être administrées par balnéation, lors de la primo-vaccination. Un rappel par voie orale, en distribuant le vaccin avec l'alimentation, est possible pour la yersiniose. Chez la truite arc-en-ciel, l'immunité se développera au bout de 336 degrés jours (soit 28 jours à 12°C) après vaccination avec une de ces spécialités (sauf pour le vaccin contre la lactococcose, l'immunité ne se mettant en place qu'au bout de 420 degrés jours) et durera de 4 à 6 mois, selon la température de l'eau (ANSES 2022).

4.2- Autovaccins

Les valences bactériennes non couvertes par les vaccins disponibles en France peuvent faire l'objet de la création d'un auto-vaccin : en effet, l'utilisation d'un auto-vaccin est possible si le couple agent pathogène/espèce animale concernée ne dispose d'aucun vaccin disponible ayant une AMM en France, même si un autre vaccin peut être importé, car sa prescription entre dans le cadre de la cascade (Code de la santé publique 2021). De même, il n'est pour l'instant possible de concevoir un auto-vaccin en France que pour des maladies bactériennes.

La conception d'un auto-vaccin est indissociable d'un diagnostic préalable de la maladie, ou à défaut d'une forte suspicion clinique. Des prélèvements sont ensuite réalisés dans l'élevage dans le but d'isoler et d'identifier la bactérie. On préférera alors utiliser des organes (préférentiellement ceux fortement colonisés par l'espèce bactérienne d'intérêt) d'animaux malades sacrifiés juste avant prélèvement pour éviter toute contamination par la putréfaction ou par l'environnement (SNGTV (Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires) 2017). La prescription par le vétérinaire ayant encadré le prélèvement bactérien, via la rédaction d'une ordonnance, est alors réalisable (Code de la santé publique 2010). L'auto-vaccin, réalisé à partir de la ou des souches prélevées sur le terrain, est un vaccin inactivé. Il ne peut être fourni à un élevage autre que celui chez qui l'isolement bactérien a été réalisé.

Les autovaccins sont particulièrement utiles chez les espèces de production secondaires comme les poissons. Comme vu précédemment, il existe très peu de vaccins commerciaux avec AMM en France pour la truite arc-en-ciel et ceux-ci ne couvrent pas toutes les maladies principales de cette espèce. Ainsi, il n'existe aucun vaccin commercial disponible contre la flavobactériose à *Flavobacterium psychrophilum*, une maladie pourtant majeure en élevage truiticole. Cela est aussi vrai pour la furonculose à *Aeromonas salmonicida*, une maladie affectant principalement les Salmonidés comme la truite et posant problème en élevage français.

III- La furonculose à *Aeromonas salmonicida*

A- Agent pathogène et facteurs de virulence chez les Salmonidés

1- L'agent bactérien de la furonculose

Les bactéries du genre *Aeromonas* sont des bacilles de 1 à 3 µm, Gram négatif, anaérobies facultatives et non sporulées. Elles appartiennent à la classe des *Gammaproteobacteria*, à l'ordre des *Aeromonadales* et à la famille des *Aeromonadaceae*. Le genre *Aeromonas* comprend 32 espèces identifiées à ce jour, dont *Aeromonas salmonicida* et *Aeromonas hydrophila* représentent les espèces les mieux connues. Ces bactéries se trouvent très majoritairement en milieu aquatique et sont le plus souvent des agents pathogènes opportunistes, se développant chez des animaux fragilisés (par le stress en condition d'élevage, par exemple)(Gonçalves Pessoa et al. 2019).

Aeromonas salmonicida, l'agent bactérien responsable de la furonculose (ou septicémie hémorragique) de la truite, est une bactérie psychrophile non motile capable de se développer convenablement entre 22 et 25 °C. Cette bactérie se divise en plusieurs sous-espèces : *A. salmonicida subsp. salmonicida*, *A. salmonicida subsp. achromogenes*, *A. salmonicida subsp. masoucida*, *A. salmonicida subsp. smithia* et *A. salmonicida subsp. pectinolytica*. *A. salmonicida subsp. salmonicida*

représente cependant l'agent principal de la furonculose chez les Salmonidés, les autres sous-espèces étant considérées comme des agents atypiques (Menanteau-Ledouble et al. 2016). Contrairement aux autres espèces du genre *Aeromonas* comme *Aeromonas hydrophila*, une espèce ubiquiste touchant de nombreuses espèces de poissons, *A. salmonicida* est aussi capable d'infecter des animaux en bonne santé (Reith et al. 2008). *A. salmonicida* atteint préférentiellement les Salmonidés (même si d'autres genres peuvent être touchés, comme les Cyprinidés).

Cette bactérie est facilement cultivable sur la plupart des milieux nutritifs, y compris la gélose au sang ou la gélose tryptone soja. On obtient alors, après 48 heures entre 22 et 25°C, de petites colonies circulaires surélevées et translucides. Les colonies d'*A. salmonicida subsp salmonicida* ont également la particularité de produire un pigment brun, parfois non décelable avant 10 jours de croissance (Roberts 2012). Ce critère reste cependant insuffisant pour identifier la bactérie, d'autres espèces (comme *A. hydrophila*, *A. media* ou *Pseudomonas spp.*) pouvant produire un pigment similaire. Les autres sous-espèces d'*A. salmonicida* peuvent également ne produire aucun pigment. L'identification de la bactérie doit donc être confirmée par l'utilisation de tests biochimiques, immunologiques, ou moléculaires comme la PCR ou le MALDI-TOF. L'association de l'ensemble de ces types de test reste préférable, les sous-espèces atypiques d'*A. salmonicida* pouvant fausser les résultats des tests biochimiques (Noga 2010).

2- Facteurs de virulence

2.1- La couche S (A-layer)

La couche S (ou A-layer en anglais, pour Additional protein layer) est retrouvée chez la plupart des souches pathogènes d'*A. salmonicida* et recouvre la bactérie en quasi-totalité. Cette couche protéique permet à la bactérie d'adhérer aux cellules de son hôte, en particulier les macrophages. Elle possède également un rôle de défense de la bactérie en lui permettant d'échapper aux bactériophages ou encore aux mécanismes de cytotoxicité cellulaires (Dallaire-Dufresne et al. 2014; Bjornsdottir et al. 1992). Ce facteur de virulence n'est pas indispensable pour obtenir une souche pathogène, mais sa présence coïncide avec de fortes capacités hémolytiques et donc des lésions plus prononcées et une mortalité plus précoce chez les animaux touchés (Beaz-Hidalgo, Figueras 2013).

2.2- Le LPS

Le LPS (LipoPolySaccharide) est une toxine retrouvée dans la membrane externe des bactéries Gram négatif. Cette toxine est composée de trois parties distinctes : l'antigène-O (propre à chaque espèce bactérienne et induisant une réponse immunitaire adaptative), le core (qui est un oligosaccharide) rattaché au lipide A. Ce lipide A permet la fixation du LPS à la membrane bactérienne et représente l'agent de toxicité du LPS. (Beaz-Hidalgo & Figueras 2013).

2.3- Système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III correspond à un complexe protéique en forme d'aiguille (lui donnant également le nom d'injectisome) permettant le passage de protéines ou de toxines du cytoplasme bactérien à celui de la cellule-hôte. Le système de sécrétion de type III est formé par l'ensemble d'une vingtaine de protéines différentes (Frey & Origi 2016). Sa structure est schématisée dans la **Figure 8**.

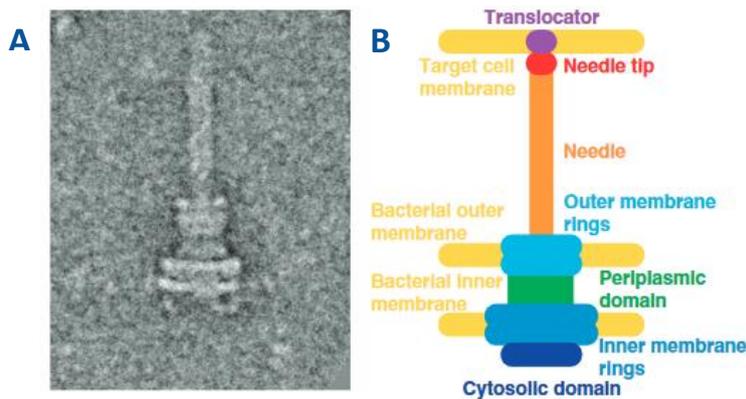


Figure 8 : système de sécrétion de type III purifié vu au microscope électronique à transmission (A) et schéma simplifié correspondant (B) (Puhar & Sansonetti 2014)

Parmi les toxines passant par l'injectisome, on retrouve notamment des enzymes responsables d'ADP-ribosylation des protéines de l'hôte, des tyrosine-phosphatases ou encore des kinases modifiant les acides aminés. Toutes ces modifications conduisent *in fine* à l'apoptose de la cellule (Beaz-Hidalgo & Figueras 2013; Dallaire-Dufresne et al. 2014). Ce système est essentiel à la virulence d'*A. salmonicida* : les bactéries mutées avec un système de sécrétion invalide sont incapables de provoquer une infection systémique (Burr et al. 2005). Cette mutation plasmidique apparaît notamment lorsque la bactérie est cultivée à plus de 22°C, ce qui représente une condition stressante pour la bactérie (Beaz-Hidalgo & Figueras 2013).

2.4- Produits extracellulaires

Les bactéries du genre *Aeromonas* sécrètent plusieurs types de molécules, dont des lipases, des protéases ou encore des hémolysines.

Les hémolysines, molécules capables d'engendrer la destruction de nombreuses cellules (érythrocytes, macrophages, cellules épithéliales...), induisent la création de pores dans les membranes cellulaires et donc la mort cellulaire. Elles sont un facteur de virulence important et provoquent le développement des lésions et une mortalité rapide chez la truite arc-en-ciel (Beaz-Hidalgo & Figueras 2013).

Les protéases sont, comme leur nom l'indique, des enzymes capables de dégrader les protéines. Cette faculté leur confère la capacité de dégrader le mucus des poissons infectés et ainsi de faciliter l'entrée des bactéries dans l'organisme. En plus de permettre un échappement aux défenses de l'hôte, l'action des protéases permet de libérer des nutriments pour les bactéries infectantes, facilitant ainsi leur survie (Janda & Abbott 2010).

Les lipases sont, chez *A. salmonicida*, majoritairement représentées par la glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase (GCAT), qui est omniprésente au sein du genre *Aeromonas*. La GCAT est capable d'hydrolyser les phospholipides membranaires et donc, chez le poisson, d'induire la lyse des érythrocytes (Dallaire-Dufresne et al. 2014).

2.5- Biofilm et quorum sensing

A. salmonicida est une bactérie capable d'adhérer aux supports et de s'y développer, via la formation de biofilms. Le biofilm est une structure bactérienne composée d'une population bactérienne en croissance adhérant à un support et protégée par une matrice extracellulaire polymérique produite par la colonie bactérienne. Les étapes de sa formation sont résumées dans la **Figure 9**. La matrice extracellulaire confère une capacité de résistance importante aux bactéries, que cela soit aux conditions environnementales ou encore à l'usage des antibiotiques, de par une protection mécanique mais également grâce aux modifications d'expression du génome bactérien ayant lieu dans ce biofilm (Desbois et al. 2020). La formation d'un biofilm dans l'organisme colonisé facilitera l'échappement des bactéries aux cellules immunitaires de l'hôte. Ce mécanisme d'échappement est d'autant plus efficace que les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies, comme cela peut être le cas par des conditions d'élevage stressantes (Hänsch 2012).

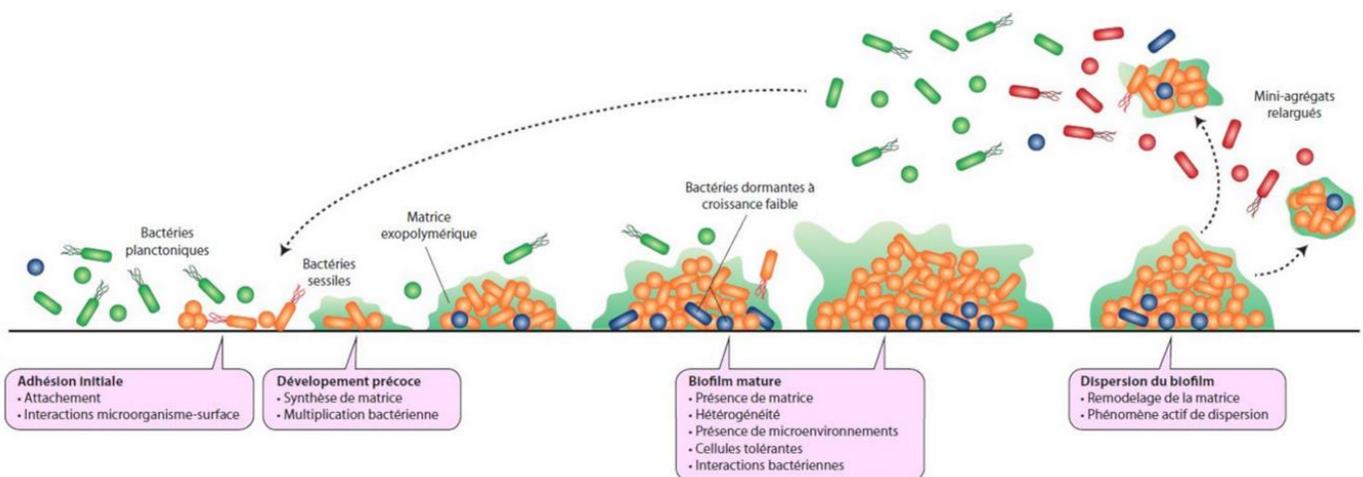


Figure 9 : Représentation de la formation d'un biofilm bactérien (Aumeran et al. 2020)

Le quorum sensing correspond à la capacité de communication de certaines espèces bactériennes via la production de molécules de faible poids moléculaire dans l'environnement. Ce moyen de communication permet de coordonner l'expression génétique ainsi que la densité de toute la population, et donc, par exemple, la synthèse des facteurs de virulence extracellulaires (Beaz-Hidalgo & Figueras 2013). Chez les bactéries Gram négatif, il existe trois systèmes de quorum sensing, qui fonctionnent tous sur le même principe : la bactérie produit une molécule appelée « auto-inducteur », détectée par les autres bactéries de la colonie via leurs récepteurs. Lorsque la densité bactérienne augmente, la concentration de l'auto-inducteur dans le milieu augmente également (Talagrand-Reboul et al. 2017). Le quorum sensing a été identifié comme étant un facteur de virulence chez *A. salmonicida* en 2011 : une souche mutante incapable de l'utiliser induisait une mortalité plus tardive chez les animaux infectés, par rapport à une souche sauvage (Schwenteit et al. 2011).

2.6- Antibiorésistance d'*Aeromonas salmonicida*

Les bactéries du genre *Aeromonas* ont une forte propension aux échanges d'éléments génétiques, y compris les gènes de résistance aux antibiotiques. Cette capacité fait qu'elles sont souvent utilisées comme indicateurs pour suivre les antibiorésistances dans les environnements aquatiques (Patil et al. 2016).

Les résultats obtenus au cours de différentes études sont cependant très variables : les phénotypes non sauvages (c'est-à-dire ayant une sensibilité inférieure à l'antibiotique par rapport à une souche sauvage) peuvent aller de 13% à 95% des souches étudiées. Les résistances au florfénicol semblent moins nombreuses : de 0 à 25% des souches présentent un phénotype non sauvage. Des résistances à l'oxytétracycline et aux sulfamides/triméthoprimine sont également mises en évidence (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) et al. 2022). L'étude du génome d'une souche d'*A. salmonicida* multi-résistante isolée dans un élevage de truite arc-en-ciel au Chili montre que 34% du génome de cette souche est similaire à celui d'*A. hydrophila*, suggérant la présence de nombreux échanges de gènes entre ces deux espèces (Valdes et al. 2015). Il convient de noter qu'*A. hydrophila* représente elle-même une source non négligeable de gènes d'antibiorésistance (Stratev & Odeyemi 2016).

Les souches d'*A. salmonicida* utilisées dans les études précédentes provenant de pays très divers, il reste difficile de généraliser ces résultats à la France, ou même à l'Europe. En France, il n'existe malheureusement pas de données d'antibiorésistance officielles, en raison du manque de représentativité des échantillons analysés. Ceci s'explique par leur faible nombre, mais également par des problèmes de méthodologie relatifs aux antibiogrammes pour *A. salmonicida* (ANSES 2021).

B- La maladie : la furunculose

1- Epidémiologie

La furunculose classique est une maladie touchant les Salmonidés (truite arc-en-ciel, saumon Atlantique *Salmo salar* ou l'omble de fontaine *Salvelinus fontinalis*...) de tout âge et causée par *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Cette maladie n'atteint pas les Salmonidés de façon égale : le saumon Atlantique est considéré comme très sensible à la bactérie, particulièrement au stade « smolt » (anglicisme désignant le jeune saumon redescendant vers la mer), alors que la truite arc-en-ciel est considérée comme plus résistante (Cipriano et al. 1994 ; Roberts 2012).

Aeromonas salmonicida est une bactérie ayant été isolée sur l'ensemble du globe (excepté l'Antarctique), mais davantage retrouvée dans les grandes zones d'élevage comme les pays scandinaves (Norvège, Suède, Finlande, Islande, Danemark), les Etats-Unis ou encore quelques pays asiatiques comme le Bangladesh. Il y a cependant peu de données disponibles concernant d'autres grands producteurs comme la Chine (CABI 2019; Roberts 2012). L'utilisation récente d'un système de génotypage des différentes souches isolées dans le monde tendrait à montrer que cette répartition mondiale viendrait des activités anthropiques, notamment via le transport de poissons vivants (Gulla et al. 2019).

2- Transmission

La furunculose se transmet par voie horizontale, majoritairement par voie orale à la suite d'une translocation intestinale mais également en pénétrant la peau, particulièrement si celle-ci est abrasée. La transmission verticale semble possible, étant donné la répartition de la bactérie dans l'ensemble

des fluides du poisson, mais reste exceptionnelle (Noga 2010; Roberts 2012). La bactérie est également présente dans le milieu, et peut survivre trois semaines dans l'eau, ainsi que trois mois dans les sédiments (RAIZO (Réseau d'Alerte et d'Information Zoosanitaire) 2018).

Les sources majoritaires, en plus de l'environnement, sont les animaux malades présentant des ulcères ou encore les animaux moribonds, qu'ils soient sauvages ou présents dans l'élevage. Des porteurs sains, ayant survécu à une première infection, peuvent également être une source silencieuse de la bactérie (Noga 2010; RAIZO (Réseau d'Alerte et d'Information Zoosanitaire) 2018).

Des conditions d'élevage stressantes pour les animaux favorisent la furunculose : une température de l'eau trop élevée, une densité trop importante, des changements alimentaires brutaux, des manipulations excessives ou encore une eau pauvre en oxygène sont d'autant de conditions facilitant l'expression de la furunculose en élevage (RAIZO (Réseau d'Alerte et d'Information Zoosanitaire) 2018; Roberts 2012; Noga 2010). Ces conditions stressantes sont néanmoins insuffisantes pour expliquer l'apparition de la maladie chez les animaux, de par la capacité d'*A. salmonicida* d'infecter des animaux sains (Reith et al. 2008).

3- Expression clinique

La furunculose se retrouve sous trois formes cliniques :

-la forme suraigüe concerne très majoritairement les très jeunes poissons, en particulier les jeunes saumons avant et pendant le stade « smolt ». Cette forme, la plus rare, conduit à une mortalité très importante parmi les alevins sans qu'il n'y ait vraiment d'autre symptôme décelable, mis à part une mélanose. A l'histologie, on observe parfois seulement une nécrose de l'endothélium atrial (Noga 2010).

-la forme aigüe, la plus commune, touche préférentiellement les jeunes animaux en croissance. Elle prend la forme d'une septicémie hémorragique sévère, avec un grand nombre d'animaux qui meurent en deux ou trois jours. Les lésions observées (**Figure 10**) sont des hémorragies, des pétéchies au niveau musculaire et des ulcérations du tégument autour des yeux et des nageoires dorsales et pectorales (Noga 2010; RAIZO (Réseau d'Alerte et d'Information Zoosanitaire) 2018).

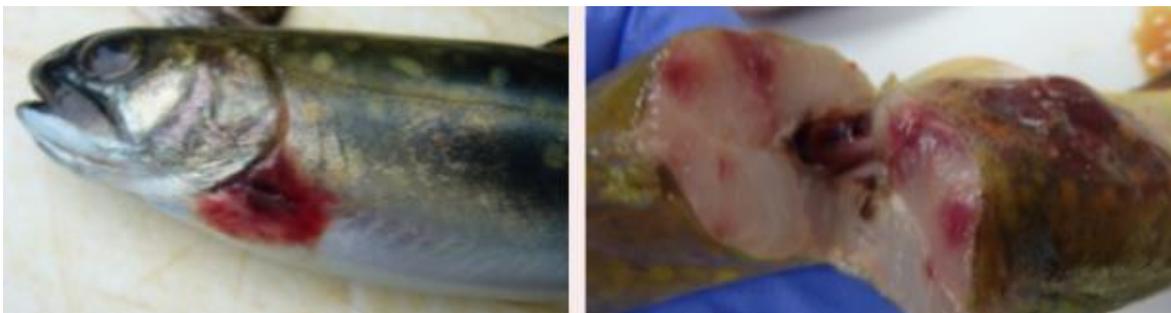


Figure 10 : Exemples de lésions visibles lors de furunculose aigüe sur des ombles de fontaine (*Salmo fontinalis*). Hémorragies à la base de la nageoire pectorale et hémorragies musculaires (RAIZO (Réseau d'Alerte et d'Information Zoosanitaire) 2018).

-la forme chronique, moins fréquente, atteint davantage les animaux adultes. Le furoncle, lésion caractéristique (mais inconstante) de la furunculose, s'observe durant cette forme de la maladie. Ces furoncles prennent la forme de tuméfactions sur le dos ou les côtés de l'animal et peuvent s'ouvrir et s'ulcérer en libérant un liquide séro-hémorragique très riche en bactéries (**Figure 11**). D'autres lésions peuvent également être observées dans la forme chronique : multiples hémorragies sur la peau, les muscles, les branchies, exophtalmie, entérite nécrotique, écoulements sanguins provenant des narines. La mortalité est moyenne à élevée (Noga 2010; Roberts 2012; RAIZO 2018).

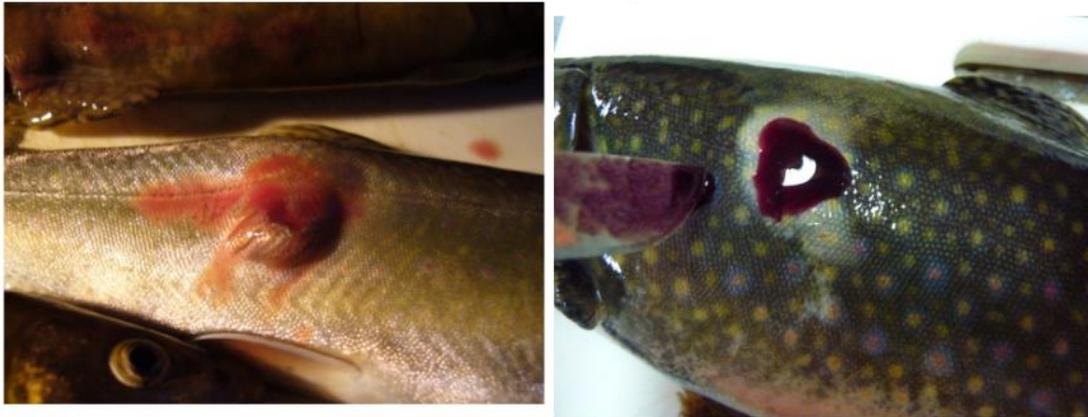


Figure 11 : Furoncles sur des ombles de fontaine (*Salmo fontinalis*) lors de forme chronique de furunculose. Noter l'aspect séro-hémorragique du contenu du furoncle après section (RAIZO (Réseau d'Alerte et d'Information Zoosanitaire) 2018).

Des aspects plus atypiques de la maladie, provenant des sous-espèces autres que *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*, sont également retrouvés, principalement chez les Cyprinidés. Chez les carpes et poissons rouges, ces bactéries atypiques provoquent notamment l'érythrodermatite, une maladie caractérisée par la présence d'abcès et d'ulcères sur la peau des animaux (Roberts 2012; Wiklund & Dalsgaard 1998).

A l'histopathologie, les lésions sont typiquement celles d'une septicémie hémorragique : on observe une nécrose des tissus, en particulier la rate, le foie et le rein avec une très faible réponse immunitaire. Des micro-colonies bactériennes très denses peuvent être retrouvées dans tous les tissus, comme dans la **Figure 12**. Les furoncles, quant à eux, sont des lésions de nécrose de liquéfaction avec un centre nécrotique riche en fibrine, bactéries, érythrocytes mais également en cellules immunitaires comme les macrophages (Roberts 2012; Bruno 2015).

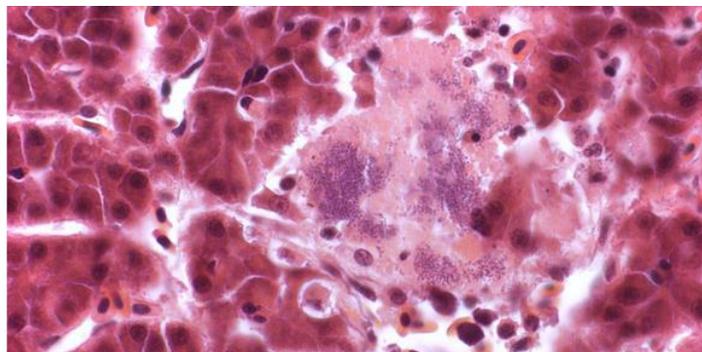


Figure 12: lésion diffuse de nécrose hépatique chez une truite arc-en-ciel, avec de nombreuses colonies bactériennes d'*Aeromonas salmonicida* au centre de la lésion. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (Bruno 2015).

4- Réponse immunitaire de l'animal

Une infection à *A. salmonicida* chez la truite arc-en-ciel active tout d'abord le processus de l'immunité innée. Le recrutement de cellules immunitaires, comme les macrophages et les polynucléaires, est très rapide (Brietzke et al. 2015). La réponse immunitaire innée de l'hôte peut cependant être exagérée : c'est l'afflux massif de macrophages et de polynucléaires neutrophiles dans l'épiderme, ainsi qu'une hyperhémie excessive conduisant à la formation d'un œdème, qui provoque l'apparition des furoncles lors de la forme chronique de la maladie, par nécrose des tissus (Roberts 2012). De plus, *A. salmonicida* possède plusieurs mécanismes d'évitement de l'immunité : certains facteurs de virulence, comme le LPS, ont par exemple la capacité d'inhiber le système du complément (Sarais et al. 2022).

La réponse immunitaire adaptative met plus de temps à se mettre en place et permettra d'obtenir *in fine* des anticorps contre la bactérie, si l'animal survit jusque-là. Les titres en anticorps obtenus peuvent alors être assez élevés, en particulier après une vaccination (Villumsen et al. 2012). La protection contre l'expression clinique de la furunculose est corrélée positivement à la quantité d'anticorps sanguins. La réponse humorale est donc une réponse efficace contre la furunculose chez les Salmonidés (Romstad et al. 2013). Cependant, même si la réponse adaptative humorale est importante et relativement bien connue, il existe très peu d'études sur la réponse adaptative cellulaire après infection ou vaccination contre *A. salmonicida* chez les Salmonidés.

La génétique de l'animal infecté est un facteur pouvant jouer sur ses capacités immunitaires. Une étude a ainsi montré qu'une famille de saumons, catégorisée comme « résistante », avec des expressions plus fortes de gènes pro-inflammatoires, présentait de meilleurs taux de survie après infection avec *A. salmonicida* qu'une famille « classique ». Ces saumons résistants présentaient également une activité basale du complément supérieure aux saumons classiques (Zhang et al. 2011). Cette composante génétique fait que la résistance aux maladies est un critère de sélection valable pour les Salmonidés.

5- Diagnostic et traitement

Le diagnostic de la furunculose ne peut se faire uniquement après observation des animaux. En effet, comme vu précédemment, le furoncle (la lésion typique de cette maladie) est d'apparition inconstante, et la maladie s'exprime par bien d'autres symptômes très peu spécifiques. Le véritable diagnostic de certitude se fera par association entre signes cliniques observés et isolement bactérien sur le rein, la rate ou les lésions internes, en prenant des échantillons sur plusieurs animaux représentatifs des mortalités (Noga 2010). De plus, l'observation de micro-colonies dans des tissus colorés à l'éosine et à l'hématoxyline (cf. **Figure 12**) est considéré comme pathognomonique (Bruno 2015).

Le traitement consiste en l'administration d'un antibiotique, le plus souvent par voie orale, *via* l'alimentation. De nombreuses molécules sont utilisables, parmi elles l'oxytétracycline, la fluméquine, l'acide oxolinique, le florfenicol ou encore l'amoxicilline (Smith 2019). L'enrofloxacin est également utilisable, mais son appartenance à la famille des fluoroquinolones en fait un antibiotique critique, et son utilisation est donc strictement réglementée. En France, seuls l'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline possèdent une AMM pour la truite (ANSES 2022). Ce traitement antibiotique ne suffit pas à lui seul et ne se substitue pas à des mesures d'hygiène basiques, comme le fait d'éliminer

quotidiennement les poissons morts et les animaux moribonds, qui représentent une source importante de la bactérie au sein de l'élevage (Noga 2010).

C- La vaccination contre la furunculose : enjeux

1- Les moyens de vaccination disponibles

Les vaccins contre la furunculose existent et sont omniprésents dans les grands bassins de production de Salmonidés comme la Norvège. Un vaccin était commercialisé dès les années 80 mais ne fut pas adopté par les éleveurs de saumon à cause de lésions granulomateuses adhérentes aux viscères qui rendaient les animaux invendables (Quentel et al. 2007). Des essais ont également montré l'efficacité de vaccins à sous-unités, avec 14 protéines issues d'*A. salmonicida*, chez la truite arc-en-ciel, offrant ainsi de nouvelles perspectives concernant les vaccins contre la furunculose chez cette espèce (Marana et al. 2017). Pour l'instant, deux solutions restent possibles pour les éleveurs français souhaitant vacciner leurs animaux contre la furunculose : l'utilisation de vaccins commerciaux et l'utilisation d'autovaccins.

1.1- Utilisation de vaccins commerciaux importés : exemple de l'Alphaject 3000

L'Alphaject 3000 est un vaccin inactivé adjuvé sous forme injectable destiné au saumon Atlantique *Salmo salar*, immunisant les animaux contre *Aeromonas salmonicida* et deux souches de *Vibrio anguillarum* (HPRA (Health Products Regulatory Authority) 2022). La France ne présentant aucun vaccin contre la furunculose ayant une AMM, une possibilité pour les éleveurs de truites est d'importer ce vaccin de Norvège (lieu où se situe le laboratoire fabricant). Néanmoins, la valence *Vibrio* est peu utile chez la truite arc-en-ciel car il s'agit essentiellement d'une bactérie d'eau salée et il existe déjà des vaccins adaptés à la truite arc-en-ciel, rendant l'utilisation de ce vaccin importé onéreuse (ANSES 2019). Ce vaccin induit une protection efficace contre la furunculose chez la truite arc-en-ciel pendant au moins 3 mois à 14°C mais des anticorps sont tout de même retrouvés 24 mois après vaccination chez la truite fario *Salmo trutta* (Villumsen et al. 2012). Cette protection est indépendante de la ploïdie des animaux vaccinés, du moins chez le saumon de l'Atlantique (Chalmers et al. 2016).

1.2- Utilisation d'un auto-vaccin

Une autre possibilité pour les éleveurs français souhaitant vacciner leurs animaux contre la furunculose est l'utilisation d'auto-vaccins. En effet, il n'existe aucun vaccin présentant une AMM valable en France immunisant contre *A. salmonicida*. Selon le principe de la cascade, il est alors possible de prescrire un autovaccin, après diagnostic et isolement bactérien de l'agent de la furunculose. Cet auto-vaccin ne doit être réalisé qu'après une étude bénéfices/coûts, le coût d'achat et de réalisation de l'auto-vaccin devant être jugé inférieur aux coûts de la maladie (ANSES 2013).

2- Enjeux de la vaccination contre la furunculose

2.1- Limiter les pertes économiques pour l'éleveur

Les épisodes de furunculose en élevage provoquent des pertes financières directes pour les éleveurs : comme vu précédemment, cette maladie provoque en effet une mortalité variable parmi les poissons. Le traitement de cette maladie nécessite également l'emploi d'antibiotiques sur plusieurs jours, à la charge de l'éleveur (RAIZO (Réseau d'Alerte et d'Information Zoosanitaire) 2018). Les pertes peuvent être plus insidieuses, en passant par la perte d'appétit des animaux et donc de GMQ (Gain Moyen Quotidien) ou encore par l'utilisation du temps de l'éleveur pour gérer la maladie, au détriment des autres activités à réaliser dans l'élevage.

A titre d'exemple, la Norvège a connu en 1980 une croissance explosive du nombre de fermes à saumons, ainsi que de la densité de poissons dans les cages. Cette croissance a engendré une augmentation de cas de furonculose sur les animaux et donc l'emploi d'antibiotiques en très grandes quantités. L'utilisation de la vaccination dans cette filière a permis de réduire drastiquement l'usage des molécules antibiotiques, faisant de la Norvège un des pays utilisant le moins d'antibiotiques pour ses élevages piscicoles, alors qu'elle reste le premier pays producteur de saumons au monde (WHO (World Health Organization) 2015).

2.2- Limiter l'apparition d'antibiorésistances

La limitation de la quantité d'antibiotiques utilisée pour lutter contre la furonculose ne permet pas uniquement de réduire les pertes économiques de l'éleveur. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, *Aeromonas salmonicida* est une bactérie pouvant développer des résistances aux antibiotiques, tel que l'oxytétracycline ou le florfenicol et disséminer ces gènes via des échanges de plasmides avec d'autres bactéries. L'arsenal thérapeutique disponible en France et possédant une AMM pour le traitement des poissons est relativement faible, et laisse une faible marge de manœuvre en cas d'apparition de résistance dans un élevage. De plus, même si de nouvelles molécules antibiotiques sont régulièrement étudiées, aucune famille d'antibiotique n'a été découverte depuis plus de 30 ans (Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) 2022). Cette diminution de la quantité d'antibiotiques utilisés est donc essentielle, et s'inscrit dans le cadre du plan Ecoantibio 2, ayant pour but de limiter l'apparition d'antibiorésistances dans le milieu vétérinaire (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation 2017b).

IV- Conclusion

La filière truiticole française voit, depuis quelques années, sa production s'orienter progressivement vers l'élevage de truites de 2kg et plus, afin de fournir le marché en filets et en produits fumés. La durée d'élevage de ces animaux étant donc allongée, ils sont plus à risque de subir des épisodes de maladie.

Parmi les maladies pouvant sévir sur ces animaux, la furonculose, due à *Aeromonas salmonicida*, fait partie des plus préoccupantes. En effet, cette maladie affecte aussi bien les alevins que les très grosses truites, et apparaît particulièrement en été, lors de la montée en température de l'eau. La furonculose étant saisonnière, les poissons vivant plusieurs années sur le site d'élevage sont donc plusieurs fois à risque pendant leur cycle de production.

Un des moyens de prévenir cette maladie est l'utilisation de la vaccination. Cependant, il n'existe aucun vaccin avec AMM en France : les éleveurs souhaitant vacciner leurs animaux doivent alors avoir recours à des vaccins commerciaux importés ou à des autovaccins. Il n'existe toutefois aucun protocole concernant l'usage de ces derniers, rendant leur utilisation empirique sur le terrain.

Partie 2 : Etude expérimentale

I – Objectifs

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet Medic'eau, un projet financé par le FEAMP (Fond Européen pour les Affaires Maritimes et la Pêche) ayant pour objectif d'optimiser l'utilisation des médicaments en élevage truiticole, dans un contexte de réduction du recours aux antibiotiques. Pour cela, ce projet se concentre sur deux volets : la révision du schéma posologique des antibiotiques utilisés en élevage, afin d'en améliorer l'efficacité et de réduire les risques de sélection de gènes d'antibiorésistance ; ainsi que l'optimisation des conditions d'utilisation des vaccins afin d'en augmenter l'efficacité. Ces deux volets seront axés autour de la gestion de la furonculose, maladie fréquente en élevage et majoritairement gérée par antibiothérapie. L'ensemble de ce projet est mené par l'équipe APPIFish (Antibiotic resistance Pathogenicity Infectiology in Fish) affiliée à l'INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement) et à Oniris (Ecole nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation).

Cette étude s'inscrit dans le volet sur la vaccinologie de ce projet, avec la problématique suivante : *Quelle est l'efficacité des différents protocoles vaccinaux utilisant un autovaccin contre la furonculose chez la truite arc-en-ciel ?*

L'évaluation de cette efficacité vaccinale suit un raisonnement en plusieurs étapes :

A- Recensement des pratiques de vaccination sur le terrain

Afin d'adapter notre protocole expérimental aux pratiques sur le terrain, nous souhaitons avoir un aperçu des protocoles vaccinaux utilisés par les éleveurs et les vétérinaires. Pour cela, ils ont été soumis à un questionnaire permettant de mieux cerner leurs pratiques et de voir si certains protocoles ou certaines voies d'administration sont davantage utilisés que d'autres. Le questionnaire permet également aux éleveurs et vétérinaires de partager leur ressenti quant à l'efficacité des protocoles vaccinaux utilisés.

B- Evaluation de l'efficacité vaccinale des différentes voies d'administration dans le temps

Le premier objectif de l'étude expérimentale est de comparer la durée de l'efficacité vaccinale entre 3 et 6 mois après vaccination par différentes voies (voie orale, voie intrapéritonéale ou par balnéation). En effet, plusieurs études abordent les variations d'efficacité entre les différentes voies d'administration vaccinale : ainsi, l'immunité apportée par la vaccination par balnéation contre le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse de la truite semble plus fugace que celle apportée après vaccination par injection intrapéritonéale (Dong et al. 2020). De plus, les vaccins contre la vibriose par voie orale ou par balnéation semblent induire des titres en anticorps plus faible que l'injection intrapéritonéale chez la truite (Palm Landolt et al. 1998). Les études se concentrant sur l'efficacité vaccinale contre la furonculose concernent majoritairement le saumon Atlantique. Néanmoins, il existe quelques études ayant montré l'efficacité et la durabilité de vaccins expérimentaux par balnéation et par injection intrapéritonéale chez la truite arc-en-ciel (Villumsen et al. 2015; Villumsen & Raida 2013).

C- Evaluation de l'efficacité vaccinale de protocoles utilisant des rappels

Le second objectif de l'étude expérimentale est de comparer l'efficacité de différents protocoles vaccinaux avec ou sans rappel par voie orale ou intrapéritonéale. De rares études se sont intéressées à l'efficacité vaccinale avec utilisations de protocoles utilisant un rappel vaccinal. Des résultats ont ainsi montré qu'un rappel par balnéation contre *Yersinia ruckeri*, après une primovaccination par balnéation, induit une meilleure protection contre la bactérie (Schmidt et al. 2016). Une étude a également montré qu'un protocole (donc primovaccination et rappel) entièrement basé sur la voie orale est peu efficace, dans le cadre d'un vaccin contre la yersiniose (Jaafar et al. 2019). Les études comparant différents protocoles restent cependant peu nombreuses et nous n'avons pas trouvé de résultats concernant des protocoles vaccinaux contre la furonculose chez la truite arc-en-ciel.

II – Evaluation des pratiques vaccinales des vétérinaires et des éleveurs

A- Matériels et méthodes

1- Réalisation des questionnaires

Deux questionnaires, l'un à destination des éleveurs, l'autre à destination des vétérinaires aquacoles, ont été conçus. Ces deux questionnaires ont été réalisés au sein de l'équipe APPIFish. Ils ont ensuite été relus et validés par l'ensemble des membres de l'équipe avant d'être vérifiés et corrigés par des vétérinaires praticiens aquacoles. Cette dernière correction a ainsi permis de supprimer certaines questions jugées peu pertinentes ou de modifier la formulation d'autres.

2- Forme et contenu des questionnaires

Les deux questionnaires sont présentés sous format numérique, accessibles via un lien hypertexte fourni. Ils contiennent des réponses sous forme de QROC (questions à réponse courte ouverte) et de QCM (questions à choix multiples) (cf. **Annexe 2** et **Annexe 3**) :

- Les QCM concernent la majorité des questions des deux questionnaires, avec pour objectif de réduire le temps de remplissage pour le répondant et de faciliter l'analyse des données. Des réponses de type « autres », où la personne interrogée peut rédiger une réponse non proposée, sont parfois disponibles pour certaines questions.
Exemple : à la question « *Quelle espèce élevez-vous ?* », une réponse « *autre* » était disponible en plus des réponses « *truite arc-en-ciel* » et « *truite fario* ».
- Les QROC permettent principalement aux personnes interrogées d'apporter certaines précisions concernant les protocoles vaccinaux (notamment pour le questionnaire destiné aux vétérinaires) ou de donner des valeurs exactes plutôt que de choisir une fourchette de valeurs.
Exemples : « *Quelle est votre production annuelle moyenne (en tonnes) ?* » ou encore « *Etes-vous satisfait de l'efficacité vaccinale ?* ».

Toujours dans un but d'optimisation et de gain de temps pour le répondant, les questions ne le concernant pas ne sont pas proposées : par exemple, un éleveur ne vaccinant pas ne voit pas les questions portant sur la vaccination.

Chaque questionnaire est divisé en deux parties : une première partie permet d'en savoir plus sur la personne répondant au questionnaire (sexe, âge, durée et zone géographique d'exercice...). Une sous-partie supplémentaire est également présente dans le questionnaire destiné aux éleveurs, afin d'avoir une description globale de l'élevage (espèce élevée, production, charge des bassins...).

La deuxième partie s'intéresse plus spécifiquement à la furonculose et à la gestion de celle-ci en élevage. Ainsi, les éleveurs doivent d'abord renseigner des informations sur les épisodes de furonculose de leur élevage (année concernée, taille des animaux malades, pertes attribuées à la maladies...) avant d'accéder à la partie vaccination. Seuls les éleveurs précisant vacciner leurs animaux (ou les vétérinaires déclarant prescrire des vaccins) contre la furonculose ont accès aux questions relatives à la vaccination, ces dernières ayant pour but de préciser les protocoles utilisés (poids des animaux vaccinés, température de l'eau, saison, forme d'administration du vaccin, rappels...). Les personnes déclarant ne pas utiliser la vaccination sont redirigées vers une question leur permettant de préciser la raison de cette abstention. Les vétérinaires doivent remplir une série de questions permettant de connaître le ou les protocoles employés, ainsi que les critères utilisés pour favoriser un protocole par rapport à un autre.

Une troisième partie concerne l'usage des antibiotiques dans le cadre de la lutte contre la furonculose. Cette partie étant consacrée à une autre étude réalisée simultanément à la nôtre (correspondant au second volet du projet Medic'eau), nous ne nous y intéresserons pas ici.

Enfin, les éleveurs et les vétérinaires ont le choix de laisser leurs coordonnées, afin que nous ayons la possibilité de les recontacter pour préciser davantage leurs réponses (notamment concernant les protocoles vaccinaux utilisés).

3- Transmission des questionnaires

Le questionnaire destiné aux éleveurs a tout d'abord été transmis aux GDS (Groupements de défense sanitaire) de Bretagne et de Nouvelle-Aquitaine, qui ont pris le relais et envoyé le lien à l'ensemble de leurs éleveurs piscicoles adhérents. Il a ensuite été transmis à l'ensemble des GDS de France et envoyé aux éleveurs adhérents, de la même façon que précédemment.

Concernant les vétérinaires, le questionnaire leur a été directement transmis par mail.

Les répondants renseignent le questionnaire leur étant destiné de façon autonome et sur la base du volontariat.

4- Analyse des questionnaires

Les résultats de chaque questionnaire ont été regroupées sous forme de tableur sous format xlsx. Les données ainsi regroupées ont ainsi pu être analysées sous forme de statistiques descriptives, avec la réalisation de figures et de tableaux permettant de les résumer.

B- Résultats

1- Questionnaire à destination des éleveurs

Nous avons obtenu les réponses de 23 éleveurs de truite arc-en-ciel sur une période de décembre 2021 à mars 2022.

1.1-Profil des éleveurs

Les résultats obtenus relatifs au profil des éleveurs sont détaillés dans la **Figure 13** et la **Figure 14**. Les pisciculteurs interrogés sont majoritairement des hommes (n=21), d'âges variés, mais dont la moitié a au moins 20 ans d'expérience dans le milieu piscicole.

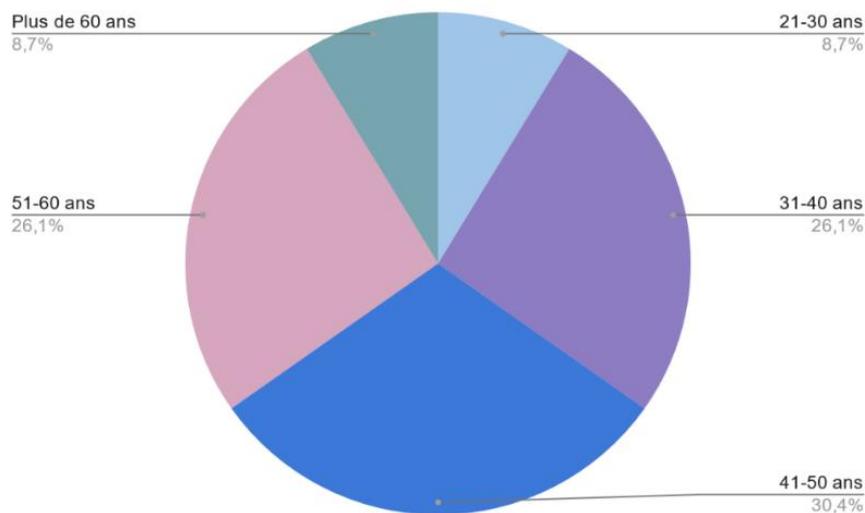


Figure 13: Répartition des âges des éleveurs interrogés

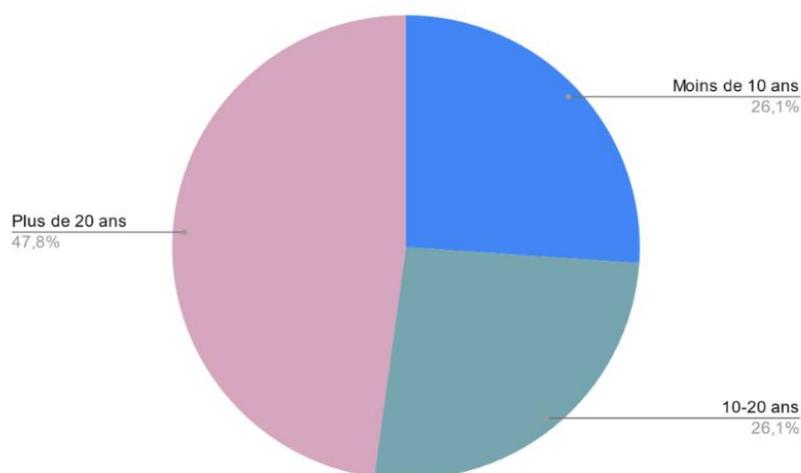


Figure 14 : Répartition de l'ancienneté des éleveurs interrogés dans le milieu piscicole

1.2-Profil des élevages

Concernant l'origine géographique des élevages interrogés, ils proviennent à moitié environ de Bretagne, mais également de Normandie et des Hauts de France (**Figure 15**).

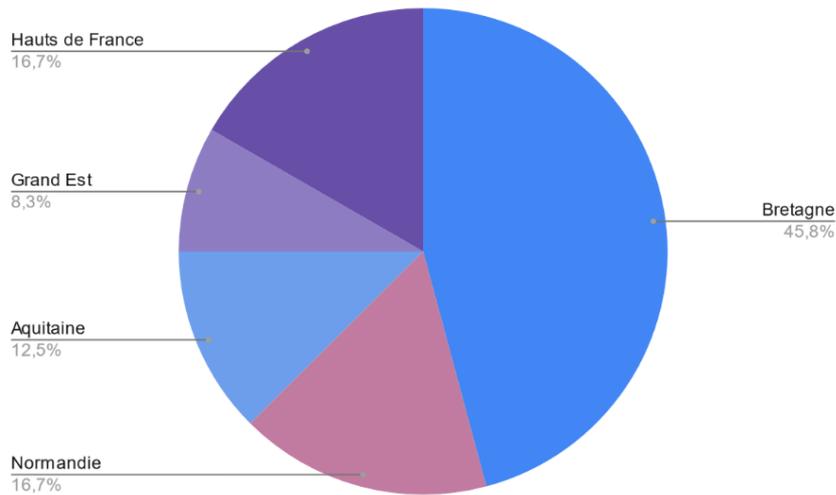


Figure 15 : Répartition géographique des élevages piscicoles de l'étude

Comme nous pouvons le voir sur la **Figure 16**, l'ensemble des bassins de chaque élevage occupe des volumes très variés, avec une majorité (n=15) d'élevages avec un volume total des bassins de moins de 4500m³. Les élevages de plus de 7500 m³ sont moins nombreux (n=3), mais leur volume peut être très conséquent : pour illustration, les bassins du plus gros élevage de l'étude occupent un volume de 25000 m³. D'après la **Figure 17**, le chargement des bassins est tout aussi varié, mais est majoritairement compris entre 20 et 50 kg/m³(n=14).

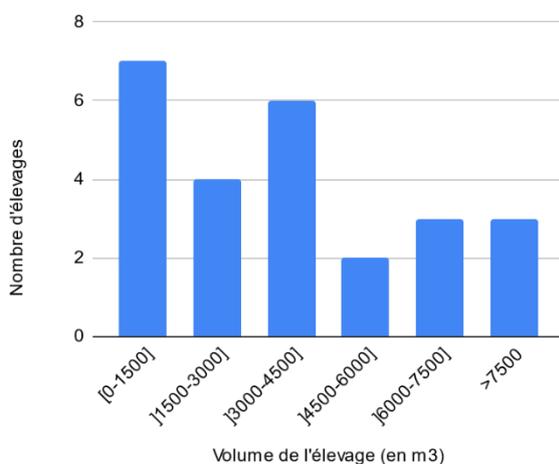


Figure 16: Volume des élevages piscicoles de l'étude (en m³)

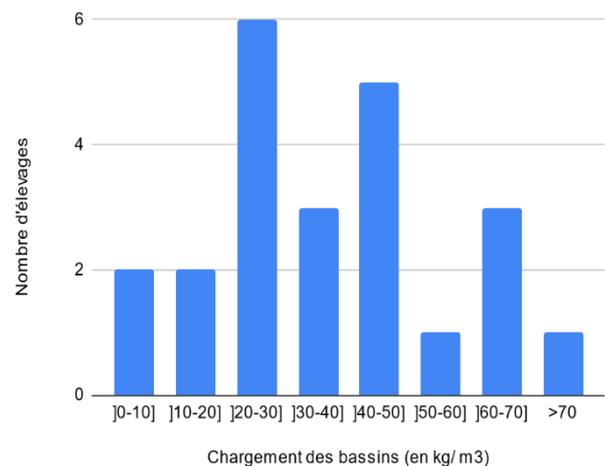


Figure 17: Chargement des élevages piscicoles de l'étude (en kg/m³)

Sur 23 élevages, plus de la moitié, soit 16 élevages, produisent entre 0 et 200 tonnes de poisson par an (**Figure 18**).

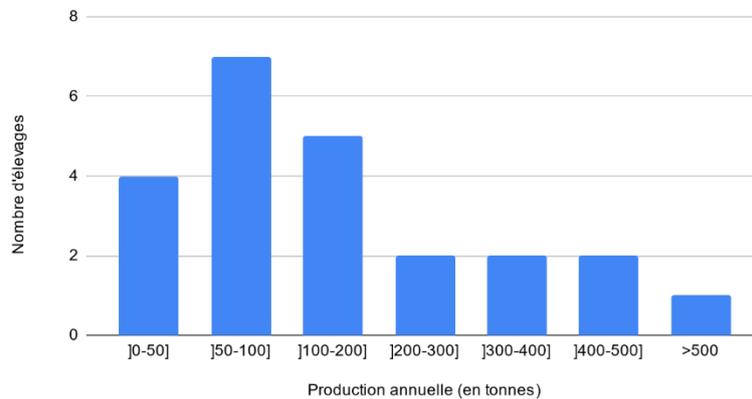


Figure 18 : Production annuelle des élevages interrogés (en tonnes)

Chacun des 23 élevages concernés élève sur place de la truite arc-en-ciel. Quelques éleveurs ont également fait le choix d'élever de la truite fario (n=6) et de l'omble de fontaine (n=1) sur leur site de production. Un éleveur de saumon Atlantique est également recensé.

La ploïdie des poissons au sein des élevages est assez hétérogène (**Figure 19**). Seuls 3 élevages ont fait le choix d'élever uniquement des diploïdes, contre 4 élevages élevant uniquement des triploïdes. Les élevages possédant les deux types d'animaux les élèvent principalement en bassins séparés (n=16, sur 18 réponses).

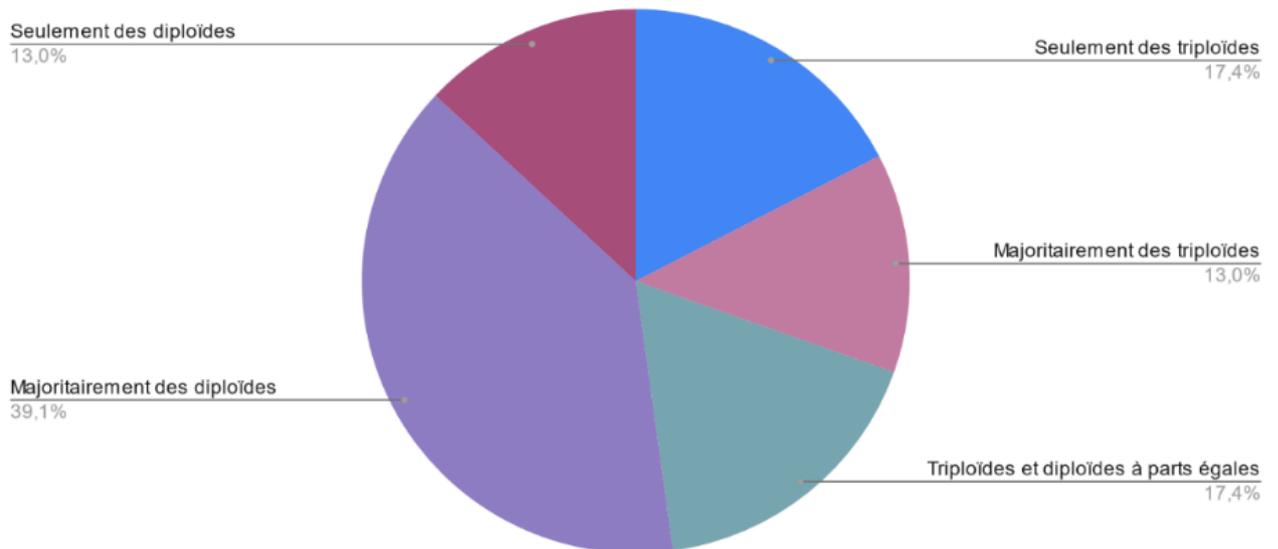


Figure 19 : Répartition des animaux élevés par les pisciculteurs interrogés en fonction de leur ploïdie

Enfin, concernant les objectifs d'élevage (**Figure 20**), ce sont aussi bien la production de truites portions que de truites pour filet ou pour fumage. Cependant, il est à noter que quasiment tous les élevages (n=20) produisent des gros animaux pour fumage.

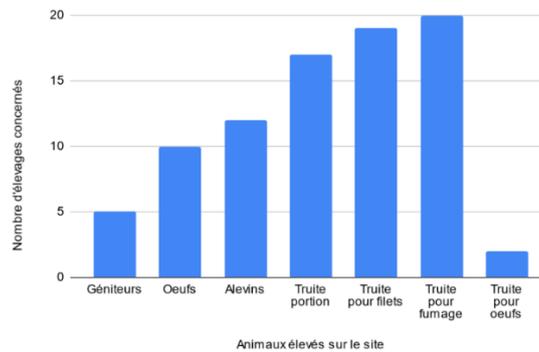


Figure 20 : Catégories d'animaux élevés sur les différents sites de l'étude

1.3- La furonculose au sein des élevages piscicoles

Sur les 23 éleveurs ayant répondu au questionnaire, seule la moitié a remonté des cas de furonculose (n=12) entre 2010 et 2021. Les éleveurs ayant déclaré avoir eu des cas de furonculose ces dix dernières années semblent avoir eu davantage de cas entre 2018 et 2020, avec 11 éleveurs déclarant au moins un épisode de furonculose en 2020 (**Figure 21**). De plus, cette maladie semble apparaître davantage entre les mois de Juin et Septembre dans ces élevages (**Figure 22**). Les cas apparaissent surtout à une température d'eau entre 14 et 18°C (n=10, sur 12 réponses).

La furonculose touche toutes les catégories d'animaux, des alevins aux animaux de plus de 1kg, mais surtout les animaux de plus de 500g (n=13, sur 19 réponses). Plusieurs catégories de poids peuvent être touchées dans un même élevage.

La mortalité liée à ces épisodes se situe entre 0 et 30% (n=12, sur 14 réponses), en ne dépassant jamais cette valeur. Cette mortalité peut varier d'une année à une autre chez le même éleveur. Deux éleveurs notent également que certains épisodes se caractérisent uniquement par l'apparition de furoncles, sans mortalité associée.

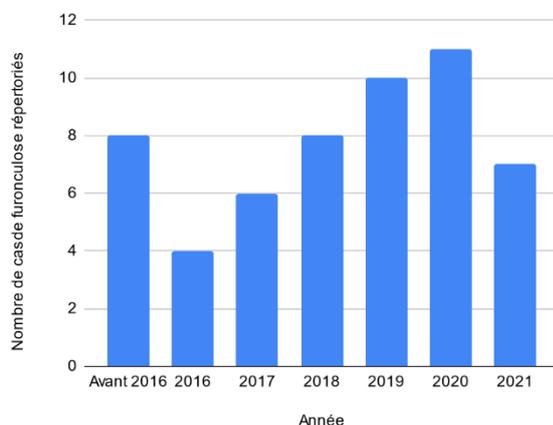


Figure 21 : Répartition des cas de furonculose en fonction de l'année

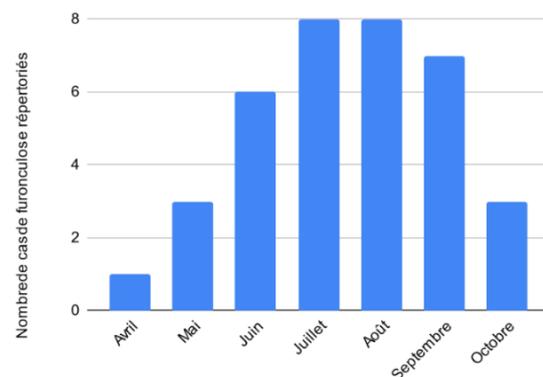


Figure 22 : Répartition des cas de furonculose en fonction du mois

1.4- La vaccination contre la furonculose au sein des élevages

Sur les 23 éleveurs ayant répondu au questionnaire, seuls 7 déclarent vacciner leurs animaux contre la furonculose, ces 7 éleveurs ayant tous déjà eu au moins un cas de furonculose ces 10 dernières années. Le **Tableau 1** résume les différents protocoles utilisés. Ces protocoles sont très hétérogènes : ainsi, aucun éleveur ne vaccine sur la même période de l'année ou ne vaccine les animaux au même poids. Cependant, tous les éleveurs vaccinent leurs poissons à une température d'eau inférieure à 15°C.

De plus, seuls 3 éleveurs réalisent un rappel sur leurs animaux, rappel réalisé à des durées très variables après la réalisation de la primovaccination. Enfin, la voie injectable semble être la voie préférentielle d'administration du vaccin : les 7 éleveurs l'utilisent tous au moins une fois dans leurs protocoles vaccinaux, que cela soit en primovaccination ou en rappel. Tous ces éleveurs utilisent un autovaccin, provenant de chez Biovac/CEVA. Un éleveur utilise également le vaccin commercial Alphaject 3000 conjointement à l'autovaccin.

Les 5 autres éleveurs ayant eu des cas de furonculose choisissent de ne pas vacciner leurs animaux car cette maladie a un impact trop faible dans leur élevage pour justifier l'utilisation du vaccin (n=4). Après avoir été recontactés, certains éleveurs précisent en effet bien gérer les épisodes de maladie sans traitement antibiotique, mais en réduisant la ration alimentaire de leurs animaux, voire en faisant une mise à jeun pendant environ 3 jours. Le manque d'efficacité du vaccin est une autre raison évoquée par un éleveur.

Tableau 1 : Résumé des différents protocoles vaccinaux utilisés par les éleveurs de l'étude (NR : non renseigné ; IP : intrapéritonéale)

*Cet éleveur utilise également de l'Alphaject 3000, sans préciser s'il l'utilise uniquement en primovaccination ou en rappel.

		Eleveur n°							
		1	2	3	4	5	6*	7	
Primovaccination	Forme d'administration	Balnéation	IP	IP	IP	IP		IP	IP
	Période	Septembre- Octobre	Novembre - Décembre	Mars-Avril	Janvier- Février	Janvier à Juin		Mars à Juin	3 lots vaccinés respectivement en Février, fin Septembre et en Décembre
	Température de l'eau	10-15 °C	10-15°C	10-15°C	10-15°C	10-15°C		10-15°C	<10°C
	Poids des animaux	2-20g	50-100g	<100g et 500g à 1kg	200-500g	>1kg		A partir de 500g	<100g
Rappel vaccinal	Rappel ?	Oui	Non	Non	Non	Oui		Oui	Non
	Forme d'administration	IP				Reproducteurs : voie orale	Non reproducteurs : voie orale ou IP selon la durée restante avant abattage	IP	
	Durée entre primovaccination et rappel	6 mois				3 mois		1 an	
	Température de l'eau	10-15°C				10-15°C		10-15°C	
Autre	Satisfaction concernant le protocole	Oui pour l'efficacité. La charge de travail est considérée comme importante pour l'IP.	Oui pour l'efficacité. Non pour la charge de travail	Non, l'efficacité du vaccin est considérée comme moyenne	Oui, efficacité et charge de travail acceptables	Oui, surtout depuis la mise en place du rappel par voie orale sur les reproducteurs : moins de cas de furonculose et moins de charge de travail		NR	Pas de recul sur le protocole pour l'instant car il s'agit de sa première année de réalisation

2- Questionnaire à destination des vétérinaires

Nous avons obtenu les réponses de 6 vétérinaires sur une dizaine contactée sur la période de décembre 2021 à mars 2022. Une réponse n'a pas été incluse dans l'analyse des résultats, la personne ayant répondu n'étant pas vétérinaire clinicien, elle ne prescrivait ni vaccin ni antibiotique. Le **Tableau 2** synthétise les réponses obtenues au questionnaire concernant les protocoles vaccinaux.

2.1- Profil des vétérinaires

Les résultats obtenus relatifs au profil des vétérinaires répondants sont détaillés dans les **Figures 23 et 24**. Les vétérinaires ayant participé à l'étude sont tous des hommes, d'au moins 31 ans et de durée de carrière variable.

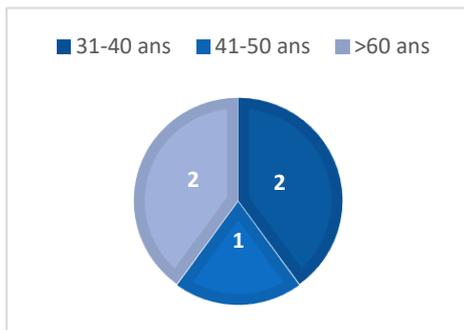


Figure 23: Age des vétérinaires interrogés

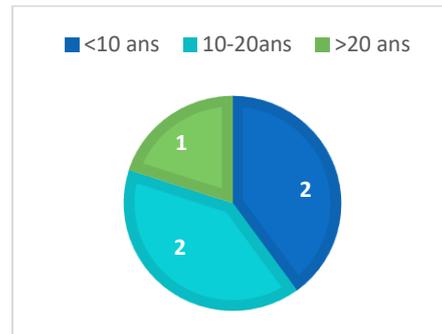


Figure 24: Durée de carrière des vétérinaires interrogés

Comme nous pouvons le voir sur la **Figure 25**, les 5 vétérinaires interrogés travaillent donc globalement sur l'ensemble de la France. Deux vétérinaires indiquent également travailler à l'étranger. La pisciculture représente, chez 3 vétérinaires sur 5, au moins la moitié de l'activité professionnelle (**Figure 26**). Tous (n=5) suivent des élevages de salmoniculture d'eau froide, ces élevages représentant au moins 60% de leur activité en filière piscicole. Certaines suivent également des élevages de bars et dorades (n=3), ainsi que des élevages d'esturgeons (n=2).

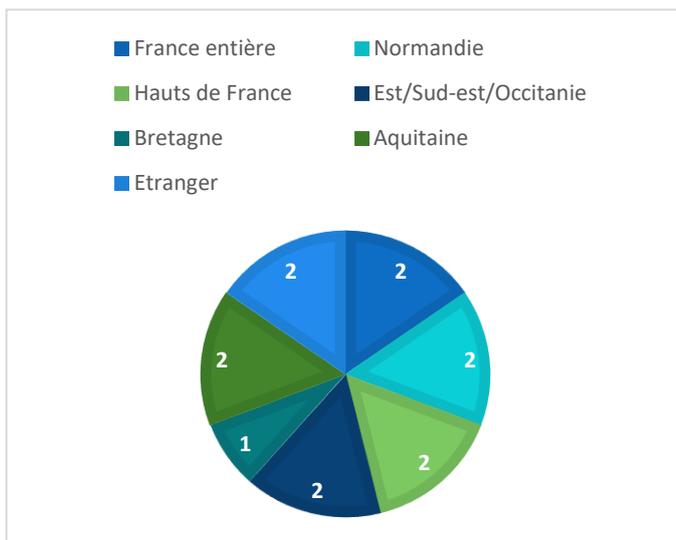


Figure 25: Répartition géographique de l'exercice des vétérinaires interrogés

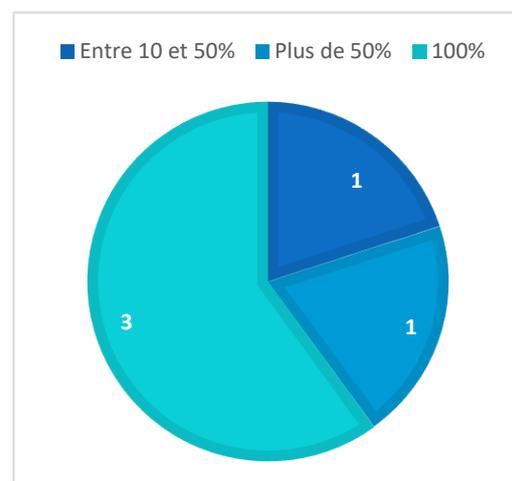


Figure 26: Part de la pisciculture dans le domaine d'activité des vétérinaires interrogés

Tableau 2 : Résumé des protocoles vaccinaux utilisés par les vétérinaires piscicoles interrogés (IP : intrapéritonéale)

		vétérinaire n°				
		1	2	3	4	5
	Vaccin utilisé	Autovaccin	Autovaccin	Autovaccin Alphaject 3000	Alphaject 3000	Autovaccin Alphaject 3000 Autres vaccins commerciaux
Primovaccination	Forme d'administration	Balnéation		IP	IP (Alphaject)	IP : éleveur motivé
				Balnéation : lors de la recherche d'un protocole vaccinal le plus robuste possible	Voie orale : lorsqu'il n'y a pas assez de main d'œuvre	Voie orale : sur des animaux de faible taille commerciale, si la pression infectieuse est faible à moyenne
Rappel vaccinal	Forme d'administration	IP	Ne vaccine pas, les éleveurs truiticoles ne sont pas demandeurs	Oral	IP (Alphaject)	IP : si l'élevage subit une pression infectieuse forte sur les gros animaux ou sur des reproducteurs
	Durée entre primovaccination et rappel	3 mois		IP : en cas de rechute avérée ou sur des animaux à cycles longs (reproducteurs)	Voie orale : après 2 injections, au besoin	
Autres	Recommandations faites aux éleveurs	IP : mise à jeun 24h avant l'anesthésie des animaux Balnéation : bain de 1 minute dans une solution à 10 ⁹ UFC/mL, avec des alevins sains, triés, de plus de 3g			Après IP : 1 an Après balnéation : 3 mois	3 mois
	Informations supplémentaires	Rappel uniquement fait si l'élevage subit une forte pression infectieuse et qu'il existe un risque de mauvaise couverture vaccinale	Vaccine uniquement des animaux marins avec l'autovaccin contre la furunculose	Primovaccination : la réaliser idéalement chez des animaux naïfs vis-à-vis de l'agent pathogène, après stimulation per os du système immunitaire Balnéation : manipulations les plus douces possibles	IP : porter des gants et être vigilant quant à la qualité de l'injection Voie orale : préparer l'aliment 24h avant le début de la vaccination	

2.2- Protocoles vaccinaux utilisés par les vétérinaires

Comme nous pouvons le constater dans le **Tableau 2**, les protocoles habituellement utilisés par les vétérinaires sont tous différents, que cela soit dans la forme d'administration que dans la réalisation de rappels. De plus, les vaccins utilisés sont très divers : deux vétérinaires n'utilisent qu'un autovaccin alors qu'un autre n'utilise que l'Alphaject 3000. Enfin, deux vétérinaires utilisent ces deux vaccins conjointement.

Tous les vétérinaires interrogés précisent que l'efficacité du vaccin est assez variable. Tous souhaiteraient obtenir des souches ou des adjuvants plus immunogènes, augmentant la durée de l'immunité

C- Discussion et conclusion

1- Biais d'échantillonnage

Seuls 23 éleveurs truiticoles et 5 vétérinaires praticiens en filière piscicole ont répondu aux questionnaires.

Concernant le questionnaire à destination des éleveurs, la longueur de celui-ci a pu freiner les potentiels répondants. En effet, une section sur l'usage des antibiotiques contre la furunculose s'ajoutait à la section sur la vaccination. Celle-ci pouvait s'avérer très longue à remplir et nécessitait l'appui du registre d'élevage, elle a donc pu constituer un frein aux réponses des éleveurs. De plus, le questionnaire a été envoyé par mail par les GDS et les éleveurs ont répondu sur la base du volontariat. Un manque de temps ou de volonté (notamment pour les éleveurs non concernés par la furunculose) de répondre pourrait également expliquer le faible taux de réponse observé. Afin d'augmenter le nombre de réponses au questionnaire, une possibilité aurait été d'envoyer celui via les coopératives d'éleveurs. Néanmoins, cette alternative aurait provoqué un biais d'échantillonnage : la répartition géographique des élevages aurait été davantage limitée et les conduites zootechniques plus uniformes, celles-ci dépendant en partie de la coopérative des éleveurs.

Il y a, en France, moins d'une dizaine de vétérinaires pratiquant majoritairement dans le domaine piscicole. Nous pouvons donc dire que les réponses obtenues dans le questionnaire sont assez représentatives des pratiques des vétérinaires sur le terrain. Cela n'est cependant pas vrai pour les réponses obtenues par les éleveurs : en effet, la France comptait, en 2007, environ 500 sites de production sur l'ensemble du territoire (CIPA 2021). En se basant sur ces chiffres, les réponses obtenues dans le questionnaire représentent donc moins de 5% des éleveurs français. Cependant, la répartition géographique des éleveurs répondants reste assez fidèle à la réalité, avec 75 % des éleveurs provenant de Bretagne, des Hauts de France ou d'Aquitaine (CIPA 2021).

Les réponses obtenues chez les éleveurs de truite ne nous permettent donc pas de tirer de conclusion sur l'ensemble des éleveurs de France. Cependant, l'objectif de ces questionnaires n'était pas de décrire les pratiques de tous les éleveurs et vétérinaires, mais d'avoir un aperçu de la pluralité des protocoles utilisés par ces acteurs de la filière.

Enfin, les questions posées sur le protocole vaccinal utilisé ne nous permettent pas d'avoir une description précise de la réalisation de ce dernier. Il n'y a pas de question posée à l'éleveur concernant son avis sur l'efficacité du protocole. Ces lacunes ont été compensées en recontactant par téléphone les éleveurs ayant laissé leurs coordonnées, afin de demander ces précisions.

2- La furonculose dans les élevages

La furonculose ne semble pas être une généralité dans les élevages, avec seulement la moitié des élevages répondants concernés. Cette maladie semble s'exprimer davantage pendant les mois chauds de l'année, entre Juin et Septembre. De plus, les épisodes de furonculose semblent assez fluctuants en fonction des années : celles ayant présenté davantage d'épisodes de la maladie (2018, 2019 et 2020) correspondent en effet à des étés particulièrement chauds, avec des températures au-dessus des normales de saison (Météo-contact 2022). L'inverse est vrai également : beaucoup moins de cas de furonculose ont été enregistrés en 2021, et cette année contraste en terme de température avec les années précédentes, chaque mois d'été étant sous les normales saisonnières (Météo-contact 2022). Cette tendance correspond aux descriptions faites de la maladie dans la littérature : celle-ci s'exprime en effet lors de périodes de stress pour les animaux, en particulier lors de la hausse de la température et de la baisse du taux d'oxygène dans l'eau, comme cela peut-être le cas lors d'étés particulièrement chauds (RAIZO 2018).

Les réponses des éleveurs montrent que la furonculose affecte davantage les animaux de plus de 500 g. Les animaux de grande taille, notamment les truites à destination des ateliers de fumaison, vivent en effet plusieurs étés sur site et sont donc plus à risque de développer la furonculose. La mortalité, oscillant entre 0 et 30 %, est fidèle aux données retrouvées dans la littérature et correspond à l'expression d'une forme aiguë, à mortalité élevée (30%), et d'une forme chronique affectant les animaux plus lourds mais avec une mortalité plus faible (RAIZO 2018).

La production de plus gros animaux, afin de répondre à la demande de filets et de produits fumés, associé au réchauffement climatique fait que cette maladie semble devenir de plus en plus préoccupante pour les années à venir. Le réchauffement climatique a déjà été mis en cause en tant que facteur majoritaire d'apparition et de maintien d'épisodes de furonculose dans des régions d'eau froide auparavant indemnes, comme dans le nord du Québec (Tam et al. 2011). Bien qu'il n'y ait pas de chiffres officiels quant au nombre de cas annuels, une approximation de la prévalence en élevage peut être faite grâce au Résapath. Ce système permet de collecter les données d'antibiogrammes issus de prélèvements d'espèces très diverses. Chez les poissons de pisciculture, *Aeromonas salmonicida* représente déjà plus de la moitié des antibiogrammes répertoriés en 2020 par le Résapath, montrant l'importance de la furonculose en élevage. (ANSES 2021).

3- Les protocoles vaccinaux utilisés

3.1- La vaccination en élevage

La vaccination contre la furonculose n'est pas une généralité dans les élevages. Cela s'explique en partie par le fait qu'une partie des élevages n'est pas concernée par la maladie, et n'a donc pas d'intérêt à vacciner. Cependant, certains éleveurs ayant des épisodes de furonculose jugent également l'impact de la maladie comme insuffisant pour justifier une vaccination. Cela peut s'expliquer si la maladie reste peu fréquente et s'il y a peu de mortalité dans les lots d'animaux. Certains éleveurs précisent gérer la furonculose avec un rationnement alimentaire des lots de truites après apparition de premiers signes cliniques sur certains individus. Nous n'avons trouvé aucune étude montrant un effet positif de cette pratique sur la mortalité. Cependant, une étude a montré chez le saumon royal (*Onchorhynchus tshawytscha*) que les animaux atteints de furonculose ont tout de même tendance à consommer davantage après une période de mise à jeun, facilitant ainsi l'administration de traitements dans l'alimentation (Pirhonen et al. 2003). De plus, la vaccination est perçue comme

moyennement efficace par plusieurs éleveurs et vétérinaires, de même que chronophage par une partie des éleveurs, particulièrement la vaccination par voie intrapéritonéale nécessitant une anesthésie et une manipulation individuelle des poissons. La vaccination paraît donc comme un surcoût financier et une surcharge de travail.

3.2- Protocoles de primovaccination

3.2.1- Animaux vaccinés

Les animaux recevant une première vaccination sont d'âge et de poids très variables. En effet, les truites vaccinées par les éleveurs ayant répondu au questionnaire pèsent de 2 g à plus de 1 kg, en passant par toutes les gammes de poids entre ces deux valeurs. Cette hétérogénéité dans le poids des animaux repose très certainement sur les différents épisodes cliniques vécus par les éleveurs. Ainsi, un éleveur ayant connu des épisodes de furunculose sur de très jeunes animaux, voire des alevins, pourrait avoir tendance à vacciner ses poissons plus tôt qu'un éleveur ayant des troubles sur des animaux plus lourds. Les truites peuvent être vaccinées très tôt par balnéation : certaines études ont ainsi montré l'efficacité de cette voie d'administration en vaccinant des animaux de 6g (Bøggwald & Dalmo 2019). Concernant les vaccins intrapéritonéaux, à titre d'exemple, l'AMM de l'Alphaject 3000 préconise de vacciner des animaux de plus de 10g (HPRA (Health Products Regulatory Authority) 2022). Une étude a également montré l'efficacité d'un vaccin intrapéritonéale sur des animaux de 9g (Villumsen, Koppang, Raida 2015). La vaccination par injection intrapéritonéale en dessous de ces poids semble néanmoins difficilement réalisable, du fait des manipulations requises.

3.2.2- Vaccins utilisés

Les vétérinaires cliniciens interrogés prescrivent presque tous des autovaccins. Certains vétérinaires font également le choix d'utiliser des vaccins commerciaux importés, un vétérinaire faisant même le choix de n'utiliser qu'une seule spécialité commerciale (Alphaject 3000). De façon logique, ces pratiques se retrouvent également chez les éleveurs : tous les éleveurs interrogés vaccinant leurs animaux utilisent au moins une fois un autovaccin. Seul un éleveur utilise également l'Alphaject 3000. Cette tendance à favoriser l'utilisation des autovaccins peut s'expliquer de plusieurs façons : l'autovaccin vaccine effectivement contre la ou les souches d'*Aeromonas salmonicida* circulant dans l'élevage, et il ne présente pas d'autre valence inutile pour l'élevage, contrairement à certains vaccins commerciaux importés comme l'Alphaject 3000 et sa bivalence vibriose, peu utile en eau douce.

3.2.3- Formes d'administrations utilisées

Les voies d'administration conseillées par les vétérinaires sont multiples, et dépendent finalement beaucoup de la façon de fonctionner de l'éleveur et de sa motivation. Ainsi, les voies injectables en intra-péritonéale sont fréquemment conseillées, mais la balnéation et la voie orale restent possibles si l'éleveur n'a pas la main d'œuvre nécessaire à la mise en place de l'injection vaccinale.

Les éleveurs interrogés et vaccinant leurs animaux utilisent, quant à eux, presque tous l'injection intrapéritonéale. Seul un éleveur vaccine ses animaux entre 2 et 20 g par balnéation. De plus, certains éleveurs vaccinent des animaux de taille déjà conséquente, supérieure à 1 kg, rendant la balnéation difficile à utiliser en pratique. Cette préférence pour l'injection intrapéritonéale, malgré la main d'œuvre et le temps nécessaires à la vaccination, peut s'expliquer par une efficacité perçue comme plus importante. D'après une étude datant de 2013 portant sur la vaccination contre *Y. ruckeri* chez la truite arc-en-ciel, cette efficacité est très dépendante du temps entre vaccination et contact avec

l'agent pathogène : ainsi, une unique injection intrapéritonéale était toujours considérée comme efficace après 3255 degrés.jour, alors qu'une unique balnéation était considérée comme inefficace au-delà de 2325 degrés.jour. L'immunité conférée par la vaccination par balnéation semble donc plus fugace que celle conférée par l'injection intrapéritonéale. Cependant, dans cette étude, l'utilisation d'un protocole associant vaccin par balnéation et injection intrapéritonéale 45 degrés.jour plus tard s'est montrée efficace lors du challenge infectieux réalisé 1750 degrés.jour après vaccination (Chettri et al. 2013). Une étude également publiée en 2013 montre cependant des résultats contraires, avec une vaccination par balnéation avec un vaccin expérimental contre *Aeromonas salmonicida* se montrant efficace 2350 degrés.jour après vaccination (Villumsen & Raida 2013).

Un vétérinaire conseille également d'utiliser la vaccination orale sur des animaux de faible taille commerciale, avec pour objectif de limiter la charge de travail. Cependant, cette voie d'administration n'est jamais utilisée en primovaccination sur les animaux chez les éleveurs interrogés, très certainement car elle est également perçue comme peu efficace. A notre connaissance, il n'existe effectivement aucune étude montrant l'efficacité d'un vaccin par voie orale utilisé seul contre la furunculose ou contre une autre maladie bactérienne.

3.2.4- Période de vaccination

Les éleveurs interrogés vaccinent leurs animaux sur des périodes très hétérogènes, allant de Septembre à Juin. Tous les éleveurs précisent vacciner à une température inférieure à 15°C, donc avant l'augmentation estivale de la température de l'eau. Il existe cependant une différence de réponse immunitaire des animaux selon la température de l'eau. Ainsi, des truites arc-en-ciel maintenues à 15-16°C et infectées avec *Aeromonas salmonicida* auront une augmentation du nombre de lymphocytes B circulants plus importante et plus rapide que des animaux maintenus à 11°C. L'immunité innée sera également moins efficace à des températures suboptimales (Abram et al., 2017). Toutefois, une faible température d'eau correspond à une teneur en oxygène dissous dans l'eau plus élevée : les manipulations nécessaires à la vaccination, en particulier pour la voie intrapéritonéale, sont considérées comme moins à risques pour les animaux.

De même, les pratiques vaccinales sont très différentes : 4 éleveurs étalent leurs vaccinations sur une période d'un à deux mois, alors que 3 autres les réalisent sur plus de 4 mois. Enfin, un éleveur précise vacciner trois lots de truites sur 3 mois dans l'année. La diversité de ces pratiques s'explique très certainement par les organisations différentes de chaque éleveur, le nombre de lots présents sur site etc.

Cependant, la période à risque concernant la furunculose étant de juin à Septembre, les animaux vaccinés très peu de temps avant le début de l'été pourraient être à risque de ne pas être protégés s'ils subissent un épisode de maladie tôt dans la saison. A titre comparatif, la plupart des vaccins commerciaux utilisés en France, que cela soit contre la yersiniose ou la vibriose, sont considérés comme efficaces au bout de 336 degrés.jours, soit 28 jours à 12°C (ANSES 2022). Inversement, une vaccination faite longtemps avant la période à risque de la furunculose pourrait être moins efficace. Néanmoins, une étude réalisée avec un vaccin commercial et un autovaccin contre *A. salmonicida*, tous deux administrés par voie intra-péritonéale, ont montré la persistance d'anticorps à des niveaux assurant la protection jusqu'à 14 mois à 14°C (soit plus de 5800 degrés.jours) (Villumsen et al. 2015).

3.3- Rappels vaccinaux

3.3.1- Utilisation des rappels vaccinaux

Les recommandations des vétérinaires interrogés sur l'utilisation du rappel vaccinal semblent plutôt hétérogènes : certains l'utilisent de façon assez systématique alors que d'autres vont plutôt travailler au cas par cas. Un vétérinaire précise ainsi utiliser les rappels uniquement si l'élevage subit une forte pression infectieuse sur les gros animaux ou sur les reproducteurs.

Les éleveurs, quant à eux, n'utilisent pas non plus systématiquement les rappels vaccinaux. Ainsi, sur 7 éleveurs interrogés et vaccinant leurs animaux, seuls 3 éleveurs utilisent un rappel. Parmi ces trois éleveurs, un élève des animaux reproducteurs : la valeur de ces animaux ainsi que leur cycle de production long expliquent l'utilisation d'un rappel. Un autre éleveur effectue un rappel sur ses truites après une primovaccination par balnéation sur de très petits animaux (2-20g). En effet, la vaccination par balnéation sur des truites de cette taille est généralement efficace, mais de courte durée et est largement améliorée avec l'emploi de rappels vaccinaux (Børgwald & Dalmo 2019). A titre d'exemple, une étude a montré l'efficacité de vaccins commerciaux contre la yersiniose jusqu'à 6 mois seulement après balnéation, à une température entre 8 et 14°C (Deshmukh 2012). Cet éleveur primovaccinant ses animaux en Septembre et en Octobre, le rappel pourrait alors être nécessaire pour assurer une protection contre la furonculose en Juin. Le dernier éleveur effectue un rappel par voie intrapéritonéale un an après la primovaccination, également administrée par injection intrapéritonéale. Ce protocole sert potentiellement à assurer une protection vaccinale chez les animaux avec une longue période de production. Cette voie d'administration permet en effet d'obtenir une protection de longue durée contre la furonculose chez la truite arc-en-ciel (Villumsen et al. 2015). L'utilisation d'un rappel vaccinal un an après la primovaccination permettrait ainsi de relancer l'immunité des truites en fin de production peu de temps avant les éventuels épisodes de furonculose.

Concernant les éleveurs ne faisant pas de rappels sur leurs animaux, il est possible qu'ils considèrent qu'une seule vaccination est suffisante pour couvrir la période à risque de furonculose dans leur élevage. Une autre possibilité est que la charge de travail nécessaire à la vaccination des animaux ne permette la réalisation que d'un seul chantier de vaccination.

3.3.2- Durée entre rappel et primovaccination

Pour les vétérinaires, la durée entre primovaccination et rappel dépend principalement de la voie d'administration de la primovaccination : ainsi, des truites ayant été vaccinées par balnéation devraient avoir leur rappel 3 mois après celui-ci, alors que des truites vaccinées par injection intrapéritonéale peuvent attendre un an après la primovaccination. Cependant, un vétérinaire conseille tout de même de réaliser les rappels 3 mois après la primo-vaccination, peu importe la voie d'administration.

Les éleveurs restent dans cette fourchette de durée : parmi les 3 éleveurs réalisant des rappels vaccinaux, les durées entre primovaccination et rappel sont respectivement de 3 mois, 6 mois et 1 an. L'éleveur réalisant une vaccination par balnéation sur ses jeunes truites en Octobre réalise un rappel par voie injectable 6 mois après, donc juste avant l'été. Même si le rappel est réalisé juste avant la période à risque pour la furonculose, les recommandations faites par les vétérinaires (soit le rappel vaccinal 3 mois après une vaccination par balnéation) ne semblent pas être respectées. Il est cependant possible que le protocole ait été modulé afin de mieux s'intégrer à l'emploi du temps de

l'éleveur. L'immunité conférée par la balnéation est cependant fugace, et l'effet « booster » du rappel pourrait être amoindri s'il est réalisé trop tard, les taux sanguins d'anticorps diminuant rapidement après une première immunisation (Anderson et al. 1979 ; Bøgwald & Dalmo 2019).

3.3.3- Voies d'administration

Les vétérinaires préconisent uniquement les voies orales et injectables (IP) pour la réalisation de rappels vaccinaux, cette dernière étant davantage utilisée sur les animaux subissant une forte pression infectieuse par *A. salmonicida* ou ayant un cycle d'élevage long. Ces deux voies d'administration sont également les voies utilisées par les éleveurs. La balnéation est en effet compliquée à utiliser pour la réalisation de rappels : les animaux étant plus gros, les manipulations pour sa réalisation deviennent difficiles voire impossibles à mettre en œuvre.

Tous les éleveurs réalisant des rappels vaccinaux utilisent l'injection par voie intrapéritonéale. Un éleveur utilise également le vaccin par voie orale sur ses reproducteurs ou sur ses animaux de productions ayant presque atteint leur taille d'abattage, la vaccination de ces animaux évitant probablement l'apparition de furoncles et le déclassement des truites à l'abattoir. Ce choix lui a principalement permis de gagner du temps lors de la réalisation de ses vaccinations.

3.4- Satisfaction des éleveurs et vétérinaires

Alors que les vétérinaires ont plutôt tendance à trouver le vaccin moyennement efficace, les éleveurs sont globalement satisfaits des protocoles qu'ils utilisent. Le problème rapporté par quelques éleveurs est principalement la charge de travail supplémentaire, surtout lorsque celle-ci est réalisée par injection intrapéritonéale.

Un éleveur rejoint cependant l'avis des vétérinaires et trouve le vaccin moyennement efficace sur ses animaux. Afin de contrer cette efficacité médiocre, les vétérinaires souhaiteraient une amélioration des adjuvants afin de rendre la préparation vaccinale plus immunogène. Néanmoins, les adjuvants huileux utilisés dans les vaccins par injection sont déjà connus pour provoquer la formation d'adhérences chez les poissons, de par leur forte capacité inflammatoire (Noia et al. 2014). Ces lésions, lorsqu'elles sont retrouvées sur un faible nombre de poissons, sont pour le moment acceptées (Villumsen et al. 2015) mais l'utilisation d'adjuvants plus immunogènes et moins inflammatoires pourrait conduire à l'augmentation du prix des vaccins, rendant leur accès plus compliqué aux éleveurs. Un travail sur les souches bactériennes est également proposé. Cependant, ce travail sur l'obtention de souches plus immunogènes est possible pour un vaccin commercial, étant donné qu'un nombre fini de souches est utilisé pour un grand nombre d'élevages, mais non réalisable pour un autovaccin, une souche correspondant à un élevage.

4- Conclusion

La furunculose est une maladie bien présente parmi les élevages interrogés et qui pourrait l'être de plus en plus dans les années à venir, en lien avec le changement climatique (Tam et al. 2011). Un des moyens de prévenir cette maladie est l'utilisation de la vaccination. Celle-ci n'est néanmoins pas une généralité à l'heure actuelle, et est souvent considérée comme manquant d'efficacité ou comme une surcharge de travail pour l'éleveur. Ces deux aspects représentent donc un frein à son utilisation, malgré l'importance de la furunculose en élevage.

De plus, même s'il existe quelques préférences comme l'utilisation de la voie injectable, les pratiques constatées sur le terrain sont très hétérogènes. Ainsi, un protocole proposé par un vétérinaire ne ressemblera que peu à celui proposé par un autre, de même pour les protocoles utilisés par les éleveurs. De plus, les protocoles utilisés par les éleveurs peuvent parfois diverger de ceux conseillés par les vétérinaires.

L'absence de réel consensus sur les protocoles vaccinaux à base d'autovaccins contre la furonculose fait que leur utilisation semble être assez empirique. Cet empirisme peut également représenter une des sources du manque d'efficacité parfois relevé par les professionnels de la filière truiticole.

III – Etude expérimentale de l'efficacité vaccinale contre *A. salmonicida* chez la truite arc-en-ciel

Comme nous avons pu le constater lors de l'étude de terrain décrite précédemment, il n'existe pas de protocole vaccinal véritablement établi pour lutter contre la furonculose. Ainsi, même s'il est couramment jugé d'efficacité variable, il est difficile de réellement évaluer l'efficacité de ce vaccin sur le terrain, les protocoles utilisés étant très divers. Cette difficulté est exacerbée par le fait que les autovaccins représentent la majorité des vaccins utilisés contre la furonculose chez la truite arc-en-ciel.

Durant cette étude, notre objectif est d'évaluer l'efficacité de différents protocoles en se basant sur ce qui est fait sur le terrain et notamment de comparer l'efficacité des différentes voies d'administration avec ou sans rappel vaccinal, en utilisant un autovaccin. Un second objectif est d'évaluer la durée de l'efficacité vaccinale en fonction de la voie d'administration employée.

A- Matériels et méthodes

Le protocole expérimental décrit dans ce document a été autorisé par la Direction générale de la recherche et de l'innovation du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (n° APAFIS #35027-2022012811456492 v1) (**Annexe 4**).

Les expérimentations permettant de répondre aux objectifs précédemment cités se sont déroulées sur 23 semaines et ont été divisées en 3 périodes : la phase de primovaccination, la phase de rappel vaccinal et les challenges infectieux. Le premier challenge infectieux permet d'étudier l'efficacité d'une unique prise vaccinale après 1425 degrés.jours (3 mois à 16 °C). Le second challenge infectieux permet, quant à lui, d'évaluer l'efficacité de protocoles comprenant un rappel vaccinal, ainsi que l'efficacité d'une seule prise vaccinale après 2470 degrés.jours (6 mois à 16 °C). La chronologie des évènements est résumée sur la **Figure 27**.

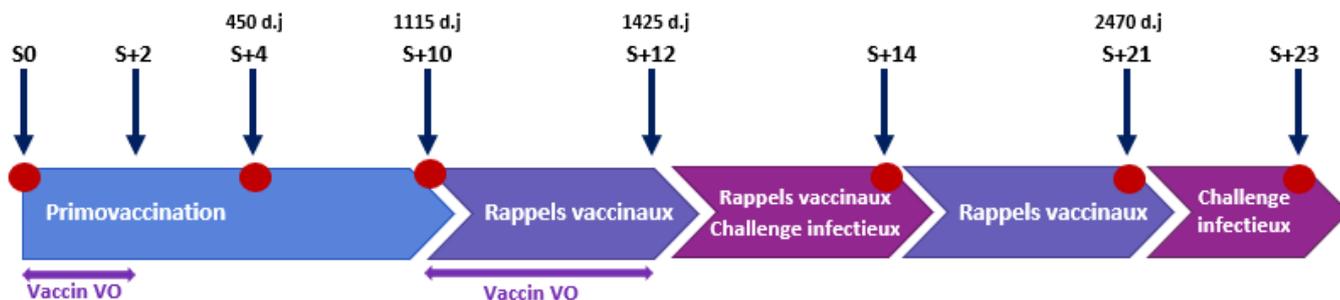


Figure 27 : Déroulement global de l'expérimentation. Les pastilles rouges représentent les moments où les prélèvements sanguins ont lieu. Degrés.jour : d.j et semaine : S sur la frise

Les 13 lots d'animaux ont été définis et répartis de la façon suivante :

- Lots soumis au premier challenge infectieux C1 :
 - Lot NV-C1 : animaux Non Vaccinés
 - Lot VO-C1 : animaux avec primovaccination par Voie Orale
 - Lot IP-C1 : animaux avec primovaccination par injection IntraPéritonéale
 - Lot Baln-C1 : animaux avec primovaccination par Balnéation
- Lots soumis au second challenge infectieux C2 :
 - Lots avec rappel vaccinal :
 - Lot VO-IP : primovaccination VO et rappel vaccinal IP
 - Lot Baln-IP : primovaccination Baln et rappel vaccinal IP
 - Lot IP-IP : primovaccination et rappel par IP
 - Lot IP-VO : primovaccination par IP et rappel par VO
 - Lots sans rappel vaccinal :
 - Lot VO-C2 : primovaccination VO sans rappel
 - Lot IP-C2 : primovaccination IP sans rappel
 - Lot Baln-C2 : primovaccination Baln sans rappel
 - Lot NV-C2 : animaux Non Vaccinés
- Lot témoin négatif :
 - Lot NV-NC : animaux Non Vaccinés Non Challengeés

1- Matériel d'étude nécessaire à l'expérimentation

1.1- Animaux utilisés

Les truites utilisées pour cette étude sont des truites triploïdes stériles, arrivées le 14 Octobre 2021 à un poids moyen de 5g sur la station expérimentale aquacole d'Oniris, en provenance de la Pisciculture Expérimentale INRAE des Monts d'Arrée (PEIMA). Ces truites sont indemnes vis-à-vis des maladies réglementaires en France. De plus, aucun cas de furunculose n'a été observé à la PEIMA depuis plusieurs années et aucune vaccination contre la furunculose n'y est pratiquée.

Les poissons ont été maintenus à la station aquacole tout le temps de leur croissance, jusqu'à atteindre un poids moyen de 150g au début de la manipulation (Mars 2022). Ces animaux ont connu un épisode de flavobactériose (*Flavobacterium spp.*) au mois de Novembre 2021, épisode ayant conduit à la mise en place d'un traitement de 10 jours au florfénicol (10 mg/kg) dans l'alimentation du 17 au 27

Novembre 2021. Ce traitement a été achevé 4 mois avant le début de notre essai. Un total de 689 truites est disponible pour l'ensemble de l'expérimentation. Chaque lot est composé de 45 animaux (soit 585 animaux au total) Le surplus de truites a, d'une part, permis d'anticiper d'éventuelles épisodes de mortalité, notamment du fait des différentes manipulations d'anesthésie et en cas de résurgence de flavobactériose (50 poissons disponibles) et d'autre part a été utilisé dans une autre étude complémentaire visant à étudier l'expression des gènes de l'immunité (54 poissons). Les résultats de cette étude ne seront pas décrits dans ce manuscrit.

1.2-Maintenance des animaux

Les truites ont été nourries pendant l'ensemble de l'expérimentation avec l'aliment NEO 19 CDC F4, un aliment de croissance extrudé fourni par la SCA Le Gouessant. Sa composition est précisée dans l'**Annexe 5**. Hors période de vaccination et de challenge infectieux, les truites ont été nourries à l'aide d'un distributeur automatique calibré, rempli chaque jour avec la quantité de nourriture à distribuer pour la journée. Les animaux ont reçu quotidiennement 1,4% de leur biomasse en nourriture, avec une période de jeun le vendredi et le dimanche, correspondant ainsi à une alimentation quotidienne à 1% sur une semaine.

En dehors des périodes de challenge infectieux, les truites ont été maintenues dans des bassins de 1000L, avec une eau à $16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en circuit recirculé et avec apport constant en oxygène via un bullage d'air. Les bassins sont enrichis avec des tuyaux en PVC, permettant aux animaux d'explorer et de se cacher au besoin.

1.3-Souche d'*Aeromonas salmonicida* utilisée et culture

Deux souches d'*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ont été utilisées lors de cette expérimentation. La souche CAE 235 est une souche isolée sur un cas clinique de furunculose de truite arc-en-ciel par le Laboratoire Départemental Vétérinaire des Landes (40) en 2006. La souche 1414 est issue de la souche CAE 235 après deux passages sur truites arc-en-ciel en 2017. Ces deux souches sont conservées depuis à -80°C .

Lors de l'expérimentation, ces souches ont été cultivées sur milieu Tryptone Soja (gélose TSA ou bouillon TSB, BOKAR Diagnostics) à 20°C , en condition aérobie.

1.4-Préparation de la souche bactérienne pour le challenge infectieux

Un essai de virulence a été réalisé une semaine environ avant la réalisation du premier challenge infectieux : la souche CAE 235 a été remise en culture sur gélose Tryptone Soja (TSA, BOKAR Diagnostics) jusqu'à observation d'une pigmentation (apparaissant en général entre 48 et 72h) à 20°C . Quelques colonies ont ensuite été repiquées dans un bouillon Tryptone Soja (TSB, BOKAR Diagnostics) pendant 24 h à 20°C . La suspension bactérienne obtenue a de nouveau été repiquée en TSB pendant 5 h à 20°C , permettant ainsi d'obtenir une population bactérienne en phase de croissance exponentielle à une concentration de 10^8 UFC/mL, correspondant à une densité optique à 625nm comprise entre 0,28 et 0,35. Une dilution en eau physiologique stérile a été réalisée afin d'obtenir une solution à 10^7 UFC/mL, utilisée pour infecter 5 poissons par injection intramusculaire (100 μL par poisson, soit 10^6 UFC/poisson). La souche du premier poisson mort était considérée comme la plus virulente et a été récupérée par ensemencement de la rate et du rein sur gélose TSA.

La souche virulente ainsi sélectionnée a été remise en culture avant chaque challenge infectieux de cette expérimentation, à 20 °C jusqu'à observation d'une pigmentation sur des géloses TSA. Quelques colonies ont ensuite été repiquées dans des flacons de TSB de 50mL à 20 °C pendant 48h puis transférées dans des flacons de TSB de 500 mL la veille du challenge. La densité bactérienne a été contrôlée par mesure de la densité optique, de la même façon que précédemment. Une fois la densité optique souhaitée obtenue (environ 0,3 à 625 nm), correspondant à une concentration bactérienne de 10^8 UFC/mL, le contenu de ces flacons a été mélangé dans un unique récipient, permettant d'homogénéiser les cultures. Un dénombrement de la suspension bactérienne a également été réalisé grâce à l'ensemencement de Steers, afin de vérifier la concentration bactérienne.

1.5- Préparation des autovaccins contre *Aeromonas salmonicida*

Les autovaccins utilisés ont été fournis par le laboratoire Biovac/CEVA situé à Beaucouzé (49). Ces vaccins sont des vaccins inactivés et adjuvés, produits à partir de la souche CAE 1414. L'ordonnance correspondant à leur prescription se trouve en **Annexe 6**. Les flacons ont tous été conservés à +4 °C en attendant leur utilisation. La description de leur préparation est réalisée ci-après, par forme d'administration.

1.5.1- Vaccin par voie intrapéritonéale

Le vaccin par injection est un vaccin huileux avec une concentration de 10^9 UFC/mL. Le volume de vaccin à injecter est de 100 µL par animal, dans la cavité péritonéale. Deux flacons de 50mL étaient disponibles pour l'ensemble de la manipulation. Aucune préparation préalable, mis à part une homogénéisation avant utilisation, n'a été faite avant utilisation.

1.5.2- Vaccin par balnéation

Le vaccin par balnéation se présente sous la forme d'un vaccin « aqueux », à une concentration de 10^{10} UFC/mL. Ce vaccin est à diluer au 1/10^{ème} dans du PBS afin d'obtenir la solution vaccinale à 10^9 UFC/mL. Un litre de solution vaccinale après préparation permet de vacciner environ 500 g de poissons. Vingt flacons de 50 mL étaient disponibles pour la manipulation, permettant ainsi de préparer 10 L de solution vaccinale.

1.5.3- Vaccin par voie orale

Le vaccin par voie orale est un vaccin huileux de concentration bactérienne égale à 10^9 UFC/mL et à incorporer dans l'aliment des truites. Le mélange a été réalisé à l'aide d'un robot mélangeur la veille de la vaccination des truites. La quantité de vaccin à ajouter à l'aliment a été incorporée au fur et à mesure pendant le mélange. Chaque truite à vacciner devant ingérer 100µL (soit 10^8 UFC/truite) de vaccin sur l'ensemble de la période de vaccination, cette quantité dépendait du nombre d'animaux. Après homogénéisation, de l'huile de foie de morue a été ajouté progressivement à hauteur de 2% du poids d'aliment à compléter (permettant d'obtenir un aliment à 25% de matières grasses), et le mélange a été poursuivi pendant 15 minutes. L'aliment supplémenté ainsi obtenu a été stocké dans un seau rigoureusement identifié, avec la date de fabrication et la quantité d'éléments ajoutés, et placé au réfrigérateur à +4 °C.

Au vu du poids moyen des animaux et du nombre d'animaux à vacciner, 2 lots de 532,6 g d'aliment ont été préparés pour la primovaccination, chacun contenant 10mL d'huile de foie de morue et 7,95 mL de vaccin. De la même façon, 2 lots de 261 g d'aliment ont été réalisés pour le rappel vaccinal, avec 5mL d'huile de foie de morue et 2,25mL de vaccin. Un lot permettait de vacciner les animaux sur une période de 5 jours.

2- Déroulé de l'expérimentation

Après un premier tri permettant d'exclure les animaux présentant des lésions externes (exophtalmie, scoliose...) ou présentant des valeurs de poids extrêmes (de moins de 90 g ou plus de 210 g), 689 truites (en comptant les animaux surnuméraires) ont été intégrées à l'étude expérimentale. Comme indiqué précédemment, 13 lots ont été constitués, dépendant des modalités d'administration du vaccin en primovaccination, du rappel vaccinal et du challenge infectieux.

2.1- Allotement et primovaccination des animaux (S0)

Les 689 truites ont été réparties, dans un premier temps, en quatre lots :

- Un lot (Baln) de 159 animaux, vacciné par balnéation
- Un lot (IP) de 210 animaux, vacciné par injection intrapéritonéale
- Un lot (VO) de 161 animaux, vacciné par voie orale
- Un lot (NV) de 159 animaux, non vacciné

La répartition des animaux est schématisée dans la **Figure 28**. L'allotement a été réalisée deux semaines avant le début de l'expérimentation. Le poids des animaux du lot Baln était compris entre 90 et 150g et celui des autres lots était compris entre 110 et 210g.

En vue de l'anesthésie, toutes les truites de l'expérimentation ont été mises à jeun 24h avant le début des manipulations.

Les truites ont été anesthésiées dans un bac contenant 50 L d'eau et 0,08 g/L de MS-222 (SIGMA Aldrich, France). Elles ont été pesées à l'aide d'une balance avec une précision de $\pm 0,01$ g. Un prélèvement sanguin de 200 μ L a été fait au niveau de la veine caudale à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille de 23 G, changées entre chaque truite. Les prélèvements sanguins ont été conservés au réfrigérateur à +4 °C une nuit avant récupération du sérum. Celui-ci a été récupéré après centrifugation 15 min à 600 g et conservé à -20 °C avant analyse.

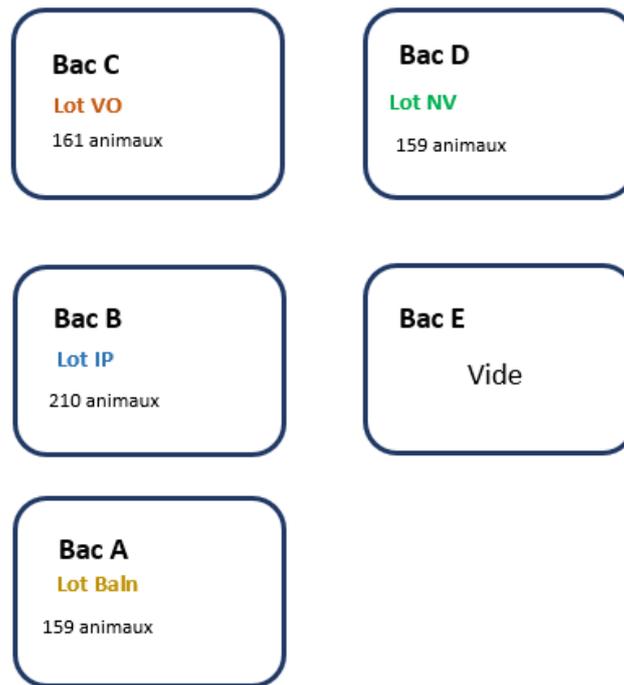


Figure 28 : Disposition de la salle 1 lors de la primovaccination.

Les animaux vaccinés par injection ont chacun reçu 100 µL d'autovaccin par voie intrapéritonéale, administré à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille hypodermique de 23 G crânialement aux nageoires pelviennes. Les aiguilles et seringues ont été changées tous les 10 poissons. Afin de faciliter la contention pour l'opérateur, la truite à vacciner était placée dans un dispositif permettant de stabiliser sa position (cf. **Figure 29**). La vaccination a été réalisée immédiatement après le prélèvement sanguin.



Figure 29 : Dispositif de contention utilisé lors de la réalisation de l'injection intrapéritonéale

Les animaux vaccinés par voie orale ont été nourris avec une ration correspondant à 0,4 % de leur poids vif (complétée par de l'aliment sans supplémentation, afin d'atteindre un rationnement correspondant à 1 % du poids vif) pendant 2 x 5 jours, espacés de 5 jours avec un aliment non supplémenté. La vaccination a débuté dès la fin de l'ensemble des pesées et prélèvements sanguins.

Concernant les truites vaccinées par balnéation, la vaccination a été réalisée par immersion d'un groupe de 13 ou 14 poissons dans des bacs contenant 3,3 L de solution vaccinale à 10^9 UFC/mL pendant une minute (cf. **Figure 30**). Un bac de 3,3L de solution vaccinale a permis de réaliser la balnéation de 4 lots de 13 ou 14 poissons. Les animaux ont été replacés dans leur bac d'origine après leur vaccination.



Figure 30 : Réalisation de la vaccination par balnéation.

2.2- Efficacité vaccinale par voie d'administration : premier challenge infectieux (S12 à S14)

2.2.1- Réallotement

45 animaux ont été sélectionnés aléatoirement pour être déplacés dans la salle n°3, où le challenge infectieux a eu lieu. Chaque lot a été distribué dans 3 bacs de 15 animaux chacun, selon le plan illustré dans la **Figure 31**. Les truites ont été maintenues dans des bacs de 200 L jusqu'à la fin du challenge infectieux. Ce réallotement a eu lieu deux semaines avant la réalisation du challenge infectieux (S10). Des enrichissements permettant aux truites de se cacher sont présents dans chaque bac. Les autres truites ont été maintenues dans la salle n°1, dans leur bac d'origine.

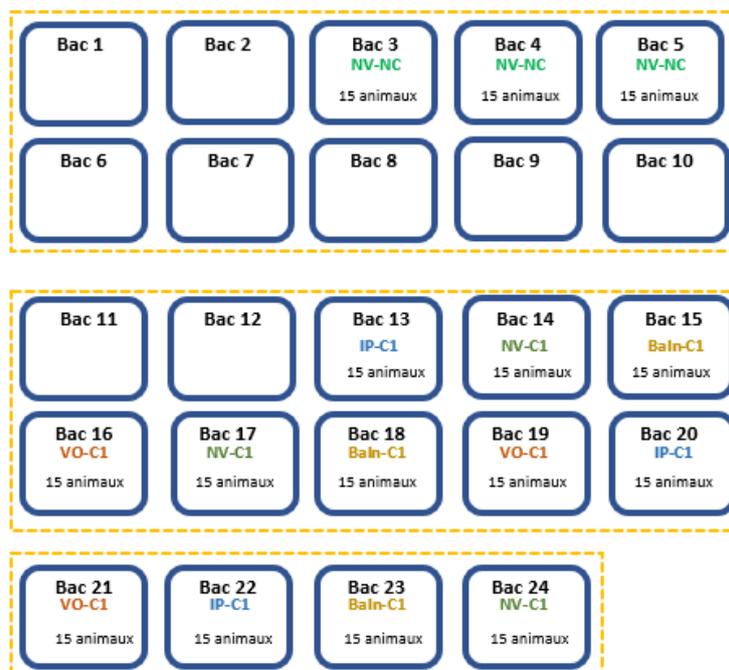


Figure 31 : Disposition de la salle 3 lors du premier challenge infectieux

2.2.2- Challenge infectieux 3 mois (1425 degrés.jour) après primovaccination

Les animaux de la salle 3 ont tous été anesthésiés et pesés de la même façon que lors des manipulations précédentes. Un prélèvement sanguin de 200 µL a également été réalisé. Les truites ont ensuite été réintégréées à leur bac respectif.

Les animaux du lot NV-NC étant destinés à rejoindre le bac D avec le lot NV-C2 dans la salle 1 à la fin de la période du challenge infectieux, ils ont été marqués à l'aide d'une agrafe pour permettre leur distinction. Leur réutilisation a permis de limiter le nombre d'animaux utilisés lors de cette expérimentation. Ces animaux ont été placés sur une travée différente des lots challengés pendant toute la durée du challenge infectieux, afin de limiter les risques de contamination par *A. salmonicida*. Les mouvements des lots de truites entre les deux salles utilisées lors de cette étude sont résumés dans la **Figure 32**.

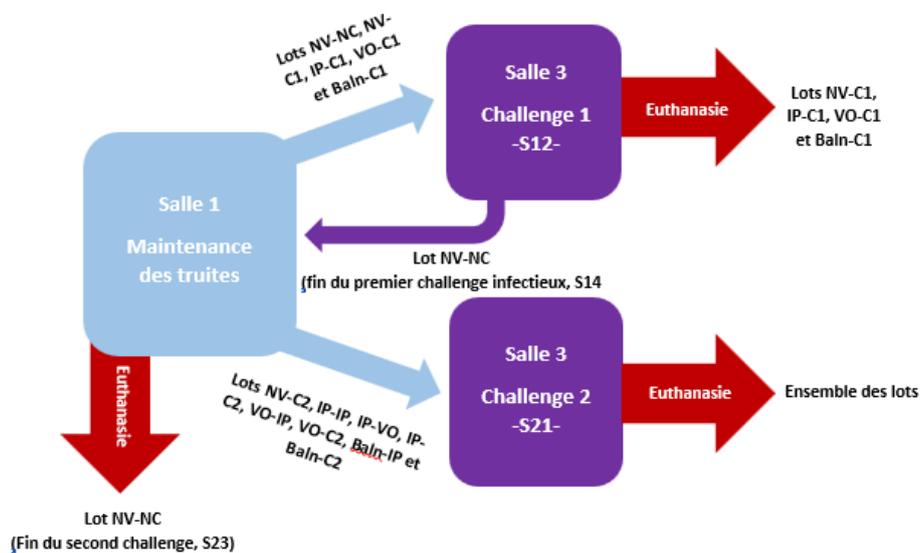


Figure 32 : Synthèse des mouvements des différents lots de truite entre la salle 1 et la salle 3

Afin de réaliser le challenge infectieux par balnéation, le niveau des bacs a été abaissé à 50 L, avec ajout de 500 mL de solution bactérienne de TSB contenant 10^8 UFC/mL d'*A. salmonicida* dans l'eau, permettant ainsi d'obtenir une concentration finale en bactéries de 10^6 UFC/mL. L'eau n'a pas été renouvelée pendant 24h mais un apport d'oxygène a néanmoins été assuré en continu via un bullage d'air. Les animaux témoins négatifs NV-NC ont subi le même traitement, mais en recevant 500mL de TSB stérile.

Les animaux ont été observés deux fois par jour pendant deux semaines, date marquant la fin du challenge avec la souche CAE 235 et l'euthanasie des truites. Les animaux morts ou moribonds (c'est-à-dire ayant de grandes difficultés à la nage et/ou restant au fond du bac sans mouvement lors de stimulation et/ou présentant des furoncles de plus d'1 cm²) ont été retirés des bacs, et la date de leur mort ainsi que leurs signes cliniques externes ont été notés sur une fiche de suivi (cf. **Annexe 8**). Les animaux moribonds ont été euthanasiés à l'aide de 2-phénoxyéthanol 0,6% (SIGMA Aldrich). La **Figure 33** présente quelques exemples de furoncles observés chez les truites challengées.



Figure 33 : Furoncles à différents stades observés chez les truites infectées par *Aeromonas salmonicida*

Les truites mortes ou euthanasiées au cours des deux semaines ont été autopsiées afin de relever les lésions internes et de réaliser des prélèvements bactériologiques (cf. paragraphe III.A.2.4). Au bout de 2 semaines post challenge infectieux, tous les animaux survivants ont été euthanasiés, avec autopsie et réalisation de prélèvements bactériologiques de la même façon que précédemment. Les truites du lot NV-NC ont été réintroduites dans le bac D (salle 1) avec les autres truites non vaccinées. Afin de vérifier qu'il n'y a pas eu d'infection par *Aeromonas salmonicida*, 6 individus ont été autopsiés et prélevés de la même façon que les animaux des lots challengés.

2.3- Second challenge infectieux 2470 degrés.jour (6 mois) après primovaccination (S21 à S23)

2.3.1- Rappels vaccinaux (S10)

Selon le même procédé que pour la primovaccination, après anesthésie au MS-222 (SIGMA Aldrich, France), tous les animaux ont été pesés. Des échantillons sanguins ont également été prélevés sur chaque truite.

Trois lots de 45 truites maximum, dépendant du nombre d'animaux surnuméraires, provenant respectivement des lots Baln, IP et VO, ont été sélectionnés aléatoirement. Ces animaux ont été vaccinés par voie intrapéritonéale, l'injection de 100 µL de solution vaccinale étant réalisée à la suite du prélèvement sanguin, de la même façon que celle décrite précédemment.

Un lot de 48 poissons sélectionnés aléatoirement parmi les truites primovaccinées par injection intrapéritonéale a reçu un rappel par voie orale. Ce lot a été placé dans le bac E. L'aliment contenant le vaccin correspond, de la même façon que lors de la primovaccination, à 0,4 % du poids vif des animaux. Le rappel vaccinal a commencé le même jour que la manipulation, en fin de journée.

Les animaux ayant eu uniquement une primovaccination et partageant les mêmes bacs que les animaux ayant reçu un rappel ont été identifiés à l'aide d'une agrafe posée crânialement à leur nageoire dorsale.

Les lots ont été renommés XX-xx, « XX » correspondant à la voie d'administration utilisée pour la primovaccination et « xx » à la voie utilisée pour le rappel vaccinal. Les animaux ne recevant pas de rappel ont eu le code « sR ». La **Figure 34** résume la disposition de chacun des lots dans la salle 1.

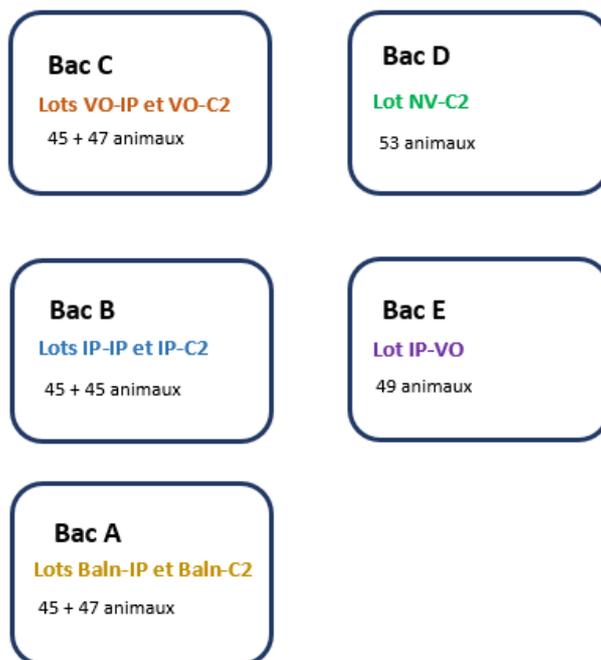


Figure 34 : Disposition de la salle 1 lors du rappel vaccinal

2.3.2 – Réallotement et réalisation du challenge infectieux

Les truites de chaque lot ont été réparties aléatoirement dans la salle 3, où le challenge infectieux a eu lieu, selon le plan de la **Figure 35**. Chaque lot a été distribué dans 3 bacs équivalents, selon le nombre total de truites dans les lots. Les truites ont été déplacées en salle 3 après la pesée et le prélèvement sanguin. Les animaux ont été maintenus dans les mêmes conditions que lors du premier challenge infectieux. Par manque de bacs dans la salle 3, les poissons du lot NV-NC ont été maintenus dans la salle 1.

Le challenge infectieux et le suivi des animaux ont été réalisés de façon identique à la description du 1^{er} challenge, faite dans le paragraphe III.A.2.2.2.

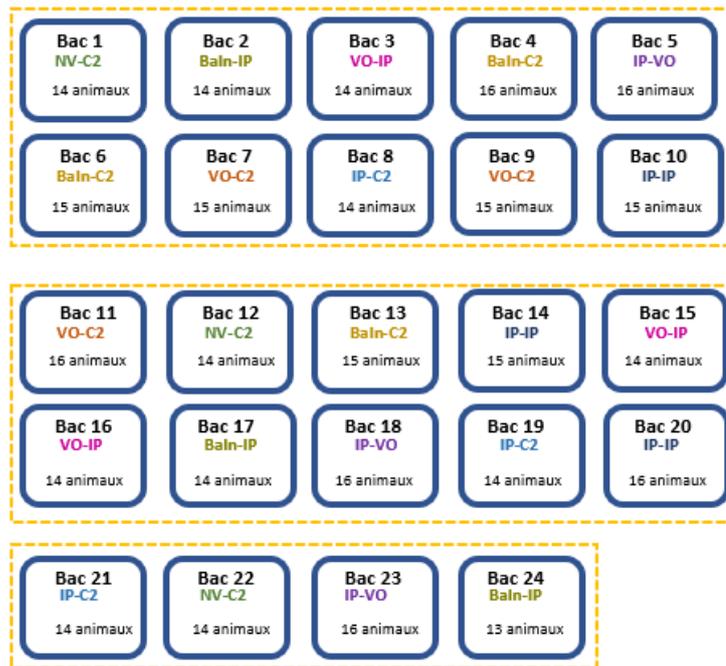


Figure 35 : Disposition de la salle 3 lors du second challenge infectieux

2.4- Suivi de la mortalité et démarche nécropsique

Lors de chaque challenge infectieux, les animaux retrouvés morts ont été autopsiés, de même pour les animaux moribonds après euthanasie. La date de la mort ainsi que les observations faites lors de l'autopsie ont été notées sur la fiche d'autopsie correspondant au bac d'origine du poisson (cf. **Annexe 9** pour exemple). Tous les animaux euthanasiés et retrouvés morts ont été autopsiés le jour même, permettant ainsi le relevé des lésions internes comme la présence de pétéchies (cf. **Figure 36**). Un document de référence a été créé afin de limiter la subjectivité entre les différents opérateurs participant au suivi des animaux (cf. **Annexe 10**).



Figure 36 : Pétéchies sur la paroi abdominale et le foie de truites infectées par *Aeromonas salmonicida*

Afin de confirmer que la mort des truites était bien due à l'infection par *Aeromonas salmonicida*, des prélèvements sur gélose TSA ont été réalisés sur le rein et les lésions cutanées ou le mucus, lorsqu'aucune lésion externe n'était visible. Ces géloses ont été mises en culture à +22°C pendant 48h. L'apparition d'une pigmentation brune au bout de quelques jours de culture, comme sur la **Figure 37**,

a permis de confirmer la présence d'*A. salmonicida*. De la même façon, afin d'infirmier l'implication d'autres agents pathogènes sur les animaux morts ou moribonds, comme *Flavobacterium spp.*, des prélèvements de rein et de rate ont été mis à cultiver sur gélose FLP culture à +16°C.

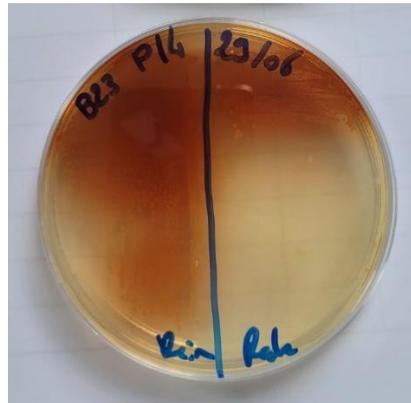


Figure 37 : Culture d'*Aeromonas salmonicida* sur prélèvement de rein et de rate de truite infectée. La pigmentation brune caractéristique apparaît en 48h en moyenne.

En fonction des observations cliniques, nécropsiques et bactériologiques, les animaux ont été classés en plusieurs catégories :

-les truites « positives » : l'isolement d'*Aeromonas salmonicida* sur prélèvement rénal s'est révélé positif

-les truites « douteuses » : les animaux ont présenté une forme clinique de maladie (c'est-à-dire sont soit morts une semaine maximum après le challenge infectieux, soit ont présenté des furoncles ou des pétéchies) mais les résultats de bactériologie n'ont pas permis pas de mettre en cause *A. salmonicida* ou *Flavobacterium spp.*

-les truites « négatives » : les truites n'ont pas présenté de forme clinique et aucun résultat bactériologique n'est positif ou bien les truites ont présenté une forme clinique et seuls les isollements de *Flavobacterium spp.* se sont révélés positifs.

2.5- Suivi de la production d'anticorps sanguins anti-Ass

Les prélèvements sanguins ont été réalisés durant chacune des manipulations précédentes, ainsi que 4 semaines après la primovaccination et le rappel vaccinal et à la fin des challenges infectieux (cf. **Figure 27**), afin d'étudier la production d'anticorps après vaccination et après le challenge infectieux. Les animaux retrouvés morts ou moribonds pendant les challenges infectieux ont également été prélevés, lorsque cela était possible.

La quantité d'anticorps spécifiques anti-Ass des *sera* a été analysée par la technique ELISA indirecte décrite en **Annexe 7**. Pour chaque lot et chaque date de prélèvement, 23 échantillons de *serum* ont été analysés.

3- Traitement et analyse des données récoltées

L'ensemble des données récoltées a été compilé dans une base de données sous format .xlsx, analysée via le logiciel R (version 4.2.0).

3.1- Analyse du poids au cours du temps

L'analyse du poids des truites de chaque lot au cours du temps a été réalisée via la création d'un modèle linéaire multiple, en utilisant les packages suivants : *lmerTest*, *stats*, *lsmeans*, *car*, *performance*, *ggpubr*, *visreg*, *ggplot2* et *emmeans*.

La régression linéaire simple permet d'expliquer une variable quantitative y en fonction d'une variable explicative quantitative ou qualitative x . Cette régression consiste à déterminer l'équation de la droite passant au plus près de l'ensemble des couples (x, y) via la méthode des moindres carrés. Les distances entre les différents points et la droite de régression sont appelées les résidus du modèle. La régression générale multiple est une généralisation de la régression linéaire simple et permet de prendre en compte plusieurs variables explicatives. Les variables explicatives conservées pour la réalisation de la régression multiple sont celles identifiées ayant une p-value inférieure à 0,05 lors d'un test ANOVA de type 3, correspondant à un risque de 5 % de rejeter l'hypothèse nulle H_0 alors que celle-ci est vraie. Ces variables sont donc considérées comme ayant un effet significatif sur la variable à expliquer.

Ici, la valeur à expliquer est le poids des animaux. Les variables explicatives retenues car considérées comme significatives lors des régressions linéaires simples sont le lot et le jour de la pesée. Le modèle de régression linéaire multiple, associé à l'utilisation de la fonction *lsmeans*, permet d'identifier les différences significatives entre deux couples (Lot, Jour), notamment entre deux lots pour un même jour.

Il est également possible de comparer les pentes 2 à 2 des droites de régression du poids en fonction du temps pour chaque lot grâce à la fonction *emtrends*, ce qui revient à comparer le GMQ entre chaque lot. Les pentes de deux lots sont considérées comme significativement différentes lorsque la p-value est inférieure à 0,05.

Des tests de comparaison de moyenne (par test de Student 2 à 2 ou test de Kruskal-Wallis, lorsque les conditions nécessaires pour le test de Student ne sont pas vérifiées) ont été réalisés au préalable afin de vérifier l'absence d'effet du bac sur le poids des animaux d'un même lot à un même temps expérimental. Aucune dépendance n'a été constatée entre le bac et le poids des animaux d'un même lot lors de la pesée avant et à la fin du premier challenge infectieux.

3.2- Comparaison de moyenne et ELISA

Les résultats des analyses par ELISA sont exprimés en DO (Densité Optique), la DO étant proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-Ass de l'échantillon. Les moyennes de DO de chaque lot ont été comparées pour un même temps expérimental en utilisant le test de Kruskal-Wallis. Lorsque la p-value obtenue via ce test est inférieure à 0,05, cela correspond à une différence de moyenne entre deux lots ou plus, sans précision sur les lots concernés. L'utilisation du test de Wilcoxon, disponible dans le package *rstatix*, permet de réaliser des comparaisons entre paires de lots et donc de déterminer plus précisément quels sont les lots statistiquement différents pour un même temps expérimental : on estime qu'il existe une différence significative entre deux lots dès lors que la p-value est inférieure à 0,05.

3.3- Analyse de survie

L'analyse de survie permet de déterminer la probabilité d'un évènement, ici la mort d'un individu, dans le temps. Certains individus ne présentant pas l'évènement à la fin de la période d'étude ont un temps de survie dit « censuré ». Il s'agit ici des animaux ayant survécu au bout de la période de 2 semaines après challenge infectieux. Cette analyse de survie est réalisée via deux modèles : l'estimation de Kaplan-Meier, non paramétrique et le modèle de Cox, semi-paramétrique, en utilisant les packages suivants : *survival*, *survminer*, *ggpubr* et *coxphf*.

L'estimation de Kaplan-Meier est non paramétrique, elle ne se base sur aucune hypothèse sur la distribution des temps de survie. Il n'est donc pas possible d'introduire un possible effet aléatoire lié aux différents bacs où sont réparties les truites. La courbe d'estimation de Kaplan-Meier représente la fonction de survie des animaux au cours du temps, pour chaque lot. Le test du log-rank permet de comparer la probabilité de survie entre 2 lots différents. Lorsque la p-value du test est inférieure à 0,05, on peut conclure à une différence de survie significative entre les deux lots. Cette différence ne peut cependant pas être quantifiée via cette méthode.

Le modèle de Cox est un modèle semi-paramétrique, et permet donc d'affiner l'estimation de Kaplan-Meier, en prenant en compte un éventuel effet aléatoire lié aux bacs où se trouvent les animaux. En effet, lors du challenge infectieux, les animaux d'un lot sont répartis en 3 bacs. Plusieurs facteurs peuvent expliquer une variation de mortalité entre deux bacs : la quantité de bactéries présente dans l'eau lors de la baignade peut différer entre deux bacs, les animaux malades peuvent excréter plus ou moins de bactéries etc. Le modèle de Cox permet de se prémunir de ces effets aléatoires difficilement quantifiables. Il s'agit d'une méthode de régression permettant d'expliquer le risque instantané de mort de l'animal en fonction de plusieurs variables explicatives. Dans notre étude, seule la variable explicative « Lot » a été retenue.

Le modèle de Cox permet d'obtenir des Hazard Ratio (HR) qui, contrairement à l'estimation de Kaplan-Meier, permettent de quantifier la différence de survie au cours du temps entre deux lots. Ces Hazard Ratio s'interprètent de la façon suivante :

HR = 1 : Le lot étudié a le même risque de mortalité au cours du temps que le lot de référence choisi

HR < 1 : Le lot étudié a un risque de mortalité au cours du temps moindre par rapport au lot de référence

HR > 1 : Le lot étudié a un risque de mortalité au cours du temps accru par rapport au lot de référence

La valeur d'un hazard ratio est considérée comme statistiquement significative lorsque la p-value est inférieure à 0,05. De plus, afin que le lot soit effectivement considéré comme influant sur la mortalité par rapport au lot de référence, l'intervalle de confiance à 95% ne doit pas comprendre la valeur 1. Dans le cas où la p-value est supérieure à 0,05 mais que l'intervalle de confiance à 95% comprend la valeur 1, alors le lot a bien un effet sur la mortalité sans que celui-ci ne soit formellement identifié.

3.4- Régression logistique binomiale et signes cliniques

Un modèle de régression logistique binomiale de Firth a été utilisé afin d'évaluer les interactions entre des variables de type 0/1 (Non/Oui) comme la mortalité ou encore la présence de furoncles. Le modèle de régression logistique de Firth a été choisi afin de pouvoir analyser les données malgré une

séparation parfaite entre certaines données, notamment chez les animaux non challengés qui n'ont présenté aucune mortalité ou aucun signe clinique. Un effet aléatoire lié au bac est également ajouté afin de se prémunir des mêmes variations que celles décrites dans le paragraphe précédent. Les packages utilisés pour cette analyse sont les suivants : *logistf* et *nnet*.

Les variables à expliquer retenues pour le premier challenge sont :

- la mortalité
- la présence de signes cliniques externes : seule la présence de furoncle a été retenue
- la présence de signes internes lors des autopsies : seules l'absence d'aliment dans le tube digestif et la présence de pétéchies ont été retenues
- la culture d'*Aeromonas salmonicida* sur les prélèvements de rein et de mucus

Les variables explicatives retenues pour le premier challenge sont :

- le contact ou non avec la bactérie lors du challenge infectieux
- la présence de signes cliniques externes
- la présence de signes cliniques internes
- la culture d'*Aeromonas salmonicida* sur les prélèvements de rein et de mucus
- le lot (équivalent au protocole vaccinal)

Concernant le second challenge infectieux, les variables à expliquer retenues sont uniquement la mortalité. Les variables explicatives sont, quant à elles, le contact ou non avec la bactérie lors du challenge infectieux et le lot. Les animaux au statut considéré comme « douteux » ont été exclus des analyses.

Des régressions logistiques univariées ont d'abord été conduites, permettant ainsi d'évaluer l'effet d'une seule variable explicative sur la variable à expliquer et de quantifier cet effet par rapport à une référence (en général, le lot non vacciné challengé). Ces régressions permettent, via le calcul d'Odds Ratio (OR), d'évaluer si la variable explicative est un facteur de risque ou un facteur de protection sur la variable à expliquer.

Les odds ratio s'interprètent de la même façon que les Hazard Ratio décrits précédemment :

OR = 1 : la variable explicative n'a aucun effet sur la variable à expliquer par rapport à la référence

OR < 1 : la variable explicative est un facteur de protection sur la variable à expliquer par rapport à la référence

OR > 1 : la variable explicative est un facteur de risque sur la variable à expliquer par rapport à la référence

La valeur d'un odd ratio est considérée comme statistiquement significative lorsque la p-value est inférieure à 0,05. De la même façon que pour les HR, l'intervalle de confiance à 95% ne doit pas comprendre la valeur 1 au risque de ne pas pouvoir interpréter l'influence de la variable explicative sur la variable à expliquer.

B- Résultats

1- Mortalité hors challenge infectieux

La mort d'animaux a été observée à la suite des manipulations de pesée et de prélèvement sanguins : 59 animaux sont morts pendant l'expérimentation, hors challenge infectieux, avec une répartition homogène dans les lots d'animaux. Sur l'ensemble de ces truites, seules 3 ont été retrouvées le jour même ou le lendemain des manipulations : la cause la plus probable de la mort est un accident lors de l'anesthésie. Trois autres truites sont mortes d'hypoxie, à la suite d'une coupure électrique. Cependant, la majorité des animaux sont morts préférentiellement environ 1 semaine après anesthésie et manipulation (ce qui exclue l'hypothèse de l'accident anesthésique), et ont développé des infections au niveau du point de prélèvement sanguin et des ulcérations des nageoires. Des prélèvements bactériologiques sur rein et rate ont été réalisés sur géloses TSA et FLP et ont pu mettre en évidence la présence de *Flavobacterium spp.* Le **Tableau 3** résume la distribution des animaux morts de cette maladie dans les lots. Un traitement au Florfénicol à 10mg/kg/j a été réalisé dès le premier épisode de mortalité après la primovaccination avec pour objectif de limiter cette dernière. Ce traitement a été considéré comme un échec, la mortalité due à la flavobactériose ayant continué de façon similaire dès la fin du traitement antibiotique. Celui-ci a été terminé 63 jours avant le premier challenge infectieux.

Tableau 3: Nombre de morts dus à *Flavobacterium spp.* hors période de challenge infectieux. SO : Sans Objet

Lot	S0-S4	S4-S10	S10-S14	S14-S21
NV-NC			0	2
NV-C1	4	4	0	SO
NV-C2			1	1
IP-C1	8	3	1	SO
IP-C2			1	0
IP-IP			0	0
IP-VO			1	0
VO-C1	2	7	0	SO
VO-C2			0	2
VO-IP			2	0
Baln-C1	4	5	0	SO
Baln-C2			0	0
Baln-IP			2	3
Total	18	19	8	8
	53			

2- Adhérences intrapéritonéales chez les animaux vaccinés par voie intrapéritonéale

La présence d'adhérences intrapéritonéales (cf. **Figure 38**) a été observée chez les animaux lors des autopsies. Ces adhérences ont été retrouvées uniquement chez les truites vaccinées au moins une fois par injection intrapéritonéale.



Figure 38 : Adhérences intrapéritonéales observées chez un individu vacciné par injection intrapéritonéale. Noter également la présence de quelques zones mélaniques sur la paroi et la masse adipeuse.

Sur l'ensemble des truites vaccinées au moins une fois par injection intrapéritonéale et ayant été utilisées lors des challenges infectieux, 82,3 % ont présenté au minimum de la fibrine sur les organes abdominaux lors des autopsies. Parmi ces truites ayant présenté des signes d'inflammation dans l'abdomen, plus de la moitié (soit 53,7 %) ont présenté des adhérences sévères entre les organes abdominaux ou entre les organes et la paroi musculaire. Le détail des adhérences observées par lot est présenté dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Répartition des adhérences dans les lots concernés. Adhérence sévère : adhérence entre plusieurs organes et/ou adhérences étendues entre organes et paroi musculaire

Lot	Nombre total d'animaux	Adhérences	Adhérence sévères
IP-C1	42	36 (85,7 %)	24 (66,7 %)
IP-C2	21	18 (85,7 %)	5 (27,8 %)
IP-IP	16	11 (68,8 %)	6 (54,5 %)
IP-VO	18	11 (61,1 %)	8 (72,7 %)
VO-IP	20	19 (95 %)	9 (47,4 %)
Baln-IP	30	26 (86,7 %)	13 (50 %)
Total	147	121 (82,3 %)	65 (53,7 %)

3- Evolution du poids des animaux au cours du temps

L'évolution du poids des animaux entre la primovaccination et la fin du premier challenge infectieux est présentée dans la **Figure 39**. Le poids des animaux des lots NV-NC et NV-C1 est confondu lors de la primovaccination (de S0 à S10), les deux lots n'étant pas encore distingués. Les lots non vaccinés et vaccinés par voie orale (avec ou sans rappel) sont tout à fait similaires dans leur croissance et pour un même temps de pesée. Les animaux vaccinés par voie intrapéritonéale sont, quant à eux,

statistiquement plus légers que les animaux des lots témoins en début d'expérimentation. Cette différence reste néanmoins mineure : au premier jour d'expérimentation, les animaux du lot IP pèsent 159 g contre 167 g pour les truites non vaccinées. Cette différence s'estompe après la réalisation du rappel vaccinal, sauf pour les truites du lot IP-IP qui présentent une différence moyenne de 11 g par rapport aux animaux non vaccinés (cf. **Annexe 11**). De même, les animaux vaccinés par balnéation (avec ou sans rappel) ont un poids significativement inférieur aux animaux non vaccinés tout le long de l'expérimentation. Finalement, 21 semaines après primovaccination, seuls les animaux vaccinés par cette voie d'administration ont un poids statistiquement inférieur aux animaux non vaccinés. Tous les lots montrent tout de même une forte variabilité dans les poids observés. Le détail des p-values obtenues via le modèle de régression linéaire multivarié se trouve en **Annexe 11**.

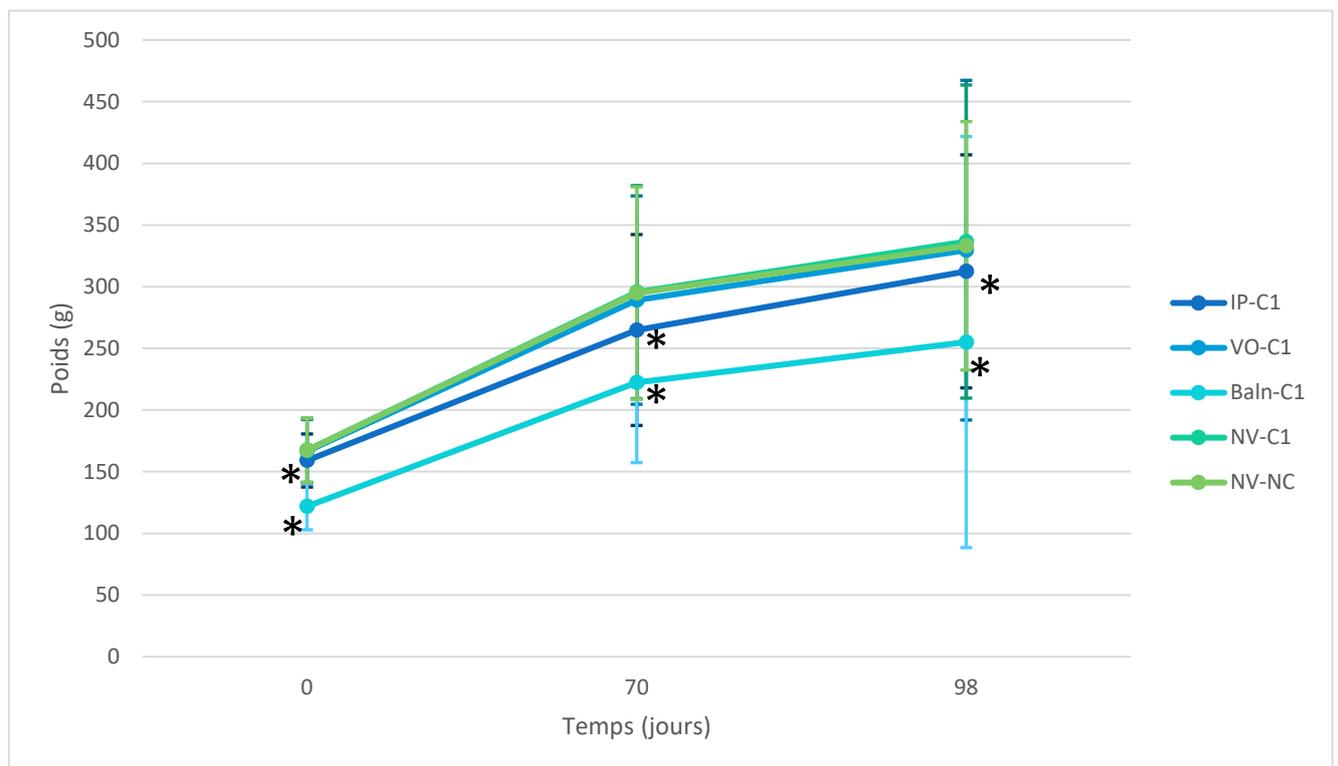


Figure 39 : Evolution du poids des animaux par lot (primovacciné uniquement) en fonction du temps. Les astérisques représentent une différence de poids significative par rapport au lot NV-NC. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 %.

La **Figure 40** permet de préciser ces résultats de croissance en comparant les valeurs des pentes des droites de régression linéaire en fonction du temps pour chaque lot. La pente des droites obtenues s'exprimant en g/j, elle peut être assimilée au GMQ (Gain Moyen Quotidien) des truites. Comme nous pouvons le voir, le GMQ est différent entre les 5 lots concernés par le premier challenge infectieux. Cependant, les GMQ des lots NV-NC, NV-C1 et VO-C1 sont considérés comme similaires. Les lots IP-C1 et Baln-C1 ont également des GMQ statistiquement similaires. Cependant, le GMQ de ces deux lots est significativement inférieur à celui des 3 autres lots.

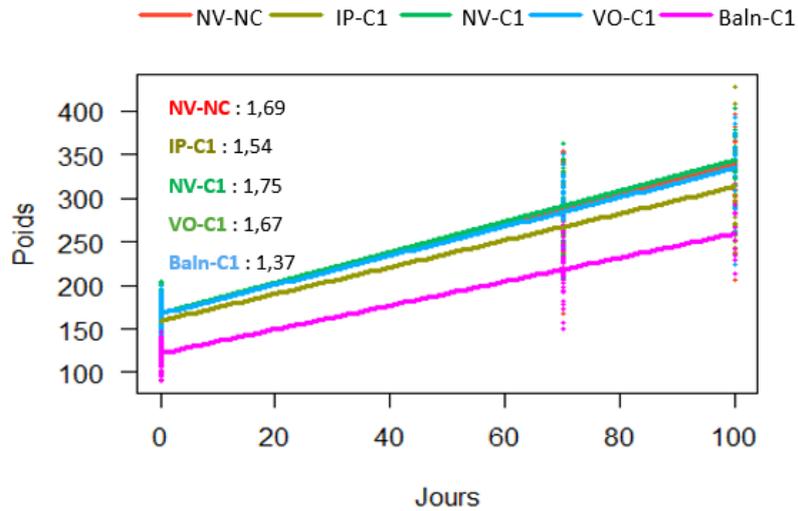


Figure 40 : Courbes de régression linéaire du poids des truites en fonction du temps par lot (primovacciné uniquement)

Comme nous pouvons le voir sur la **Figure 41**, obtenue selon la même méthode que la figure précédente, cette différence de poids s'estompe bien avec le temps et, après la réalisation des rappels vaccinaux, seuls les animaux vaccinés par balnéation ont une croissance moindre par rapport aux animaux non vaccinés. Les animaux du lot IP-IP, malgré un poids inférieur d'environ 11 g par rapport aux animaux non vaccinés, semblent tout de même avoir une croissance similaire aux autres lots. Le détail des p-values des différences entre les pentes se trouve en **Annexe 11**.

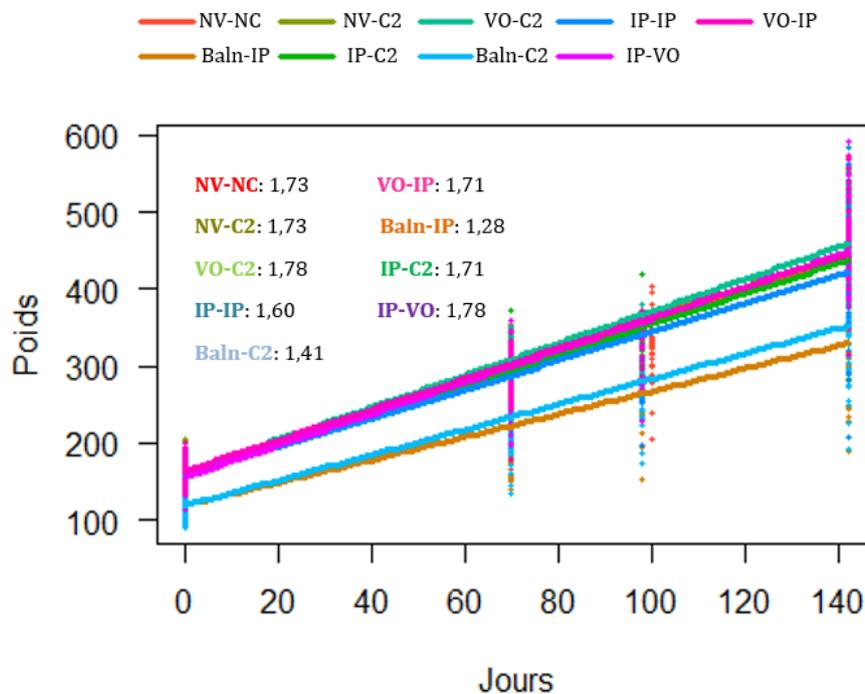


Figure 41 : Courbes de régression linéaire du poids des truites en fonction du temps par lot (avec et sans rappel vaccinal)

4- Evolution de la quantité d'anticorps sanguins des animaux au cours du temps

L'évolution dans le temps de la densité optique (assimilable à la quantité d'anticorps sanguins) des prélèvements sanguins traités par ELISA est présentée dans les **Figures 42 et 43**. Les densités optiques observées pour les animaux des lots NV- NC et NV-C1 sont confondues lors de la primovaccination (de S0 à S10 = jours 70), les deux lots n'étant pas encore distingués. Tous les animaux des différents lots présentent des densités optiques similaires au début de la manipulation (**Figure 42**). Cependant, des différences significatives apparaissent 4 semaines (28 jours) après la primovaccination entre les animaux non vaccinés et les animaux vaccinés par injection intrapéritonéale et par balnéation. Cette augmentation de la quantité d'anticorps sanguins persiste 10 semaines (70 jours) après primovaccination chez les truites vaccinées par injection seulement, les truites vaccinées par balnéation retrouvant une densité optique similaire aux animaux non vaccinés (**Figure 42**). Le détail des densités optiques 4 semaines après primovaccination est présenté en **Annexe 12**.

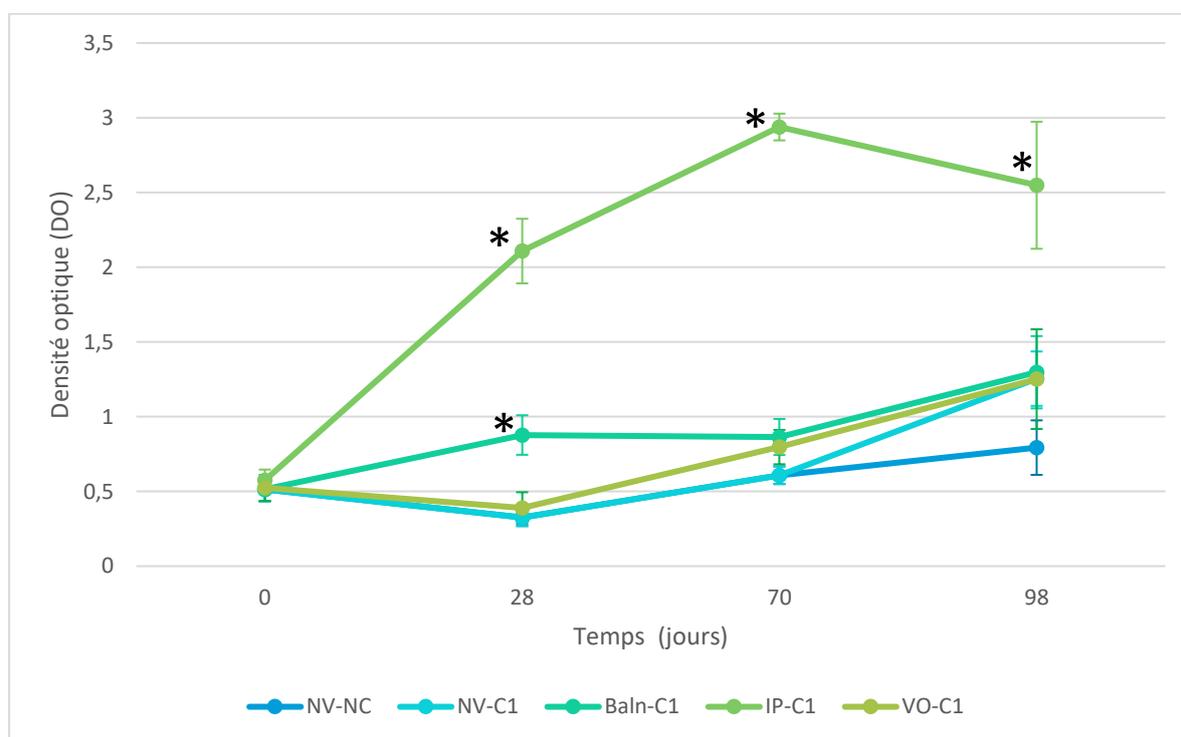


Figure 42 : Evolution de la densité optique (comparable à la production d'anticorps sanguins) chez les lots utilisés lors du premier challenge infectieux. Les astérisques correspondent à une différence significative par rapport au lot NV-NC. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 %.

Comme nous pouvons le voir sur la **Figure 43**, les anticorps sanguins persistent jusqu'à 23 semaines (161 jours) après injection chez les truites vaccinées une unique fois par injection intrapéritonéale. De plus, tous les lots d'animaux ayant reçu au moins une injection intrapéritonéale, que cela soit par rappel vaccinal ou non, ont des quantités d'anticorps similaires à partir de 14 semaines (98 jours) après primovaccination (et 4 semaines après rappel vaccinal). Enfin, les animaux n'ayant reçu qu'une primovaccination par voie orale ou par balnéation continuent d'avoir une production d'anticorps similaire aux animaux non vaccinés jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les p-value des comparaisons de densité optique et le détail de celles-ci 4 semaines après rappel vaccinal se trouvent en **Annexe 12**.

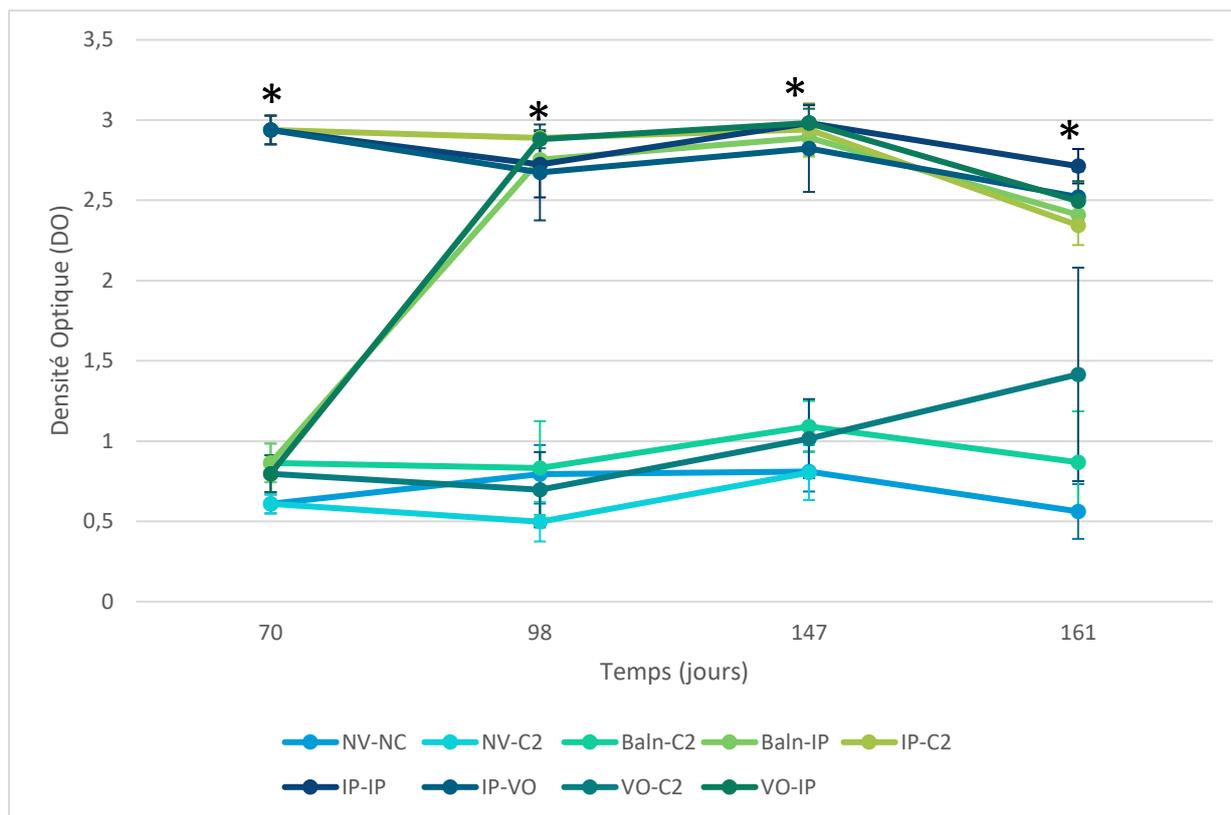


Figure 43 : Evolution de la densité optique (comparable à la production d'anticorps sanguins) chez les lots utilisés lors du second challenge infectieux. Les astérisques correspondent à une différence significative par rapport au lot NV-NC. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95 %.

5- Premier challenge infectieux : comparaison de l'efficacité vaccinale entre les voies d'administration

5.1- Mortalité

La période de recueil des données correspond au début du contact des animaux avec *Aeromonas salmonicida* par balnéation, de S12 à S14. Cinq animaux (3 animaux du lot NV-NC et 2 animaux du lot IP-C1) n'ont pas été inclus dans les analyses car morts entre l'allotement en salle 3 et le début du challenge infectieux, suite à l'arrêt de l'oxygénation de l'eau due à une coupure de courant.

5.1.1- Effet du challenge infectieux sur la mortalité

Sur les 178 animaux soumis au challenge infectieux, 77 truites sont mortes sur les 2 semaines, avec des morts observées dans les 4 lots, soit un taux de mortalité global de 43,3 % (cf. **Tableau 5**). La mortalité a commencé dès le lendemain de la fin du challenge infectieux, avec un mort dans le lot VO-C1. Sur les 77 truites mortes pendant l'ensemble du challenge, 73 sont mortes pendant la première semaine suivant le contact avec *A. salmonicida*.

Tableau 5: Mortalité observée pendant le premier challenge en fonction des lots. RPS (Relative Percent Survival) = $(1 - (\text{mortalité lot vacciné} / \text{mortalité lot NV-C1})) * 100$

Lot	Nombre total d'animaux	Survivants	Morts	Mortalité par lot (%)	RPS (%)
NV-NC (Témoin -)	42	42	0	0	SO
NV-C1 (Témoin +)	45	27	18	40	SO
Baln-C1	45	10	35	77,8	-94,4
IP-C1	43	42	1	2,3	94,2
VO-C1	45	22	23	51,1	-27,8
Total	220	143	77	43,3	

Les animaux soumis au challenge infectieux ont tous présenté une mortalité variable : les extrêmes sont rencontrés chez le lot IP-C1, avec une seule truite morte sur 42 animaux (2,3 % de mortalité) et chez le lot Baln-C1, avec 35 truites mortes sur 45 (77,8 % de mortalité). La mortalité observée chez les animaux du lot NV-C1, ayant été en contact avec la bactérie, est de 40 %. A titre de comparaison, aucun animal non soumis au challenge infectieux (lot NV-NC) n'est mort pendant la période d'observation.

L'odd ratio de l'effet du challenge sur la mortalité (tous lots confondus), obtenu par régression binomiale univariée, est le suivant :

$$OR_{(\text{ref Lot sans challenge})} = 119,25, \text{ p-value} < 0,0001$$

Ce résultat concorde avec ceux obtenus avec le modèle de Cox, présentés plus en détail dans **l'Annexe 12**.

Le challenge infectieux a bien conduit à une mortalité accrue chez les animaux qui y ont été soumis par rapport aux animaux non challengés.

5.1.2- Effet de la voie d'administration du vaccin sur la mortalité

La **Figure 44** présente la probabilité de survie de chaque lot en fonction du temps, selon le modèle de Kaplan-Meier. Les intervalles de confiance à 95 % sont représentés par des aires de couleur autour des courbes correspondantes.

Les truites du lot NV-C1 ont présenté un taux de mortalité de 40 % (**Tableau 3**). Les animaux du lot VO-C1 ont eu une mortalité assez similaire aux témoins positifs (**Figure 44**). Le lot IP-C1 a montré une mortalité de 2,3 % (**Tableau 3**), bien inférieure à ces témoins. Enfin, les animaux du lot Baln-C1 ont eu une mortalité supérieure aux témoins positifs, avec un taux de mortalité de 77,8 % (**Tableau 3**). Le calcul du RPS pour chaque lot vacciné montre que le vaccin par injection intrapéritonéale offre une protection contre la mortalité, avec un RPS de 94,2 % (**Tableau 3**). Cependant, la vaccination par balnéation et, dans une moindre mesure, la vaccination par voie orale, semblent représenter des facteurs de risque concernant la mortalité, avec des RPS de respectivement -94,4 et -27,8 % (**Tableau 3**).

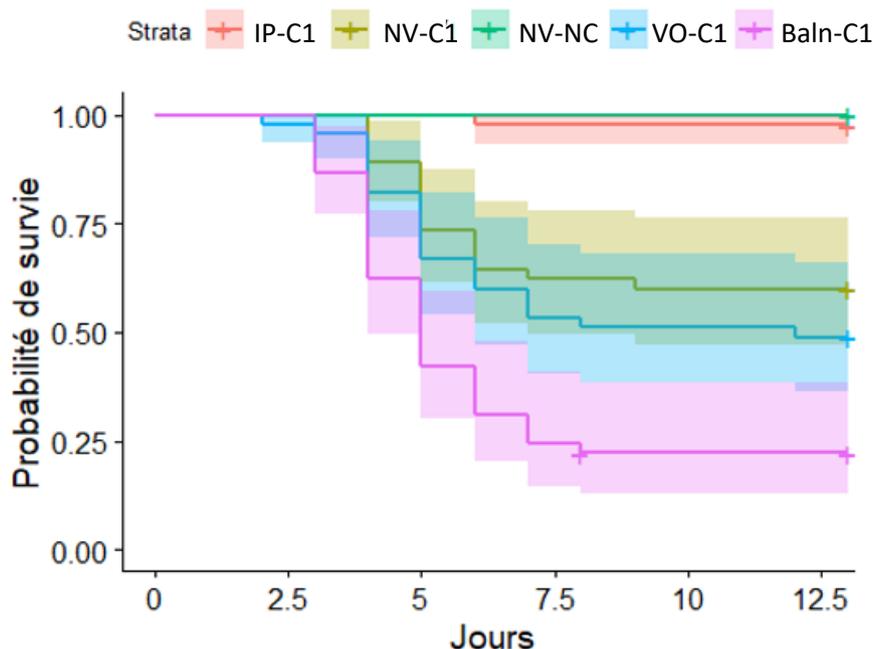


Figure 44: Probabilité de survie des animaux utilisés lors du premier challenge infectieux en fonction du temps et en fonction du lot. Les aires colorées autour des courbes correspondent aux intervalles de confiance à 95%.

Ces résultats sont confirmés par les OR, calculés par un modèle de régression logistique binomiale incorporant un effet aléatoire lié aux bacs :

$$OR_{(\text{ref lot NV-C1})\text{Lot IP-C1}} = 0,05 \text{ (p-value} < 0,0001)$$

$$OR_{(\text{ref lot NV-C1})\text{Lot VO-C1}} = 1,52 \text{ (p-value} = 0,32)$$

$$OR_{(\text{ref lot NV-C1})\text{Lot Baln-C1}} = 5,07 \text{ (p-value} = 0,0003, \text{ IC}_{95\%} = [0,71 - 2,52])$$

Il existe bien une différence significative de mortalité entre le lot IP-C1 et le lot NV-C1, la vaccination par voie intrapéritonéale protège les animaux contre la mortalité due à la furunculose. La différence de mortalité entre le lot VO-C1 et le lot NV-C1 n'est en revanche pas statistiquement significative, le vaccin ne semble donc pas avoir d'effet positif ou négatif sur la mortalité. De façon surprenante, malgré une valeur de p-value inférieure à 0,05, il n'est pas possible d'interpréter la différence de mortalité entre le lot Baln-C1 et le lot NV-C1 car l'intervalle de confiance comprend la valeur 1. Ce résultat est similaire que l'on incorpore un effet aléatoire dans le modèle ou non. Contrairement à ce que laissait penser le RPS du lot Baln-C1 (**Tableau 3**), la vaccination par balnéation ne semble donc pas représenter un facteur de risque concernant la mortalité. La vaccination par voie orale ou par balnéation ne semble, *in fine*, pas induire de protection contre l'apparition de mortalité lors de contact avec *A. salmonicida*.

De plus, le modèle de Cox (incorporant également un effet aléatoire sur les bacs) nous permet de comparer la mortalité très faible du lot IP-C1 au lot NV-NC :

$$HR_{(\text{ref Lot NV-NC})\text{Lot IP-C1}} = 6,17 \text{ (p-value} = 0,28)$$

La p-value étant supérieure à 0,05, il n'existe pas de différence significative entre la mortalité chez les animaux challengés du lot IP-C1 et les animaux du lot NV-NC. La protection conférée par la vaccination intrapéritonéale semble donc très efficace, au point d'induire une mortalité similaire à un lot d'animaux n'ayant pas été en contact avec l'agent pathogène.

Seule l'injection intrapéritonéale semble être efficace contre la furonculose 1425 degrés,jour (3 mois à 16 °C) après vaccination. Cette vaccination confère une protection efficace, permettant d'approcher la mortalité observée chez des animaux n'ayant pas été en contact avec la bactérie.

5.2- Expression clinique et diagnostic de furonculose

Aucun animal du lot NV-NC n'a présenté de furoncle. De même, sur les 6 animaux autopsiés de ce lot, aucun signe clinique de furonculose n'a été observé, et aucun prélèvement bactériologique ne s'est révélé être positif. Ces truites ont donc été réintégrées en salle 1 avec les autres truites non vaccinées (lot NV-C2).

Néanmoins, il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les animaux challengés et les animaux non challengés ni dans l'apparition de furoncles, de pétéchies ou d'anorexie, ni dans la croissance d'*A. salmonicida* après prélèvement de tissu rénal et de mucus. Ces résultats peuvent s'expliquer par le faible nombre d'animaux du lot NV-NC autopsiés (n=6) ou par le faible nombre d'animaux ayant présenté de signes cliniques : à titre d'exemple, seules 28 truites sur les 178 soumises au challenge infectieux ont présenté au moins un furoncle après infection.

5.2.1- Expression de signes cliniques de furonculose selon les lots

Le résumé de l'expression de furoncles, de pétéchies et d'anorexie est présenté dans le **Tableau 6**. Comme nous pouvons le voir dans ce tableau, les signes cliniques les plus fréquemment retrouvés sont les signes cliniques internes, avec 38,8 % des truites challengées ayant exprimé des pétéchies. Ces pétéchies sont le plus souvent la signature d'un processus septicémique, en lien avec la dissémination hématogène de la bactérie. Les truites du lot Baln-C1 semblent particulièrement touchées par ce processus, avec 75,6 % des animaux présentant des pétéchies à l'autopsie. Enfin, le nombre de poissons ayant développé au moins un furoncle reste modérée : seuls 28 poissons, uniformément répartis dans les lots NV-C1, VO-C1 et Baln-C1 ont présenté un furoncle.

Tableau 6 : Expression de signes cliniques de furonculose chez l'ensemble des animaux en fonction des lots. Les pourcentages sont calculés sur l'ensemble des animaux du lot concerné.

Lot	Nombre total d'animaux	Morts	Furoncle	Anorexie	Pétéchies
NV-C1 (Témoin +)	45	18	7 (15,6 %)	15 (33,3 %)	18 (40 %)
Baln-C1	45	35	11 (24,4 %)	23 (51,1 %)	34 (75,6 %)
IP-C1	43	1	1 (2,3 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
VO-C1	45	23	9 (20 %)	22 (48,9 %)	17 (37,8 %)
Total	178	77 (43,3 %)	28 (15,7 %)	60 (33,7 %)	69 (38,8 %)

Les signes cliniques présentés dans le **Tableau 6** ont principalement été retrouvés chez des animaux retrouvés morts ou moribonds : à titre d'exemple, sur les 28 animaux ayant présenté des furoncles, 24 ont été retrouvés morts ou moribonds sur la période de challenge infectieux.

Les OR ont été calculés selon un modèle de régression logistique binomiale univariée avec effet aléatoire. Ils sont présentés dans le **Tableau 7**. Le détail des p-values et des intervalles de confiance se trouve en **Annexe 13**.

Tableau 7 : Odd Ratios de l'expression de signes cliniques en fonction du lot, avec le lot NV-C1 comme référence. Les OR non significatifs sont affichés en gras.

Lot	Furoncle	Anorexie	Pétéchie
IP-C1	0,18	0,02	0,01
VO-C1	1,33	1,9	0,88
Baln-C1	1,71	2,08	4,98

Comme nous pouvons le voir, seul le lot IP-C1 montre une différence significative dans l'expression de signes cliniques par rapport au lot NV-C1. Les lots VO-1 et Baln-C1 n'ont cependant pas montré de différence significative dans l'expression de signes clinique par rapport aux animaux du lot NV-C1.

La vaccination intrapéritonéale, en plus d'être un facteur de protection vis-à-vis de la mortalité, protège également de l'apparition de furoncles chez les animaux.

5.2.2- Signes cliniques et diagnostic de certitude chez les animaux morts et vivants

Le **Tableau 7** résume les signes cliniques observés chez les animaux morts ou moribonds retrouvés durant le challenge infectieux, pour chaque lot. Les résultats de culture sur prélèvement de rate et de tube digestif ne sont pas présentés : les résultats issus des prélèvements de rate sont très redondants avec ceux obtenus sur les prélèvements de rein. Les prélèvements de tube digestif sont, quant à eux, fréquemment contaminés par des bactéries de la flore digestive.

Sur les 77 animaux morts au cours de cette expérimentation, *Aeromonas salmonicida* a été isolée chez 76 truites, confirmant ainsi que la cause de la mort est bien la furunculose chez ces animaux. La mort du 77^{ème} individu étant arrivée très tôt après la fin de la balnéation avec la bactérie, il est possible que celui-ci n'ait pas toléré cette manipulation.

Tableau 8 : Expression de signes cliniques et résultats de bactériologie chez les animaux morts par lot. Les pourcentages sont calculés par rapport aux animaux morts uniquement.

Lot	Morts	Ass Rein	Ass Mucus	Anorexie	Pétéchie	Furoncle
NV-C1	18	18 (100%)	13 (72,2 %)	15 (83,3 %)	15 (83,3 %)	6 (33,3 %)
Baln-C1	35	35 (100%)	22 (62,9 %)	21 (60 %)	33 (94,3 %)	9 (25,7 %)
IP-C1	1	1 (100 %)	1 (100%)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (100 %)
VO-C1	23	22 (95,7 %)	15 (65,2 %)	20 (87 %)	17 (73,9 %)	8 (34,8 %)
Total	77	76 (98,7 %)	51 (66,2 %)	56 (72,7 %)	65 (84,4 % %)	24 (31,2 %)

Comme nous pouvons le voir dans le **Tableau 8**, l'isolement de la bactérie du tissu rénal est confirmé chez presque tous les animaux morts (76 sur 77 morts). Ces truites ont majoritairement exprimé des signes cliniques internes, avec des pétéchies (84,4 %). Peu d'animaux ont présenté des furoncles : seules 24 truites sur 77 ont développé un furoncle. Les truites sont donc vraisemblablement mortes d'une forme aigüe de furunculose, après dissémination de la bactérie dans leur organisme.

Enfin, *A. salmonicida* a été isolée sur prélèvement de mucus chez 51 animaux sur les 77 morts. La bactérie a été plus facilement isolée sur mucus chez les animaux présentant des furoncles : *A. salmonicida* a été retrouvée dans le mucus chez 92 % des animaux morts présentant des furoncles. Cependant, elle est également présente chez 54,7 % des animaux morts sans furoncles. Ces truites sont donc également porteuses de la bactérie dans leur mucus.

Le **Tableau 9** présente la fréquence des signes cliniques et des isolements bactériens positifs chez les animaux morts et les animaux vivants.

Tableau 9: Comparaison des résultats bactériologiques et des signes cliniques entre animaux morts et animaux vivants. Les pourcentages sont calculés selon le n de la colonne correspondante.

Signe clinique	Mort (n = 77)	Vivant (n = 101)	Total (n = 178)
Rein	76 (98,7 %)	2 (2 %)	78 (43,8 %)
Mucus	51 (66,2 %)	13 (12,9 %)	64 (36 %)
Anorexie	56 (72,7 %)	4 (4%)	60 (33,7 %)
Pétéchie	65 (84,4 %)	4 (4 %)	69 (38,8 %)
Furoncle	24 (31,2 %)	4 (4 %)	28 (15,7 %)

Comme nous pouvons le voir, les animaux vivants en fin de challenge infectieux ne présentent que peu de signes cliniques comparativement aux animaux morts. Aucun signe clinique, mis à part une truite ayant développé un furoncle, n'a été observé chez les animaux du lot IP-C1. *A. salmonicida* a été isolée sur le mucus de 13 animaux, dont 4 truites ayant développé un furoncle. Parmi les 9 truites positives sans furoncle, 4 truites étaient issues du lot IP-C1 : ainsi, dans ce lot, 9,5 % des animaux étaient porteurs de la bactérie dans leur mucus sans présenter aucun signe clinique. Ces animaux étaient cependant issus d'un même bac.

Tous les animaux morts durant ce challenge infectieux, mis à part un unique individu, sont morts de furunculose, confirmée par culture bactériologique. Le furoncle est un signe clinique inconstant mais corrélé à une forte quantité de bactéries dans le mucus. Enfin, les truites vaccinées par injection intrapéritonéale n'ont présenté quasiment aucun signe clinique, mais plusieurs individus peuvent être considérés comme porteurs de la bactérie dans leur mucus.

6- Second challenge infectieux : comparaison de l'efficacité vaccinale de protocoles avec et sans rappel vaccinal

La période de recueil des données correspond au début de la balnéation et du contact des animaux avec *Aeromonas salmonicida*, de S21 à S23. Un épisode d'hypoxie sévère au cours de l'infection a conduit à la mort de 174 animaux. De plus, 6 truites sont mortes à la suite de l'anesthésie, lors du prélèvement sanguin avant infection. Ces 180 truites n'ont pas été incluses dans les analyses de mortalité. Toutes les truites au statut considéré comme « douteux » ou « négatif » (soit 17 animaux), comme défini dans le paragraphe III.A.3.3, ont été exclues des analyses.

6.1- Effet du challenge infectieux sur la mortalité

Le **Tableau 10** résume les mortalités ayant eu lieu lors de la période de challenge infectieux selon les lots. Sur un total de 168 animaux soumis au second challenge infectieux, 74 (soit 44 %) sont morts de furonculose (cf. **Tableau 10**). Cette mortalité a été observée dans tous les lots soumis au challenge infectieux, mais elle a été particulièrement sévère dans le lot NV-C2 : tous les animaux de ce lot sont morts de furonculose. A contrario, les mortalités les plus faibles sont observées dans les lots ayant reçu au moins une injection intrapéritonéale. Le lot VO-IP enregistre la plus faible mortalité, avec 11,8 %.

Aucun animal du lot non challengé n'est mort ou n'a présenté de signe clinique de furonculose au cours de la période de challenge infectieux. Les Hazard Ratio obtenus via le modèle de Cox permettent de comparer les mortalités des animaux challengés aux truites du lot NV-NC. Seuls les lots Baln-IP, IP-C2, IP-IP et VO-IP ont une mortalité similaire aux animaux non challengés, avec une p-value supérieure à 0,05. Les animaux des autres lots ont, a contrario, une mortalité statistiquement supérieure à celle du lot NV-NC. Le détail des Hazard Ratio obtenus, ainsi que des p-value et des intervalles de confiance à 95 % se trouve en **Annexe 14**.

Tableau 10 : Mortalité observée pendant le second challenge en fonction des lots. RPS (Relative Percent Survival) = $(1 - (\text{mortalité lot vacciné} / \text{mortalité lot NV-C2})) * 100$

Lot	Nombre total d'animaux	Survivants	Morts	Mortalité (%)	RPS (%)
NV-NC (Témoin -)	36	36	0	0	SO
NV-C2 (Témoins +)	27	0	27	100	SO
Baln-IP	30	25	5	16,7	83,3
Baln-C2	35	15	20	57,1	42,9
IP-IP	11	7	4	36,4	63,6
IP-C2	20	17	3	15	85
IP-VO	18	11	7	38,9	61,1
VO-IP	17	15	2	11,8	88,2
VO-C2	10	4	6	60	40
Total	204	130	74	44	

Le challenge infectieux a donc induit une mortalité dans tous les lots concernés. La différence de mortalité avec le lot non vacciné non challengé n'est cependant pas toujours statistiquement significative, en particulier dans les lots ayant reçu au moins une injection intrapéritonéale.

6.2- Effet du protocole vaccinal appliqué sur la mortalité

La **Figure 45** présente la probabilité de survie de chaque lot en fonction du temps, selon le modèle de Kaplan-Meier. Les intervalles de confiance à 95 % ne sont pas présentés ici par souci de clarté et de lisibilité mais sont disponibles en **Annexe 14**.

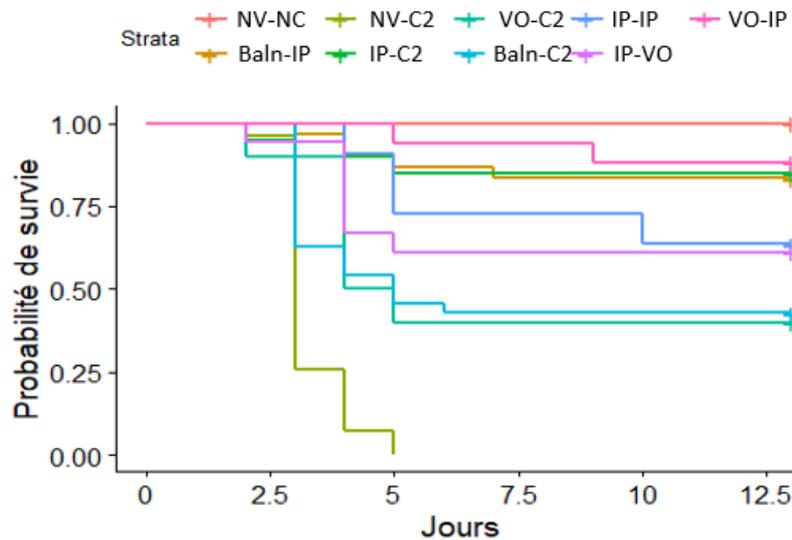


Figure 45: Probabilité de survie des animaux utilisés lors du second challenge infectieux en fonction du temps et en fonction du lot

Comme nous pouvons le voir sur cette figure, tous les lots d'animaux vaccinés ont des mortalités inférieures aux animaux non vaccinés (lot NV-C2), qui sont tous morts pendant le challenge infectieux. On remarque néanmoins que les lots IP-C2, VO-IP et Baln-IP ont une mortalité très faible, de l'ordre de 15 %. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment, *via* l'analyse de Cox. Les lots IP-IP et IP-VO présentent, quant à eux, une mortalité intermédiaire, de l'ordre de 35 %. Enfin, les lots Baln-C2 et VO-C2 présentent la mortalité la plus élevée parmi les lots d'animaux vaccinés, avec environ 60 %. Tous ces lots, mis à part le lot VO-C2, présentent des Odd Ratio significatifs inférieurs à 1 (cf. **Tableau 11**). Ces résultats, mis à part pour le lot Baln-C2, concordent avec les RPS calculés et présentés dans le **Tableau 10**. Ces protocoles vaccinaux semblent donc être, à des degrés différents, protecteurs vis-à-vis de la mortalité liée à la furonculose.

Tableau 11 : Odd Ratios de la mortalité en fonction du lot, avec le lot NV-C2 comme référence. Les OR non significatifs sont affichés en gras.

Lot	OR	p-value	IC 95 %
Baln-C2	0,07	0,002	[-6,9 - (-1)]
Baln-IP	0,005	<0,0001	[-8,2 - (-2,3)]
IP-C2	0,006	<0,0001	[-8,2 - (-2,1)]
IP-IP	0,01	<0,0001	[-7,6 - (-1,5)]
IP-VO	0,02	<0,0001	[-6,9 - (-1)]
VO-C2	0,07	0,045	[-5,4 - 1,2]
VO-IP	0,004	<0,0001	[-8,2 - (-2)]

De plus, comme nous pouvons le voir dans le **Tableau 12**, il n'existe pas de différence significative de mortalité entre les différents lots avec rappel ayant reçu au moins une injection intrapéritonéale comparativement au lot IP-C2. Les protocoles utilisant un rappel vaccinal ou une primovaccination par injection intrapéritonéale semblent donc avoir la même efficacité qu'un protocole utilisant une unique injection intrapéritonéale 2470 degrés.jour avant challenge infectieux.

Tableau 12 : Odd Ratios de la mortalité en fonction du lot, avec le lot IP-C2 comme référence. Les OR non significatifs sont affichés en gras.

Lot	OR	p-value
IP-IP	1,79	0,52
IP-VO	3,1	0,12
VO-IP	0,99	0,99
Baln-IP	0,87	0,86

Tous les protocoles vaccinaux (mis à part la voie orale et la balnéation utilisées seules, avec un RPS de 40 % environ) testés lors du second challenge infectieux semblent avoir été efficaces contre la furunculose. Les protocoles IP-IP, IP-VO, VO-IP et Baln-IP ont également eu la même efficacité que le protocole utilisant une unique injection intrapéritonéale.

C- Discussion

1- Innocuité vaccinale

1.1-Mortalité hors challenge infectieux et traitement antibiotique

Des épisodes de mortalité ont été observés pendant toute la durée de l'expérimentation, plus particulièrement après les manipulations et anesthésies. Quelques morts sont imputables à l'anesthésie. Cependant, le reste de la mortalité est très certainement lié à la résurgence d'épisodes de flavobactériose, la présence de la bactérie ayant été confirmée par culture sur FLP de prélèvements de rein et de rate réalisés sur les animaux morts. En effet, les truites utilisées avaient déjà vécu un épisode de cette maladie avant le début de l'expérimentation et *Flavobacterium spp.* est une bactérie très résistante dans l'environnement. La flavobactériose est également connue pour faire des résurgences lorsque les poissons subissent un stress, comme cela peut être le cas lors des manipulations et des anesthésies (Noga 2010). Les mortalités observées ont été similaires entre les lots vaccinés et les lots non vaccinés, ne remettant ainsi pas en cause l'innocuité de l'autovaccin.

Cette pression infectieuse indépendante de tout challenge infectieux a pu interférer avec la réponse immunitaire des animaux après la réalisation des vaccins et/ou après contact avec *Aeromonas salmonicida*. Afin d'étudier l'impact d'*A. salmonicida* seule sur la santé des animaux il aurait été intéressant d'utiliser des animaux dits EOPS (Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques). Cependant, sous l'hypothèse que l'obtention de tels animaux est possible, leur maintenance nécessiterait de très nombreuses précautions, notamment en termes de biosécurité, afin d'éviter toute contamination extérieure. De plus, même si la présence de *Flavobacterium spp.* complique

l'interprétation des résultats dans le cas présent, il convient tout de même de noter que cette bactérie est omniprésente en élevage de salmonidés, au point d'être parfois considérée comme endémique à cette production (Noga 2010).

Le traitement au florfénicol mis en place pour contrôler l'infection à *Flavobacterium spp.* a été terminé plus de 60 jours avant le challenge infectieux et n'a pas été réitéré. Le florfénicol est une molécule facilement dégradée sous le rayonnement ultraviolet et possédant une demi-vie évaluée à 100h dans l'eau exposée au rayonnement solaire (ANSES 2014). L'eau du circuit recirculé passant sous un rayonnement UV, il est peu probable que l'utilisation de florfénicol ait interféré avec la réalisation du premier challenge infectieux. Par ailleurs, sur les 77 poissons morts au cours de celui-ci, 76 sont morts de furunculose, confirmée par l'observation de signes cliniques et d'au moins une culture positive à *A. salmonicida*.

1.2-Poids des animaux en fonction de la voie d'administration du vaccin et adhérences

Les animaux vaccinés par voie orale ont présenté une croissance tout à fait similaire aux animaux non vaccinés jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ce n'est cependant pas le cas pour les animaux vaccinés par voie intrapéritonéale et par balnéation, qui ont montré un poids moyen et un GMQ moindre que les animaux non vaccinés.

Concernant les animaux vaccinés par balnéation, les truites ont volontairement été sélectionnées, pour des aspects pratiques, plus légères que les autres lots. Le GMQ moindre par rapport aux animaux non vaccinés peut s'expliquer par rapport au choix volontaire d'allouer les animaux de la queue de lot. Cette pratique a pu conduire à la sélection d'individus plus fragiles, moins enclins à grossir malgré le rationnement identique aux autres lots.

Concernant le lot d'animaux vaccinés par voie intrapéritonéale, le poids moyen des truites au début de l'expérience était déjà légèrement plus faible, avec 8 g de différence, alors que la sélection a été réalisée dans le même pool d'animaux : il s'agit ici d'un biais de sélection, malgré la sélection aléatoire des animaux lors de la formation des lots. Cependant, ce biais n'explique pas à lui seul le GMQ plus faible des animaux primovaccinés par injection intrapéritonéale comparativement aux autres lots (hors balnéation), tous ces animaux étant issus d'un même pool. Cette croissance freinée peut s'expliquer par l'omniprésence d'adhérences intrapéritonéales observées chez ces animaux : 82,3 % des truites ayant reçu au moins une injection intrapéritonéale ont présenté des adhérences de gravité diverse, dont 53,7 % des truites atteintes présentant des adhérences multiples entre organes ainsi qu'avec la paroi musculaire. Ces effets secondaires liés à la vaccination sont connus depuis longtemps, en particulier chez le saumon Atlantique mais également chez la truite arc-en-ciel, en lien avec l'emploi d'adjuvants huileux comme dans l'autovaccin utilisé ici (Villumsen et al. 2015 ; Poppe & Breck 1997). La vaccination par injection intrapéritonéale, via l'apparition de lésions macroscopiques dans l'abdomen, est également connue comme responsable d'une baisse de croissance des animaux vaccinés par rapport aux animaux non vaccinés (Midtlyng 1997).

Cependant, cette différence de croissance n'est notable que jusqu'à 10 semaines après la primovaccination par injection intrapéritonéale. De même, il n'existe aucune différence significative de croissance lorsque l'on compare les lots ayant subi un rappel vaccinal par injection intrapéritonéale, à savoir Baln-C2 et Baln-IP, IP-C2 et IP-IP ou encore VO-C2 et VO-IP. Cette perte de croissance observée uniquement lors de la période de primovaccination, malgré la présence d'adhérences chez tous les

animaux concernés par au moins une injection intrapéritonéale, peut s'expliquer par le poids plus élevé des animaux lors du rappel vaccinal. En effet, il est possible que ces animaux, de par leur poids plus important au moment de l'injection intrapéritonéale, aient mieux toléré l'inflammation induite par la vaccination. En effet, les truites vaccinées en début de manipulation pesaient en moyenne 150g, alors que les animaux ayant reçu un rappel vaccinal (sauf lot Baln-IP) pesaient plus de 270g. De plus, l'étude citée précédemment et montrant qu'il existe une baisse de croissance des animaux vaccinés par rapport aux animaux non vaccinés n'avait utilisé que des poissons de petite taille, d'environ 32 g (Midtlyng et al. 1996). Il est également possible que les animaux aient mieux compensé la présence de ces adhérences car nourris en quantité moindre par rapport aux élevages (1 %). A titre d'exemple, les recommandations faites par le fournisseur de l'aliment utilisé lors de cette expérimentation varient entre 1,18 et 1,64 % de la biomasse pour des animaux entre 100 et 500g (cf. **Annexe 5**). De même, à cause de températures de l'eau trop élevées durant les mois d'été, les animaux ont été mis à jeun plusieurs fois entre le rappel vaccinal et la fin de l'expérimentation. Cette « sous alimentation » de l'ensemble des lots pourrait expliquer les croissances similaires entre les lots après la phase de rappel.

Ainsi, malgré la très bonne efficacité de cette voie d'administration contre l'expression de furonculose clinique, l'injection intrapéritonéale aurait tendance à diminuer le GMQ des animaux, tout du moins chez les animaux de 150g et moins. Cependant, cette perte de croissance semble être compensée avec le temps à partir de 10 semaines mais ceci serait à confirmer en permettant aux truites de s'alimenter selon les pratiques des pisciculteurs.

Les truites ont également présenté une grande hétérogénéité dans leur poids, peu importe le lot étudié. Cette hétérogénéité aurait pu être corrigée en incorporant davantage d'animaux dans les lots. Les résultats obtenus après analyse statistique restent cependant interprétables et il paraît donc peu nécessaire d'utiliser davantage de truite au vu des résultats recherchés dans cette expérimentation.

L'utilisation d'autovaccins contre la furonculose, peu importe la voie d'administration, ne semble donc pas induire de mortalité et n'est pas un facteur de risque de développement d'autres maladies comme la flavobactériose. La vaccination par injection intrapéritonéale induit cependant la formation d'adhérences plus ou moins sévères chez les truites vaccinées, et semble induire une baisse de croissance transitoire. Ces effets étant déjà connus et bien renseignés dans la littérature, cette expérimentation n'aura pas remis en cause l'innocuité des autovaccins testés.

2- Efficacité vaccinale

2.1- Niveau de protection et durée en fonction de la voie d'administration

2.1.1-Injection intrapéritonéale

La vaccination par injection intrapéritonéale s'est révélée protectrice vis-à-vis de l'apparition de signes cliniques ou de mortalité liés à la furonculose 1425 degrés.jour (3 mois à 16 °C) et 2470 degrés.jour (6 mois à 16 °C) après sa réalisation, avec une mortalité respectivement de 2,3 % (RPS de 94,2 %) et 15 % (RPS de 85 %) après une infection par bain dans une solution à 10⁶ UFC/mL. Les résultats obtenus durant cette expérimentation concordent avec ceux obtenus dans d'autres études chez la truite arc-en-ciel ou chez le saumon Atlantique. Ainsi, une étude a montré l'efficacité d'un vaccin expérimental

adjuvé contre la furunculose administré par voie intrapéritonéale ainsi que d'un vaccin commercial avec la même valence plus de 2300 degrés.jour après vaccination chez la truite arc-en-ciel, après un challenge infectieux également réalisé par balnéation mais avec une solution plus concentrée, à 10^7 UFC/mL (Villumsen et al. 2015). Cette voie d'administration a également conduit à la production d'une quantité importante d'anticorps, persistant jusqu'à 2470 degrés.jour (23 semaines) après vaccination. Il a été montré que les titres en anticorps sanguins sont positivement corrélés à la survie des animaux lors de challenge infectieux avec *A. salmonicida* (Romstad et al. 2013 ; Villumsen et al. 2012 ; Villumsen et al. 2015). L'efficacité de la protection obtenue après injection intrapéritonéale dans notre expérience pourrait donc s'expliquer par la grande quantité d'anticorps anti-Ass produits et leur persistance chez les animaux vaccinés par cette voie.

L'autovaccin a donc eu, durant cette expérimentation, une efficacité assez similaire à celle d'un vaccin commercial et a bien induit une production importante d'anticorps. Ces résultats concordent avec les ressentis relevés lors de l'étude expérimentale menée au préalable, et la préférence des vétérinaires et éleveurs pour l'injection intrapéritonéale.

2.1.2- Voie orale

La vaccination par voie orale n'a pas montré d'efficacité par rapport aux animaux non vaccinés. La voie orale présente en effet de nombreux inconvénients pouvant expliquer le manque d'efficacité observé durant cette expérimentation. En effet, le milieu digestif est un milieu très fréquemment en contact avec les antigènes extérieurs et est très tolérogène avec ces derniers : l'administration d'antigènes par voie orale n'engendrera donc pas forcément une réponse immunitaire (Rombout et al. 2014). Ainsi, aucune élévation significative de la quantité d'anticorps sanguins anti-Ass chez les animaux vaccinés par cette voie n'a pu être mise en évidence lors de cette expérimentation. De plus, afin d'engendrer une réponse immunitaire, l'antigène doit atteindre la partie distale de l'intestin. L'acidité de l'estomac peut détruite la majorité des antigènes ingérés et donc empêcher le contact de ceux-ci avec la muqueuse de l'intestin (Embregts & Forlenza 2016). Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'administration d'antigènes par voie anale (permettant de court-circuiter l'estomac) induit une réponse immunitaire protectrice chez la truite arc-en-ciel (Villumsen et al. 2014).

Les animaux n'étant pas nourris individuellement, il est impossible de connaître la quantité exacte d'aliment (et donc de vaccin) ingérée par chaque truite. Il existe également une compétition entre les animaux lors des nourrissages, et les plus grosses truites ont un meilleur accès à la nourriture. Il existe donc une variabilité entre les individus, certains consommant très certainement moins de vaccin que la quantité recommandée par poisson. Enfin, un autre facteur pouvant expliquer l'absence d'efficacité de la vaccination par voie orale est le fait que la souche CAE 1414, utilisée pour la réalisation du vaccin, n'était pas la souche CAE 235 utilisée lors du challenge infectieux. Même si la souche CAE 235 est la souche à l'origine de la souche CAE 1414, il n'est pas possible d'exclure une divergence entre ces deux souches expliquant le manque d'efficacité de la vaccination. Cette hypothèse reste néanmoins peu probable au vu de l'efficacité vaccinale constatée pour la vaccination par injection intrapéritonéale.

2.1.3- Balnéation

Les résultats obtenus pour les animaux vaccinés par balnéation sont plus surprenants comparativement aux autres études menées sur cette voie d'administration. En effet, ce lot d'animaux a montré une mortalité similaire au lot d'animaux non vaccinés lors du premier challenge infectieux. Ce résultat est contredit lors du second challenge infectieux, l'utilisation d'une unique balnéation semblant avoir été un facteur de protection contre la mortalité due à la furonculose 2470 degrés.jour après vaccination. Cependant, cette protection est à relativiser au vu de la très forte mortalité (100 %) observée chez les animaux témoins lors du second challenge, par rapport au premier challenge infectieux (40 %). Ces animaux ont en effet été fortement fragilisés à cause d'un épisode d'hypoxie sévère lors de la réalisation de ce challenge (cf. paragraphe III.C.3.1). Ainsi, le RPS est de 42,9 % à 2470 degrés.jour, ce qui est tout de même insuffisant pour une vaccination. De plus, les animaux vaccinés par cette voie n'ont montré qu'une élévation très fugace de la quantité d'anticorps sanguins, 4 semaines après la vaccination et non identifiable ensuite. Ainsi, lors de la réalisation du premier et second challenge infectieux, la production d'anticorps sanguins des truites vaccinées par balnéation était similaire à celle des animaux non vaccinés. L'apparente protection offerte par la vaccination par balnéation lors du second challenge infectieux est en contradiction avec les résultats obtenus lors du premier challenge infectieux et les quantités d'anticorps sanguins anti-Ass produits et serait donc à confirmer.

La balnéation a plusieurs fois été prouvée comme une voie d'administration efficace : une étude a ainsi montré l'efficacité de cette voie dans la vaccination de truites arc-en-ciel contre *A. salmonicida* 1764 et 2352 degrés.jour post-vaccination avec et sans rappel vaccinal, soit plus longtemps que dans notre étude expérimentale avec pourtant une concentration de solution vaccinale similaire (Villumsen & Raida 2013, Jaafar et al. 2019). Néanmoins, la vaccination par balnéation a été réalisée ici sur des animaux beaucoup plus gros que ceux utilisés dans ces travaux, qui n'excédaient que rarement 2g. Bien qu'il n'existe pas de limite supérieure de poids dans les RCP de la plupart des vaccins par immersion avec AMM en France, les truites vaccinées par cette méthode sont en générale de faible taille, afin de faciliter les manipulations et de limiter le coût de la vaccination, la quantité totale de vaccin à utiliser dépendant du poids total des animaux à vacciner (ANSES 2022). L'utilisation d'animaux plus légers permettrait donc potentiellement d'observer une meilleure efficacité vaccinale sur cette voie d'administration.

Cet échec vaccinal peut s'expliquer par d'autres facteurs : les truites vaccinées par balnéation étaient volontairement choisies comme étant les truites les plus petites parmi tous les animaux disponibles. Ce choix a été fait afin de se rapprocher au plus près des pratiques réalisées sur le terrain, où la balnéation est réalisée uniquement sur des animaux de petite taille (moins de 100 g en général). Cependant, cette sélection de la queue de lot pour la vaccination par balnéation a très certainement favorisé la répartition d'animaux plus fragiles dans ce lot. Ces truites ont également été mises en contact avec la même quantité de bactéries que les animaux plus lourds lors du challenge infectieux. Il est possible que ces animaux plus légers et plus fragiles aient développé, tout du moins lors du premier challenge infectieux, une forme plus aiguë de la furonculose, fréquente chez les animaux en croissance, aux dépens d'une forme chronique qui aurait entraîné une mortalité moins rapide (Noga 2010).

L'absence d'efficacité du vaccin par balnéation peut également s'expliquer par sa réalisation : les bains de vaccins ont été utilisés à plusieurs reprises, afin de s'accorder à certaines pratiques observées sur le terrain : un bain servait donc à vacciner entre 52 et 56 poissons, en 4 fois. La réutilisation des bains, associée à la perte de solution vaccinale entre chaque passage de poissons dans ceux-ci, et à la dilution avec l'eau et le mucus apportées par chaque groupe de 13-14 truites fait qu'il est difficile de savoir la quantité réelle d'agent vaccinal entré en contact avec les animaux. Il n'est pas impossible que la vaccination ait montré davantage d'efficacité si les bains n'avaient été utilisés qu'une seule fois.

2.1.4- Intérêt de rappels vaccinaux

L'utilisation de rappels vaccinaux par injection intrapéritonéale sur des animaux ayant déjà reçu une vaccination par voie intrapéritonéale, par voie orale ou par balnéation semble s'être montré protectrice vis-à-vis de la mortalité liée à la furunculose lors du second challenge infectieux. Les animaux de ces lots ont tous présenté une mortalité similaire à celles d'animaux non challengés, ainsi qu'un RPS supérieur à 60 %. Cependant, des résultats similaires ont été obtenus avec le lot IP-C2, n'ayant reçu qu'une unique injection intrapéritonéale avant challenge infectieux 2470 degrés.jour plus tard et aucune différence significative de mortalité entre ce lot IP-C2 et les lots IP-IP, Baln-IP et VO-IP n'a été mise en évidence. Il est donc fort probable que cette protection contre la furunculose soit due à l'utilisation de l'injection intrapéritonéale seule, en rappel ou primovaccination, plutôt qu'à l'association avec une autre voie d'administration, par voie orale ou balnéation. Ces résultats sont appuyés par les quantités d'anticorps sanguins observés chez les animaux de ces lots : il n'existe aucune différence significative entre les lots IP-C2, IP-IP, Baln-IP et VO-IP 4 semaines après réalisation du rappel (soit 14 semaines après primovaccination). Les lots Baln-IP et VO-IP, au vu de l'absence d'efficacité des voies orales et par balnéation lors du premier challenge infectieux, seraient finalement assez équivalents au lot IP-C1 utilisé lors de ce même challenge. De même, le rappel réalisé dans le lot IP-IP ne semble pas offrir de meilleure protection contre la furunculose comparativement à une injection unique. L'ensemble de ces résultats doit cependant être nuancé au vu du faible nombre d'animaux dans les lots lors du second challenge infectieux.

Un raisonnement similaire peut être utilisé pour le lot IP-VO, ayant reçu un rappel par voie orale. En effet, la mortalité et la quantité d'anticorps sanguins observées dans ce lot ne sont pas significativement différentes de celles observées dans le lot IP-C2. Aucun effet bénéfique supplémentaire par rapport à une unique injection intrapéritonéale n'aura ainsi été mis en évidence concernant l'utilisation d'un rappel vaccinal par voie orale.

Au vu de l'efficacité de l'injection intrapéritonéale 2470 degrés.jour après vaccination, il est possible que les rappels vaccinaux aient été réalisés trop tôt et n'aient donc pas encore d'utilité. Il serait intéressant d'étudier davantage la durée de l'efficacité de cette voie d'administration utilisée seule, afin de déterminer le moment optimal de réalisation du rappel vaccinal. Cela permettrait également d'étudier l'impact réel du rappel vaccinal, sans que celui-ci ne soit complètement occulté par l'efficacité liée à la primovaccination.

Comme nous l'avons vu précédemment, tous les protocoles vaccinaux ressortant comme efficaces utilisent au moins une fois l'injection intrapéritonéale. Cependant, cette voie d'administration est également la plus contraignante pour les éleveurs piscicoles et il serait intéressant de tester des protocoles vaccinaux n'utilisant pas cette voie. Des protocoles combinant vaccin par balnéation et

vaccin par voie orale ont déjà été étudiés chez la truite arc-en-ciel contre la yersiniose (Jaafar et al. 2019). De même, un protocole utilisant une primovaccination et un rappel vaccinal par balnéation a été prouvé comme efficace contre la furonculose chez la truite arc-en-ciel (Villumsen, Raida 2013). Ces protocoles ont cependant été réalisés chez des animaux de petite taille, contrairement aux animaux utilisés lors de cette expérimentation.

L'injection intrapéritonéale est donc la seule voie d'administration s'étant révélée efficace jusqu'à 2470 degrés.jour (6 mois à 16 °C) après réalisation. La vaccination par voie orale n'aura, quant à elle, montré aucune efficacité durant cette expérimentation. Les résultats obtenus pour la vaccination par balnéation semblent plus contradictoires entre les deux challenges infectieux, mais, au vu de la quantité d'anticorps sanguins observée chez ces truites, cette voie d'administration ne serait pas non plus efficace. L'utilisation de rappels vaccinaux n'aura, quant à elle, pas montré d'intérêt supérieur par rapport à l'utilisation d'une unique injection intrapéritonéale.

2.2-Portage d'*Aeromonas salmonicida* dans le mucus

Sur les 9 animaux vivants à la fin du premier challenge infectieux et chez qui *Aeromonas salmonicida* a été isolée du mucus sans présence de furoncle, 4 appartiennent au lot vacciné par voie intrapéritonéale, alors que ces animaux n'ont présenté aucun signe clinique de furonculose par ailleurs. Ces animaux sont donc porteurs, malgré la vaccination efficace, de la bactérie. *Aeromonas salmonicida* se transmet principalement par transfert horizontal, par ingestion et passage de la bactérie au travers de la muqueuse digestive ou par voie cutanée, via des abrasions (Roberts 2012). De plus, la bactérie peut également être transmise à des lots naïfs par du matériel contaminé : une contamination d'un lot naïf par un lot d'animaux ayant survécu à un épisode de furonculose ne serait donc pas impossible, suite à des erreurs de biosécurité (RAIZO 2018). Cette transmission serait d'autant plus facilitée que les animaux expriment des lésions cutanées, que cela soit à cause de diverses maladies (comme la flavobactériose) ou à cause des conditions de maintien, la densité d'animaux dans les bassins étant un facteur d'apparition de telles lésions (Tørud & Håstein 2008).

Cependant, ces résultats sont à nuancer. En effet, pour le lot vacciné par voie intrapéritonéale, les 4 truites chez qui *A. salmonicida* a été isolée sur le mucus appartiennent au même bac. La bactérie est capable de survivre jusqu'à 3 semaines dans l'eau et sur les parois, soit plus longtemps que la durée totale du challenge infectieux (RAIZO 2018). Il est donc plus probable que les bactéries isolées depuis le mucus proviennent de l'environnement du bac et de leur persistance suite au challenge. Cependant, nous n'expliquons par la raison pour laquelle seul ce bac est concernée.

La notion de portage bactérien, particulièrement chez les animaux vaccinés par injection intrapéritonéale, reste donc une notion difficile à mettre en évidence au vu de la résistance potentielle de la bactérie dans l'environnement.

3- Biais expérimentaux

3.1- Second challenge infectieux et hypoxie

Les animaux soumis au second challenge infectieux ont subi un très fort épisode d'hypoxie pendant la baignade, associé à une température élevée de l'eau (plus de 20°C). Ces deux facteurs combinés ont conduit à une forte mortalité des truites, avec la perte de plus de 40 % des animaux. De plus, cette mortalité n'est pas homogène et a surtout concerné les animaux les plus lourds, certainement les plus sensibles à l'hypoxie, majoritairement des lots VO-IP et VO-C2. Les lots Baln-IP et Baln-C2, soit les animaux les plus légers, sont ceux ayant montré le moins de mortalité.

De plus, l'hypoxie a représenté un stress sévère chez les animaux ayant survécu, et, comme abordé dans le paragraphe III.C.1.1, a pu favoriser la résurgence de flavobactériose par la suite. Cette résurgence, associée à la fragilité des poissons, a conduit à la création de différentes catégories lors des analyses de mortalité, afin d'étudier au mieux l'impact de *A. salmonicida* seule sur cette dernière. Cette catégorisation a conduit à l'exclusion de 17 truites des analyses, leur mortalité étant soit de cause non élucidée, soit due à *Flavobacterium spp.* De même, la flavobactériose interférant avec la furunculose lors de ce challenge, il a été décidé de ne pas analyser les signes cliniques des animaux.

Lors du premier challenge infectieux, la biomasse totale par bac a atteint un maximum de 4,5 kg, contre 7,7 kg lors du second challenge. Lors de la baignade dans 50 L d'eau, la charge maximale a donc été de 90 kg/m³ lors du premier challenge et 150 kg/m³ lors du second. Afin d'éviter l'hypoxie liée à cette baisse du niveau de l'eau, il conviendrait donc de ne pas dépasser 90 kg/m³ lors de la baignade, ce qui reviendrait à réaliser une baignade dans 100 L d'eau au lieu de 50L pour une biomasse totale de 7,7 kg. De même, les taux d'oxygène dissous dans l'eau étant plus bas lorsque l'eau est chaude, il convient de réaliser ces manipulations dans de l'eau fraîche, à 16 °C ou moins, bien oxygénée.

L'hypoxie subie par les animaux lors du second challenge infectieux a donc conduit à une fragilisation des poissons et a fortement interféré avec la réalisation de celui-ci. Il conviendrait, lors d'expérimentations ultérieures nécessitant l'emploi d'une infection par baignade, de ne pas dépasser une charge des bacs de 90 kg/m³, avec une température de l'eau inférieure ou égale à 16°C.

3.2- Puissance statistique

La puissance statistique $1-\beta$ d'un test correspond à la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle H_0 alors que celle-ci est bien incorrecte. Dans notre étude, l'hypothèse nulle serait par exemple que deux lots présentent une mortalité similaire. La puissance statistique serait donc la probabilité de conclure sans se tromper que deux lots ont une mortalité différente. Le risque de seconde espèce β correspond au risque de se tromper en ne démontrant pas la différence entre deux groupes, alors que celle-ci est réelle.

La détermination du nombre d'animaux par lot a été réalisée à l'aide du site web <https://biostatgv.sentiweb.fr/> (IPLESP et al. 2012), en réalisant un test de comparaison de 2 proportions observés (pourcentage de mortalité dans le lot vacciné $P_1 = 20\%$, pourcentage de mortalité dans le lot non vacciné $P_2 = 50\%$, soit une différence de mortalité de 30 %), avec un risque

alpha de 0,05 et une puissance à 0,9. Un nombre de 51 poissons par lot était alors préconisé. Dans notre étude, au vu de la mortalité ayant eu lieu avant le premier challenge infectieux, ce nombre a été diminué et chaque lot est composé de maximum 45 animaux, répartis dans trois bacs.

A titre d'exemple, les différences de mortalité entre les lots IP-C1 et NV-C1 ainsi que Baln-C1 et NV-C1 sont respectivement de 37,7 % et 37,8 %. Le nombre d'individus dans chaque lot est suffisant pour avoir une puissance statistique de 0,95 (avec un risque α de première espèce fixé à 0,05), ce qui est tout à fait acceptable (IPLESP et al. 2012). Cependant, la différence de mortalité entre les lots VO-C1 et NV-NC est seulement de 11,1%. Afin de pouvoir mettre en évidence une différence statistique ou non, avec une puissance $1-\beta$ fixée à 0,9 et un risque α fixé à 0,05, il aurait fallu 228 animaux par lot pour conclure réellement à une différence ou similitude entre les mortalités de ces deux lots. L'ensemble de ces calculs a été réalisé à l'aide du package R *epiR 0,9-96*, via le site web <https://biostatgv.sentiweb.fr/> (IPLESP et al. 2012). Le nombre d'animaux nécessaires rend cependant complexe toute expérimentation avec des animaux de même taille et le manque d'efficacité du vaccin par voie orale observé durant cette expérimentation ou chez les éleveurs ne justifie pas sa réalisation.

Bien que l'exemple de la comparaison de mortalité entre lots soit le plus parlant, le manque de puissance statistique est également un obstacle à l'interprétation des autres résultats, notamment la comparaison de l'expression de signes cliniques internes ou externes entre les lots. En effet, les différences entre lots non vaccinés et lots vaccinés sont parfois très faibles. Ce manque de puissance aurait également pu être un problème lors de l'analyse de mortalité observée pendant le second challenge infectieux, au vu du faible nombre d'animaux dans les lots, mais celui-ci a été compensé par la très forte mortalité dans le lot NV-C2.

Le manque de puissance statistique parfois observé lors de cette expérimentation n'interfère finalement que peu avec l'analyse des résultats, au vu des mortalités observées dans les lots lors du premier et second challenge infectieux.

3.3- Hétérogénéité des lots

Les truites des lots vaccinés par balnéation ont volontairement été sélectionnées de plus petite taille afin d'être au plus proche des pratiques réalisées sur le terrain, les éleveurs utilisant cette voie d'administration le plus souvent sur des animaux de faible poids. Cette différence de poids entre les lots représente néanmoins un biais dans l'interprétation des résultats obtenus lors des challenges infectieux, particulièrement pour le second challenge infectieux. En effet, les animaux vaccinés par balnéation ont moins été affectés par l'épisode d'hypoxie subi lors de ce challenge, très certainement grâce à leur poids plus léger par rapport aux truites des autres lots.

Des animaux de plus petite taille, d'environ 50-60 g dans tous les lots, permettraient d'utiliser toutes les voies d'administrations de vaccin utilisées pendant cette expérimentation tout en ayant une meilleure homogénéité des animaux. Cela serait toujours en accord avec les observations faites sur le terrain, certains éleveurs vaccinant leurs animaux par voie intrapéritonéale à un poids inférieur à 100 g. Dans l'absolu, la vaccination par injection intrapéritonéale est même possible sur des animaux de

moins de 10 g (Villumsen et al. 2015). Une telle homogénéisation permettrait probablement de comparer plus facilement les courbes de croissance entre les lots, ainsi que d'obtenir une expression de furonculose similaire entre les animaux lors des challenges infectieux et de faciliter les manipulations lors de ceux-ci. De plus, le fait de maintenir des animaux plus petits permettrait également de maintenir des lots de plus grande taille dans les mêmes conditions que lors des expérimentations décrites dans ce document. Néanmoins, les épisodes de furonculose dans les élevages apparaissent davantage chez des animaux de plus de 500g. La vaccination de truite plus légères implique la réalisation d'un challenge infectieux sur des truites de petites tailles, ce qui concorde donc moins avec les observations faites sur le terrain.

L'utilisation d'animaux de plus petite taille, d'environ 50-60 g, permettrait également de tester les 3 voies d'administration utilisées lors de cette expérimentation tout en ayant des animaux de poids homogène. Cependant, la réalisation d'un challenge infectieux sur des animaux de cette taille serait moins en adéquation avec les observations faites en élevage, la furonculose affectant davantage des animaux de 500 g environ.

D- Conclusion

Cette expérimentation avait pour objectif de tester l'efficacité de différents protocoles vaccinaux utilisant plusieurs voies d'administration, via la réalisation d'un challenge infectieux réalisé 1425 et 2470 degrés.jour, soit environ 3 et 6 mois à 16 °C, après leur réalisation. Ces challenges infectieux ont été réalisés par immersion des poissons pendant 24 heures dans un bain contenant 10^6 UFC/mL, avec un suivi des animaux pendant 2 semaines après celui-ci.

Finalement, seuls les protocoles utilisant au moins une fois l'injection intrapéritonéale auront montré une réelle efficacité dans la prévention de l'expression de signes cliniques de furonculose et de mortalité. Cette étude a également pu démontrer la durabilité de l'efficacité vaccinale après injection intrapéritonéale, avec une protection des animaux contre la furonculose jusqu'à 2470 degrés.jour après vaccination, correspondant à 6 mois dans une eau à 16 °C et à 1 an environ dans des conditions naturelles non contrôlées.

La vaccination par injection intrapéritonéale peut cependant s'accompagner d'une croissance moindre des animaux après vaccination, très probablement en lien avec les adhérences intrapéritonéales en résultant. La croissance semble néanmoins se normaliser avec le temps. De plus, même s'il s'agit de la voie d'administration la plus efficace en termes de protection, l'injection intrapéritonéale reste contraignante pour les éleveurs au vu de la main d'œuvre et des manipulations nécessaires.

Les primovaccinations par voie orale et par balnéation en une seule administration ne semblent pas se suffire à elles-mêmes pour protéger les animaux des conséquences d'un épisode de furonculose 1425 degrés.jour après vaccination. L'évaluation de l'efficacité de ces voies pourrait cependant être améliorée en utilisant des animaux plus petits et homogènes en termes de poids ou en modifiant la méthode de vaccination par balnéation. Un protocole associant une primovaccination avec administrations répétées pourrait également améliorer l'efficacité vaccinale.

Les protocoles utilisant un rappel se sont également montrés efficaces. Leur utilité, notamment pour le protocole associant deux injections intrapéritonéales, reste cependant discutable au vu de la durée d'efficacité de la vaccination intrapéritonéale utilisée seule. La réalisation de rappels vaccinaux avant ce temps apparaît donc comme peu utile.

Il pourrait être intéressant de tester des protocoles associant deux administrations par voie orale et/ou par balnéation pour induire une immunité suffisante et diminuer la mortalité liée à un épisode de furonculose. L'utilisation de protocoles utilisant uniquement ces deux voies permettrait aux éleveurs de se passer de l'injection intrapéritonéale et d'alléger ainsi leur charge de travail. De la même façon, même si l'injection intrapéritonéale est apparue comme efficace durant cette expérimentation, nous ne savons pas quelle est la durée de cette protection et donc quel est le moment le plus judicieux pour réaliser un rappel vaccinal.

Conclusion générale

Dans un contexte global d'allongement du cycle de production des truites arc-en-ciel en élevage piscicole, la furonculose pourrait être une maladie davantage rencontrée à l'avenir. L'augmentation de la prévalence de cette maladie pourrait également être exacerbée par une augmentation des températures moyennes en été, conduisant à un élevage dans des conditions plus stressantes pour les animaux durant cette période. L'allongement du cycle de production, combiné à des facteurs de stress plus fréquents, font que les truites d'élevage pourraient être plus à risque de développer la maladie. La vaccination des truites est une réponse possible à cette problématique et permet non seulement de protéger les animaux contre les aspects délétères de la furonculose mais également de limiter l'utilisation d'antibiotiques lors d'épisodes de cette maladie. Cette diminution de l'utilisation d'antibiotiques permet de faire d'une pierre deux coups : l'apparition d'antibiorésistances, que cela soit chez *A. salmonicida* ou d'autres bactéries, est limitée et l'éleveur réduit ses pertes économiques liées à la maladie.

Il n'existe aucun vaccin commercial contre la furonculose disponible avec AMM en France. Les éleveurs souhaitant vacciner leurs animaux peuvent utiliser des vaccins importés, avec le risque que ceux-ci contiennent des valences inutiles pour leurs animaux. Cependant, même si quelques éleveurs utilisent ces vaccins, la majorité vaccinent leurs truites avec des autovaccins, ceux-ci ayant une action très ciblée sur l'agent pathogène effectivement présent sur l'élevage. Néanmoins, il n'existe aucun consensus quant à leur utilisation, et les protocoles utilisées sont propres à chaque vétérinaire et chaque éleveur, même si une tendance à l'utilisation de la voie injectable intrapéritonéale semble être ressentie. Ainsi, même si l'efficacité de la vaccination contre la furonculose est considérée comme moyenne par les acteurs de la filière piscicole, il est en réalité difficile d'estimer cette dernière au vu de la pluralité des protocoles vaccinaux utilisés sur le terrain.

Cette étude expérimentale visait à répondre à cette problématique, en cherchant à comparer l'efficacité des différentes voies d'administration disponibles pour un autovaccin contre la furonculose, à savoir l'injection intrapéritonéale, la balnéation et la voie orale. Au cours de cette expérimentation, seule la voie intrapéritonéale aura montré une réelle efficacité jusqu'à 2470 degrés.jour après vaccination, avec en contrepartie une croissance moindre des animaux vaccinés par cette voie par rapport aux animaux non vaccinés, en tout cas en début de protocole.

Cette étude expérimentale a également permis de montrer qu'une unique injection intrapéritonéale avec un autovaccin contre la furonculose permet de protéger les animaux aussi efficacement 2470 degrés.jour après vaccination que des protocoles utilisant un rappel selon notre protocole expérimental. Des recherches sur la durée d'efficacité de cette voie d'administration permettraient de déterminer, si besoin, le moment optimal de réalisation d'un rappel vaccinal et, in fine, de réduire les manipulations nécessaires à la vaccination en élevage. De même, il pourrait être intéressant d'étudier l'efficacité de protocoles avec rappels utilisant uniquement la voie orale ou la balnéation, toujours dans l'optique de faciliter la réalisation de la vaccination en élevage.

Bibliographie

- ABRAM, Q, DIXON, B et KATZENBACK, B, 2017. Impacts of Low Temperature on the Teleost Immune System. *Biology*. 22 novembre 2017. Vol. 6, n° 4, pp. 39. DOI 10.3390/biology6040039.
- ADAMS, A (éd.), 2016. *Fish Vaccines* [en ligne]. Basel : Springer Basel. [Consulté le 23 février 2022]. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases. ISBN 978-3-0348-0978-8. Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/978-3-0348-0980-1>
- ADAMS, A, 2019. Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & Shellfish Immunology*. juillet 2019. Vol. 90, pp. 210-214. DOI 10.1016/j.fsi.2019.04.066.
- AGIUS, C et ROBERTS, R J, 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*. septembre 2003. Vol. 26, n° 9, pp. 499-509. DOI 10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x.
- ALI, A, REXROAD, C, THORGAARD, G, YAO, J et SALEM, M, 2014. Characterization of the rainbow trout spleen transcriptome and identification of immune-related genes. *Frontiers in Genetics* [en ligne]. 14 octobre 2014. Vol. 5. [Consulté le 30 décembre 2021]. DOI 10.3389/fgene.2014.00348. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2014.00348/abstract>
- ANDERSON, D, DIXON, O et ROBERSON, B, 1979. Kinetics of the primary immune response in rainbow trout after flush exposure to *Yersinia ruckeri* 0-antigen. *Developmental & Comparative Immunology*. 1 janvier 1979. Vol. 3, pp. 739-744. DOI 10.1016/S0145-305X(79)80066-X.
- ANSES (AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DE L'ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL), 2013. *Autovaccins à usage vétérinaire -Avis de l'ANSES, Rapport d'expertise collective-*.
- ANSES (AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DE L'ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL), 2014. *Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de tylosine ou de florfénicol dans les eaux destinées à la consommation humaine*. 27 février 2014.
- ANSES (AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DE L'ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL), 2019. *Conclusion de réunion filière aquacole* [en ligne]. Ploufragan. [Consulté le 25 février 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.reseau-francais-sante-animale.net/wp-content/uploads/2020/05/2020-04-Poissons-avr-2019-pour-SIMV.pdf>
- ANSES (AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DE L'ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL), 2021. *Bilan 2020 - Résapath* [en ligne]. novembre 2021. Disponible à l'adresse : <https://resapath.anses.fr/>
- ANSES (AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DE L'ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL), 2022. Index des RCP. *Index des médicaments vétérinaires autorisés en France* [en ligne]. 25 janvier 2022. [Consulté le 19 mars 2022]. Disponible à l'adresse : <http://www.ircp.anmv.anses.fr/>
- AUMERAN, C, BALESTRINO, D et FORESTIER, C, 2020. Biofilms bactériens et santé. *Encyclopédie de l'Environnement* [en ligne]. [Consulté le 10 février 2022]. Disponible à l'adresse : <http://www.encyclopedie-environnement.org/?p=11013>
- BASSITY, E et CLARK, T, 2012. Functional Identification of Dendritic Cells in the Teleost Model, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). BOUDINOT, Pierre (éd.), *PLoS ONE*. 12 mars 2012. Vol. 7, n° 3, pp. e33196. DOI 10.1371/journal.pone.0033196.

- BEAZ-HIDALGO, R et FIGUERAS, M J, 2013. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of Fish Diseases*. avril 2013. Vol. 36, n° 4, pp. 371-388. DOI 10.1111/jfd.12025.
- BERGMANN, S.M., JIN, Y., FRANZKE, K., GRUNOW, B., WANG, Q. et KLAFAK, S., 2020. Koi herpesvirus (KHV) and KHV disease (KHVD) – a recently updated overview. *Journal of Applied Microbiology*. juillet 2020. Vol. 129, n° 1, pp. 98-103. DOI 10.1111/jam.14616.
- BJORNSDOTTIR, R., EGGSET, G., NILSEN, R. et JORGENSEN, T. O, 1992. The A-layer protein of *Aeromonas salmonicida*: further characterization and a new isolation procedure. *Journal of Fish Diseases*. mars 1992. Vol. 15, n° 2, pp. 105-118. DOI 10.1111/j.1365-2761.1992.tb00645.x.
- BØGWALD, J et DALMO, R, 2019. Review on Immersion Vaccines for Fish: An Update 2019. *Microorganisms*. 29 novembre 2019. Vol. 7, n° 12, pp. 627. DOI 10.3390/microorganisms7120627.
- BOURNE, J, 2019. How To Farm a Better Fish. *National Geographic* [en ligne]. 10 mars 2019. [Consulté le 7 mars 2022]. Disponible à l'adresse : <http://www.nationalgeographic.com/foodfeatures/aquaculture/>
- BOWDEN, T, COOK, P et ROMBOUT, J, 2005. Development and function of the thymus in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*. novembre 2005. Vol. 19, n° 5, pp. 413-427. DOI 10.1016/j.fsi.2005.02.003.
- BRIETZKE, A, KORYTÁŘ, T, JAROS, J, KÖLLNER, B, GOLDAMMER, T, SEYFERT, H-M et REBL, A, 2015. *Aeromonas salmonicida* Infection Only Moderately Regulates Expression of Factors Contributing to Toll-Like Receptor Signaling but Massively Activates the Cellular and Humoral Branches of Innate Immunity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Immunology Research*. 2015. Vol. 2015, pp. 1-16. DOI 10.1155/2015/901015.
- BRUNO, D.W., 2015. Furunculosis. *ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish*. 2015. N° 37, pp. 5. DOI 10.17895/ICES.PUB.5209.
- BURR, S, PUGOVKIN, D, WAHLI, T, SEGNER, H et FREY, J, 2005. Attenuated virulence of an *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model. *Microbiology*. 1 juin 2005. Vol. 151, n° 6, pp. 2111-2118. DOI 10.1099/mic.0.27926-0.
- CABI, 2019. *Aeromonas salmonicida* distribution map [en ligne]. 20 novembre 2019. Disponible à l'adresse : <https://www.cabi.org/isc/datasheet/95001#toDistributionMaps>
- CAPONE, D, WESTON, D, MILLER, V et SHOEMAKER, C, 1996. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture*. octobre 1996. Vol. 145, n° 1-4, pp. 55-75. DOI 10.1016/S0044-8486(96)01330-0.
- CARBALLO, J, SEOANE, R M et NIETO, T P, 2000. Adhesion of *Aeromonas salmonicida* to materials used in aquaculture. *Bulletin -European Association of Fish Pathologists*. janvier 2000. Vol. 20, n° 2, pp. 77-82.
- CARCELIN, G, CHEVAILLER, A, FOURNEL, S, GUBLER, B, LELIÈVRE, J-D, SEILLÈS, E et VITTE, J, 2018. *Immunologie fondamentale et immunopathologie : Enseignements thématique et intégré Tissu lymphoïde et sanguin Immunopathologie et immuno-intervention*. Elsevier Masson. , 65, rue Camille-Desmoulins, 92442 Issy-les-Moulineaux cedex, France. ISBN 978-2-294-75658-0.

- CHALMERS, L, THOMPSON, K, TAYLOR, J, BLACK, S, MIGAUD, H, NORTH, B et ADAMS, A, 2016. A comparison of the response of diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) siblings to a commercial furunculosis vaccine and subsequent experimental infection with *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology*. octobre 2016. Vol. 57, pp. 301-308. DOI 10.1016/j.fsi.2016.08.049.
- CHETTRI, J-K, DESHMUKH, S, HOLTEN-ANDERSEN, L, JAFAR, R, DALSGAARD, I, et BUCHMANN, K, 2013. Comparative evaluation of administration methods for a vaccine protecting rainbow trout against *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2 infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. juillet 2013. Vol. 154, n° 1-2, pp. 42-47. DOI 10.1016/j.vetimm.2013.04.001.
- CIPA (COMITÉ INTERPROFESSIONNEL DES PRODUITS DE L'AQUACULTURE), 2020. La filière piscicole française : chiffres-clés et structuration. *Salon de l'aquaponie, de l'aquaculture et de l'hydroponie*. 59950 Louverné. 9 octobre 2020.
- CIPA (COMITÉ INTERPROFESSIONNEL DES PRODUITS DE L'AQUACULTURE), 2021. Chiffres clés. *chiffres clés CIPA* [en ligne]. octobre 2021. [Consulté le 29 octobre 2021]. Disponible à l'adresse : <https://www.poisson-aquaculture.fr/chiffres-cles/>
- CIPA (COMITÉ INTERPROFESSIONNEL DES PRODUITS DE L'AQUACULTURE), 2022. Les techniques d'élevages en eau douce. *Poisson Aquaculture* [en ligne]. mars 2022. [Consulté le 8 mars 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.poisson-aquaculture.fr/les-techniques-delevages-en-eau-douce/>
- CIPRIANO, R, FORD, L et JONES, T, 1994. Relationship Between Resistance of Salmonids to Furunculosis and Recovery of *Aeromonas salmonicida* From External Mucus. *Journal of Wildlife Diseases*. octobre 1994. Vol. 30, n° 4, pp. 577-580. DOI 10.7589/0090-3558-30.4.577.
- CODE DE LA SANTÉ PUBLIQUE, 2010. *Article R5141-141* [en ligne]. 6 mai 2010. [Consulté le 18 février 2022]. Disponible à l'adresse : https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000022292440/
- CODE DE LA SANTÉ PUBLIQUE, 2021. *Article L5143-4* [en ligne]. 22 octobre 2021. [Consulté le 9 mars 2022]. Disponible à l'adresse : https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000044233748
- COLLET, B, 2014. Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. *Developmental & Comparative Immunology*. avril 2014. Vol. 43, n° 2, pp. 160-173. DOI 10.1016/j.dci.2013.08.017.
- DALLAIRE-DUFRESNE, S, TANAKA, K, TRUDEL, M, LAFAILLE, A et CHARETTE, S, 2014. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary Microbiology*. février 2014. Vol. 169, n° 1-2, pp. 1-7. DOI 10.1016/j.vetmic.2013.06.025.
- DASH, S., DAS, S.K., SAMAL, J. et THATOI, H.N., 2018. Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*. 2018. Vol. 19, n° 2, pp. 72-81.
- DESBOIS, A, COOK, K, et BUBA, E, 2020. Antibiotics modulate biofilm formation in fish pathogenic isolates of atypical *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*. novembre 2020. Vol. 43, n° 11, pp. 1373-1379. DOI 10.1111/jfd.13232.

- DESHMUKH, S, 2012. Comparative protection of two different commercial vaccines against *Yersinia ruckeri* serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2012. pp. 7.
- DONG, F, TACCHI, L, XU, Z, LAPATRA, S et SALINAS, I, 2020. Vaccination Route Determines the Kinetics and Magnitude of Nasal Innate Immune Responses in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology*. 1 octobre 2020. Vol. 9, n° 10, pp. 319. DOI 10.3390/biology9100319.
- DONG, F, YIN, G-M, MENG, K-F, XU, H-Y, LIU, X, WANG, Q-C et XU, Z, 2020. IgT Plays a Predominant Role in the Antibacterial Immunity of Rainbow Trout Olfactory Organs. *Frontiers in Immunology*. 16 novembre 2020. Vol. 11, pp. 583740. DOI 10.3389/fimmu.2020.583740.
- EFSA PANEL ON ANIMAL HEALTH AND WELFARE (AHAW), NIELSEN, S, BICOUT, D, CALISTRI, P, CANALI, E, DREWE, J, GARIN-BASTUJI, B, GONZALES ROJAS, J, GORTAZAR SCHMIDT, C, HERSKIN, M, MICHEL, V, MIRANDA CHUECA, M-A, PADALINO, B, PASQUALI, P, ROBERTS, H-C, SPOOLDER, H, STAHL, K, VELARDE, A, VILTROP, A, WINCKLER, C, DEWULF, J, GUARDABASSI, L, HILBERT, F, MADER, R, ROMALDE, J, SMITH, P, BALDINELLI, F, KOHNLE, L et ALVAREZ, J, 2022. Assessment of animal diseases caused by bacteria resistant to antimicrobials: kept fish species. *EFSA Journal* [en ligne]. février 2022. Vol. 20, n° 2. [Consulté le 18 février 2022]. DOI 10.2903/j.efsa.2022.7076. Disponible à l'adresse : <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2022.7076>
- EMBREGTS, C et FORLENZA, M, 2016. Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species. *Developmental & Comparative Immunology*. novembre 2016. Vol. 64, pp. 118-137. DOI 10.1016/j.dci.2016.03.024.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020* [en ligne]. Rome : FAO. [Consulté le 7 mars 2022]. ISBN 978-92-5-132692-3. Disponible à l'adresse : <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en>
- FONDATION POUR LA RECHERCHE MÉDICALE (FRM), 2022. Fiche : aucun nouvel antibiotique n'a été découvert depuis 30 ans ? *Fondation pour la Recherche Médicale* [en ligne]. 17 mars 2022. [Consulté le 25 mars 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.frm.org/nos-publications/les-antibiotiques/vrai-faux/decouverte-antibiotique>
- FRANCEAGRIMER, 2020. Chiffres-clés des filières pêche et aquaculture en France en 2020. Juin 2020.
- FREY, J et ORIGGI, F, 2016. Type III Secretion System of *Aeromonas salmonicida* Undermining the Host's Immune Response. *Frontiers in Marine Science* [en ligne]. 22 juillet 2016. Vol. 3. [Consulté le 10 février 2022]. DOI 10.3389/fmars.2016.00130. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmars.2016.00130/abstract>
- GONÇALVES PESSOA, R, DE OLIVEIRA, W, MARQUES, D, DOS SANTOS CORREIA, M, DE CARVALHO, E et COELHO, L, 2019. The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial Pathogenesis*. mai 2019. Vol. 130, pp. 81-94. DOI 10.1016/j.micpath.2019.02.036.
- GUDDING, R et VAN MUISWINKEL, W, 2013. A history of fish vaccination. *Fish & Shellfish Immunology*. décembre 2013. Vol. 35, n° 6, pp. 1683-1688. DOI 10.1016/j.fsi.2013.09.031.
- GULLA, S, BAYLISS, S, BJÖRNSDÓTTIR, B, DALSGAARD, I, HAENEN, O, JANSSON, E, MCCARTHY, U, SCHOLZ, F, VERCAUTEREN, M, VERNER-JEFFREYS, D, WELCH, T, WIKLUND, T et COLQUHOUN, D, 2019. Biogeography of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* inferred by vapA genotyping. *FEMS*

Microbiology Letters [en ligne]. 12 avril 2019. [Consulté le 14 février 2022]. DOI 10.1093/femsle/fnz074. Disponible à l'adresse : <https://academic.oup.com/femsle/advance-article/doi/10.1093/femsle/fnz074/5449007>

HADFIELD, C, 2021. *Clinical Guide to Fish Medicine* [en ligne]. John Wiley & Sons, Inc. ISBN 978-1-119-25988-6. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119259886>

HÄNSCH, G-M, 2012. Host Defence against Bacterial Biofilms: "Mission Impossible"? *ISRN Immunology*. 5 novembre 2012. Vol. 2012, pp. 1-17. DOI 10.5402/2012/853123.

HENRIKSSON, P, RICO, A, TROELL, M, KLINGER, D, BUSCHMANN, A, SAKSIDA, S, CHADAG, M et ZHANG, W, 2018. Unpacking factors influencing antimicrobial use in global aquaculture and their implication for management: a review from a systems perspective. *Sustainability Science*. juillet 2018. Vol. 13, n° 4, pp. 1105-1120. DOI 10.1007/s11625-017-0511-8.

HOARE, R., NGO, T. P. H., BARTIE, K. L. et ADAMS, A., 2017. Efficacy of a polyvalent immersion vaccine against *Flavobacterium psychrophilum* and evaluation of immune response to vaccination in rainbow trout fry (*Onchorynchus mykiss L.*). *Veterinary Research*. 18 août 2017. Vol. 48, n° 1, pp. 43. DOI 10.1186/s13567-017-0448-z.

HPRA (HEALTH PRODUCTS REGULATORY AUTHORITY), 2022. *Summary of Product Characteristics of Alphaject 3000*. janvier 2022.

IPLISP (INSTITUT PIERRE LOUIS D'ÉPIDÉMIOLOGIE ET DE SANTÉ PUBLIQUE), HUET, Thibaud, TURBELIN, Clément, ESQUEVIN, Sébastien et GRISONI, Marie-Lise, 2012. BiostaTGV - Statistiques en ligne. [en ligne]. 2012. [Consulté le 9 août 2022]. Disponible à l'adresse : <https://biostatgv.sentiweb.fr/?module=etudes/sujets#>

JAAFAR, R, AL-JUBURY, A, DALSGAARD, I, MOHAMMADKARAMI, A, KANIA, P et BUCHMANN, K, 2019. Effect of oral booster vaccination of rainbow trout against *Yersinia ruckeri* depends on type of primary immunization. *Fish & Shellfish Immunology*. février 2019. Vol. 85, pp. 61-65. DOI 10.1016/j.fsi.2017.10.049.

JANDA, M et ABBOTT, S, 2010. The Genus *Aeromonas* : Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. janvier 2010. Vol. 23, n° 1, pp. 35-73. DOI 10.1128/CMR.00039-09.

JARA, B, TUCCA, F, SRAIN, B, MÉJANELLE, L, ARANDA, M, FERNÁNDEZ, C et PANTOJA-GUTIÉRREZ, S, 2021. Antibiotics florfenicol and flumequine in the water column and sediments of Puyuhuapi Fjord, Chilean Patagonia. *Chemosphere*. juillet 2021. Vol. 275, pp. 130029. DOI 10.1016/j.chemosphere.2021.130029.

JUTFELT, F, 2011. *Encyclopedia of Fish Physiology From Genome to Environment*. Anthony P. Farrell. Cambridge, Massachusetts, États-Unis : Academic Press. ISBN 978-0-08-092323-9.

KORDON, A, KALINDAMAR, S, MAJORS, K, ABDELHAMED, H, TAN, W, KARSI, A et PINCHUK, L, 2019. Effects of Live Attenuated Vaccine and Wild Type Strains of *Edwardsiella ictaluri* on Phagocytosis, Bacterial Killing, and Survival of Catfish B Cells. *Frontiers in Immunology*. 9 octobre 2019. Vol. 10, pp. 2383. DOI 10.3389/fimmu.2019.02383.

LAMERS, C. H. et DE HAAS, M. J., 1985. Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*). *Cell and Tissue Research*. 1985. Vol. 242, n° 3, pp. 491-498. DOI 10.1007/BF00225413.

- LE, T, SUN, C, CHANG, J, ZHANG, G et YIN, X, 2022. mRNA Vaccine Development for Emerging Animal and Zoonotic Diseases. *Viruses*. 15 février 2022. Vol. 14, n° 2, pp. 401. DOI 10.3390/v14020401.
- LEVRAUD, J-P et BOUDINOT, P, 2009. Arche de Noé immunologique - Le système immunitaire des poissons téléostéens. *médecine/sciences*. 1 avril 2009. Vol. 25, n° 4, pp. 405-411. DOI 10.1051/medsci/2009254405.
- LI, J, BARREDA, D, ZHANG, Y-A, BOSHRA, H, GELMAN, A, LAPATRA, S, TORT, L et SUNYER, O, 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology*. octobre 2006. Vol. 7, n° 10, pp. 1116-1124. DOI 10.1038/ni1389.
- LIEBERT, C, HALL, R et SUMMERS, A, 1999. Transposon Tn 21 , Flagship of the Floating Genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. septembre 1999. Vol. 63, n° 3, pp. 507-522. DOI 10.1128/MMBR.63.3.507-522.1999.
- LOZANO-MUÑOZ, I, WACYK, J, KRETSCHMER, C, VÁSQUEZ-MARTÍNEZ, Y et MARTIN, M, 2021. Antimicrobial resistance in Chilean marine-farmed salmon: Improving food safety through One Health. *One Health*. juin 2021. Vol. 12, pp. 100219. DOI 10.1016/j.onehlt.2021.100219.
- LUCAS, J, 2018. *Aquaculture* [en ligne]. 3. Wiley Blackwell. ISBN 978-1-119-23081-6. Disponible à l'adresse : <https://doc-veto.oniris-nantes.fr/Record.htm?idlist=1&record=19322580124911407629>
- MA, J, BRUCE, T, JONES, E et CAIN, K, 2019. A Review of Fish Vaccine Development Strategies: Conventional Methods and Modern Biotechnological Approaches. *Microorganisms*. 16 novembre 2019. Vol. 7, n° 11, pp. 569. DOI 10.3390/microorganisms7110569.
- MAGNADOTTIR, B, 2010. Immunological Control of Fish Diseases. *Marine Biotechnology*. août 2010. Vol. 12, n° 4, pp. 361-379. DOI 10.1007/s10126-010-9279-x.
- MARANA, M, SEPÚLVEDA, D, CHEN, D, AL-JUBURY, A, JAAFAR, R, KANIA, P, HENRIKSEN, N, KROSSØY, B, DALSGAARD, I, LORENZEN, N et BUCHMANN, K, 2019. A pentavalent vaccine for rainbow trout in Danish aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*. mai 2019. Vol. 88, pp. 344-351. DOI 10.1016/j.fsi.2019.03.001.
- MARANA, M, JØRGENSEN, L, SKOV, J, CHETTRI, J, HOLM MATTSSON, A, DALSGAARD, I, KANIA, P et BUCHMANN, K, 2017. Subunit vaccine candidates against *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. SCAPIGLIATI, Giuseppe (éd.), *PLOS ONE*. 9 février 2017. Vol. 12, n° 2, pp. e0171944. DOI 10.1371/journal.pone.0171944.
- MENANTEAU-LEDOUBLE, S, KUMAR, G, SALEH, M et EL-MATBOULI, M, 2016. *Aeromonas salmonicida*: updates on an old acquaintance. *Diseases of Aquatic Organisms*. 15 juin 2016. Vol. 120, n° 1, pp. 49-68. DOI 10.3354/dao03006.
- MÉTÉO-CONTACT, 2022. Température mois par mois en France depuis 1921. *Météo-Contact* [en ligne]. 18 mars 2022. [Consulté le 18 mars 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.meteocontact.fr/climatologie/france/bilans-climatiques>
- MIDTLYNG, P, 1997. Vaccinated fish welfare: protection versus side-effects. *Developments in Biological Standardization*. février 1997. Vol. 90, pp. 371-379. DOI PMID : 9270866.

- MIDTLYNG, P.J., REITAN, L.J. et SPEILBERG, L., 1996. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*L.) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology*. juillet 1996. Vol. 6, n° 5, pp. 335-350. DOI 10.1006/fsim.1996.0034.
- MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION, 2017a. La pisciculture : production et consommation. [en ligne]. 27 août 2017. [Consulté le 29 octobre 2021]. Disponible à l'adresse : <https://agriculture.gouv.fr/la-pisciculture-production-et-consommation>
- MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION, 2017b. *Ecoantibio 2 : Plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire 2017-2021*. mai 2017.
- MIRANDA, C, GODOY, F et LEE, M, 2018. Current Status of the Use of Antibiotics and the Antimicrobial Resistance in the Chilean Salmon Farms. *Frontiers in Microbiology*. 18 juin 2018. Vol. 9, pp. 1284. DOI 10.3389/fmicb.2018.01284.
- MUTOLOKI, S, MUNANG'ANDU, H et EVENSEN, Ø, 2015. Oral Vaccination of Fish – Antigen Preparations, Uptake, and Immune Induction. *Frontiers in Immunology* [en ligne]. 19 octobre 2015. Vol. 6. [Consulté le 23 février 2022]. DOI 10.3389/fimmu.2015.00519. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00519/abstract>
- MUZIASARI, W, PÄRNÄNEN, K, JOHNSON, T, LYRA, C, KARKMAN, A, STEDTFELD, R, TAMMINEN, M, TIEDJE, J et VIRTA, M, 2016. Aquaculture changes the profile of antibiotic resistance and mobile genetic element associated genes in Baltic Sea sediments. SMALLA, Kornelia (éd.), *FEMS Microbiology Ecology*. avril 2016. Vol. 92, n° 4, pp. fiw052. DOI 10.1093/femsec/fiw052.
- NAYLOR, R, HARDY, R, BUSCHMANN, A, BUSH, S, CAO, L, KLINGER, D, LITTLE, D, LUBCHENCO, J, SHUMWAY, S et TROELL, M, 2021. A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*. 25 mars 2021. Vol. 591, n° 7851, pp. 551-563. DOI 10.1038/s41586-021-03308-6.
- NOGA, E, 2010. *Fish Disease* [en ligne]. 2eme édition. Wiley Blackwell. UBCM Wiley. ISBN 978-1-118-78675-8. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118786758>
- NOIA, M., DOMÍNGUEZ, B., LEIRO, J., BLANCO-MÉNDEZ, J., LUZARDO-ÁLVAREZ, A. et LAMAS, J., 2014. Inflammatory responses and side effects generated by several adjuvant-containing vaccines in turbot. *Fish & Shellfish Immunology*. mai 2014. Vol. 38, n° 1, pp. 244-254. DOI 10.1016/j.fsi.2014.03.020.
- ONG, S-T, SHAN HO, J, HO, B et DING, J-L, 2006. Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology*. juin 2006. Vol. 211, n° 4, pp. 295-314. DOI 10.1016/j.imbio.2006.02.004.
- PALM LANDOLT, R, LANDOLT, M et BUSCH, R, 1998. Route of vaccine administration: effects on the specific humoral response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 1998. Vol. 33, pp. 157-166. DOI 10.3354/dao033157.
- PARK, J, LAGNITON, P, LIU, Y et XU, R-H, 2021. mRNA vaccines for COVID-19: what, why and how. *International Journal of Biological Sciences*. 2021. Vol. 17, n° 6, pp. 1446-1460. DOI 10.7150/ijbs.59233.
- PARLEMENT EUROPÉEN, 2021. *Règlement (UE) 2016/429 du parlement européen et du conseil du 9 mars 2016 relatif aux maladies animales transmissibles et modifiant et abrogeant certains actes dans le domaine de la santé animale (« législation sur la santé animale »)* [en ligne]. 21 avril 2021.

[Consulté le 28 mars 2022]. Disponible à l'adresse : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02016R0429-20210421>

PATIL, H, BENET-PERELBERG, A, NAOR, A, SMIRNOV, M, OFEK, T, NASSER, A, MINZ, D et CYTRYN, E, 2016. Evidence of Increased Antibiotic Resistance in Phylogenetically-Diverse *Aeromonas* Isolates from Semi-Intensive Fish Ponds Treated with Antibiotics. *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 28 novembre 2016. Vol. 7. [Consulté le 18 février 2022]. DOI 10.3389/fmicb.2016.01875. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01875/full>

PETTINELLO, R et DOOLEY, H, 2014. The Immunoglobulins of Cold-Blooded Vertebrates. *Biomolecules*. 24 novembre 2014. Vol. 4, n° 4, pp. 1045-1069. DOI 10.3390/biom4041045.

PIRHONEN, J, SCHRECK, C, RENO, P et ÖGÜT, H, 2003. Effect of fasting on feed intake, growth and mortality of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, during an induced *Aeromonas salmonicida* epizootic. *Aquaculture*. février 2003. Vol. 216, n° 1-4, pp. 31-38. DOI 10.1016/S0044-8486(02)00435-0.

POPPE, T et BRECK, O, 1997. Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil-adjuvanted vaccine. A case report. *Diseases of Aquatic Organisms*. 1997. Vol. 29, pp. 219-226. DOI 10.3354/dao029219.

POULIQUEN, H, DELÉPÉE, R, THORIN, C, HAURY, J, LARHANTEC-VERDIER, M, MORVAN, M-L et BRIS, H, 2009. Comparison of water, sediment and plants for the monitoring of antibiotics : a case study on a river dedicated to fish farming. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2009. Vol. 28, n° 3, pp. 496.

PUENTE-MARIN, NOMBELA, CHICO, CIORDIA, MENA, PEREZ, COLL, et ORTEGA-VILLAIZAN, 2019. Potential Role of Rainbow Trout Erythrocytes as Mediators in the Immune Response Induced by a DNA Vaccine in Fish. *Vaccines*. 3 juillet 2019. Vol. 7, n° 3, pp. 60. DOI 10.3390/vaccines7030060.

PUHAR, A et SANSONETTI, P, 2014. Type III secretion system. *Current Biology*. septembre 2014. Vol. 24, n° 17, pp. R784-R791. DOI 10.1016/j.cub.2014.07.016.

QUENTEL, C., BREMONT, M. et POULIQUEN, H., 2007. La vaccination chez les poissons d'élevage. *INRAE Productions Animales*. 7 septembre 2007. Vol. 20, n° 3, pp. 233-238. DOI 10.20870/productions-animales.2007.20.3.3463.

RAIDA, M et BUCHMANN, K, 2009. Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* O1. *Developmental & Comparative Immunology*. janvier 2009. Vol. 33, n° 1, pp. 35-45. DOI 10.1016/j.dci.2008.07.001.

RAIZO (RÉSEAU D'ALERTE ET D'INFORMATION ZOOSANITAIRE), 2018. *Bulletin zoosanitaire -La furunculose : défis et importance de la prévention-*. Québec : RAIZO.

REITH, M, SINGH, R, CURTIS, B, BOYD, J, BOUEVITCH, A, KIMBALL, J, MUNHOLLAND, J, MURPHY, C, SARTY, D, WILLIAMS, J, NASH, J, JOHNSON, S et BROWN, L, 2008. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics*. 2008. Vol. 9, n° 1, pp. 427. DOI 10.1186/1471-2164-9-427.

- RINGØ, E, OLSEN, R, JENSEN, I, ROMERO, J et LAUZON, H, 2014. Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. décembre 2014. Vol. 24, n° 4, pp. 1005-1032. DOI 10.1007/s11160-014-9361-y.
- ROBERTS, R, 2012. *Fish pathology* [en ligne]. 4eme édition. Wiley Blackwell. ISBN 978-1-118-22293-5. Disponible à l'adresse : <https://doc-veto.oniris-nantes.fr/Record.htm?idlist=4&record=19398964124911161469>
- ROMBOUT, J, YANG, G et KIRON, V, 2014. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*. octobre 2014. Vol. 40, n° 2, pp. 634-643. DOI 10.1016/j.fsi.2014.08.020.
- ROMSTAD, A, REITAN, L, MIDTLYNG, P, GRAVNINGEN, K et EVENSEN, Ø, 2013. Antibody responses correlate with antigen dose and in vivo protection for oil-adjuvanted, experimental furunculosis (*Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*) vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) and can be used for batch potency testing of vaccines. *Vaccine*. janvier 2013. Vol. 31, n° 5, pp. 791-796. DOI 10.1016/j.vaccine.2012.11.069.
- RØNNESETH, A, WERGELAND, H et PETTERSEN, E, 2007. Neutrophils and B-cells in Atlantic cod (*Gadus morhua L.*). *Fish & Shellfish Immunology*. septembre 2007. Vol. 23, n° 3, pp. 493-503. DOI 10.1016/j.fsi.2006.08.017.
- SÁENZ-MARTÍNEZ, D, SANTANA, P, ARÓSTICA, M, FORERO, J, GUZMÁN, F et MERCADO, L, 2021. Immunodetection of rainbow trout IL-8 cleaved-peptide: Tissue bioavailability and potential antibacterial activity in a bacterial infection context. *Developmental & Comparative Immunology*. novembre 2021. Vol. 124, pp. 104182. DOI 10.1016/j.dci.2021.104182.
- SALINAS, I, 2015. The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology*. 12 août 2015. Vol. 4, n° 3, pp. 525-539. DOI 10.3390/biology4030525.
- SARAI, F, MONTERO, R, OSTERMANN, S, REBL, A, KÖLLNER, B et GOLDAMMER, T 2022. The Early Immune Response of Lymphoid and Myeloid Head-Kidney Cells of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Stimulated with *Aeromonas salmonicida*. *Fishes*. 7 janvier 2022. Vol. 7, n° 1, pp. 12. DOI 10.3390/fishes7010012.
- SCHMIDT, A, BRUUN, M, DALSGAARD, I, PEDERSEN, K et LARSEN, J, 2000. Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fish-Pathogenic and Environmental Bacteria Associated with Four Danish Rainbow Trout Farms. *Applied and Environmental Microbiology*. novembre 2000. Vol. 66, n° 11, pp. 4908-4915. DOI 10.1128/AEM.66.11.4908-4915.2000.
- SCHMIDT, J, HENRIKSEN, N et BUCHMANN, K, 2016. ERM booster vaccination of rainbow trout using diluted bacterin: Field studies. *Aquaculture*. novembre 2016. Vol. 464, pp. 262-267. DOI 10.1016/j.aquaculture.2016.07.001.
- SCHWENTEIT, J, GRAM, L, NIELSEN, K, FRIDJONSSON, O, BORNSCHEUER, U, GIVSKOV, M et GUDMUNDSOTTIR, B, 2011. Quorum sensing in *Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes* and the effect of the autoinducer synthase AsaI on bacterial virulence. *Veterinary Microbiology*. janvier 2011. Vol. 147, n° 3-4, pp. 389-397. DOI 10.1016/j.vetmic.2010.07.020.
- SHEFAT, S, 2018. Vaccines for Use in Finfish Aquaculture. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*. 2018. Vol. 2, n° 11, pp. 5.

- SMITH, S, 2019. *Fish diseases and medicine*. CRC Press, Taylor & Francis Group. ISBN 1-4987-2786-7.
- SNGTV (SOCIÉTÉ NATIONALE DES GROUPEMENTS TECHNIQUES VÉTÉRINAIRES), 2017. Guide de Bonnes Pratiques de la prescription des autovaccins (GBPPA) à usage vétérinaire. . 11 décembre 2017. pp. 25.
- SOLETO, I, GRANJA, A, SIMÓN, R, MOREL, E, DÍAZ-ROSALES, P et TAFALLA, C, 2019. Identification of CD8 α + dendritic cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Fish & Shellfish Immunology*. juin 2019. Vol. 89, pp. 309-318. DOI 10.1016/j.fsi.2019.04.001.
- SOMMERSET, I, KROSSØY, B, BIERING, E et FROST, P, 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*. février 2005. Vol. 4, n° 1, pp. 89-101. DOI 10.1586/14760584.4.1.89.
- STEINEL, N et BOLNICK, D, 2017. Melanomacrophage Centers As a Histological Indicator of Immune Function in Fish and Other Poikilotherms. *Frontiers in Immunology* [en ligne]. 2017. Vol. 8. [Consulté le 2 mai 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00827>
- STOSIK, M, TOKARZ-DEPTUŁA, B et DEPTUŁA, W, 2021. Immunological memory in teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*. août 2021. Vol. 115, pp. 95-103. DOI 10.1016/j.fsi.2021.05.022.
- STRATEV, D et ODEYEMI, O, 2016. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. *Journal of Infection and Public Health*. septembre 2016. Vol. 9, n° 5, pp. 535-544. DOI 10.1016/j.jiph.2015.10.006.
- SUBRAMANIAN, S, MACKINNON, S et ROSS, N, 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. novembre 2007. Vol. 148, n° 3, pp. 256-263. DOI 10.1016/j.cbpb.2007.06.003.
- TALAGRAND-REBOUL, E, JUMAS-BILAK, E et LAMY, B, 2017. The Social Life of *Aeromonas* through Biofilm and Quorum Sensing Systems. *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 20 janvier 2017. Vol. 8. [Consulté le 9 février 2022]. DOI 10.3389/fmicb.2017.00037. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00037/full>
- TAM, B, GOUGH, W et TSUJI, L, 2011. The impact of warming on the appearance of furunculosis in fish of the James Bay region, Quebec, Canada. *Regional Environmental Change*. mars 2011. Vol. 11, n° 1, pp. 123-132. DOI 10.1007/s10113-010-0122-8.
- TELETCHÉA, F, 2019. Fish domestication in aquaculture: reassessment and emerging questions, 2019, DOI 10.26028/CYBIUM/2019-431-001. Disponible à l'adresse : <http://sfi-cybiuim.fr/fr/fish-domestication-aquaculture-reassessment-and-emerging-questions>
- TONGSRI, P, MENG, K, LIU, X, WU, Z, YIN, G, WANG, Q, LIU, M et XU, Z, 2020. The predominant role of mucosal immunoglobulin IgT in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after infection with *Flavobacterium columnare*. *Fish & Shellfish Immunology*. avril 2020. Vol. 99, pp. 654-662. DOI 10.1016/j.fsi.2020.01.044.
- TØRUD, B et HÅSTEIN, T, 2008. Skin lesions in fish: causes and solutions. *Acta Veterinaria Scandinavica*. août 2008. Vol. 50, n° S1, pp. S7. DOI 10.1186/1751-0147-50-S1-S7.

- URIBE, C., FOLCH, H., ENRIQUEZ, R. et MORAN, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinárni Medicina*. 11 novembre 2011. Vol. 56, n° No. 10, pp. 486-503. DOI 10.17221/3294-VETMED.
- VALDES, N, ESPINOZA, C, SANHUEZA, L, GONZALEZ, A, CORSINI, G et TELLO, M, 2015. Draft genome sequence of the Chilean isolate *Aeromonas salmonicida* strain CBA100. *FEMS Microbiology Letters*, 1 mars 2015. Vol. 362, n° 5, DOI 10.1093/femsle/fnu062. Disponible à l'adresse : <https://academic.oup.com/femsle/article/doi/10.1093/femsle/fnu062/468111>
- VILLUMSEN, K, DALSGAARD, I, HOLTEN-ANDERSEN, L et RAID, M, 2012. Potential Role of Specific Antibodies as Important Vaccine Induced Protective Mechanism against *Aeromonas salmonicida* in Rainbow Trout. KALTENBOECK, Bernhard (éd.), *PLoS ONE*. 8 octobre 2012. Vol. 7, n° 10, pp. e46733. DOI 10.1371/journal.pone.0046733.
- VILLUMSEN, K, KOPPANG, E et RAID, M, 2015. Adverse and long-term protective effects following oil-adjuvanted vaccination against *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*. 1 janvier 2015. Vol. 42, n° 1, pp. 193-203. DOI 10.1016/j.fsi.2014.09.024.
- VILLUMSEN, K, NEUMANN, L, OHTANI, M, STRØM, H et RAID, K, 2014. Oral and Anal Vaccination Confers Full Protection against Enteric Redmouth Disease (ERM) in Rainbow Trout. *PLOS ONE*. 2014. Vol. 9, n° 4, pp. 10.
- VILLUMSEN, K et RAID, M, 2013. Long-lasting protection induced by bath vaccination against *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*. novembre 2013. Vol. 35, n° 5, pp. 1649-1653. DOI 10.1016/j.fsi.2013.09.013.
- WEBER, G, HOSTUTTLER, M, CLEVELAND, B et LEEDS, T, 2014. Growth performance comparison of intercross-triploid, induced triploid, and diploid rainbow trout. *Aquaculture*. septembre 2014. Vol. 433, pp. 85-93. DOI 10.1016/j.aquaculture.2014.06.003.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2015. Vaccinating salmon: how Norway avoids antibiotics in fish farming. [en ligne]. 29 octobre 2015. [Consulté le 8 mars 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.euro.who.int/en/countries/norway/news2/news/2015/10/vaccinating-salmon-how-norway-avoids-antibiotics-in-fish-farming>
- WHYTE, S, 2007. The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology*. décembre 2007. Vol. 23, n° 6, pp. 1127-1151. DOI 10.1016/j.fsi.2007.06.005.
- WIKLUND, T et DALSGAARD, I, 1998. Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. *Diseases of Aquatic Organisms*. 1998. Vol. 32, pp. 49-69. DOI 10.3354/dao032049.
- XU, L, ZHAO, J, LIU, M, REN, G, JIAN, F, YIN, J, FENG, J, LIU, H et LU, T, 2017. Bivalent DNA vaccine induces significant immune responses against infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout. *Scientific Reports*. décembre 2017. Vol. 7, n° 1, pp. 5700. DOI 10.1038/s41598-017-06143-w.
- YAMAGUCHI, T, QUILLET, E, BOUDINOT, P et FISCHER, U, 2019. What could be the mechanisms of immunological memory in fish? *Fish & Shellfish Immunology*. février 2019. Vol. 85, pp. 3-8. DOI 10.1016/j.fsi.2018.01.035.

YANG, J, WANG, C, SHU, C, LIU, L, GENG, J, HU, S et FENG, J, 2013. Marine Sediment Bacteria Harbor Antibiotic Resistance Genes Highly Similar to Those Found in Human Pathogens. *Microbial Ecology*. mai 2013. Vol. 65, n° 4, pp. 975-981. DOI 10.1007/s00248-013-0187-2.

YUN, S, LEE, S-J, GIRI, S, KIM, H, KIM, S-G, KIM, S-W, HAN, S, KWON, J, OH, W et CHANG PARK, S, 2020. Vaccination of fish against *Aeromonas hydrophila* infections using the novel approach of transcutaneous immunization with dissolving microneedle patches in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*. février 2020. Vol. 97, pp. 34-40. DOI 10.1016/j.fsi.2019.12.026.

ZANTE, M, BORCHEL, A, BRUNNER, R, GOLDAMMER, T et REBL, A, 2015. Cloning and characterization of the proximal promoter region of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6 gene. *Fish & Shellfish Immunology*. mars 2015. Vol. 43, n° 1, pp. 249-256. DOI 10.1016/j.fsi.2014.12.026.

ZAPATA, A., DIEZ, B., CEJALVO, T., GUTIÉRREZ-DE FRÍAS, C. et CORTÉS, A., 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*. février 2006. Vol. 20, n° 2, pp. 126-136. DOI 10.1016/j.fsi.2004.09.005.

ZHANG, Z, NIU, C, STORSET, A, BØGWALD, J et DALMO, R, 2011. Comparison of *Aeromonas salmonicida* resistant and susceptible salmon families: A high immune response is beneficial for the survival against *Aeromonas salmonicida* challenge. *Fish & Shellfish Immunology*. juillet 2011. Vol. 31, n° 1, pp. 1-9. DOI 10.1016/j.fsi.2010.12.019.

ZWOLLO, P, COLE, S, BROMAGE, E et KAATTARI, S, 2005. B Cell Heterogeneity in the Teleost Kidney: Evidence for a Maturation Gradient from Anterior to Posterior Kidney. *The Journal of Immunology*. 1 juin 2005. Vol. 174, n° 11, pp. 6608-6616. DOI 10.4049/jimmunol.174.11.6608.

Annexe 1 : Liste des vaccins commerciaux disponibles pour poissons osseux (Shefat 2018). NB : Le vaccin contre la flavobactériose des Salmonidés n'est pas disponible.

SL. No.	Name of Vaccine	Species vaccinated	Diseases prevented
1	Arthrobacter Vaccine	Salmonids	Columnaris disease
2	<i>Vibrio anguillarum</i> -Ordalii	Salmonids, Rainbow trout	Vibriosis
3	<i>Aeromonas salmonicida</i> Bacterin	Salmonids	Furunculosis
4	<i>Yersinia ruckeri</i> Bacterin	Salmonids	Yersiniosis
5	<i>Edwardsiella ictaluri</i> Vaccine	Catfish	Edwardsiellosis
6	<i>Flavobacterium Columnare</i> Vaccine	Channel Catfish, Salmonids, FW species	Columnaris disease
7	<i>Listonella anguillarum</i> Vaccine	Salmonids, seabass, yellowtail	Vibriosis
8	<i>Vibrio salmonicida</i> Bacterin	Salmonids	Coldwater Vibriosis
9	<i>Vibrio anguillarum-salmonicida</i> Bacterin	Salmonids	Vibriosis
10	<i>Edwardsiella ictaluri</i> Bacterin	Channel Catfish, Japanese flounder	Enteric septicemia
11	<i>Moritella viscosa</i> Vaccine	Salmonids	Wound Disease
12	Free-cell <i>Aeromonas hydrophila</i> Vaccine	Indian Major Carps	Dropsy
13	<i>Streptococcus agalactiae</i> Vaccine	Tilapia	Streptococcosis
14	<i>Streptococcus iniae</i> Vaccine	Tilapia	Streptococcosis
15	Enteric Red Mouth (ERM) Vaccine	Salmonids	Enteric red mouth disease
16	Pasteurella Vaccine	Salmonids	Pasteurellosis
17	<i>Photobacterium damsela</i> Vaccine	Seabass, yellowtail	Pasteurellosis
18	<i>Aeromonas hydrophila</i> Vaccine	Salmonids	Motile Aeromonas Septicemia
19	Carp Erythrodermatitis	Carp species	Erythrodermatitis
20	<i>Piscirickettsia salmonis</i> Vaccine	Salmonids	piscirickettsiosis
21	aemiaGa Vaccine	Lobsters	aemiaGa
22	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> Vaccine	Salmonids, FW species	Flavobacteriosis
23	<i>Renibacterium salmoninarum</i> Vaccine	Salmonids	Bacterial Kidney Disease
24	<i>Lactococcus garvieae</i> Vaccine	Rainbow trout, yellowtail	Lactococcosis
25	Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Vaccine	Salmonids	Infectious hematopoietic necrosis
26	Infectious Pancreatic Necrosis Virus Vaccine	Salmonids	Infectious pancreatic necrosis
27	Infectious Salmon Anemia Vaccine	Salmonids	Infectious Salmon Anemia
28	<i>Iridoviral disease</i> Vaccine	Red sea bream	Iridoviral disease
29	Spring Viremia of Carp Vaccine	Common carp	Spring viremia of carp
30	Koi Herpes Virus (KHV) Vaccine	Koi carp	Koi herpes virus disease
31	Betanodavirus	Grouper	Betanoda virus disease
32	Carp Erythrodermatitis	Carp	Erythrodermatitis
33	Grass Carp Hemorrhage Disease Vaccine	Grass Carp	Grass carp hemorrhage disease
34	aemiaGa vaccine	Lobsters	aemiaGa
35	Nodavirus vaccine	Seabass	Viral Nervous Necrosis
36	Pancreas disease Virus Vaccine	Salmonids	Pancreas Disease

Questionnaire à destination des vétérinaires

I-Pour mieux vous connaître

1- Vous êtes : un homme / une femme

2- Vous avez :

- 21-30 ans
- 31-40 ans
- 41-50 ans
- 51-60 ans
- > 60 ans

3- Quelle est votre école d'origine ?

- Nantes
- Alfort
- Lyon
- Toulouse
- Liège
- Autre :

4- Avez-vous suivi l'année de spécialité aquacole à Nantes ? Oui / Non

5- Depuis quand travaillez-vous en pisciculture ?

- < 10 ans
- 10-20 ans
- > 20 ans

6- Quelles sont vos régions d'exercice professionnel ?

- Bretagne
- Normandie
- Aquitaine
- Hauts de France
- Etranger
- Autre :

7- Quelle part de votre activité représente la pisciculture ?

- < 10%
- 10-50%
- > 50%
- 100%

8- Décrivez en quelques mots le type de pisciculture que vous suivez (espèces, types d'élevages, proportion dans votre clientèle piscicole...)

.....

II- Vaccination contre la furunculose

1- Prescrivez-vous des vaccins contre la furunculose chez la truite arc-en-ciel ? Oui / Non

2- Prescrivez-vous des vaccins contre la furunculose chez d'autres espèces aquacoles ? Si oui, lesquelles ?

.....

3.1.- Si vous ne prescrivez pas de vaccin contre la furunculose, pourquoi ?

- Le vaccin n'est pas efficace
- Vos éleveurs ne souhaitent pas vacciner
- L'impact de la furunculose dans les élevages que vous suivez est trop faible
- Autre :

3.2- Si autre, merci de décrire :

.....

4- Quel vaccin utilisez-vous ?

- Autovaccin
- Alphaject 3000
- Autre :

5.1- Utilisez-vous des vaccins administrables par voie orale ? Toujours / Parfois / Jamais

5.2- Si la réponse à la question précédente était parfois, dans quels cas ?

.....

5.3- Que recommandez-vous aux éleveurs pour la préparation/administration par voie orale ?

.....

6.1- Utilisez-vous des vaccins administrables par voie intrapéritonéale ? Toujours / Parfois / Jamais

6.2- Si la réponse à la question précédente était parfois, dans quels cas ?

.....

6.3- Que recommandez-vous aux éleveurs pour la préparation/administration par voie intrapéritonéale ?

.....

6.1- Utilisez-vous des vaccins administrables par balnéation ? Toujours / Parfois / Jamais

6.2- Si la réponse à la question précédente était parfois, dans quels cas ?

.....
6.3- Que recommandez-vous aux éleveurs pour la préparation/administration par balnéation ?

.....
7.1- Prescrivez-vous des rappels ?

- Oui
- Non
- Parfois
- Autre :

7.2- Vous prescrivez habituellement des rappels.

7.2.1- Par voie orale ? : Toujours / Parfois / Jamais

7.2.2- Si la réponse à la question précédente était parfois, dans quels cas ?

.....
7.2.3- Par voie intrapéritonéale ? : Toujours / Parfois / Jamais

7.2.4- Si la réponse à la question précédente était parfois, dans quels cas ?

.....
7.2.5- Par balnéation ? : Toujours / Parfois / Jamais

7.2.6- Si la réponse à la question précédente était parfois, dans quels cas ?

.....
7.3- Vous prescrivez parfois des rappels.

7.3.1- Dans quels cas ?

.....
7.3.2- Par voie orale ? : Toujours / Parfois / Jamais

7.3.3- Si la réponse à la question précédente était parfois, dans quels cas ?

.....
7.3.4- Par voie intrapéritonéale ? : Toujours / Parfois / Jamais

7.3.5- Si la réponse à la question précédente était parfois, dans quels cas ?

.....
7.3.6- Par balnéation ? : Toujours / Parfois / Jamais

7.3.7- Si la réponse à la question précédente était parfois, dans quels cas ?

.....
7.4- Vous ne prescrivez jamais de rappel. Pourquoi ?

.....

8- Si vous prescrivez un rappel, combien de temps après la primovaccination le préconisez-vous ?

- 3 mois
- 6 mois
- 1 an
- Jamais
- Autre :

9- Si vous prescrivez un schéma vaccinal différent de ceux proposés ci-dessus, indiquez lequel et pourquoi ?

.....

10- Etes-vous satisfait de l'efficacité vaccinale ?

.....

11- Selon vous, sur quel(s) point(s) faudrait-il travailler pour améliorer cette efficacité ?

.....

Questionnaire à destination des éleveurs

I-Pour mieux vous connaître vous et votre élevage

A- Pour mieux vous connaître

1. Vous êtes :

- Un homme
- Une femme

2. Vous avez :

- 21-30 ans
- 31-40 ans
- 41-50 ans
- 51-60 ans
- > 60 ans

3. Depuis quand travaillez-vous en pisciculture ?

- < 10 ans
- 10-20 ans
- > 20 ans

B- Pour mieux connaître votre élevage

1. Dans quelle région êtes-vous ?

- Bretagne
- Normandie
- Aquitaine
- Hauts de France
- Autre :

2. Quel est le volume (en m³) de votre élevage ?

3. Quelle est votre production moyenne annuelle (en tonnes) ?

4. Quelle est la charge moyenne de vos bassins (en kg/m³) ?

5. De combien de sites exploitez-vous ?

C- Pour mieux connaître vos animaux

1. Quelle espèce élevez-vous ?

- Truite arc-en-ciel
- Truite fario
- Autre :

2. Dans quelles catégories ?

- Œufs
- Alevins
- Géniteurs
- Truite portion
- Truite pour filets
- Truite pour œufs
- Truite pour fumage

3. Quelle génétique utilisez-vous ?

- Aqualande
- Milin Nevez/Bretagne truite
- Viviers de Sarrance
- Murgat
- Margerit
- Troutlodge
- Troutex
- Aquasearch
- Autre :

4. Quelle type de truite élevez-vous ?

- Exclusivement des diploïdes (mâles ou femelles)
- Exclusivement des triploïdes
- Majoritairement des diploïdes
- Majoritairement des triploïdes
- A parité environ, diploïdes et triploïdes

5. Si vous élevez des diploïdes et des triploïdes, sont-elles élevées dans des bassins séparés ?

- Oui, toujours
- Oui, en général
- Non, en général
- Non, jamais

II-La furunculose dans votre élevage

1. Avez-vous déjà eu des cas de furunculose dans votre élevage durant les 10 dernières années (2010-2021) ? Oui / Non

2. En quelle(s) année(s) ?

- 2021
- 2020
- 2019
- 2018
- 2017
- 2016

- Avant 2016

3. A quelle saison ?

- Avril
- Mai
- Juin
- Juillet
- Août
- Septembre
- Octobre
- Autre :

4. A quelle température de l'eau ?

- 10-12°C
- 12-14°C
- 14-16°C
- 16-18°C
- Autre :

5. Sur quelle taille d'animaux ?

- Alevins
- < 250g
- 250-500g
- 500g-1kg
- > 1kg

6. En général, vous observez une mortalité de :

- > 50%
- 30-50%
- 10-30%
- < 10%
- Aucune ou très faible, vous observez uniquement des furoncles

III- La vaccination dans votre élevage

1. Vaccinez-vous vos animaux contre la furunculose ? Oui / Non / Ca dépend des années

2. Vaccinez-vous contre d'autres maladies ?

- Non
- Yersiniose
- Vibriose
- Autre :

A- Vous vaccinez contre la furonculose

1- Primovaccination

1. Quand avez-vous vacciné contre la furonculose ?

- 2021
- 2020
- 2019
- 2018
- 2017
- 2016
- Avant 2016

2. Quel vaccin utilisez-vous ?

- Alphaject 3000
- Autovaccin
- Autre :

3. Si vous utilisez un autovaccin, qui est le fabricant ?

4. Comment administrez vous le vaccin lors de la primo-vaccination ?

- Voie intrapéritonéale
- Balnéation
- Alimentation

5. A quelle période ?

- Janvier-Février
- Mars-Avril
- Mai-Juin
- Juillet-Août
- Septembre-Octobre
- Novembre-Décembre

6. A quelle température de l'eau ?

- < 10°C
- 10-15°C
- > 15°C

7. Sur quels animaux ?

- < 100g
- 100-200g
- 200-500g
- 500g-1kg
- > 1kg

2- Rappel vaccinal

1. Réalisez-vous un rappel ? Oui / Non

2. Si vous effectuez un rappel, comment l'administrez-vous ?

- Voie intrapéritonéale
- Balnéation
- Alimentation

3. Si vous effectuez un rappel, à quelle température de l'eau ?

- < 10°C
- 10-15°C
- > 15°C

4. Si vous effectuez un rappel, combien de temps après la première vaccination ?

- 3 mois
- 6 mois
- 1 an
- 2 ans
- Autre :

5. Depuis que vous vaccinez contre la furonculose, vous observez une mortalité :

- Aucune, pas de signes cliniques
- Aucune mais des furoncles sont observés sur les animaux
- < 1%
- 1-10%
- > 10%

B- Vous ne vaccinez pas contre la furonculose

Pour quelle(s) raison(s) ?

- Le vaccin n'est pas efficace
- Le vaccin est trop cher
- Vous n'avez pas le matériel
- Vous n'avez pas de furonculose, ou l'impact de la maladie dans votre élevage est trop faible
- Le vaccin entraîne des lésions intrapéritonéales
- Vous êtes contre la vaccination
- Autre :

Annexe 4 : Autorisation de projet pour la manipulation expérimentale



**Direction générale
de la recherche et de l'innovation**

**Service de la performance, du financement et de la
contractualisation avec les organismes de recherche**

Département des pratiques de recherche réglementées

Cellule Animaux utilisés à des Fins Scientifiques - AFIS

Affaire suivie par : V. Delassault et V. Gomez

Tél : 01 55 55 97 27 / 77 58

Mél : autorisation-projet@recherche.gouv.fr

1, rue Descartes
75231 Paris SP 05

Paris, le 17 février 2022

Autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, le projet :

1. référencé sous le numéro APAFIS #35027-2022012811456492 v1
2. ayant pour titre : Projet Medic'eau : Evaluation des pratiques vaccinales contre la furonculose chez la Truite Arc en Ciel
3. déposé par l'établissement utilisateur : Halle expérimentale d'aquaculture, numéro d'agrément 44272, dont la responsable est Madame Ségolène CALVEZ
4. et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale et de la conformité à l'autorisation est assurée par : Madame Emmanuelle MOREAU,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'établissement, pour une durée de 1 an à compter de la présente notification.

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le comité d'éthique en expérimentation animale n°006 et a reçu un avis favorable.

Ce projet n'est pas soumis à l'obligation d'une appréciation rétrospective à l'issue de sa réalisation.

Pour la ministre et par délégation
le chef du département des pratiques
de recherche réglementées

Laurent PINON

Madame Ségolène CALVEZ
Halle expérimentale d'aquaculture

Annexe 5 : Composition de l'aliment utilisé pendant l'ensemble de la manipulation expérimentale



*LAP free : Land Animal Protein free

NEO CDC RANGE

Extruded pellet for ongrowing **Trout**



- Feed with an elevated digestible energy level
- High content of marine products, selected for their high level of digestibility
- Ensures a good nutritional balance throughout the cycle
- Range available with or without pigments

	NEO 19 CDC		NEO 20 CDC	NEO 21 CDC	NEO 22 CDC
Commercial Ref.	3	4 / 5	5 / 7 / 9	7 / 9 / 11	9 / 11
Diameter (mm)	3,2	4 / 5,5	5,5 / 7,5 / 9,5	7,5 / 9,5 / 11,5	9,5 / 11,5
Presentation	Pellet				
Live weight (g)	10 to 50 g	50 to 400 g	100 to 2 500 g	400 to 3 500 g	1 800 to 3 500 g

PACKING

15, 20, 25 kg bag, big bag or bulk
Store feed in a cool and dry place.

FLOATING TYPE

Floating, half-floating or sinking

INDICATIVE NUTRITIONAL PROFILE		NEO 19 CDC		NEO 20 CDC	NEO 21 CDC	NEO 22 CDC
		3	4 / 5	5 / 7 / 9	7 / 9 / 11	9 / 11
Protein	(%)	45	40	39	38	36
Fats	(%)	21	23	27	30	32
Digestible Energy	(MJ/Kg)	19,6	19,5	20,6	21,6	21,9
DP / DE	(g/MJ)	21,3	18,9	17,5	16,2	15
Gross Energy	(MJ/Kg)	22,6	22,7	23,7	24,6	24,8
Fibre	(%)	1,8	2,5	2,3	1,5	1,9
Ash	(%)	6,8	6,8	6	5,7	5,9
Phosphorus	(%)	0,95	0,95	0,9	0,9	0,9

VITAMINS INCORPORATION

Vit. A (UI/Kg)	10 000
Vit. D3 (UI/Kg)	1 750
Vit. E (mg/Kg)	200
Vit. C (mg/Kg)	150

SUSTAINABILITY

Here at Le Gouessant, we believe that aquaculture is sustainable if performance, quality and preservation of marine resources are combined, that is why we are Global GAP certified.



S.A.S. LE GOUessant AQUACULTURE – 1 rue de la Jeannaie, ZI La ville Es Lan- B.P. 40228
22402 LAMBALLE-ARMOR CEDEX – Tél. : +33 (0)2 96 30 74 74 – E mail : contact.aqua@legouessant.fr – www.aqua.legouessant.com

Indicative and non-contractual values, please refer to the label for actual composition. Shelf life 10 months from manufacture date.

April 2021

FEEDING TABLE

Live Weight (g)		Feed	P	F	Diameter		Feeding rate (% of Biomass / day) following water temperature																			
From	To				N°	(mm)	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
10	50	NEO CDC 19	45	21	3	3,2	1,02	1,09	1,17	1,26	1,34	1,43	1,51	1,59	1,68	1,75	1,80	1,83	1,84	1,82	1,78	1,66	1,51			
50	100				4	4	0,90	0,98	1,06	1,14	1,22	1,31	1,39	1,47	1,55	1,61	1,67	1,71	1,73	1,71	1,66	1,53	1,39			
100	150		40	23	5	5,5	0,83	0,90	0,98	1,06	1,13	1,21	1,28	1,37	1,45	1,53	1,59	1,63	1,64	1,62	1,54	1,43	1,28			
150	200				5	5,5	0,79	0,86	0,93	1,01	1,08	1,14	1,22	1,28	1,36	1,44	1,50	1,53	1,54	1,51	1,44	1,33	1,22			
200	400				5	5,5	0,72	0,78	0,85	0,92	0,99	1,06	1,13	1,18	1,26	1,33	1,38	1,41	1,41	1,38	1,32	1,23	1,13			
400	500	NEO CDC 20	39	27	7	7,5	0,64	0,68	0,75	0,81	0,86	0,93	0,99	1,05	1,11	1,17	1,21	1,23	1,23	1,21	1,17	1,08	0,99			
500	1 000				7	7,5	0,58	0,63	0,68	0,73	0,79	0,84	0,90	0,95	1,00	1,04	1,08	1,10	1,12	1,11	1,06	0,98	0,90			
1 000	1 500				7	7,5	0,50	0,55	0,59	0,63	0,68	0,73	0,78	0,82	0,87	0,90	0,94	0,96	0,96	0,97	0,96	0,92	0,85	0,78		
1 500	1 800				7	7,5	0,46	0,50	0,54	0,58	0,62	0,66	0,70	0,74	0,79	0,83	0,86	0,88	0,88	0,87	0,83	0,78	0,70			
400	500	NEO CDC 21	38	30	7	7,5	0,61	0,65	0,71	0,77	0,82	0,88	0,94	1,00	1,06	1,11	1,16	1,18	1,18	1,16	1,11	1,03	0,94			
500	1 000				7	7,5	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80	0,86	0,91	0,95	0,99	1,03	1,05	1,07	1,06	1,01	0,94	0,86			
1 000	1 500				7	7,5	0,48	0,52	0,56	0,60	0,65	0,69	0,74	0,78	0,83	0,86	0,90	0,91	0,92	0,91	0,88	0,81	0,74			
1 500	1 800				7	7,5	0,44	0,47	0,51	0,55	0,59	0,63	0,67	0,71	0,75	0,79	0,82	0,84	0,84	0,83	0,80	0,74	0,67			
1 800	2 000				9	9,5	0,42	0,45	0,49	0,53	0,56	0,60	0,63	0,67	0,71	0,75	0,78	0,79	0,80	0,79	0,75	0,70	0,63			
2 000	2 500				9	9,5	0,38	0,42	0,45	0,48	0,52	0,55	0,58	0,62	0,65	0,69	0,72	0,74	0,74	0,74	0,69	0,65	0,58			
1 800	2 000	NEO CDC 22	36	32	9	9,5	0,41	0,45	0,48	0,52	0,55	0,59	0,63	0,66	0,70	0,74	0,77	0,78	0,79	0,78	0,74	0,69	0,63			
2 000	2 500				9	9,5	0,38	0,41	0,44	0,48	0,51	0,54	0,58	0,61	0,64	0,68	0,71	0,73	0,73	0,73	0,68	0,64	0,58			
2 500	3 000				9	9,5	0,34	0,37	0,40	0,43	0,46	0,49	0,52	0,55	0,58	0,61	0,63	0,64	0,65	0,64	0,60	0,56	0,52			
3 000	3 500				11	11,5	0,31	0,33	0,36	0,38	0,41	0,44	0,46	0,49	0,52	0,54	0,57	0,58	0,58	0,58	0,54	0,50	0,46			
3 500	4 000				11	11,5	0,27	0,30	0,32	0,34	0,37	0,39	0,42	0,44	0,47	0,49	0,51	0,52	0,53	0,51	0,48	0,45	0,42			

Feeding rates are indicatives and based on the feed nutritional values. It must be adapted to local conditions and farming goals

Annexe 6 : Ordonnance de prescription des autovaccins utilisés pour la manipulation expérimentale

Cabinet vétérinaire (livraison)

Oniris – site de la Chanterrie
Batiement G4 – Aquaculture
101, route de Gachet
CS 44706
44307 Nantes cedex 03



Structure concernée par l'emploi des autovaccins

Oniris, Station expérimentale aquacole
101, route de Gachet
CS 44706
44307 Nantes cedex 03

Nantes, le 27/01/2022

PRESCRIPTION D'AUTOVACCINS CONTRE LA FURONCULOSE A *AEROMONAS SALMONICIDA*
SALMONICIDA (souche CAE1414) CHEZ LA TRUITE ARC EN CIEL

- | | |
|--|---------------------|
| 1- Autovaccin administré par voie intrapéritonéale
Concentration bactérienne : 10^9 CFU/ml
Volume injecté par poisson : 100 μ l | 2 flacons de 50 ml |
| 2- Autovaccin administré par voie orale
Concentration bactérienne : 10^9 CFU/ml
Volume administré par poisson : 100 μ l
Administrer ce volume dans l'aliment en 2 x 5 jours, espacé de 5 jours d'aliment sans vaccin | 2 flacons de 50 ml |
| 3- Autovaccin administré par balnéation
Concentration bactérienne : 10^{10} CFU/ml
Diluer au 1/10 la préparation vaccinale dans du PBS
Volume administré : 1 litre pour 500g de poissons
Durée de la balnéation : 1 minute | 20 flacons de 50 ml |

Gratuit, vu avec Hubert Gantelet
Livraison souhaitée : semaine 11

Emmanuelle Moreau
Docteure vétérinaire
Professeure à Oniris

Annexe 7 : Protocole ELISA utilisé pour la détermination des titres en anticorps anti-Ass

	<p><u>MODE OPERATOIRE</u></p> <p>Version n°1.0 applicable au 2011-03</p>	<p>Page 1</p>	
---	--	---------------	--

1. Objet et domaine d'application

Détection et dosage d'anticorps anti-*Aeromonas salmonicida sub. salmonida* dans le serum de truite Arc en Ciel

2. Principe de la méthode

ELISA indirect

3. Appareillages et matériels

Sonicateur (UMR Secalim)
 Plaque fond plat 96 puits Maxisorp NUNC
 Spectrophotomètre – filtre 450 nm (MULTISKAN GO)

4. Réactifs chimiques et biologiques

Tampon carbonate 1 M pH 9,6
 Na₂CO₃ 8,75 g
 NaHCO₃ 14,00 g
 H₂O qsp 250 ml
 Ajuster à pH9,5
 Tampon carbonate 0,1 M pH 9,6
 Diluer au 1/10 le tampon carbonate 1M (10 ml de tampon 1M + 90 ml d'H₂O)
 Tampon PBS (PBS tablet ; sigma P4417-50TAB)
 Tampon PBS – 0,1 % tween (PBSt)
 Gélatine (sigma)
 Salmonid Ig rabbit polyclonal antibody (Origene, SP1423)
 Goat anti-rabbit IgG(Fc), HRP conjugate (Biorad STAR121P)
 TMB Liquid Substrate, Supersensitive, for ELISA (sigma, T4444-4x100ML)
 HCl 1N : 8.6 ml d'HCl 37% + EPPI qsp 100ml
 Serum « témoin négatif »
 Serum « témoin positif »

5. Contenu du mode opératoire

NB : dans tout le mode opératoire, on entend par :
 Rinçage : remplir les puits avec 250µl de PBSt et éliminer immédiatement le liquide en retournant la plaque – Tapoter sur un torchon la plaque renversée afin d'éliminer un maximum de liquide

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Cyril Hénard	Emmanuelle Moreau	
Fonction :	Etudiant M2	EC	
Visa :			

	<p><u>MODE OPERATOIRE</u></p> <p>Version n°1.0 applicable au 2011-03</p>	<p>Page 2</p>	
---	--	---------------	--

Lavage : remplir les puits avec 250µl de PBSt, incuber 5 min à température ambiante et éliminer le liquide en retournant la plaque - Tapoter sur un torchon la plaque renversée afin d'éliminer un maximum de liquide

Préparation de l'antigène (si nécessaire)

- Culture souche CAE 235 en TSB : 10⁸ CFU/ml
- 3 lavages en PBS
- Sonication dans de la glace (6 cycles de 30sec de sonication – 30 sec d'arrêt)
- Centrifugation – récupération du surnageant
- Dosage protéique : kit BCA (Pierce)
- Congeler à -20°C en aliquot de 50 µg

Sensibilisation des plaques maxisorp

- Préparer du tampon carbonate à 0,1M à partir du tampon carbonate 1M
- Préparation d'une solution d'antigènes à 2.5 µg/ml dans du tampon carbonate **0.1M**
- pH 9.6
- Déposer 100 µl / puits – incuber 1 nuit à 4°C
- Rincer les plaques puis laver les plaques 2 fois avec 250 µl de PBSt

Saturation des plaques

- Préparer une solution de gélatine 2% dans du PBSt (0,6g de gélatine + 30 ml PBSt – dissoudre par chauffage). Déposer 150 µl / puits et incuber 1 h à température ambiante (RT)
- Rincer les plaques puis laver les plaques 2 fois avec 250 µl de PBSt

Dépôt des serums

- Préparer les dilutions au 1/100 des sera dans du PBSt (3 µl de serum pour 300 µl de PBSt)
- Déposer 100 µl de serum 1/100 / puits en duplicat – incuber 1 nuit à 4°C
- Rincer les plaques puis Laver les plaques 2 fois avec 250 µl de PBSt
- Sur chaque plaque, faire une colonne « blanc » : déposer 100 µl de PBSt (sans serum)
- Sur chaque plaque, faire 4 puits du serum « témoin négatif » et 4 puits du serum « témoin positif »

Action de l'anticorps polyclonal anti-Ig de salmonidés (Salmonid Ig rabbit polyclonal antibody)

- Préparer une dilution à 1/20000 dans du PBSt (1 µl dans 20 ml de PBSt)
- Déposer 100 µl / puits - incuber 1h à RT
- Rincer les plaques puis Laver les plaques 2 fois avec 250 µl de PBSt

Action du conjugué (Goat anti-rabbit IgG(Fc), HRP conjugate (Biorad))

- Préparer une dilution à 1/20000 dans du PBSt (1 µl dans 20 ml de PBSt)
- Déposer 100 µl / puits - incuber 1h à RT

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Cyril Hénard	Emmanuelle Moreau	
Fonction :	Etudiant M2	EC	
Visa :			

<p>Unité BioEpAR</p>  	<p><u>MODE OPERATOIRE</u></p> <p>Version n°1.0 applicable au 2011-03</p>	<p>Page 3</p>	
---	--	---------------	--

Rincer les plaques puis Laver les plaques 2 fois avec 250 µl de PBSt
Rincer les plaques puis Laver les plaques 1 fois avec 250 µl de PBS (sans tween)

Action du substrat

Déposer 100 µl / puits de TMB - Incubation 20 min à l'abri de la lumière à RT
Ajouter 100 µl d'HCl 1M / puits
Lecture à 450 nm

6. Calcul

- Calculer la moyenne de la DO des « blancs »
- Pour chaque serum, calculer la moyenne de la DO du duplicat et soustraire la moyenne de la DO des « blancs »
- Eventuellement, calculer le taux d'anticorps pour chaque sérum

$$\text{taux d'anticorps} = \frac{DO_{\text{test}} - DO_{\text{serum négatif}}}{DO_{\text{serum positif}} - DO_{\text{serum négatif}}}$$

7. Références

Romstad, Anne Berit, Liv Jorun Reitan, Paul Midtlyng, Kjersti Gravningen, and Oystein Evensen. 2012. "Development of an Antibody ELISA for Potency Testing of Furunculosis (*Aeromonas Salmonicida* Subsp *Salmonicida*) Vaccines in Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L)." *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* 40 (1): 67–71. doi:10.1016/j.biologicals.2011.09.011

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Cyril Hénard	Emmanuelle Moreau	
Fonction :	Etudiant M2	EC	
Visa :			

Annexe 9 : Exemple de fiche de suivi des résultats d'autopsie utilisée lors des challenges infectieux

Ecole Nationale Vétérinaire
ONIRIS

Medic'eau

Station Expérimentale d'Aquaculture

SUIVI MORBIDITES ET MORTALITE

Salle N° : 3 Bassin N° : 11	Protocole vaccinal	Lot : VO sR - Challenge	Date d'inoculation:
N° souche et origine : CAE 1414	Charge Infectieuse : 1,1.10 ⁶ CFU/ml	Nb de poissons inoculés : 45	

N° du poisson	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Date de mortalité															
Date de morbidité															
Euthanasie															
Signes cliniques***															
Autopsie*															
Furoncles															
Présence*															
Taille (cm)															
Aspect***															
Rate															
Taille (cm)															
Section***															
TD hémorragique*															
Marquage*															
Bactériologie **															
<i>Aeromonas</i> *															
Autre**															
Remarques															

* Oui : O / Non : N

** Cf fiche de bactériologie

*** cf fiche d'autopsie

Medic'eau : vaccination

– Signes cliniques et autopsie –

Signes cliniques

Aspect général



Figure 1 : Abdomen distendu. Noter **AbD**

Signes cliniques au niveau des nageoires et bouche

NC : nageoire caudale

NAn : nageoire anale

Bo : bouche

NPv : nageoire pelvienne

NPc : nageoire pectorale

ND : nageoire dorsale

NAd : nageoire adipeuse



Figure 2 : Nageoire effilochée, noter "+" à côté du code correspondant à la nageoire (ex : ici, cela correspond à NC+)



Figure 3 : Nageoire abimée, légèrement érodée. Noter "+" avec le code de la nageoire (ici, on aurait donc NC++)



Figure 4 : Nageoire très érodée, lésion évolutive rouge. Noter "+++" avec le code de la nageoire (ici, on aurait donc NC+++)



Figure 5 : Base hémorragique. Noter "BH" avec le code de la nageoire (Ici, on aurait donc NpcBH)

Signes cliniques au niveau de l'anus

Anus : **A**

Prolapsus : **AP**

Aspect rougeâtre hémorragique : **AH**



Signes cliniques au niveau cutané



Figure 6 : Pertes d'écaillés. Noter PE.



Figure 7 : Queue hémorragique (pétéchies). Noter QH.



Figure 8 : Ligne latérale hémorragique (pétéchies). Noter LLH.

Furoncles

Pour l'aspect des furoncles, noter uniquement la lésion la plus grave observée sur l'animal.
Exemple : un animal présentant des lésions « 1 » et « 3 » sera uniquement annoté « 3 » sur la feuille de suivi.



Figure 9 : Surélévation de la peau (cf. flèche orange). Furoncle non ouvert, noter "1" dans la ligne "Aspect". Présence d'une lésion « 2 » également (cf. flèche verte)



Figure 10 : Furoncle non perforé avec nécrose de la peau. Noter "2" dans la ligne "Aspect".



Figure 11 : Furoncles perforés avec érosion et nécrose profondes atteignant la couche musculaire. Noter "3" dans la ligne « Aspect ».

Adhérences intrapéritonéales



Figure 12 : Adhérences intrapéritonéales. Noter "Oui" dans la ligne "Adhérences IP"

Rate : Aspect extérieur (pour information)

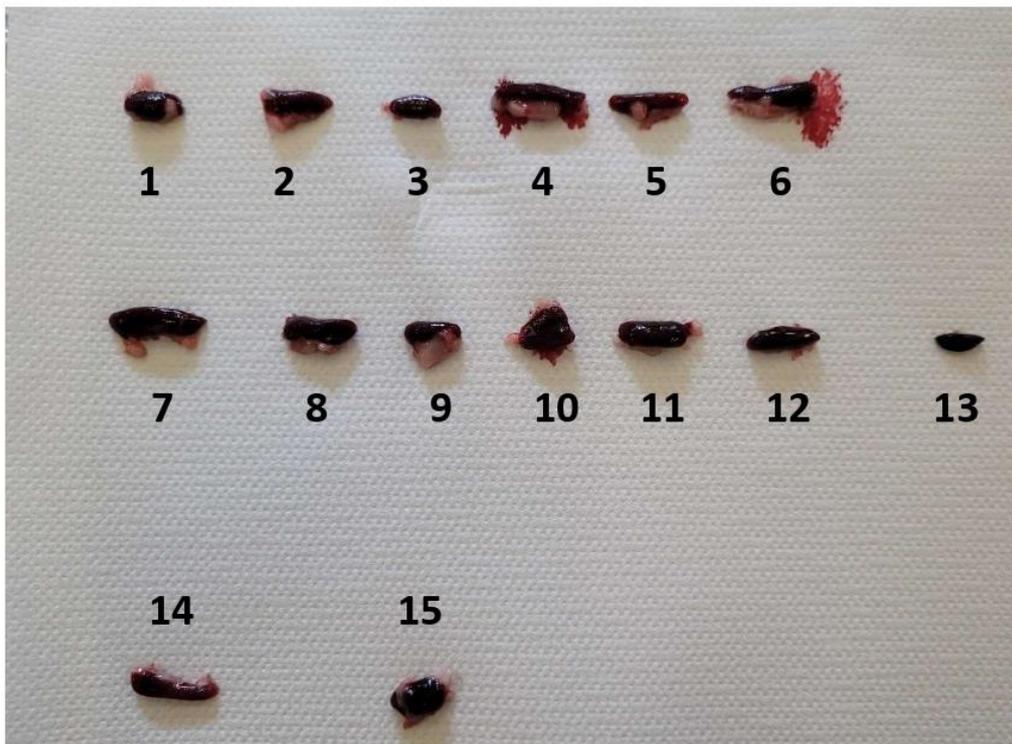


Figure 13 : rates de truite arc-en-ciel. Noter l'hétérogénéité de formes et de tailles. Les rates 1 à 12 ont été prélevées sur des animaux en bonne santé apparente. La rate 13 est issue d'une truite décrochée par rapport à son lot, la 14 est issue d'une truite à scoliose et la 15, d'une truite moribonde.



Figure 14 : rate autolysée (noter Aly).

Rate : Aspect après section transversale



Figure 15: section triangulaire, bords pointus (rate n°8). Noter ST.



Figure 16: La forme triangulaire est conservée, les bords sont émoussés (rate n°11). Noter SE.



Figure 17 - Section ronde, aucun angle visible (rate n°3). Noter SR.

Annexe 11 : Analyses statistiques du poids des animaux en fonction du temps et en fonction du lot

Lot 1/Lot 2	Différence de poids	p-value
NV-NC/NV-C1	-1,48	0,9597
NV-NC/IP-C1	12,72	<0,0001
NV-NC/VO-C1	1,61	0,946
NV-NC/Baln-C1	54,14	<0,0001
IP-C1/NV-C1	-14,2	<0,0001
IP-C1/VO-C1	-11,11	<0,0001
IP-C1/Baln-C1	41,42	<0,0001
NV-C1/VO-C1	3,1	0,621
NV-C1/Baln-C1	55,62	<0,0001
VO-C1/Baln-C1	52,53	<0,0001

Ce tableau présente la différence moyenne de poids entre deux lots au même temps pour le premier challenge infectieux. Ces données ont été obtenues par une méthode de régression linéaire du poids en fonction du temps et du lot, sans prise en compte d'effet aléatoire. Une différence négative signifie que les animaux du lot 1 ont un poids inférieur à celui du lot 2. Les résultats non significatifs sont affichés en gras.

Lot 1 /Lot 2	Différence de poids 3	p-value	Lot 1 /Lot 2	Différence de poids 3	p-value
NV-NC/NV-C2	-0,59	1	NV-C2/IP-IP	11,64	0,0014
NV-NC/Baln-IP	65,05	<0,0001	NV-C2/IP-VO	5,85	0,4924
NV-NC/IP-C2	7,49	0,1639	NV-C2/VO-IP	0,15	1
NV-NC/VO-C2	-3,23	0,9734	IP-C2/VO-C2	-10,72	0,0058
NV-NC/Baln-C2	58,67	<0,0001	IP-C2/Baln-C2	51,18	<0,0001
NV-NC/IP-IP	11,05	0,0027	IP-C2/IP-IP	3,56	0,9332
NV-NC/IP-VO	5,26	0,624	IP-C2/IP-VO	-2,23	0,9963
NV-NC/VO-IP	-0,46	1	IP-C2/VO-IP	-7,93	0,1281
Baln-IP/NV-C2	-65,64	<0,0001	VO-C2/Baln-C2	61,9	<0,0001
Baln-IP/IP-C2	-57,56	<0,0001	VO-C2/IP-IP	14,28	<0,0001
Baln-IP/VO-C2	-68,28	<0,0001	VO-C2/IP-VO	8,49	0,0687
Baln-IP/Baln-C2	-6,38	0,451	VO-C2/VO-IP	2,79	0,9909
Baln-IP/IP-IP	-54,01	<0,0001	Baln-C2/IP-IP	-47,63	<0,0001
Baln-IP/IP-VO	-59,8	<0,0001	Baln-C2/IP-VO	-53,42	<0,0001
Baln-IP/VO-IP	-65,5	<0,0001	Baln-C2/VO-IP	-59,12	<0,0001
NV-C2/IP-C2	8,08	0,106	IP-IP/IP-VO	-5,79	0,4515
NV-C2/VO-C2	-2,64	0,9933	IP-IP/VO-IP	-11,49	0,002
NV-C2/Baln-C2	59,26	<0,0001	IP-VO/VO-IP	-5,7	0,5409

Ce tableau présente la différence moyenne de poids entre deux lots au même temps pour le second challenge infectieux. Ces données ont été obtenues selon la même méthode que précédemment. Les résultats non significatifs sont affichés en gras.

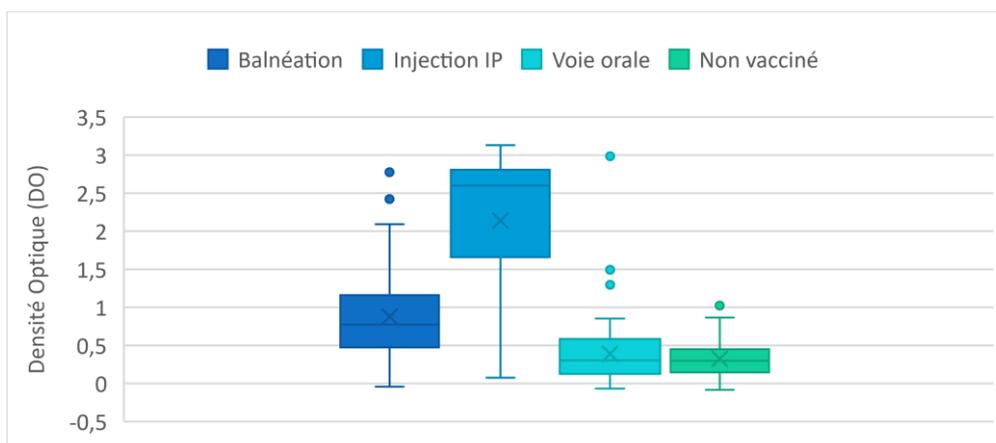
Lot 1 - Lot 2	Différence de pente	p-value
NV-NC/NV-C1	-0,0594	0,8074
NV-NC/IP-C1	0,1555	0,017
NV-NC/VO-C1	0,0211	0,9955
NV-NC/Baln-C1	0,3179	<0,0001
IP-C1/NV-C1	-0,2149	0,0005
IP-C1/VO-C1	-0,1343	0,0983
IP-C1/Baln-C1	0,1625	0,052
NV-C1/VO-C1	0,0806	0,6354
NV-C1/Baln-C1	0,3774	<0,0001
VO-C1/Baln-C1	0,2968	<0,0001

Ce tableau présente la différence moyenne entre les pentes des droites de régression linéaire de deux lots, pour les lots utilisés lors du premier challenge infectieux uniquement. La pente est ici assimilée au GMQ des animaux. Une différence de pente négative signifie que le lot 1 a une plus faible croissance que le lot 2. Les résultats non significatifs sont affichés en gras.

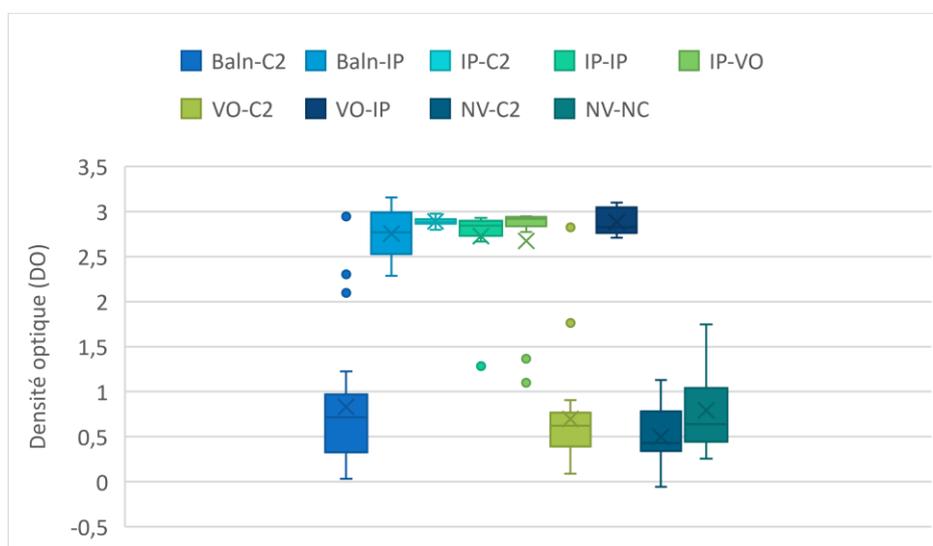
Lot 1 /Lot 2	Différence de poids 3	p-value	Lot 1 /Lot 2	Différence de poids 3	p-value
NV-NC/NV-C2	-0,02	1	NV-C2/IP-IP	0,13	0,237
NV-NC/Baln-IP	0,5	<0,0001	NV-C2/IP-VO	-0,07	0,9368
NV-NC/IP-C2	0,0008	1	NV-C2/VO-IP	0,007	1
NV-NC/VO-C2	-0,1	0,5803	IP-C2/VO-C2	-0,1	0,5807
NV-NC/Baln-C2	0,33	<0,0001	IP-C2/Baln-C2	0,33	<0,0001
NV-NC/IP-IP	0,11	0,4073	IP-C2/IP-IP	0,11	0,4303
NV-NC/IP-VO	-0,09	0,7552	IP-C2/IP-VO	-0,09	0,7544
NV-NC/VO-IP	-0,01	1	IP-C2/VO-IP	-0,01	1
Baln-IP/NV-C2	-0,51	<0,0001	VO-C2/Baln-C2	0,44	<0,0001
Baln-IP/IP-C2	-0,49	<0,0001	VO-C2/IP-IP	0,21	0,0013
Baln-IP/VO-C2	-0,6	<0,0001	VO-C2/IP-VO	0,02	1
Baln-IP/Baln-C2	-0,16	0,0722	VO-C2/VO-IP	0,09	0,7644
Baln-IP/IP-IP	-0,38	<0,0001	Baln-C2/IP-IP	-0,22	0,0008
Baln-IP/IP-VO	-0,58	<0,0001	Baln-C2/IP-VO	-0,42	<0,0001
Baln-IP/VO-IP	-0,51	<0,0001	Baln-C2/VO-IP	-0,35	<0,0001
NV-C2/IP-C2	0,02	1	IP-IP/IP-VO	-0,2	0,0029
NV-C2/VO-C2	-0,08	0,8323	IP-IP/VO-IP	-0,12	0,308
NV-C2/Baln-C2	0,35	<0,0001	IP-VO/VO-IP	0,07	0,8951

Ce tableau présente la différence moyenne entre les pentes des droites de régression linéaire de deux lots, pour les lots utilisés lors du second challenge infectieux. Les résultats non significatifs sont affichés en gras.

Annexe 12 : Analyses statistiques de la densité optique des prélèvements sanguins traités par ELISA



Répartition des densités optiques (équivalentes à la production d'anticorps sanguins) dans chaque lot 4 semaines après primovaccination.



Répartition des densités optiques (équivalentes à la production d'anticorps sanguins) dans chaque lot 4 semaines après rappel vaccinal et 14 semaines après primovaccination.

Lot 1 / Lot 2	T0	T4	T10	T14
Baln-C1/IP-C1	0,08	<0,0001	<0,0001	0,04
Baln-C1/VO-C1	1	<0,0001	1	1
Baln-C1/NV	1	<0,0001	0,15	1
IP-C1/VO-C1	1	<0,0001	<0,0001	0,0006
IP-C1/NV-C1	0,86	<0,0001	<0,0001	0,0005
VO-C1/NV-C1	1	1	1	1
NV-NC/NV-C1	SO	SO	1	0,005

Détail des p-value obtenues après test de comparaison de moyenne de Wilcoxon pour les lots utilisés lors du premier challenge infectieux. Les valeurs non significatives sont affichées en gras.

Lot 1 / Lot 2	T10	T14	T21	T23
IP-C2/VO-C2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	1
IP-C2/Baln-C2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
IP-C2/IP-IP	1	1	1	0,15
IP-C2/IP-VO	1	1	1	1
IP-C2/VO-IP	<0,0001	1	1	1
IP-C2/Baln-IP	<0,0001	1	1	1
IP-C2/NV-C2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
VO-C2/Baln-C2	1	1	1	1
VO-C2/IP-IP	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,17
VO-C2/IP-VO	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,74
VO-C2/VO-IP	1	<0,0001	<0,0001	0,76
VO-C2/Baln-IP	1	<0,0001	<0,0001	0,94
VO-C2/NV-C2	1	1	1	0,23
Baln-C2/IP-IP	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0005
Baln-C2/IP-VO	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Lot 1 / Lot 22	T 10	T 14	T 21	T 23
Baln-C2/VO-IP	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Baln-C2/Baln-IP	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Baln-C2/NV-C2	1	1	0,64	1
IP-IP/IP-VO	1	1	1	1
IP-IP/VO-IP	<0,0001	1	1	1
IP-IP/Baln-IP	<0,0001	1	1	0,03
IP-IP/NV-C2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
IP-VO/VO-IP	<0,0001	1	1	1
IP-VO/Baln-IP	<0,0001	1	1	1
IP-VO/NV-C2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
VO-IP/Baln-IP	1	1	1	1
VO-IP/NV-C2	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Baln-IP/NV-C2	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001
NV-C2/NV-NC	1	0,53	1	SO

Détail des p-value obtenues après test de comparaison de moyenne de Wilcoxon pour les lots utilisés lors du second challenge infectieux. Les valeurs non significatives sont affichées en gras.

Annexe 13 : Analyses statistiques de la mortalité et de l'expression d'une furonculose des animaux lors du premier challenge infectieux

Lot	HR	IC 95 %	p-value
NV-C1	6,17	[-1,47 - 5,11]	0,28
IP-C1	91,22	[1,61 - 7,41]	0,002
VO-C1	124,64	[1,92 - 7,72]	0,001
Baln-C1	270,72	[2,70 - 8,50]	0,0001

Détail des résultats obtenus via le modèle de Cox avec prise en compte d'un effet aléatoire lié aux bacs où se trouvaient les animaux. Les HR sont calculés avec le lot NVNC comme référence. Les résultats non significatifs sont affichés en gras.

Variable à expliquer	OR	IC 95 %	p-value
Mortalité	119,2	[1,37 - 6,98]	<0,0001
Rein	19,45	[-0,01 - 5,95]	0,008
Mucus	8,22	[-0,88 - 5,09]	0,08
Anorexie	18,76	[-0,06 - 5,92]	0,009
Pétéchie	27,87	[0,34 - 6,31]	0,002
Furoncle	13,71	[-0,04 - 5,60]	0,02

Détail des résultats obtenus après réalisation d'une régression logistique binomiale univariée, avec la réalisation du challenge comme variable explicative et prise en compte d'un effet aléatoire lié aux bacs où se trouvaient les animaux. Les résultats non significatifs sont affichés en gras.

		IP-C1	VO-C1	Baln-C1
Mortalité	OR	0,05	1,52	5,07
	IC 95 %	[-4,67 - (-1,22)]	[-0,38 - 1,27]	[0,71 - 2,52]
	p-value	<0,0001	0,32	0,0003
Furoncle	OR	0,18	1,33	1,71
	IC 95 %	[-3,51 - 0,1]	[-0,77 - 1,35]	[-0,49 - 1,57]
	p-value	0,03	0,59	0,3
Pétéchie	OR	0,01	0,88	4,98
	IC 95 %	[-6,92 - (-1,22)]	[-0,92 - 0,75]	[0,6 - 2,39]
	p-value	<0,0001	0,77	0,0006
Anorexie	OR	0,02	1,9	2,08
	IC 95 %	[-6,64 - (-0,94)]	[-0,20 - 1,47]	[-0,12 - 1,56]
	p-value	<0,0001	0,15	0,1
Ass Rein	OR	0,05	1,27	5,24
	IC 95 %	[-4,76 - (-1,31)]	[-0,56 - 1,09]	[0,73 - 2,58]
	p-value	<0,0001	0,57	0,0003
Ass Mucus	OR	0,23	1,09	1,84
	IC 95 %	[-2,53 - (-0,38)]	[-0,75 - 0,93]	[-0,21 - 1,45]
	p-value	0,005	0,85	0,15

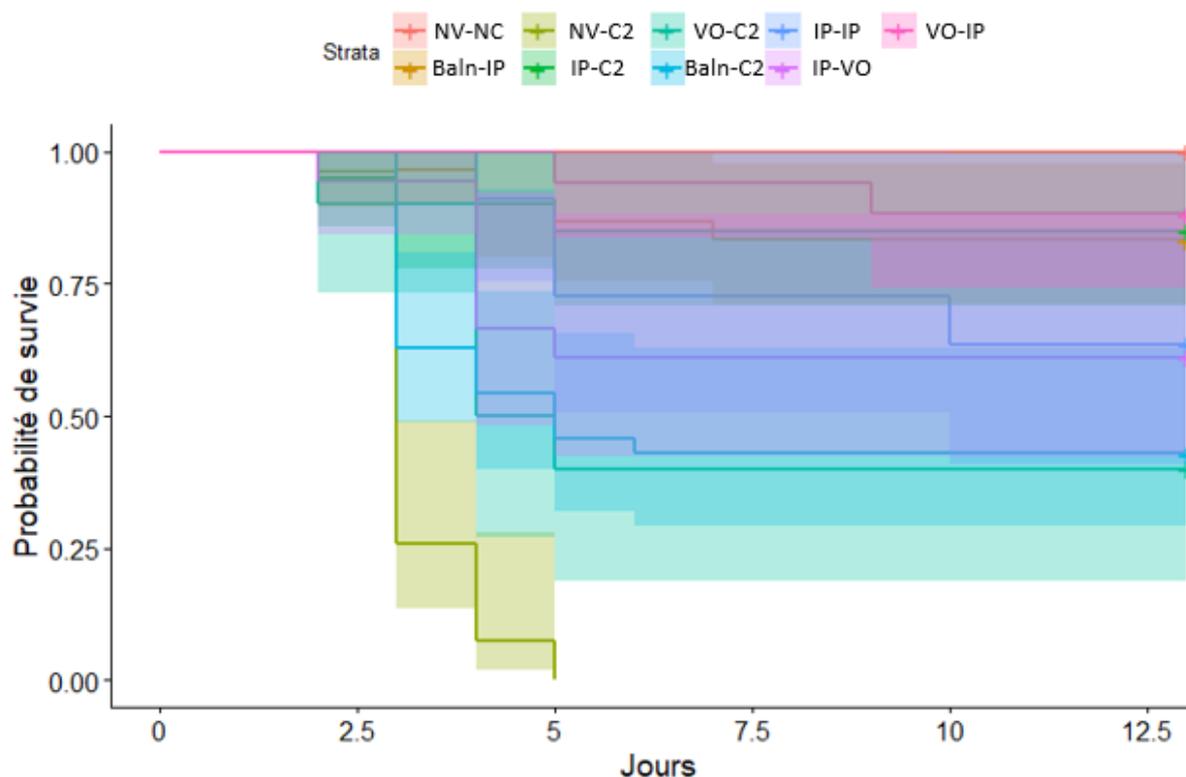
Détail des résultats obtenus après régression logistique binomiale univariée, avec la mort des animaux comme variable à expliquer et prise en compte d'un effet aléatoire lié aux bacs où se trouvaient les

animaux. Les OR ont été calculés avec le lot NV-C1 comme lot de référence. Les valeurs non significatives sont affichées en gras.

Variable explicative	OR	IC 95 %	p-value
Furoncle	0,64	[-3,22 - 2,10]	0,77
Pétéchie	65,24	[1,51 - 6,75]	0,001
Ass Rein	638,7	[4,06 - 9,37]	<0,0001
Ass Mucus	1,26	[-2,18 - 2,83]	0,87

Détail des résultats obtenus après régression logistique binomiale multivariée, avec la mort des animaux comme variable à expliquer et prenant en compte un effet aléatoire lié aux bacs où se trouvaient les animaux. Les résultats non significatifs sont affichés en gras.

Annexe 14 : Analyses statistiques de la mortalité des animaux lors du second challenge infectieux



Graphique représentant la probabilité de survie des truites utilisées lors du second challenge infectieux en fonction du temps, selon la méthode de Kaplan Meier. Les aires colorées représentent les intervalles de confiance à 95 %.

Lot	HR	p-value	IC 95 %
Baln-C2	60,75	0,01	[2,56-919]
Baln-IP	9,88	0,14	[0,46-211,1]
IP-C2	10,93	0,13	[0,49-242,8]
IP-IP	19,41	0,06	[0,83-449,9]
IP-VO	27,36	0,03	[1,34-554,6]
VO-C2	60,75	0,007	[3,07-1200,9]
VO-IP	7,37	0,22	[0,29-183,8]
NV-C2	115,15	0,002	[5,55-2388]

Détail des Hazard Ratio obtenus avec le modèle de Cox, utilisant le lot NV-NC comme référence et prise en compte d'un effet aléatoire lié aux bacs où se trouvaient les animaux..Les résultats non significatifs sont affichés en gras.

Sloann Cindy Cathy MARIE

**VACCINATION CONTRE LA FURONCULOSE A *AEROMONAS SALMONICIDA*
CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL (*ONCHORHYNCHUS MYKISS*) : ETAT DES
LIEUX ET FACTEURS IMPACTANT SON EFFICACITE**

(Vaccination against Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) furunculosis due to *Aeromonas salmonicida* : current situation in France and factors impacting its efficiency)

Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire : Nantes, le 21 Novembre 2022

RESUME

Ce manuscrit porte sur la furonculose à *Aeromonas salmonicida* chez la truite arc-en-ciel, une maladie rencontrée notamment dans les élevages truiticoles français. Une première partie bibliographique vise à présenter l'importance de la vaccination contre les maladies rencontrées en élevage piscicole, plus particulièrement contre la furonculose en France, dans un contexte d'évolution de la durée de production des animaux et de changement climatique. A la suite d'une étude de terrain présentée dans ce document, il apparaît que la vaccination contre la furonculose en France est réalisée majoritairement via des auto-vaccins, sans qu'il n'existe de protocole vaccinal précis. L'efficacité vaccinale de différents protocoles réalisés à l'aide d'un autovaccin disponible sous 3 formes d'administration (injection intrapéritonéale, balnéation et voie orale) a été étudiée expérimentalement, après infection de truites avec *A. salmonicida* par balnéation. L'analyse statistique n'a montré une réelle efficacité vaccinale que chez les animaux vaccinés au moins une fois par injection intrapéritonéale, avec une protection efficace contre la mortalité induite par la maladie. Cette efficacité s'accompagne cependant provisoirement d'une croissance moindre des truites, ces animaux présentant de nombreuses adhérences intrapéritonéales. La durée de l'efficacité après vaccination par injection intrapéritonéale pourrait être précisée, afin de déterminer le moment optimal pour la réalisation d'un rappel vaccinal. De même, l'efficacité d'autres protocoles vaccinaux n'utilisant que la voie orale et/ou la balnéation pourrait être étudié afin de se dispenser de l'utilisation de l'injection intrapéritonéale, lourde de manipulations pour les éleveurs.

MOTS CLES :

- Truite arc-en-ciel
- Furonculose
- Aeromonas salmonicida*
- Vaccination
- Autovaccin
- Prophylaxie
- Aquaculture

DATE DE SOUTENANCE : le 21 Novembre 2022, à Nantes