



**HAL**  
open science

# EXperimental determination of good practices for the manufacturing and storage of antibiotic-top-coated fish feed, within the specific constraints of French trout farms

Lucie Ménager

► **To cite this version:**

Lucie Ménager. EXperimental determination of good practices for the manufacturing and storage of antibiotic-top-coated fish feed, within the specific constraints of French trout farms. Life Sciences [q-bio]. 2024. dumas-04926749

**HAL Id: dumas-04926749**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04926749v1>**

Submitted on 3 Feb 2025

**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 2024 - Thèse n° 155

**DÉTERMINATION EXPÉRIMENTALE DES BONNES  
PRATIQUES DE FABRICATION ET DE CONSERVATION  
D'ALIMENTS ENROBÉS AVEC DES ANTIBIOTIQUES, DANS  
LE CADRE DES CONTRAINTES SPÉCIFIQUES DES  
FERMES TRUTTICOLES FRANÇAISES**

**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 20 décembre 2024

par

**Lucie MENAGER**

Sous la direction de

**Antoine ROSTANG**

Président du jury : Madame Ségolène CALVEZ professeure à ONIRIS VetAgroBio

Membres du jury : Monsieur Antoine ROSTANG maître de conférence à ONIRIS VetAgroBio

Madame Catherine BELLOC professeure à ONIRIS VetAgroBio

Membre invité : Monsieur Jean-Luc LE RESTE correspondant qualité HALIEUTICA



ANNEE 2024 - Thèse n° 155

**DÉTERMINATION EXPÉRIMENTALE DES BONNES  
PRATIQUES DE FABRICATION ET DE CONSERVATION  
D'ALIMENTS ENROBÉS AVEC DES ANTIBIOTIQUES, DANS  
LE CADRE DES CONTRAINTES SPÉCIFIQUES DES  
FERMES TRUTTICOLES FRANÇAISES**

**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 20 décembre 2024

par

**Lucie MENAGER**

Sous la direction de

**Antoine ROSTANG**

Président du jury : Madame Ségolène CALVEZ professeure à ONIRIS VetAgroBio

Membres du jury : Monsieur Antoine ROSTANG maître de conférence à ONIRIS VetAgroBio

Madame Catherine BELLOC professeure à ONIRIS VetAgroBio

Membre invité : Monsieur Jean-Luc LE RESTE correspondant qualité HALIEUTICA



# Liste des enseignants

<b>Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment</b>		
Responsable : <b>Emmanuel JAFFRES</b> – Adjointe : <b>Frédérique NGUYEN</b>		
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (MC Stagiaire) Martine KAMMERER (Pr émérite) Marc GOGNY (Pr émérite)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Lionel MARTIGNAT (Pr)	Julie HERVE (Pr) Grégoire MIGNOT (MC)
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Jérôme ABADIE (MC) Florian CHOCTEAU (MC stagiaire)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC) Pierre CORDIER (CERC)
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (MC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC HDR) Emmanuel JAFFRES (MC HDR)	Mathilde MOSSER (MC) Boris MISERY (MC) Raouf TAREB (MC) Judith LORANT (MC stagiaire)
PACENV = VET1	Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG)	Charlotte MOCQUARD (PRAG) Aurore CALVEL (PRAG)
<b>Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique</b>		
Responsable : <b>Raphaël GUATTEO</b> – Adjoint : <b>Jean-Michel CAPPELIER</b>		
Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Ségolène CALVEZ (Pr) Aurélien MADOUASSE (MC HDR) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr) Pauline MAISONNASSE (CERC)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC HDR) Léa LOISEL (AERC) Kenny OBERLE (MC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC) Aurore BOISHARDY (CERC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (MC) Bruno LE BIZEC (Pr)	Sofia STRUBBIA (MC) Marie-France PILET (Pr)

<b>Département DSC Sciences cliniques</b>		
Responsable : <b>Olivier GAUTHIER</b> – Adjoint : <b>Marion FUSELLIER</b>		
Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (Pr)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Claire DEFOURMSTRAUX (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass) Vincent BRUET (MC)	Sabrina VIEU (AERC) Maria Dolores SANCHEZ (CERC)
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 (Pr) Catherine IBISCH (MC HDR) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) Francis FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (Pr) Lamia BRIAND-AMIRAT(Pr)
<b>Département GPA Génie des procédés alimentaires</b>		
Responsable : <b>Vanessa JURY</b> – Adjointe : <b>Cyril TOUBLANC</b>		
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 (Pr) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
PAC-ING	Cyril Gaillard (PCEA)	
<b>Département MSC Management, statistiques et communication</b>		
Responsable : <b>Jean-Michel GALIHARRET</b> – Adjointe : <b>Sibylle DUCHAINE</b>		
Mathématiques, statistiques, informatique	Chantal THORIN (Pr Ag) Evelyne VIGNEAU (Pr) Jean-Michel GALHARRET(MC)	Véronique CARIOU (Pr) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC) Franck INSGNARES (IE)	Sibylle DUCHAINE (MC) Sonia MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC) Christophe PAPINEAU (Ens. Cont.)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GUYLER (Ens. Cont.) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

## Formations Techniciens supérieurs

Responsable : **Laurence FRERET**

Laurence FRERET (PCEA) Françoise BRICHET (IAE) Christophe CARON (PLPA) Virginie MAGIN (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 :** MENAGER Lucie
- **Année de soutenance :** 2024
- **Titre de la thèse :** Détermination expérimentale des bonnes pratiques de fabrication et de conservation d'aliments enrobés avec des antibiotiques, dans le cadre des contraintes spécifiques des fermes trutticoles françaises
- **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 :** 183

# Remerciements

## *Aux membres de mon jury,*

**À Madame Ségolène CALVEZ**, professeure à Oniris,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être la présidente de ce jury de thèse. Sincère hommage.

**À Monsieur Antoine ROSTANG**, maître de conférences à Oniris,

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse original et pour m'avoir accompagnée au long de ce travail. Également pour vos relectures attentives du manuscrit, vos remarques et vos conseils. Sincères remerciements.

**À Madame Catherine BELLOC**, professeure à Oniris,

Pour avoir accepté d'être l'assesseur de ce jury, et ainsi me faire l'honneur de juger de la qualité de mon travail de thèse. Sincère hommage.

**À Monsieur Jean-Luc LE RESTE**, correspondant qualité Halieutica,

Pour m'avoir accueillie à Pontivy avec gentillesse et pour le travail fourni sur ce sujet, avec une motivation et une rigueur sans failles. Chaleureux remerciements.

## *Aux personnes ayant participé à ce projet,*

**À Madame Sara PICON et à Messieurs Pierre-Marie BOITARD, Matthieu JAMIN, Alain LEBRETON, Guillaume LERESTE et Christian RAVAILLE,**

Pour votre implication et la pertinence de vos remarques tout au long de la réalisation de ce projet.

# Table des matières

Liste des illustrations .....	14
Liste des tableaux.....	17
Liste des abréviations.....	19
Introduction .....	20
I. Contexte scientifique et réglementaire.....	22
A. Contexte de la filière aquacole et trutticole.....	23
1. Aquaculture .....	23
a) Mondiale .....	23
b) Française .....	23
2. Trutticulture.....	23
a) Mondiale .....	23
b) Française .....	24
B. La truite arc-en-ciel.....	24
1. Particularités physiologiques et mode de vie .....	24
a) Ectothermie.....	24
b) Milieu de vie .....	24
2. Zootechnie de la truite arc-en-ciel .....	25
a) Élevage .....	25
(1) Fécondation artificielle .....	25
(2) Incubation.....	26
(3) Alevinage et pré-grossissement .....	26
(4) Grossissement.....	26
b) Densité des animaux.....	26
c) Alimentation .....	26
C. Pathologie de la truite arc-en-ciel .....	27
1. Maladies infectieuses.....	28
a) Parasitoses.....	28
b) Mycoses.....	28
c) Viroses.....	28
d) Bactérioses .....	28
2. Moyens de lutte contre les bactérioses des truites arc-en-ciel .....	30
a) Prévention .....	30
(1) Prophylaxie sanitaire .....	30

(2) Prophylaxie médicale : la vaccination .....	30
b) Traitements .....	31
(1) Antibiotiques .....	31
(2) Autres traitements .....	31
D. Utilisation des antibiotiques en filière trutticole.....	31
1. Modes d'administration.....	31
a) Balnéation ou trempage .....	31
b) Injection.....	31
c) Voie orale .....	32
(1) Qualité du mélange médicamenteux .....	32
(2) Baisse du niveau d'ingestion.....	35
(3) Lessivage de l'antibiotique .....	35
(4) Impact environnemental.....	36
2. Molécules utilisées en pisciculture .....	38
a) Tétracyclines.....	38
b) Phénicolés.....	39
c) Autres familles d'intérêt vétérinaire en aquaculture.....	39
(1) Quinolones et fluoroquinolones .....	39
(2) Sulfamides .....	39
(3) Macrolides .....	40
(4) Aminoglycosides .....	40
(5) Pénicillines .....	40
3. Spécialités disponibles .....	40
4. Règlementation .....	41
a) Cascade de prescription .....	41
b) Temps d'attente.....	42
c) Médicaments enrobés en ferme piscicoles .....	43
Synthèse .....	44
II. Étude expérimentale .....	45
A. Caractérisation des pratiques d'enrobage dans la filière trutticole française .....	46
1. Matériels et méthodes .....	46
a) Rédaction .....	46
(1) Situation générale.....	46
(2) Utilisation des antibiotiques .....	46
(3) Point de vue des éleveurs.....	47

b)	Diffusion .....	47
c)	Traitement des réponses .....	47
2.	Résultats .....	48
a)	Caractérisation des exploitations .....	48
b)	Utilisation des antibiotiques.....	50
c)	Pratiques d'enrobage.....	51
(1)	Antibiotiques utilisés .....	51
(2)	Aliments utilisés.....	52
(3)	Agent enrobant utilisé .....	53
(4)	Réalisation du mélange .....	55
(5)	Séchage du mélange .....	58
(6)	Conservation du mélange.....	58
d)	Avis et attentes des éleveurs .....	59
3.	Discussion .....	60
a)	Représentativité du sondage .....	60
b)	Biais de méthodologie.....	60
c)	Dichotomie éclosion et grossissement.....	61
d)	Utilisation des antibiotiques et enrobage.....	61
(1)	Antibiotiques .....	62
(2)	Aliments enrobés.....	62
(3)	Agents enrobants.....	62
(4)	Réalisation du mélange .....	63
(5)	Séchage .....	63
(6)	Conservation.....	64
	Synthèse .....	65
B.	Détermination préliminaire des procédés inadaptés.....	66
1.	Matériel et méthodes .....	66
a)	Matières premières et matériel .....	66
(1)	Médicaments antibiotiques .....	66
(2)	Aliments et taux de rationnement.....	67
(3)	Agent enrobant.....	68
(4)	Matériel utilisé .....	68
b)	Modalités de mélange fixées.....	68
c)	Modalités comparées.....	69
d)	Méthodes d'évaluation de l'efficacité.....	70

(1)	Appréciation visuelle .....	70
(2)	Centrifugation .....	70
(3)	Immersion .....	70
2.	Résultats .....	71
a)	Quantités minimales et maximales .....	71
b)	Quantité d'huile ajoutée .....	72
(1)	Procédure A : Aliment GROS et OTC poudre .....	72
(2)	Procédure C : Aliment EC et FFN solution .....	74
c)	Méthode de mélange de l'antibiotique et de l'huile .....	76
d)	Mode de versement de l'antibiotique sur l'aliment .....	77
(1)	Procédures A et B : aliment GROS et OTC ou FFN .....	77
(2)	Procédure C : Aliment EC et FFN solution .....	77
(a)	Versement sur l'aliment, mélangeuse à l'arrêt .....	77
(b)	Pulvérisation, mélangeuse en fonctionnement .....	79
(c)	Projection, mélangeuse en fonctionnement .....	80
e)	Durée de fonctionnement de la mélangeuse .....	80
(1)	Procédure A : aliment GROS et OTC .....	80
(2)	Procédures B et C : FFN et alim GROS ou EC .....	80
f)	Temps de séchage .....	80
(1)	Procédure B : Aliment GROS et FFN .....	80
(2)	Procédure C : Aliment EC et FFN .....	81
g)	Nettoyage .....	81
(1)	Nettoyage mécanique .....	81
(2)	Nettoyage à l'eau .....	82
h)	Quantification des pertes de médicament .....	83
3.	Discussion .....	83
a)	Appréciation de l'efficacité des méthodes .....	83
b)	Intérêt de la centrifugation pour l'évaluation de l'homogénéité .....	84
c)	Quantité de mélange réalisé .....	84
d)	Quantité d'huile de colza ajoutée .....	85
e)	Méthode de mélange de l'antibiotique et de l'huile .....	85
f)	Mode incorporation de l'antibiotique à l'aliment .....	85
g)	Temps de brassage de l'aliment et de l'antibiotique .....	86
h)	Temps de séchage .....	87
i)	Nettoyage .....	87

j)	Quantification de la quantité d'antibiotique perdue .....	88
	Synthèse .....	89
C.	Détermination expérimentale de la stabilité des mélanges .....	90
1.	Matériel et méthodes .....	90
a)	Matières premières .....	90
b)	Modalités de mélange et matériel utilisé.....	91
c)	Réalisation des prélèvements .....	92
d)	Modalités comparées.....	92
e)	Technique analytique.....	93
(1)	Extraction des échantillons .....	93
(2)	Paramètres chromatographiques .....	93
(3)	Spectrométrie de masse.....	93
f)	Traitement des résultats .....	93
2.	Résultats .....	94
a)	Validation de la méthode analytique.....	94
b)	Comparaison des méthodes de conservation .....	94
3.	Discussion .....	96
a)	Méthode analytique .....	96
b)	Stabilité de l'oxytétracycline .....	97
c)	Stabilité du florfénicol.....	97
	Synthèse .....	98
D.	Détermination expérimentale de l'efficacité des mélanges .....	99
1.	Matériel et méthodes .....	99
a)	Choix des modalités .....	99
a)	Modalités de mélange et matériel utilisé.....	100
b)	Modalités comparées.....	101
c)	Réalisation des échantillons .....	103
d)	Technique analytique.....	103
e)	Traitement des résultats .....	103
2.	Résultats .....	105
a)	Teneur en principe actif.....	105
b)	Influence du temps de mélange.....	106
(1)	Procédure A.....	106
(2)	Procédure B.....	106
(a)	Mélanges préparés avec 5 ml/kg d'huile .....	106

(b)	Mélanges préparés avec 10 ml/kg d'huile.....	107
c)	Influence de la quantité d'huile .....	108
(1)	Procédure B.....	108
(a)	Mélanges brassés 10 minutes.....	108
(b)	Mélanges brassés 15 minutes.....	109
(2)	Procédure C.....	110
d)	Influence des pertes mesurées sur la teneur en principe actif .....	111
3.	Discussion .....	113
a)	Évaluation du protocole expérimental .....	113
b)	Performances des méthodes de mélange .....	115
(1)	Teneur en principe actif.....	115
(a)	Comparaison aux lignes directrices .....	115
(b)	Comparaison à la littérature scientifique .....	117
(2)	Homogénéité .....	117
c)	Comparaison des modalités de mélange .....	120
(1)	Temps de mélange .....	120
(2)	Quantité d'huile .....	121
d)	Application sur le terrain.....	123
(1)	Matériel et matières premières .....	123
(2)	Température.....	123
(3)	Autres aliments .....	123
(4)	Autres formes galéniques.....	123
(5)	Habitude du manipulateur.....	124
	Synthèse .....	125
	Conclusion.....	126
	Bibliographie.....	128
	Annexe 1 : RCP du produit Aquaflor <sup>NDV</sup> .....	140
	Annexe 2 : Spécialités disponibles en France.....	147
	Annexe 3 : Questionnaire .....	152
	Annexe 4 : Aliments utilisés .....	165
	Annexe 5 : Analyse des échantillons.....	167
	Annexe 6 : Point de contrôle .....	178
	Annexe 7 : Statistiques.....	180

# Liste des illustrations

Figure 1 : Illustration des bassins type "raceways" dans une pisciculture française (Comité Régional du Tourisme de Bourgogne-Franche-Comté) .....	25
Figure 2 : Bilan sur les modes d'administration des antibiotiques en filière trutticole .....	37
Figure 3 : Principe de la cascade de prescription en filière aquacole d'après le règlement (UE) n°2019/6 relatif aux médicaments vétérinaires.....	42
Figure 4 : Logo du projet enr-EAU-bage.....	44
Figure 5 : Répartition géographique des piscicultures étudiées .....	48
Figure 6 : Nombre de sites exploités par pisciculture. ....	48
Figure 7 : Espèces présentes sur l'exploitation .....	49
Figure 8 : Catégories de poissons présentes sur l'exploitation .....	49
Figure 9 : Ploïdie des truites arc-en-ciel produites.....	49
Figure 10 : Pisciculteurs ayant déjà réalisé un enrobage d'aliment à la ferme.....	50
Figure 11 : Pisciculteurs ayant déjà fait fabriquer un aliment médicamenteux.....	50
Figure 12 : Pisciculteurs ayant déjà eu recours aux injections .....	50
Figure 13 : Pisciculteurs ayant déjà eu recours à la balnéation.....	50
Figure 14 : Nombre de pisciculteurs répondant aux questionnaires sur les pratiques d'enrobage en fonction de l'atelier.....	51
Figure 15 : Molécules les plus utilisées en éclosion .....	51
Figure 16 : Molécules les plus utilisées en grossissement .....	51
Figure 17 : Utilisation d'huile comme agent enrobant, en éclosion et en grossissement.....	53
Figure 18 : Type d'huile utilisé pour l'enrobage d'aliments en éclosion et en grossissement...53	
Figure 19 : Proportion de pisciculteurs utilisant un autre agent enrobant que de l'huile en éclosion et en grossissement.....	54
Figure 20 : Ordre de versement de l'agent enrobant et de l'antibiotique sur l'aliment en éclosion et en grossissement.....	55
Figure 21 : Mode de versement de l'agent enrobant sur l'aliment en éclosion et en grossissement .....	55
Figure 22 : Matériel utilisé pour la réalisation d'aliment enrobé en éclosion .....	56
Figure 23 : Mode de versement de l'antibiotique dans le cadre d'une solution, en éclosion et en grossissement.....	57
Figure 24 : Mode de versement de l'antibiotique dans le cadre d'une poudre, en grossissement .....	57
Figure 25 : Temps de mélange, en éclosion et en grossissement.....	57
Figure 26 : Changement de rotation de la mélangeuse au cours du mélange, en éclosion et en grossissement.....	58
Figure 27 : Moment de la distribution par rapport à la réalisation du mélange, en éclosion et en grossissement.....	58

Figure 28 : Durées de conservation du mélange, en éclosion et en grossissement .....	59
Figure 29 : Température de conservation des aliments en grossissement.....	59
Figure 30 : Conservation de l'aliment à l'abri des rayons ultra-violets (UV) en éclosion et en grossissement.....	59
Figure 31 : Capture d'écran du film du mélange de 0,5 kg d'aliment EC. Les granules passent sous la pale sans être mélangés .....	71
Figure 32 : Mise en évidence du nuage de poudre d'OTC observé en comparant le tambour de la mélangeuse avant et après mise en route de celle-ci.....	72
Figure 33 : Aspect des granules après mélange, selon la quantité d'huile incorporée .....	72
Figure 34 : Dépôt graisseux en fond de tambour après mélange avec 20 ml/kg d'huile .....	73
Figure 35 : Culots obtenus suite à la centrifugation des mélanges de la procédure A (OTC+GROS) .....	74
Figure 36 : Dépôt de granules collés sur les parois observable à partir de 40 ml/kg d'huile ajoutée .....	75
Figure 37 : Aliment vierge et aliment mélangé avec 50ml/kg d'huile.....	75
Figure 38 : Culots obtenus suite à la centrifugation des mélanges de la procédure C (FFN+EC)	76
Figure 39 : Matériel utilisé pour le mélange du florfenicol (coloré en vert) et de l'huile de colza. A gauche le récipient destiné au secouage du mélange après mise en place du bouchon, à droite le saladier et le fouet.....	76
Figure 40 : Répartition de la poudre d'OTC à la surface de l'aliment, mélangeuse à l'arrêt.....	77
Figure 41 : Versement en plusieurs points de l'huile et de l'antibiotique sur l'aliment.....	78
Figure 42 : Grumeaux visibles au fond de la mélangeuse après 5 minutes de mélange.....	78
Figure 43 : Grumeaux récupérables après tamisage des granules mélangés 10 minutes .....	78
Figure 44 : Grumeaux récupérés à l'issue du mélange, après ouverture .....	78
Figure 45 : Plaque de granules formée suite au versement de la solution, après 10 minutes de brassage .....	79
Figure 46 : Dépôt sur les pales de la mélangeuse après pulvérisation .....	79
Figure 47 : Dépôt sur les pales de la mélangeuse après utilisation du pistolet drogueur .....	79
Figure 48 : Type de pistolet drogueur utilisé (Coveto) .....	80
Figure 49 : Film lipidique à la surface de l'eau après immersion d'un même échantillon, immédiatement après sa préparation ou 12 h plus tard .....	81
Figure 50 : Absence de film lipidique à la surface de l'eau après immersion d'un même échantillon, immédiatement après sa préparation ou 12h plus tard .....	81
Figure 51 : Tambour de la mélangeuse après nettoyage à l'aide de graviers préalablement rincés .....	82
Figure 52 : Tambour de la mélangeuse après deux nettoyages à l'aide d'une éponge et de détergent. Le dépôt d'OTC est montré par la flèche bleue .....	82
Figure 53 : Quantité d'oxytétracycline mesurée dans les échantillons issus de la procédure A, selon leur mode de conservation .....	95

Figure 54 : Quantité de florfénicol mesurée dans les échantillons issus de la procédure B, selon leur mode de conservation.....	95
Figure 55 : Quantité de florfénicol mesurée dans les échantillons issus de la procédure C, selon leur mode de conservation.....	96
Figure 56 : Tests statistiques utilisés pour la comparaison de la moyenne ou de la médiane des quantités d'antibiotiques mesurées.....	104
Figure 57 : Tests statistiques utilisés pour la comparaison de variance de quantités d'antibiotiques mesurées.....	104
Figure 58 : Quantité d'oxytétracycline (en mg/kg) mesurée dans les échantillons de la procédure A mélangés 10 minutes et 15 minutes.....	106
Figure 59 : Quantité de florfénicol (en mg/kg) mesurée dans les échantillons de la procédure B, enrobés avec 5 ml/kg d'huile et mélangés 10 minutes et 15 minutes.....	107
Figure 60 : Quantité de florfénicol (en mg/kg) mesurée dans les échantillons de la procédure B, enrobés avec 10 ml/kg d'huile et mélangés 5 minutes, 10 minutes et 15 minutes.....	108
Figure 61 : Quantité de florfénicol (en mg/kg) mesurée dans les échantillons de la procédure B, brassés 10 minutes et enrobés avec 5 ml/kg ou 10 ml/kg d'huile.....	109
Figure 62 : Quantité de florfénicol (en mg/kg) mesurée dans les échantillons de la procédure B, brassés 15 minutes et enrobés avec 5 ml/kg ou 10 ml/kg d'huile.....	109
Figure 63 : Quantité de florfénicol (en mg/kg) mesurée dans les échantillons de la procédure C, enrobés 10 ml/kg, 15 ml/kg ou 22,5 ml/kg d'huile.....	110
Figure 64 : Teneur moyenne en antibiotique par rapport aux pertes estimées, pour les mélanges de la procédure B.....	111
Figure 65 : Teneur moyenne en antibiotique par rapport aux pertes estimées, pour les mélanges de la procédure C.....	111
Figure 66 : Extraits du RCP de la spécialité Aquaflor <sup>NDV</sup> (Agence européenne des médicaments).....	146
Figure 67 : Caractéristiques de l'aliment type éclosionerie utilisé (0,5 mm de diamètre).....	165
Figure 68 : Caractéristiques de l'aliment type grossissement utilisé (NEO 20 ; 5 mm de diamètre).....	166
Figure 69 : Protocole d'extraction et d'analyse des échantillons d'aliments enrobés.....	171
Figure 70 : Diagrammes quantile-quantile ou Q-Q plots des essais de stabilité, partie 1.....	181
Figure 71 : Diagrammes quantile-quantile ou Q-Q plots des essais de stabilité, partie 2.....	182
Figure 72 : Diagrammes quantile-quantile ou Q-Q plots des essais de stabilité, partie 3.....	183

# Liste des tableaux

Tableau I : Variation des besoins alimentaires de la truite arc-en-ciel au cours de son élevage, d'après (Breton 2005 ; Hardy et Barrows 2003 ; Kamalam et al. 2020 ; Lovell 2003).....	27
Tableau II : Principales bactérioses de la truite arc-en-ciel en France, par ordre décroissant de dangerosité.....	29
Tableau III : Revue des méthodes d'enrobage d'aliments pour poissons avec des antibiotiques dans la littérature.....	34
Tableau IV : Biodisponibilité orale de l'oxytétracycline chez la truite arc-en-ciel dans la littérature.....	38
Tableau V : Spécialités antibiotiques disposant d'une autorisation de mise sur le marché pour truites, poissons ou salmonidés en France (d'après ANSES 2024).....	41
Tableau VI : Conversion des réponses brutes pour l'analyse statistique.....	47
Tableau VII : Caractéristiques des aliments utilisés pour l'enrobage et taux de rationnement appliqué.....	52
Tableau VIII : Quantité d'agent enrobant incorporé au mélange, en millilitres par kilogramme d'aliment préparé.....	54
Tableau IX : Quantité d'aliment enrobé préparé habituellement.....	56
Tableau X : Caractéristiques des aliments utilisés, d'après les fiches techniques présentées en annexe 4.....	67
Tableau XI : Modalités de mélange sélectionnées.....	69
Tableau XII : Modalités de mélange testées lors des essais préliminaires.....	69
Tableau XIII : Avantages et inconvénients des différents modes d'incorporation sur l'aliment type éclosion.....	86
Tableau XIV : Avantages et inconvénients des différents modes de nettoyage.....	87
Tableau XV : Proportion de volume d'antibiotique sur le volume total de solution en fonction des cas.....	88
Tableau XVI : Procédures retenues à l'issue des essais préliminaires.....	89
Tableau XVII : Rappel de la nomenclature des procédures de mélange mises en place.....	90
Tableau XVIII : Modalités de mélange retenues pour les essais de stabilité.....	91
Tableau XIX : Méthodes de mélange appliquée pour la réalisation des essais de stabilité.....	92
Tableau XX : Résultats obtenus pour la validation de la méthode LC-MS.....	94
Tableau XXI : Rappel de la nomenclature des procédures de mélange mises en place.....	99
Tableau XXII : Modalités de mélange retenues pour les essais d'homogénéité.....	100
Tableau XXIII : Méthodes de mélange appliquée pour la réalisation des essais d'homogénéité.....	101
Tableau XXIV : Modalités comparées lors des essais d'homogénéité.....	102
Tableau XXV : Teneur en antibiotique mesurée dans les échantillons d'aliment lors des essais finaux, par rapport à la concentration cible.....	105

Tableau XXVI : Pertes d'antibiotiques mesurées et pertes non expliquées, par rapport à la teneur en antibiotique théorique .....	112
Tableau XXVII : Teneur en antibiotique moyenne par réplicat minimale et maximale en fonction des protocoles de mélange .....	115
Tableau XXVIII : Teneur en antibiotique mesurée dans les échantillons d'un mélange de la procédure B (FFN + Aliment GROS).....	116
Tableau XXIX : Écarts de la teneur moyenne mesurée par réplicat par rapport à la valeur cible et à la quantité d'antibiotique incorporée, maximaux et minimaux, pour la procédure A (OTC + aliment GROS) .....	117
Tableau XXX : Coefficient de variation calculé par réplicat en fonction des protocoles de mélange .....	118
Tableau XXXI : Teneur en antibiotique mesurée dans les échantillons de certains mélanges de la procédure A et B.....	119
Tableau XXXII : Teneur en antibiotique mesurée dans les échantillons de deux mélanges de la procédure B.....	120
Tableau XXXIII : Spécialités contenant du florfénicol (ANSES 2024) .....	147
Tableau XXXIV : Spécialités contenant de l'oxytétracycline (ANSES 2024) .....	149
Tableau XXXV : Script du questionnaire transmis aux éleveurs .....	152
Tableau XXXVI : Résultats obtenus lors de la validation de la méthode.....	172
Tableau XXXVII : Résultats obtenus lors des essais de stabilité .....	173
Tableau XXXVIII : Résultats obtenus lors des essais d'homogénéité, pour la procédure A .....	174
Tableau XXXIX : Résultats obtenus lors des essais d'homogénéité, pour la procédure B avec ajout de 5ml/kg d'huile .....	175
Tableau XL : Résultats obtenus lors des essais d'homogénéité, pour la procédure B avec ajout de 10ml/kg d'huile .....	176
Tableau XLI : Résultats obtenus lors des essais d'homogénéité, pour la procédure C .....	177
Tableau XLII : Exemple de points de contrôle mis en place lors des essais de stabilité.....	178
Tableau XLIII : Analyse statistique des essais d'homogénéité .....	180

# Liste des abréviations

<b>AMM</b>	Autorisation de mise sur le marché
<b>ANMV</b>	Agence nationale du médicament vétérinaire
<b>ANOVA</b>	Analyse de variance
<b>ANSES</b>	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>CIPA</b>	Comité interprofessionnel des produits de l'aquaculture
<b>CMC</b>	Carboxyméthylcellulose
<b>CROC</b>	Question à réponse ouverte courte
<b>CV</b>	Coefficient de variation
<b>DGAL</b>	Direction générale de l'alimentation
<b>EC</b>	Écloserie
<b>EPI</b>	Équipement de protection individuel
<b>FAO</b>	Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
<b>FCR</b>	Force de centrifugation relative
<b>FFN</b>	Florfenicol
<b>FIDA</b>	Fond international de développement agricole
<b>GROS</b>	Grossissement
<b>LC</b>	Chromatographie en phase liquide
<b>MS</b>	Spectrométrie de masse
<b>NDV</b>	Nom déposé vétérinaire
<b>NHI</b>	Nécrose hématoïétique infectieuse
<b>NPI</b>	Nécrose pancréatique infectieuse
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>OTC</b>	Oxytétracycline
<b>PAM</b>	Programme alimentaire mondial
<b>PMF</b>	Pectine faiblement méthylée
<b>QCM</b>	Questionnaire à choix multiples
<b>RCP</b>	Résumé des caractéristiques du produit
<b>SHV</b>	Septicémie hémorragique virale
<b>SNGTV</b>	Société nationale des groupements techniques vétérinaires
<b>TAC</b>	Truite arc-en-ciel
<b>TMPS</b>	Triméthoprim et sulfamide
<b>TR</b>	Tour
<b>UNICEF</b>	Fond des nations unies pour l'enfance
<b>UV</b>	Ultra-violet
<b>WPI</b>	Isolat de protéines sériques

# Introduction

En 2022, plus de 40 % de la population mondiale n'a pas les moyens de s'offrir un régime alimentaire sain (FAO, FIDA, OMS, PAM et UNICEF<sup>1</sup> 2024). Or, dans cette nécessité d'assurer la sécurité alimentaire de la population, l'importance des produits halieutiques est reconnue. En effet, le poisson, par exemple, présente des avantages nutritifs importants notamment en termes d'apport de protéines, d'acides gras essentiels, de micronutriments et de minéraux (Park *et al.* 2012). Les produits alimentaires aquatiques sont également mis en avant dans le cadre de la lutte contre le changement climatique. En effet, ils présentent une empreinte écologique et des émissions de gaz à effet de serre plus faibles en comparaison avec les productions animales terrestres (FAO 2023).

C'est la réunion de ces facteurs qui, avec la limitation des ressources halieutiques issues de la pêche, permet l'expansion rapide et massive de l'aquaculture (FAO 2022a). Cette expansion, avec l'intensification de la production et la libre circulation des poissons qui l'accompagnent, représente un terreau fertile pour le développement de maladies (Renault et Guichard 2007). Dans le cadre de la lutte contre ces affections des poissons, plusieurs stratégies sont envisageables, préventives ou curatives. Ainsi, la vaccination contre de nombreuses maladies bactériennes et virales est couramment pratiquée à travers le monde (Alday-Sanz *et al.* 2012). Les antibiotiques sont également largement utilisés. Or, cet usage d'antibiotiques peut présenter des risques de toxicité, d'abord pour les animaux traités, mais également pour l'environnement et les consommateurs. Il peut également engendrer le développement d'antibiorésistance (Limbu *et al.* 2021).

L'antibiorésistance est qualifiée par l'organisation mondiale de la santé comme « l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement » (OMS 2020). L'aquaculture est également concernée par cette problématique. En effet plusieurs études mettent en lumière la fréquence accrue de bactéries résistantes aux seins des fermes aquacoles (Schmidt *et al.* 2000 ; Seyfried *et al.* 2010). Des bactéries aquatiques, comme certaines du genre *Vibrio*, représentent directement un risque pour la santé humaine. D'autres, comme *Aeromonas salmonicida*, peuvent transmettre horizontalement des gènes de résistances à d'autres bactéries ayant un fort pouvoir pathogène sur l'homme comme *Escherichia coli* (Inglis *et al.* 1993).

Un usage inapproprié des antibiotiques, notamment en termes de schéma posologique et de voie d'administration, est un facteur favorisant l'apparition de résistances bactériennes (Mulcahy 2011). Or, en aquaculture, les schémas posologiques ont majoritairement été définis il y a longtemps, souvent de manière empirique, sans tenir compte de la sélection de bactéries résistantes. Leur efficacité n'est pas toujours attestée par des essais cliniques (Bianchini et Baldisserotto 2021). La filière trutticole française n'échappe pas à ce constat avec très peu de spécialités disposant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour l'espèce truite (Quentel *et al.* 2007).

---

<sup>1</sup> Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) ; Fond international de développement agricole (FIDA) ; Organisation mondiale de la santé (OMS) ; Programme alimentaire mondial (PAM) ; Fond des nations unies pour l'enfance (UNICEF)

L'aquaculture se heurte de plus à des difficultés quant à l'administration des antibiotiques aux poissons. Ainsi, si, pour des raisons de praticité, la majorité des antibiotiques sont distribués par voie orale, l'accès aux aliments médicamenteux est limité. En effet, la faible disponibilité de prémélanges médicamenteux, associée aux faibles biomasses à traiter et à des délais de fabrication des aliments parfois importants, rendent leur utilisation impossible dans certains cas (Park *et al.* 2012). Les éleveurs peuvent alors être contraints d'enrober eux-mêmes les aliments avec des antibiotiques, directement à la ferme, afin de traiter les poissons (Daniel 2009). Or, il n'existe pas à ce jour de consensus permettant de garantir la qualité de ce type de mélange.

L'établissement de guides de bonnes pratiques d'utilisation des antibiotiques en filière trutticole permettrait de favoriser un usage raisonné des antibiotiques et de répondre à des enjeux de santé publique, de santé animale mais également à des enjeux sociétaux. En effet, l'usage des antibiotiques est l'une des principales controverses concernant l'acceptabilité de l'élevage en France (Delanoue et Roguet 2015).

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet « enr-EAU-bage », porté par l'INRAE avec le soutien de la SNGTV, et financé par le plan national de lutte contre l'antibiorésistance Écoantibio 2. Son objectif final est de produire des guides de bonnes pratiques pour la fabrication d'aliments enrobés avec des antibiotiques en fermes, en filière trutticole française.

La première partie de cette thèse s'applique à décrire les spécificités de l'élevage de la truite arc-en-ciel en France et les modalités d'utilisation des antibiotiques au sein de cette filière, afin de mieux comprendre les particularités de cette production, et les besoins en matière de fabrication d'aliments médicamenteux. La seconde partie présente les différentes études qui ont été conduites dans le cadre du projet « enr-EAU-bage ».

# **I. Contexte scientifique et réglementaire**

## A. Contexte de la filière aquacole et trutticole

### 1. Aquaculture

#### a) Mondiale

La production aquacole est en croissance constante à l'échelon mondial, avec une augmentation de 609 % entre 1990 et 2020 (FAO 2022a). En 2022, 130,9 millions de tonnes ont été produites, dont 94,4 tonnes d'animaux aquatiques. Cela représente 59 % de la production halieutique mondiale, la production aquacole dépassant aujourd'hui la production de la pêche en termes de tonnes produites (FAO 2024a). L'expansion de l'aquaculture mondiale devrait se poursuivre avec une hausse de la production d'animaux estimée à 10 % d'ici 2032 (FAO 2024b).

L'aquaculture se développe dans un contexte où les ressources de la pêche ne suffisent plus à satisfaire la demande croissante. En effet la consommation de produits alimentaires d'origine aquatique augmente depuis les années 60 à un rythme presque deux fois supérieur au taux d'accroissement de la population mondiale. La consommation annuelle par habitant est en effet passée de moins de 10 kg à plus de 20 kg au cours de ces 60 dernières années. Par ailleurs, la durabilité des ressources halieutiques naturelles est un sujet de préoccupation avec la baisse de la part des stocks exploités à un niveau biologiquement durable (FAO 2024b).

La production aquacole mondiale est largement dominée par l'Asie qui, en 2022, produit 91,6 % de la production totale, suivie par l'Amérique latine et les Caraïbes. L'Europe arrive en troisième position avec 2,7 % de la production (FAO 2024b).

Dans ce cadre, la pisciculture représente 66 % du volume produit par l'aquaculture, avec la carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idella*) l'espèce la plus élevée en eau douce, et le saumon atlantique (*Salmo salar*) l'espèce la plus élevée en eau salée (FAO 2022b).

#### b) Française

La France se place en 2022 comme le deuxième producteur de l'Union européenne de produits aquacoles, derrière l'Espagne et devant l'Italie avec 183 mille tonnes produites (Eurostat 2024).

En France la conchyliculture (moules/huitres) et l'élevage de crustacés sont largement prédominants, devant la pisciculture et la culture d'algues et cyanobactéries (Agreste 2022).

### 2. Trutticulture

#### a) Mondiale

Les salmonidés représentent le 4<sup>e</sup> groupe d'espèce le plus produit mondialement, derrière les cyprinidés (carpe herbivore par exemple), les poissons-chats (barbue de rivière par exemple) et les cichlidés (tilapia du Nil par exemple) (FAO 2024a).

Au sein des salmonidés, le saumon atlantique (*Salmo salar*) est de loin l'espèce la plus représentée. La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est en première place parmi les espèces de salmonidés d'eau douce les plus élevés mondialement (FAO 2012).

## b) Française

La France se place en 2022 comme le premier producteur de truite arc-en-ciel (TAC) de l'Union européenne, devant l'Italie et le Danemark (Eurostat 2024).

La salmoniculture date en France de la fin du 19<sup>e</sup> siècle, quand les premières truites furent importées d'Amérique du Nord (Breton 2005). Elle domine aujourd'hui la pisciculture française, l'élevage de truite et autres salmonidés représentant 79 % des ventes en pisciculture (Agreste 2022).

La truite arc en ciel, *Oncorhynchus mykiss*, est aujourd'hui l'espèce de poisson la plus élevée dans le pays et représente 97 % de la production de salmonidés d'eau douce. Elle est suivie par la truite fario (*Salmo trutta*) et d'autres salmonidés comme l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) ou l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*). Son élevage concerne près de 300 piscicultures et les régions les plus fortement productrices sont la Nouvelle-Aquitaine, les Hauts-de-France et la zone représentée par la Bretagne et la Normandie (Agreste 2022).

Les truites « très grandes », soit de plus de deux kilos, représentent la majorité du tonnage destiné à la consommation humaine. Les truites portions de 500 grammes sont plutôt produites pour l'export et le repeuplement (Agreste 2022). De plus, le marché de la truite fumée, exploitant également des truites « très grandes », est en essor en France (Plan national "aquacultures d'avenir" 2022).

## B. La truite arc-en-ciel

### 1. Particularités physiologiques et mode de vie

Les poissons téléostéens vivent dans l'eau et ont un organisme adapté à ce mode de vie, expliquant des différences notables de physiologie par rapport à nos mammifères domestiques.

#### a) Ectothermie

Les téléostéens sont ectothermes, leur organisme ne produisant que peu ou pas de chaleur. Leur température corporelle varie par conséquent en fonction de leur environnement : ils sont poïkilothermes (Carter 2005 ; Breton 2005).

L'activité des poissons (prise de nourriture notamment), leur croissance et leur métabolisme varie avec la température corporelle. Ainsi, le métabolisme augmenterait de 50 % par tranche de 5 °C, dans un intervalle de confort donné (Brown 1993). La température de confort varie selon le stade physiologique des poissons, ainsi pour la truite arc-en-ciel la température idéale lors de l'éclosion se situe entre 11 °C et 12 °C, alors que la température d'élevage idéale des adultes se situe entre 14 °C et 18 °C (Breton 2005 ; Carter 2005).

#### b) Milieu de vie

La truite *Oncorhynchus mykiss* supporte aussi bien les eaux douces que saumâtres ou salées. Ainsi, si toutes fraient en eau douce, il est démontré qu'au sein de certaines populations dites anadromes les juvéniles migrent vers l'eau salée pour y grandir, quand certaines populations dites sédentaires passent l'intégralité de leur cycle de vie en eau douce. Les populations

anadromes de *Oncorhynchus mykiss* sont appelées « tête d'acier » et les populations sédentaires « arc-en-ciel » (Kendall *et al.* 2015 ; Quinn et Myers 2004).

## 2. Zootechnie de la truite arc-en-ciel

### a) Élevage

L'élevage de truite arc-en-ciel en France a essentiellement lieu en eau douce. La phase de grossissement en eau de mer est réalisable mais reste marginale en aquaculture (Zarza 2012). L'approvisionnement en eau se fait très majoritairement par l'eau de rivière (Breton 2005).

Les truites sont principalement élevées en bassins circulaires ou en raceways. Les raceways sont des bassins rectangulaires allongés, souvent placés en série (Agreste 2022). Un exemple est proposé en figure 1.



Figure 1 : Illustration des bassins type "raceways" dans une pisciculture française (Comité Régional du Tourisme de Bourgogne-Franche-Comté)

L'élevage de la truite comporte 4 phases distinctes (d'après Breton 2005 ; Comité interprofessionnel des produits de l'aquaculture (CIPA)) :

#### (1) Fécondation artificielle

La reproduction de la truite est maîtrisée. Cela permet notamment de produire des lots composés uniquement d'animaux femelles, ou d'animaux triploïdes (donc stériles). Les lots tous femelles sont issus de la fécondation d'ovules par des spermatozoïdes issus de femelles traitées à la testostérone. Ces femelles produisent des spermatozoïdes porteurs d'un chromosome X qui fécondent des ovules porteurs d'un chromosome X pour donner des lots d'alevins exclusivement femelles. Les lots triploïdes sont issus d'embryons traités au moment de l'expulsion du globule polaire, empêchant cette étape. Les alevins obtenus portent trois exemplaires de chaque chromosome au lieu de deux et sont donc triploïdes.

Ces manipulations permettent de limiter l'effet de la maturation sexuelle sur la croissance des poissons. En effet, cette maturation intervient plus tardivement chez les femelles et est

sévèrement réduite chez les animaux triploïdes, ce qui permet de meilleures performances de croissances pour les animaux de ces catégories (Sheehan *et al.* 1999 ; Johnstone *et al.* 1978).

## (2) Incubation

L'embryonnement, soit l'apparition des yeux de l'alevin, a lieu après la fécondation. Cette phase est suivie de l'éclosion puis de la résorption du sac vitellin, qui va durer plusieurs semaines.

## (3) Alevinage et pré-grossissement

Cette phase prend place après la résorption du sac vitellin, lorsque les animaux commencent à être alimentés. Elle dure environ neuf mois durant lesquels les truites passent progressivement du stade « alevin » (5 à 10 grammes) au stade de « truitelle » (50 grammes) puis au stade « adulte » (170 grammes).

## (4) Grossissement

Cette phase va de l'alevinage à la commercialisation, dont la date varie en fonction de l'objectif de poids de vente : 200 g à 250 g pour 10 à 12 mois d'élevage, un kilo pour 18 mois d'élevage ou deux kilos pour plus de deux ans d'élevage, soit la majorité des truites commercialisées en France (Agreste 2022). Les truites peuvent alors être placées dans des bassins extérieurs.

### *b) Densité des animaux*

Il n'existe pas de normes de densité de poissons par bassins, quel que soit le stade d'élevage. Cela explique les fortes variations de densité de peuplement selon les exploitations et les régions (Breton 2005). À titre d'exemple, la seule norme existante pour les truites concerne les exploitations piscicoles en agriculture biologique, où la densité de peuplement ne peut dépasser 25 kg de poids vif de poisson par mètre cube (règlement (CE) 710/2009 de la Commission du 5 août 2009 [...] qui concerne la production biologique d'animaux d'aquaculture et d'algues marines).

Le choix de la densité de poissons par bassin en filière trutticole est avant tout fait en fonction de l'eau, notamment sa quantité disponible et son oxygénation. En effet la qualité de l'eau est un paramètre particulièrement déterminant dans le cadre de l'élevage de truite arc-en-ciel et des autres salmonidés (Breton 2005, CIPA).

### *c) Alimentation*

Les granulés extrudés couvrent aujourd'hui la majorité du marché de l'alimentation des truites. Le processus d'extrusion est une technique de formation de granulés à partir d'un mélange humide (plus de 20 % d'eau) et cuit (la température finale pouvant atteindre 150 °C). La cuisson du mélange permet, par expansion de l'amidon, une diminution de la densité des granulés (Rokey *et al.* 2010 ; Hardy et Barrows 2003).

Cette diminution de densité présente deux avantages dans le cadre de l'alimentation des poissons. D'abord les granulés sont poreux, et peuvent être enrobés avec de l'huile afin d'en augmenter la teneur en matières grasses (Rokey *et al.* 2010). Ensuite, elle permet de produire, selon les méthodes de fabrication, des aliments flottants ou semi-flottants, s'adaptant ainsi aux besoins des poissons concernés (Rolfe *et al.* 2001 ; Hardy et Barrows 2003).

Cette technologie permet alors de produire des aliments avec une très forte teneur en lipides et des glucides plus digestibles, ainsi que des granulés plus stables dans l'eau (Hardy et Barrows 2003 ; Breton 2005 ; Hilton *et al.* 1981).

La taille du granulé doit être adaptée à la taille de la bouche du poisson. Ainsi les alevins se nourrissent de miettes de granulés ou de micro-granulés selon la technologie de l'usine d'aliment, et les adultes vont préférentiellement manger des granulés de plusieurs millimètres, qui occasionnent moins de pertes (Breton 2005).

Le besoin alimentaire des truites en termes de quantité de nourriture distribuée par jour est exprimé en pourcentage du poids vif du lot et peut être divisé en autant de repas que nécessaire. Ce pourcentage est appelé taux de rationnement. Il varie au cours de la vie de l'animal et de la température de l'eau, avec le nombre de repas par jours et avec la composition de l'aliment. L'évolution de ces besoins en fonction du stade physiologique de la truite est résumée dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I : Variation des besoins alimentaires de la truite arc-en-ciel au cours de son élevage, d'après (Breton 2005 ; Hardy et Barrows 2003 ; Kamalam *et al.* 2020 ; Lovell 2003)

	Alevins	→	Truitelles	→	Adultes
Teneur en lipides	10-19 %				25 %
Teneur en glucides	3 %				10 %
Taille des granulés	0,5 mm				9 mm
Teneur en protides	42-50 %				41 %
Taux de rationnement	6 %				0,5 %
Nombre de repas par jours	3 à 8				1 à 2

## C. Pathologie de la truite arc-en-ciel

La forte croissance de la production aquacole s'est accompagnée d'un risque accru de maladies infectieuses. Tout d'abord, la libre circulation des animaux favorise la dissémination des agents pathogènes. De même, l'absence de traitement spécifique de l'eau en sortie d'élevage peut favoriser les contaminations croisées d'autres exploitation d'un même bassin versant en système d'élevage ouvert, qui reste majoritaire en France (Labbé *et al.* 2014). Ceci pose problème face à des agents infectieux devenus plus virulents, ou moins sensibles aux traitements allopathiques (comme des bactéries antibiorésistantes). Ainsi, l'absence de réelles mesures de bioconfinement ou de bioexclusion au sein de ces structures ouvertes complexifie la lutte contre les grandes épizooties. Par ailleurs, les conditions d'élevage, et notamment la densité des animaux, peuvent également être à l'origine de la déclaration de maladies (Breton 2005). Quant

au changement climatique, il s'accompagne d'une élévation de la température de l'eau, à l'origine de la possible émergence de nouvelles affections (Renault et Guichard 2007), comme observé en Bretagne en 2023 avec la lactococose (Groupement de défense sanitaire Bretagne 2024).

Les maladies des poissons incluent les maladies non infectieuses, qu'il s'agisse de malformations, de maladies dues au milieu et notamment à la qualité de l'eau, ou encore de maladies nutritionnelles. Elles comportent également les maladies infectieuses, qu'elles soient mycosiques, parasitaires, virales ou bactériennes (Breton 2005). Cette seconde catégorie est développée au cours de la partie suivante.

## 1. Maladies infectieuses

### a) Parasitoses

Les parasitoses chez la truite arc-en-ciel sont dues à des parasites internes ou externes. Les protozooses sont des dominantes pathologiques chez les poissons en général, et la truite arc-en-ciel ne fait pas exception. Elle est ainsi sensible par exemple à l'ichtyophthiriose ou maladie des points blancs. D'autres protozoaires, du genre myxosporidies, sont à l'origine de plusieurs maladies dont le tournis et la néphrite interstitielle hyperplasique (Breton 2005 ; Roberts et Shepherd 1997). Les truites arc-en-ciel peuvent également être parasitées par des vers ou des crustacés qui se fixent extérieurement sur le poisson. Le pou du saumon par exemple se rencontre en milieu marin et peut toucher les salmonidés d'élevage effectuant leur phase de grossissement en eau salée (Breton 2005 ; Roberts et Shepherd 1997).

### b) Mycoses

Les mycoses chez la truite arc-en-ciel sont essentiellement des infections secondaires causées par des pathogènes opportunistes se développant sur des lésions cutanées de sujets affaiblis, victimes de stress ou de nombreuses manipulations (Breton 2005).

### c) Viroses

Les maladies virales constituent une dominante pathologique en élevage aquacole, notamment chez les alevins (Bernardet et Michel 2018 ; Noga 2010). On trouve parmi elles la septicémie hémorragique virale (SHV), la nécrose pancréatique infectieuse (NPI), la nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI) ou encore l'anémie infectieuse du saumon (AIS) (Roberts et Shepherd 1997; Breton 2005).

### d) Bactérioses

Les maladies bactériennes représentent un problème considérable pour la santé des poissons. Les bactérioses sont susceptibles de toucher des sujets de tous âges, et notamment ceux à forte valeur économique (Bernardet et Michel 2018).

Les bactéries pathogènes chez la truite arc-en-ciel sont en majorité des germes à Gram négatif (Sutili et Gressler 2021 ; Noga 2010). Cependant, les germes à Gram positif, longtemps considérés comme d'importance secondaire, font partie des pathogènes émergents en piscicultures, probablement suite à la modification des pratiques d'élevage (Bernardet et Michel 2018).

Le tableau suivant répertorie les bactérioses les plus courantes en élevage de truite arc-en-ciel. Elles sont classées par ordre décroissant de dangerosité en France, selon un niveau établi en 2015 par l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). Ce classement est établi en fonction de leur impact économique, de leur probabilité d'apparition ou de leur caractère zoonotique, soit la transmissibilité naturelle de l'agent causal d'un animal vertébré à l'Homme, ou inversement.

Tableau II : Principales bactérioses de la truite arc-en-ciel en France, par ordre décroissant de dangerosité (d'après ANSES 2015 ; Bernardet et Michel 2018 ; Lillehaug et al. 2003 ; Roberts et Shepherd 1997 ; Breton 2005 ; Oh et al. 2019 ; Weinstein et al. 1997 ; Kim et al. 2013)

Maladie	Agent pathogène	Coloration de Gram	Conditions d'apparition	Commentaire
Flavobactériose d'eau froide	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Négative	Alevins et truitelles de moins de 50 grammes	Taux de mortalité élevé
Streptococcies	<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>dysgalactiae</i> , <i>iniaie</i> , <i>parauberis</i>	Positive	Tous âges notamment en eaux chaudes	Taux de mortalité élevé pour <i>S. iniae</i> de type II Potentiel pouvoir zoonotique
Furonculose	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Négative	Truites lourdes notamment l'été	Taux de mortalité élevé
Rickettsiose (maladie de la fraise)	<i>Rickettsiaceae</i> caractérisée mais non encore nommée	Négative	Truites de plus de 500 grammes en eau froide	Dépréciation commerciale
Lactococcose	<i>Lactococcus garvieae</i>	Positive	Truites de plus de 80 grammes notamment l'été	Taux de mortalité élevé Potentiel pouvoir zoonotique
Yersiniose (maladie de la bouche rouge)	<i>Yersinia ruckeri</i>	Négative	Truites en grossissement	Vaccination efficace pour le contrôle de la maladie
Rénibactériose	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Positive	Tous âges	Dépréciation commerciale Mortalité lors du passage en mer
Columnariose	<i>Flavobacterium columnare</i>	Négative	Alevins et truitelles en eau chaude	Jamais documentée en pisciculture Française
Listonellose (vibriose)	<i>Listonella (Vibrio) anguillarum</i>	Négative	Truite en phase d'élevage en eau salée	Rare en France

L'ANSES classe la flavobactériose comme quatrième maladie infectieuse majeure en pisciculture française, toutes espèces confondues. Elle est la première maladie de la truite arc-en-ciel à apparaître dans ce classement, devant la streptococcose et les maladies virales telles que la SHV ou la NHI. Cela illustre la place majeure qu'occupent les infections bactériennes au sein des maladies des truites arc-en-ciel en France, et la nécessité de les prendre correctement en charge (ANSES, 2015).

## 2. Moyens de lutte contre les bactérioses des truites arc-en-ciel

### a) Prévention

#### (1) Prophylaxie sanitaire

La prévention des maladies en aquaculture passe d'abord par une bonne gestion de l'élevage, afin de limiter le stress et d'obtenir des animaux en bonne santé, plus à même de se défendre contre les agents pathogènes (Koonse 2012). Pour cela, le maintien d'une bonne qualité d'eau, notamment en termes de débit et d'oxygénation, est primordial. Afin de limiter le stress, les manipulations des poissons doivent être réduites au minimum (Breton 2005 ; Roberts et Shepherd 1997).

L'un des objectifs de la prophylaxie sanitaire est de limiter le risque d'entrée des agents pathogènes dans l'élevage (on parle de bioexclusion). Pour ce faire, les animaux achetés doivent être acheminés par un transporteur respectant des mesures d'hygiène strictes et doivent être placés en quarantaine (Breton 2005 ; Zarza 2012). Il est également recommandé de désinfecter le matériel, les œufs, ainsi que l'eau approvisionnant la pisciculture (Breton 2005 ; Roberts et Shepherd 1997).

L'autre volet de la prophylaxie est la biocompartimentation, à savoir la limitation du risque de diffusion des agents pathogènes au sein même de l'élevage. Les mesures de limitations conseillées sont le nettoyage et la désinfection du matériel ainsi que des bassins après passage d'un lot, et une gestion rigoureuse des poissons morts avec un tri régulier et envoi à l'équarrissage (Breton 2005).

#### (2) Prophylaxie médicale : la vaccination

La vaccination permet, avec les mesures de prophylaxie sanitaire, de limiter l'apparition et l'impact des épisodes infectieux chez les poissons. Elle présente un intérêt renforcé dans les zones touchées par des maladies endémiques, où les mesures sanitaires ne peuvent permettre d'exclure l'apparition des agents pathogènes (Quentel *et al.* 2007). Les vaccins ont montré leur efficacité chez les poissons et permis la réduction de l'utilisation des antibiotiques ainsi que la maîtrise de certaines maladies comme la yersiniose (Bernardet et Michel 2018 ; Heuer *et al.* 2009).

À ce jour il existe en France pour la truite des vaccins avec autorisation de mise sur le marché (AMM) contre 3 maladies : la yersiniose, la vibriose et la lactococcose (ANSES 2024). Le recours aux autovaccins est possible mais contraint en pratique par la réglementation (Quentel *et al.* 2007). Les poissons téléostéens possédant une réponse mémoire faible vis-à-vis des vaccins, la protection conférée par ceux-ci est de plus courte durée que chez les mammifères, de l'ordre de trois à douze mois en moyenne (Quentel *et al.* 2007 ; Noga 2010).

## *b) Traitements*

### (1) Antibiotiques

Les traitements les plus largement utilisés dans la lutte contre les maladies bactériennes en aquaculture sont les antibiotiques, dont les utilisations sont développées en partie D ci-après.

### (2) Autres traitements

Des recherches sont en cours afin de trouver des produits de substitution aux antibiotiques, pour réduire la sélection de gènes de résistance. La principale voie explorée est l'utilisation de probiotiques. Certaines études ont ainsi été menées sur la furunculose chez les truites arc-en-ciel (Nicolas *et al.* 2007). L'utilisation de bactériophages ou d'inhibiteurs de la croissance bactérienne tels que les polyhydroxyalcoates est également étudiée, respectivement contre la flavobactériose d'eau froide et la vibriose (Defoirdt *et al.* 2011). À ce jour toutefois, ces alternatives ne permettent pas de renoncer à l'utilisation des antibiotiques.

## D. Utilisation des antibiotiques en filière trutticole

### 1. Modes d'administration

#### *a) Balnéation ou trempage*

La balnéation correspond à l'administration du principe actif par immersion du poisson dans une eau contenant l'antibiotique dilué (Rodgers et Furones 2009). La différence entre balnéation ou trempage tient dans le temps que le poisson passe dans la solution (Sekkin et Kum 2011). Cette technique simple d'utilisation et peu stressante pour le poisson est particulièrement adaptée aux animaux avec une biomasse faible comme les alevins, ou quand la distribution orale n'est pas possible comme pour les larves. Elle est très intéressante notamment dans le cadre d'infections superficielles, et permet l'élimination de bactéries en suspension dans l'eau (Park *et al.* 2012 ; Sutili et Gressler 2021 ; Sekkin et Kum 2011).

L'absorption de l'antibiotique est réalisée via les épithéliums du poisson, notamment la peau, les branchies et les muqueuses. L'absorption est très variable entre les animaux. De fait, il est difficile de contrôler la dose réellement reçue par l'animal (Sekkin et Kum 2011 ; Rodgers et Furones 2009).

Cette technique demande des quantités importantes en antibiotiques et présente un impact environnemental plus élevé que l'administration par voie orale notamment (Inglis 2000).

#### *b) Injection*

L'injection d'antibiotiques est la seule voie d'administration qui garantisse une bonne exposition de tous les animaux traités. (Douet *et al.* 2009). Elle est généralement réalisée dans la cavité péritonéale ou dans la masse musculaire, sur un poisson préalablement anesthésié (Rodgers et Furones 2009).

Cette technique est source cependant d'une charge de travail importante pour le manipulateur et de stress pour le poisson de manière générale. Elle est ainsi réservée aux poissons de grande

valeur, notamment les animaux reproducteurs (Sekkin et Kum 2011 ; Rodgers et Furones 2009 ; Sutili et Gressler 2021).

### c) Voie orale

La voie orale est la voie d'administration la plus couramment utilisée pour la majorité des espèces de poissons. L'antibiotique est le plus souvent mélangé avec l'aliment, et distribué directement dans le bassin, bien qu'il soit possible d'administrer des antibiotiques par voie orale par sondage oro-gastrique sur poissons anesthésiés. Cette dernière technique n'est utilisée que dans le cadre d'expérimentation ou pour des traitements individuels de poissons de grande valeur tant elle est source de charge de travail pour le manipulateur et de stress pour le poisson (Park *et al.* 2012).

La distribution de l'antibiotique mélangé à l'alimentation directement dans le bassin est, au contraire, tout à fait adaptée pour les structures d'élevage telles que les trutticultures françaises. En effet la charge de travail est modérée car il n'y a pas de manutention de poissons, ce qui diminue également le stress pour ces derniers. Le recours à la voie orale est aussi économiquement avantageux en ce qu'elle requiert moins d'antibiotique que la balnéation (Reimschuessel *et al.* 2013 ; Inglis 2000).

Ce mode de distribution présente en revanche plusieurs limites discutées ci-après.

#### (1) Qualité du mélange médicamenteux

Les préparations d'antibiotique associé à l'aliment peuvent être réalisées à partir d'un prémélange médicamenteux, destiné à être intégré à l'aliment sur un site de production agréé afin de former un aliment médicamenteux (règlement (UE) 2019/6 relatif aux médicaments vétérinaires), ou en enrobant l'aliment avec l'antibiotique directement à la ferme (Park *et al.* 2012).

Un aliment médicamenteux est fabriqué par des usines d'aliment agréées qui doivent démontrer régulièrement leur capacité à produire un aliment homogène, à des taux d'incorporation vérifiés, avec une bonne stabilité dans le temps (article R5142-1 du code de la santé publique). De fait, cela garantit une grande qualité de l'aliment médicamenteux. Il y a deux procédés utilisables lors de la réalisation d'un tel aliment en usine. Premièrement, l'antibiotique peut être incorporé au mélange avant la formation des granulés, ce qui permet d'obtenir la meilleure homogénéité possible (Ranjan 2017). Ce procédé ne peut cependant pas être utilisé pour les antibiotiques thermolabiles, qui ne supporteraient pas les températures d'extrusion (Treves-Brown 2000). Secondement, l'antibiotique peut être enrobé à la surface de l'aliment après extrusion, notamment lors de l'étape d'ajout d'huile (Ranjan 2017). Quel que soit leur mode de préparation, les quantités minimales exigées pour la production d'aliments médicamenteux par les usines d'aliment sont souvent importantes, ce qui en interdit l'accès lors de traitement de lots de faible biomasse. Enfin, il existe peu de spécialités de prémélange médicamenteux disponibles sur le marché, et les délais de fabrication peuvent s'avérer incompatibles avec la prise en charge d'une maladie aiguë (Park *et al.* 2012 ; Zanuzzo *et al.* 2022 ; Noga 2010).

Ces considérations conduisent à ce que l'enrobage d'aliment, y compris directement en ferme, soit la pratique la plus courante en aquaculture (Treves-Brown 2000). Or l'un des risques majeurs de cette technique est le manque d'homogénéité du mélange, qui est rarement contrôlée

dans le cadre d'une fabrication à la ferme (Park *et al.* 2012 ; Daniel 2009). La concentration finale en principe actif dans le mélange devrait également être vérifiée, pour garantir d'un bon usage des antibiotiques. Bien réalisé, l'enrobage peut se révéler être une méthode performante en termes de concentration de médicament obtenue dans l'aliment (Zarza *et al.*, 2012).

L'enrobage de l'aliment est décrit par Treves-Brown en 2000 comme le mélange de trois éléments : un antibiotique sous forme de poudre, un agent enrobant et l'aliment, dans un ordre différent selon les caractéristiques des produits utilisés. La littérature se cantonne ainsi exclusivement à l'utilisation d'antibiotiques sous forme de poudre pour l'enrobage, quand certaines molécules ne sont parfois disponibles que sous formes de solution (voir partie I.D.3 : spécialités disponibles).

Plusieurs agents enrobants sont cités par la littérature, tels que la gélatine, les huiles végétales ou de poisson, la carboxyméthylcellulose (CMC) ou encore la pectine faiblement méthylée (PFM) (Rodgers et Furones 2009).

Peu de données existent sur les méthodes de mélange en elles-mêmes et il n'existe pas de bonnes pratiques de fabrication en ferme. Le tableau III ci-après est une compilation de certaines méthodes d'enrobages décrites dans la littérature, avec la mesure de la teneur en antibiotique de l'aliment final.

On observe, pour chaque étude, une perte d'antibiotique par rapport à la dose incorporée initialement. Bien que cette perte soit variable selon les conditions, elle est rarement négligeable. La concentration en antibiotique obtenue dans l'aliment à la suite du mélange est donc un élément crucial de l'évaluation de la qualité d'un aliment enrobé. Bien que ce phénomène soit peu documenté, il est possible de formuler des hypothèses quant à cette perte d'antibiotique. En effet, une partie de la poudre, plus ou moins mélangée avec l'agent enrobant, pourrait rester collée sur les parois du récipient utilisé pour le mélange.

Finalement, on observe une grande diversité des méthodes d'enrobage de granulés dans la littérature. La variabilité des résultats obtenus interroge sur les recommandations à faire en élevage, notamment vu la diversité des aliments disponibles (granulométrie, teneur en matière grasse) et des formes galéniques disponibles (poudre, solution).

Le prémélange médicamenteux Aquaflor® 5 % premix, qui ne dispose plus d'AMM en France, dispose d'une AMM dans certains pays d'Europe pour une utilisation en enrobage sur l'aliment. Toutefois, le résumé des caractéristiques du produit présenté en annexe 1 précise simplement de mélanger le produit avec cinq millilitres d'huile végétale ou animale par kilogramme d'aliment avec les granulés. Aucune précision n'est faite sur la durée de mélange ou de matériel à utiliser pour garantir une bonne homogénéité.

Tableau III : Revue des méthodes d'enrobage d'aliments pour poissons avec des antibiotiques dans la littérature

Étude concernée	Zanuzzo <i>et al.</i> 2022	Xu et Rogers 1994	Barreto <i>et al.</i> 2018	Jarau <i>et al.</i> 2019
Antibiotique et posologie	Tétracycline 100 mg/kg	Oxytétracycline 75 mg/kg	Florfénicol 10mg/kg	Florfénicol 10mg/kg
	Florfénicol 10mg/kg			Erythromycine 75 mg/kg
Nom déposé	Tétracycline 250	Non renseigné	Aquaflor® 5 % Premix	Aquaflor® 5 % Premix
	Aquaflor® 5 % Premix			Gallymicin®-50
Forme galénique	Poudre	Poudre	Poudre	Poudre
Agent enrobant et quantité	Huile de poisson (40 à 50 ml/kg d'aliment)	Solution de gélatine 4 % (50 ml/kg d'aliment) Huile de poisson (30 ml/kg d'aliment)	Huile de maïs (20 ml/kg d'aliment) CMC (25 ml/kg) PFM (100 ml/kg)	Huile végétale (50 ml/kg d'aliment)
Taille de granulés	Non renseignée	Non renseignée	Plusieurs tailles : de 1,4 à 4 mm de diamètre	3 mm de diamètre
Procédé de mélange	⇒ Chauffage de l'huile à 38 °C puis mélange avec l'antibiotique ⇒ Versement du mélange sur l'aliment dans un seau fermé ⇒ Secouage du seau	⇒ Dilution de l'antibiotique dans la solution de gélatine ⇒ Pulvérisation du mélange sur les granulés ⇒ Séchage ⇒ Pulvérisation de l'huile sur les granulés	⇒ Mélange du florfénicol et de l'agent enrobant non détaillé ⇒ Mélange de la solution obtenue avec l'aliment dans une turbine d'enrobage	Non renseigné
Durée de mélange	10 minutes	Non renseignée	5 minutes	Non renseignée
Résultat obtenu (par rapport à la dose incorporée)	Perte de 18 % à 20 % pour les deux antibiotiques	Pertes de 8 % à 12 % selon l'aliment utilisé	Perte de 7 % à 27 % selon l'agent enrobant	Perte de 4,8 % pour le florfénicol et de 10,2 % pour l'érythromycine

<sup>1</sup> Aquaflor® Premix 50 % et Gallymicin®-50 sont des prémélanges médicamenteux sous forme de poudre destinés à l'enrobage sur des aliments (Résumé des caractéristiques du produit (RCP) Aquaflor® présenté en annexe 1, (Jarau *et al.* 2019))

<sup>2</sup> Une turbine d'enrobage est une mélangeuse rotative dotée d'un système de pulvérisation et de chauffage, utilisée notamment pour l'enrobage de comprimés dans l'industrie pharmaceutique (Dubald 2016)

## (2) Baisse du niveau d'ingestion

Plusieurs facteurs peuvent expliquer une baisse du niveau d'ingestion lors de la mise en place d'un traitement antibiotique par voie orale, à commencer par le comportement alimentaire des poissons malades. La littérature montre en effet une forte baisse d'appétit de ces derniers. On retrouve ainsi, suite à un traitement, peu à pas de traces d'antibiotiques dans le tube digestif des poissons moribonds ou morts au cours de l'expérimentation (Coyne *et al.* 2004 ; Smith 2008 ; Park *et al.* 2012). Sur cet aspect, un diagnostic clinique précoce menant à la mise en place rapide d'un traitement permet de limiter la baisse du niveau d'ingestion, les poissons malades étant alors moins nombreux et probablement moins sévèrement atteints (Zarza 2012). Le recours à un traitement antibiotique prophylactique, soit avant l'apparition de tout signe clinique dans les bassins est interdit en Europe dans le cadre du règlement (UE) 2019/6. Toutefois, la métaphylaxie, c'est-à-dire le traitement de l'ensemble des animaux d'un groupe après qu'un diagnostic clinique a été établi sur une partie des animaux de ce groupe, permet justement de bénéficier d'un traitement le plus précoce possible (règlement (UE) 2019/6). Le traitement des truites par voie orale à l'échelle d'un bassin est métaphylactique, prévenant pour les poissons sains l'infection *de novo* et favorisant pour les poissons malades non anorexiques l'élimination des bactéries de l'organisme (Smith 2008). Vu le comportement alimentaire des poissons cliniquement atteints, la littérature suggère une importance prépondérante de la prévention de l'infection *de novo* lors de traitements métaphylactiques en pisciculture.

Par ailleurs, l'adjonction d'un antibiotique peut modifier l'appétence de l'aliment. Cet effet est majoré lors de la réalisation d'un enrobage de l'aliment par rapport à l'incorporation préalable à la formation des granulés. Il peut être provoqué par un goût désagréable de l'antibiotique, des excipients associés ou encore par un mauvais goût de l'agent enrobant (Zarza 2012 ; Daniel 2009). Hustvedt *et al.* ont ainsi montré en 1991 une baisse de 61 % de l'ingestion d'un aliment par des truites arc-en-ciel, après incorporation d'oxytétracycline. Par ailleurs, Geurden *et al.* en 2005 ont mis en évidence une préférence des truites arc-en-ciel pour les huiles de poisson, par rapport aux huiles végétales. Ainsi, l'utilisation d'huiles de poisson ou de crustacé comme agent enrobant est un levier pour pallier la baisse d'appétence liée au goût de l'antibiotique utilisé (Zarza 2012). La quantité d'antibiotique ajoutée à l'aliment peut également avoir un effet sur la palatabilité de l'aliment. Ainsi, à forte concentration, certains antibiotiques peuvent être plus facilement rejetés par les poissons (Maklakova *et al.* 2011 ; Hustvedt *et al.* 1991).

## (3) Lessivage de l'antibiotique

Le lessivage de l'antibiotique intervient lors de la distribution des granulés enrobés aux poissons, par dilution d'une partie du principe actif dans l'eau du bassin. Bien que cela concerne toute forme de distribution d'antibiotiques par voie orale, ce phénomène est d'autant plus marqué dans le cas de granulés enrobés (Ranjan 2017 ; Treves-Brown 2000 ; Xu et Rogers 1994). Cette perte d'antibiotique dans l'eau du bassin est multifactorielle (Treves-Brown 2000 ; Duis *et al.* 1995 ; Barreto *et al.* 2018 ; Xu et Rogers 1994) :

- Elle est inversement proportionnelle à la taille des granulés. En effet, les granulés de petite taille ont une surface de contact avec l'eau plus importante par rapport à leur volume.
- Elle augmente avec la température de l'eau, et avec le temps passé dans l'eau.

- Elle dépend de l'agent enrobant utilisé. Par exemple, le lessivage du florfénicol apparaît moins important avec l'utilisation d'huile végétale comme agent d'enrobage par rapport à la CMC ou à la PMF (Barreto *et al.* 2018).

Ces facteurs de variation peuvent être interdépendants. Ainsi, le choix d'une huile de poisson comme agent enrobant pourra limiter le lessivage, à la fois en repoussant les molécules d'eau et en augmentant l'appétence des granulés, ce qui favorise une prise rapide par les animaux et donc un temps de contact avec l'eau réduit (Zarza 2012). Il est à noter que le choix de l'agent enrobant dépend aussi de l'antibiotique choisi : par exemple, le florfénicol a une forte affinité avec les composés peu ou pas polaires, comme l'huile, et, *a contrario*, une faible affinité pour la CMC (Barreto *et al.* 2018).

Si l'on cumule les pertes en principes actifs liées au lessivage d'antibiotique avec celles liées à la fabrication de l'aliment enrobé, la dose réellement disponible pour traiter les animaux peut se révéler nettement inférieure aux objectifs. Ainsi, dans l'étude de Barreto *et al.* 2018, les pertes de florfénicol cumulées entre la méthode d'enrobage et le lessivage oscillent entre 14 % et 70 % selon les agents enrobants. Ainsi, pour une dose thérapeutique cible à 10 milligrammes par kilo de poids vif de florfénicol, les poissons peuvent recevoir une dose située entre 3 mg/kg et 8,6 mg/kg.

Cette perte de médicament, associée au comportement alimentaire modifié pour les animaux malades, peut être la source de problèmes majeurs en aquaculture, favorisant échecs thérapeutiques et sélection de résistances bactériennes (Inglis 2000 ; St-Hilaire *et al.* 2020).

#### (4) Impact environnemental

L'administration d'antibiotiques par voie orale pose la question des rejets dans l'environnement, bien que son impact environnemental soit réduit par rapport à la balnéation (Inglis 2000). Plusieurs phénomènes en sont responsables : le lessivage à partir de l'aliment médicamenteux ou enrobé, le nettoyage du matériel utilisé pour la fabrication, le stockage ou le transport de l'aliment enrobé, et les rejets par les animaux eux-mêmes. Ces résidus d'antibiotiques pourraient conduire à l'apparition de résistances au sein des populations de bactéries présentes dans les sédiments ou dans l'eau (Inglis 2000).

Les rejets par les animaux dépendent de la molécule elle-même, et notamment de sa métabolisation par les poissons, mais également de la forme galénique utilisée (Bianchini et Baldisserotto 2021). Le cas des médicaments à faible biodisponibilité orale notamment pose question. Ce sont des médicaments pour lesquels la fraction d'antibiotique atteignant la circulation sanguine est faible en proportion de la quantité distribuée. Autrement dit, l'essentiel du médicament n'est pas absorbé et ne fait que transiter au travers du tube digestif, en étant relargué dans l'environnement sous forme active. Ces rejets peuvent être en quantité importante (Park *et al.* 2012).

**La balnéation ou le trempage :**

Indications	Larves ou alevins
Avantages	Mise en œuvre facile ; peu stressante pour le poisson ; élimine les bactéries en suspension ; efficace sur les affections superficielles
Inconvénients	Quantités d'antibiotiques nécessaires importantes, biodisponibilité relativement faible, impact environnemental fort

**L'injection :**

Indications	Poissons de forte valeur économique (reproducteurs)
Avantages	Maitrise de la dose reçue par le poisson
Inconvénients	Forte charge de travail et stress pour le poisson

**L'administration par voie orale (la plus utilisée) :**

Indications	Tous poissons sauf larves
Avantages	Charge de travail modérée (incluant fabrication et stockage en ferme) et pas de stress pour le poisson
Inconvénients	Incertitudes quant à la dose reçue (comportement alimentaire, appétence, lessivage), qualité de l'aliment enrobé (quantité réelle de principe actif disponible, homogénéité, stabilité).

Figure 2 : Bilan sur les modes d'administration des antibiotiques en filière trutticole

## 2. Molécules utilisées en pisciculture

Les principales familles d'antibiotiques utilisées en aquaculture sont présentées dans cette section, notamment les tétracyclines et les phénicolés (Alday-Sanz *et al.* 2012). D'autres familles d'intérêt pour l'aquaculture sont également citées. Comme vu précédemment, la plupart des bactéries pathogènes en trutticulture sont à Gram négatif, une considération majeure pour le choix des antibiotiques à utiliser.

### a) Tétracyclines

Le spectre des tétracyclines est large, incluant bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ce sont des antibiotiques bactériostatiques. Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique des bactéries par fixation sur la sous-unité 30S du ribosome (Sutili et Gressler 2021 ; Noga 2010).

La molécule de la famille des tétracyclines la plus utilisée dans l'aquaculture est l'oxytétracycline (OTC), dont l'usage est très répandu du fait de sa bonne tolérance et de son coût très limité. Elle est classiquement utilisée chez la truite arc-en-ciel pour le traitement de la maladie de la fraise, de la flavobactériose, de la furunculose, de la rénibactériose ou encore de la streptococcose (Noga 2010 ; Sutili, Gressler 2021 ; Alday-Sanz *et al.* 2012).

Lors d'administration par voie orale, les posologies sont mal définies, les recommandations oscillent entre 50 à 100 milligrammes par kilogramme de poids vif par jour, pendant une dizaine de jours en général, mais pouvant aller jusqu'à 21 jours pour la rénibactériose (Noga 2010 ; Yoshimizu *et al.* 2017).

Les tétracyclines, comme les autres antibiotiques, sont préférentiellement administrées *per os* chez le poisson. Cependant, la biodisponibilité orale est très faible, inférieure à 10 % pour la truite arc-en-ciel (tableau IV). Les tétracyclines peuvent en effet former des complexes avec des ions divalents tels que le calcium (Ca<sup>2+</sup>) et le Magnésium (Mg<sup>2+</sup>). Ces deux ions sont présents notamment dans l'alimentation des poissons, et la formation de tels complexes réduit le passage de la molécule à travers la paroi intestinale (Park *et al.* 2012 ; Sekkin et Kum 2011 ; Sutili et Gressler 2021 ; Cravedi *et al.* 1987).

Tableau IV : Biodisponibilité orale de l'oxytétracycline chez la truite arc-en-ciel dans la littérature

Étude	Milieu d'étude	Espèce étudiée	Posologie	Biodisponibilité observée
Cravedi <i>et al.</i> 1987	Eau douce 14 °C	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	≈ 8 mg/kg ≈ 42 mg/kg	7 à 9 %
Rogstad <i>et al.</i> 1991	Eau douce 7 °C	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	150 mg/kg	2,6 %
Björklund et Bylund 1991	Eau douce 16 °C	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	75 mg/kg	5 à 6 %
Viel <i>et al.</i> 2024	Eau douce 16 °C et 10 °C	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	50 mg/kg 90 mg/kg 150 mg/kg	< 3 %

La faible biodisponibilité orale de cette molécule présente un problème majeur chez les salmonidés, à la fois pour atteindre les concentrations thérapeutiques nécessaires, mais également parce que la fraction non absorbée est excrétée sous forme active dans l'environnement (Park *et al.* 2012 ; Björklund et Bylund 1991).

### *b) Phénicolés*

Les antibiotiques phénicolés sont des molécules au spectre d'action large, actives sur les bactéries à Gram positif et négatif ainsi que sur les bactéries anaérobies. Ce sont des antibiotiques bactériostatiques qui agissent par inhibition de la synthèse protéique, après fixation sur la sous-unité 50S du ribosome (Sutili et Gressler 2021).

La molécule de la famille des phénicolés la plus utilisée en aquaculture est le florfénicol (FFN). C'est l'une des molécules les plus utilisées mondialement pour le traitement des poissons. Elle est notamment privilégiée pour le traitement de la furunculose, de la yersiniose ou de la flavobactériose (Alday-Sanz *et al.* 2012 ; Sutili et Gressler 2021 ; Park *et al.* 2012).

Lors d'administration par voie orale chez la truite arc-en-ciel, la posologie recommandée oscille entre cinq et vingt milligrammes par kilogramme de poids vif, la dose la plus souvent recommandée est de dix milligrammes par kilogramme de poids vif pendant dix jours (Noga 2010 ; Sutili et Gressler 2021 ; Reimschuessel *et al.* 2013).

### *c) Autres familles d'intérêt vétérinaire en aquaculture*

Ces familles sont présentées par ordre d'utilisation au sein de la trutticulture mondiale selon Alday-Sanz *et al.* 2012.

#### (1) Quinolones et fluoroquinolones

Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides avec un spectre orienté vers les bactéries à Gram négatif aérobies, et étendu aux bactéries à Gram positif dans le cadre des quinolones possédants un atome de fluor (ou fluoroquinolones). L'acide oxolinique et la fluméquine (respectivement quinolone et fluoroquinolone) sont les représentants de cette famille les plus utilisés en aquaculture, suivis par l'enrofloxacin (Sutili et Gressler 2021; Alday-Sanz *et al.* 2012 ; Swinkels *et al.* 2024).

L'enrofloxacin, ainsi que d'autres fluoroquinolones autorisées en médecine vétérinaire (la danofloxacin, la marbofloxacin, l'orbifloxacin et la pradofloxacin) sont consignées dans l'arrêté du 18 mars 2016 fixant la liste des substances antibiotiques d'importance critique, dont la prescription doit, entre autres, être associée à un antibiogramme.

#### (2) Sulfamides

Les sulfamides sont une famille d'antibiotiques bactériostatiques actifs sur les bactéries Gram positif et Gram négatif. Rarement utilisés seuls, ils sont souvent associés à une base pyrimidique, comme le triméthoprime ou l'orméthoprime, ce qui confère à l'association un effet bactéricide. L'association du triméthoprime et d'un sulfamide est désignée par l'abréviation TMPS. Ces antibiotiques sont très bien absorbés par les branchies et sont donc particulièrement adaptés à la balnéation notamment pour le traitement des larves et alevins (Sutili et Gressler 2021 ; Park *et al.* 2012).

### (3) Macrolides

Les macrolides sont une famille d'antibiotiques bactériostatiques avec un spectre d'action orienté vers les bactéries à Gram positif, aérobies comme anaérobies. Ce spectre limite leur utilisation en aquaculture mais ils sont néanmoins utilisés dans la lutte contre la réinfectieuse ou la streptococcose (Sutili et Gressler 2021).

### (4) Aminoglycosides

Les aminoglycosides ont une action bactéricide sur les bactéries à Gram négatif aérobies. Les antibiotiques de cette famille sont préférentiellement administrés par injection (Sutili et Gressler 2021). La kanamycine et la néomycine peuvent cependant être administrées par balnéation (Yanong 2003). Une forte sensibilité des truites à la néphrotoxicité des aminoglycosides conduit à utiliser ces antibiotiques avec précautions (Svec *et al.* 1982 ; McBride *et al.* 1975).

### (5) Pénicillines

Les pénicillines sont des molécules bactéricides sur les bactéries en multiplication. Les pénicillines G ont un spectre étroit limité aux bactéries à Gram positif et sont peu utilisées en aquaculture, contrairement aux pénicillines A qui ont un spectre élargi aux bactéries à Gram négatif (Sutili et Gressler 2021 ; Park *et al.* 2012).

## 3. Spécialités disponibles

De manière générale, peu de médicaments vétérinaires disposent d'une autorisation de mise sur le marché pour la pisciculture. Ceux qui sont disponibles peinent à couvrir toutes les indications pour toutes les espèces élevées, on parle de gap thérapeutique. En effet, le volume de production représenté par la pisciculture reste relativement faible en comparaison avec les productions animales industrielles type volailles, porcs ou ruminants, tout particulièrement en Europe. Ainsi les laboratoires ont peu d'intérêt à financer des dossiers de demande d'autorisation de mise sur le marché pour un volume si restreint (Rodgers et Furones 2009 ; Zarza 2012 ; Sutili et Gressler 2021).

La France ne fait pas exception à la règle. On ne compte ainsi que huit spécialités disposant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour l'espèce cible « truite » ou « salmonidé » ou « poisson » de manière générale. Parmi ces huit spécialités figurent quatre vaccins, contre la yersiniose, la vibriose et la lactococcose ainsi qu'un antifongique. Il reste trois spécialités qui sont à base d'antibiotiques et sont répertoriées dans le tableau V ci-après.

Deux de ces trois spécialités sont des prémélanges médicamenteux. Non utilisables en l'état, ils sont destinés à la réalisation d'aliments médicamenteux par des établissements disposant d'un agrément (article L5442-11 du code de la santé publique). Ce recours est minoritaire en trutticulture française parce que les biomasses traitées sont souvent trop faibles par rapport aux quantités minimales d'aliments réalisées par les usines. De plus la réalisation d'un aliment médicamenteux peut engendrer des délais incompatibles avec le traitement d'une maladie aiguë (agence nationale du médicament vétérinaire (ANMV) 2024).

Tableau V : Spécialités antibiotiques disposant d'une autorisation de mise sur le marché pour truites, poissons ou salmonidés en France (d'après ANSES 2024)

Nom déposé vétérinaire (NDV)	Laboratoire titulaire de l'AMM	Forme galénique	Principe actif	Espèces cibles
Inoxy <sup>NDV</sup> acide oxolinique 240 salmonidés	LABORATOIRES BIOVE	Prémélange médicamenteux	Acide oxolinique	<b>Truite</b>
Ps oxytétracycline aquaculture <sup>NDV</sup>	HUVEPHARMA SA	Prémélange médicamenteux	Chlorhydrate d'oxytétracycline	Anguille, Bar, Carpe, Daurade, <b>Salmonidés</b> , Turbot
Flumiquil <sup>NDV</sup> poudre à 3 %	CEVA SANTE ANIMALE	Poudre pour solution buvable	Fluméquine	Bovins, Caprins, Cheval, Lapins, Ovins, <b>Poissons</b> , Porcins, Volailles

La troisième spécialité disponible est Flumiquil<sup>NDV</sup>, une poudre à base de Fluméquine utilisable pour une distribution par voie orale aux poissons, bien que la faible concentration en principe actif rende son usage peu pratique (ANMV 2024).

Le fait qu'une seule spécialité à base d'antibiotiques (hors prémélange) possède une AMM pour le traitement des truites en France explique le nécessaire recours à la cascade de prescription par les vétérinaires dans de nombreuses situations où l'utilisation d'aliment médicamenteux n'est pas envisageable.

## 4. Règlementation

### a) Cascade de prescription

Lorsqu'il n'existe pas de médicament vétérinaire indiqué pour les poissons, le vétérinaire prescripteur peut faire appel à d'autres médicaments non indiqués pour ce groupe d'espèces. Ce principe s'appelle la cascade de prescription. Elle est décrite par le règlement (UE) 2019/6 pour les espèces aquatiques productrices de denrées alimentaires qui précise l'utilisation des médicaments hors AMM selon l'ordre présenté à travers la figure 3 page suivante.

La cascade de prescription ne peut être utilisée que pour la prescription de médicaments vétérinaires dont la ou les substance.s active.s sont autorisées conformément au règlement (CE) 470/2009, c'est-à-dire figurant dans le tableau 1 de l'annexe du règlement (UE) 37/2010 (direction générale de l'alimentation (DGAL) 2023).

En France, par exemple, le florfénicol n'est disponible pour les poissons que dans le cadre de la cascade. De même, l'oxytétracycline, sous forme de prémélange, n'est pas disponible directement pour les vétérinaires ou les éleveurs. Ainsi, pour réaliser un enrobage en ferme, il est indispensable d'utiliser un autre médicament. La liste exhaustive des spécialités à base de florfénicol ou d'oxytétracycline disponibles en France en médecine vétérinaire est disponible en annexe 2.

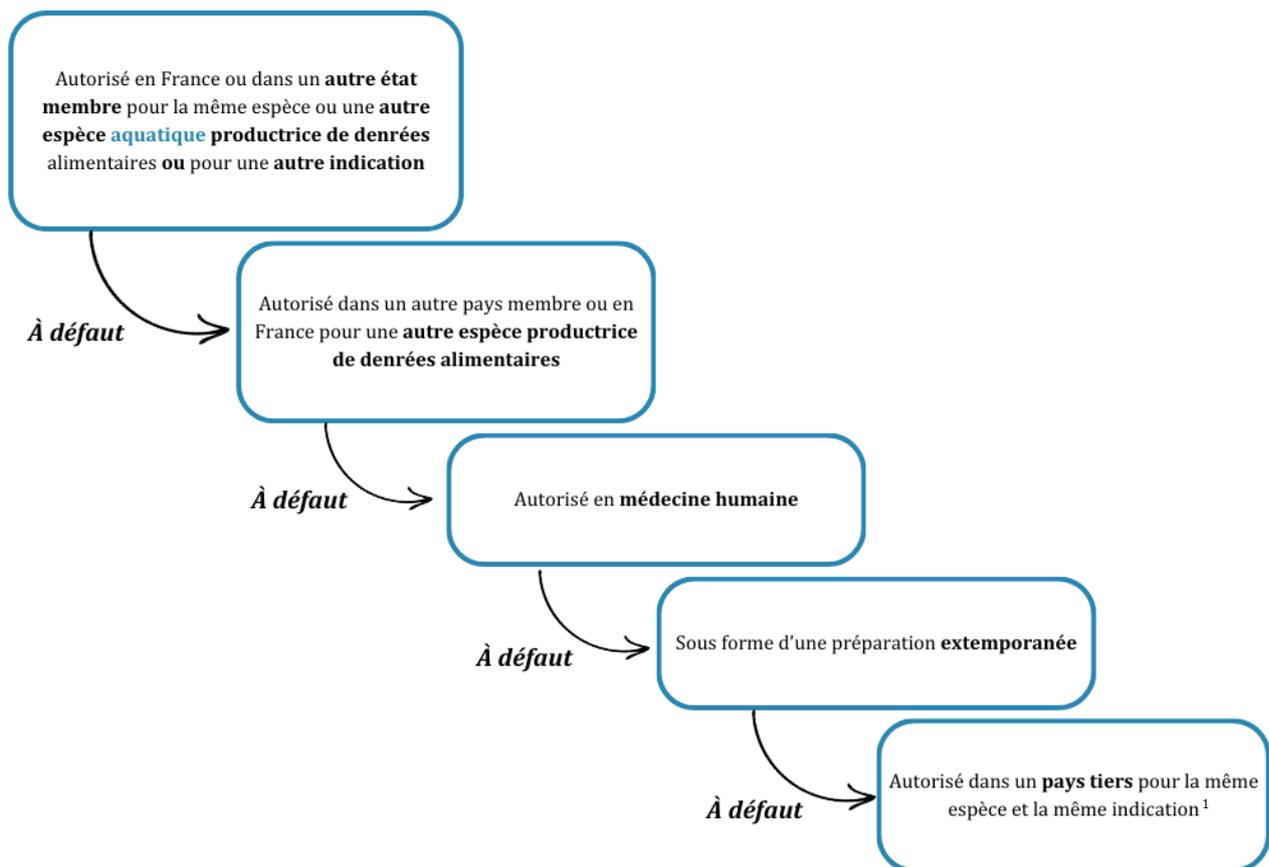


Figure 3 : Principe de la cascade de prescription en filière aquacole d'après le règlement (UE) n°2019/6 relatif aux médicaments vétérinaires (¹exception faite des médicaments immunologiques)

### b) Temps d'attente

La délivrance des médicaments vétérinaires antimicrobiens est, selon le règlement (UE) 2019/6, subordonnée à la rédaction d'une ordonnance par un vétérinaire.

Selon l'article R5141-111 du code de la santé publique, sur cette ordonnance doit figurer, entre autres, le temps d'attente. Celui-ci est défini comme « la période minimale entre la dernière administration d'un médicament vétérinaire à un animal et l'obtention de denrées alimentaires provenant de cet animal qui, dans des conditions normales d'utilisation, est nécessaire pour garantir que ces denrées alimentaires ne contiennent pas de résidus en quantités nocives pour la santé publique » selon le règlement (UE) 2019/6.

Le métabolisme du poisson téléostéen étant fonction de la température de son environnement, la vitesse d'élimination des médicaments vétérinaire et donc le temps d'attente appliqué, dépend, pour une espèce et une molécule donnée, de la température de l'eau. Ainsi, les temps d'attentes pour les espèces aquacoles sont exprimés en « degré-jour », soit le facteur du nombre de jours de temps d'attente et de la moyenne de la température journalière. Ainsi un temps d'attente de 500 degrés-jours équivaut à 50 jours si la moyenne journalière de la température de l'eau est à 10 °C ou à 20 jours si elle est à 25 °C.

Dans le cas où le médicament est prescrit dans le cadre de l'AMM, et donc selon les indications du résumé des caractéristiques du produit (RCP), le temps d'attente indiqué sur ce dernier est

reporté sur l'ordonnance. Dans le cas contraire, il est calculé en fonction de l'indication et de l'espèce cible mentionnée dans le RCP (Santos et Cunha 2021, règlement (UE) 2019/6) :

- Si l'AMM concerne une autre espèce aquatique productrice de denrée et/ou que la posologie appliquée est supérieure en dose ou fréquence à celle prévue par le RCP : **multiplication par 1,5** du temps d'attente le plus long autorisé.
- Si l'AMM concerne une espèce terrestre de production : **multiplication** de la durée du temps d'attente le plus long autorisé en jours **par 50**, sans dépasser 500 degrés-jours
- Si le temps d'attente le plus long pour n'importe quelle espèce d'animal est nul : **25 degrés-jours**.
- Si le médicament vétérinaire n'est pas autorisé pour les espèces productrices d'aliment, le temps d'attente forfaitaire est de **500 degrés-jours**.

### *c) Médicaments enrobés en ferme piscicoles*

L'utilisation de médicaments vétérinaires (hors aliments médicamenteux) prescrits pour l'administration par voie orale et destinés aux animaux producteurs d'aliments est encadrée par le règlement (UE) 2019/6 complété par le règlement délégué (UE) 2024/1159 qui s'applique à partir du neuf novembre 2025.

L'article 6 de ce règlement prévoit que l'utilisation d'aliments enrobés avec des antibiotiques soit limitée au traitement d'animaux nourris individuellement ou par petits groupes. Le paragraphe 3 de ce même article prévoit cependant une dérogation à cette règle pour les espèces aquatiques productrices d'aliment. Cette dérogation prend effet dans le cas où le recours à un aliment médicamenteux est impossible pour des raisons de disponibilité de celui-ci ou parce que les délais de livraison ne permettent pas de débiter le traitement suffisamment tôt. Le vétérinaire est alors autorisé à prescrire dans le cadre d'un traitement de groupe des médicaments antiparasitaires ou antimicrobiens destinés à être enrobés sur des aliments.

La dérogation accordée à l'aquaculture s'appuie sur trois considérations décrites par le règlement délégué. D'abord, les traitements par voie orale individuels sont impossibles à mettre en place en aquaculture, tant par l'aliment solide que par l'eau de boisson. Ensuite, l'accès aux aliments médicamenteux est limité dans certains états membres. Enfin, retarder la mise en place d'un traitement à cause des délais de livraison d'un aliment médicamenteux poserait des problèmes de santé et de bien-être animal.

Selon l'article 8 du règlement délégué, le détenteur d'animaux réalisant la préparation des médicaments vétérinaires pour administration orale doit-être équipé de sorte à :

- Permettre une dilution homogène au moyen d'équipements adaptés à la gamme de poids et de volumes à préparer.
- Permettre une utilisation efficace et sûre des médicaments.
- Réaliser un nettoyage réduisant les risques d'expositions d'animaux non cibles et de l'environnement.

Enfin, d'après l'article 10 du règlement délégué, chaque état membre peut établir les lignes directrices de bonnes pratiques en termes d'administration par voie orale de médicaments vétérinaires autres qu'aliments médicamenteux. Ainsi, chaque état membre peut adapter les recommandations formulées aux systèmes et espèces de production présents sur son territoire.

## Synthèse

Malgré les mesures préventives sanitaires et médicales qui sont mises en place en élevage, le recours aux antibiotiques reste parfois nécessaire en fermes trutticoles.

Dans ce cadre, la distribution d'antibiotiques par voie orale reste le moyen le plus largement utilisé. L'utilisation d'aliments médicamenteux est limitée à la fois par le faible nombre de prémélanges autorisés, par des délais de livraison inadaptés et par des volumes traités souvent trop faibles pour que les usines acceptent de réaliser la fabrication. De fait, la pratique la plus courante est la réalisation d'un enrobage à la ferme, à partir de médicaments utilisés hors AMM, dans le cadre de la cascade. La qualité de l'enrobage étant déterminante pour atteindre les concentrations thérapeutiques recherchées chez le poisson, elle est un levier majeur dans la lutte contre le développement de résistances aux antibiotiques dans la filière aquacole.

Il appartient alors au vétérinaire prescripteur de donner les consignes appropriées pour la réalisation de l'enrobage, une tâche difficile tant la littérature est éparse à ce sujet. Afin de formuler les recommandations adaptées à la filière trutticole française, il est nécessaire de répondre à plusieurs questions auxquelles la documentation scientifique ne répond pas, ou peu :

- Quelles sont les caractéristiques des piscicultures françaises et quelles sont leurs pratiques en termes d'utilisation des antibiotiques et notamment d'enrobage ?
- Quelles méthodes de mélange sont inefficaces et donc à déconseiller aux éleveurs ?
- Quelle est la stabilité de l'antibiotique une fois enrobé sur l'aliment ?
- Est-il possible d'obtenir un enrobage de qualité dans le cadre d'une ferme aquacole française, et quels sont les procédés les plus usinadaptés pour y parvenir ?

C'est dans ce cadre qu'a été financé le projet **enr-EAU-bage**, porté par l'INRAE, avec le soutien de la société nationale des groupements techniques vétérinaires (SNGTV), par le plan national de lutte contre l'antibiorésistance Écoantibio 2. Il porte sur la détermination expérimentale des procédures à suivre pour réaliser un enrobage de qualité dans le cadre des fermes aquacoles françaises et à la retranscription de ces procédures sous la forme de fiches de bonnes pratiques à destination des vétérinaires prescripteurs. L'objectif de ces fiches est de garantir une réalisation d'un enrobage optimal dans les fermes aquacoles françaises, répondant ce faisant aux exigences du règlement délégué (UE) 2024/1159.



Figure 4 : Logo du projet enr-EAU-bage

# **II. Étude expérimentale**

## A. Caractérisation des pratiques d'enrobage dans la filière trutticole française

La première partie du projet enr-EAU-bage consiste en la réalisation d'un questionnaire à destination des éleveurs. Son objectif est de caractériser les trutticultures françaises et leurs pratiques en termes d'utilisation d'antibiotiques en général et d'enrobage d'aliment en particulier. Cette caractérisation permettra par la suite de mieux définir les besoins de la filière pour proposer un guide de bonnes pratiques pertinent.

### 1. Matériels et méthodes

#### a) Rédaction

Le questionnaire a été adapté à l'outil *Google Forms*, mais il était également disponible sous un format *Word*. Il est court et facile d'emploi. Les questions sont majoritairement sous la forme de questions à choix multiples (QCM), et dans une moindre mesure de questions à réponses ouvertes courtes (CROC). L'objectif est que le questionnaire n'impose pas à l'éleveur de rechercher des informations complexes, et qu'il puisse être complété en moins de 15 minutes, afin de limiter les abandons en cours de remplissage. Privilégier les QCM rend également le questionnaire plus facile à traiter ensuite, et nous assure des réponses précises sur certains éléments clés. Il n'est pas obligatoire pour les éleveurs de répondre à toutes les questions posées.

Le questionnaire se divise en trois parties. La première sur la situation générale de l'élevage, la deuxième sur leur utilisation des antibiotiques et la troisième sur le point de vue des éleveurs. L'ensemble des questions est disponible en annexe 3.

#### (1) Situation générale

Cette première partie permet de replacer les réponses données dans leur contexte. Il est ainsi demandé de préciser la localisation, le type de production ou encore le tonnage produit annuellement de l'exploitation. Ces questions nous permettent de caractériser la population d'éleveurs répondants et de comparer cette population aux caractéristiques des piscicultures françaises moyennes.

#### (2) Utilisation des antibiotiques

Cette partie comporte d'abord des questions générales sur les traitements antibiotiques puis se concentre sur les pratiques d'enrobage d'aliments. Les premières questions permettent de caractériser l'usage des antibiotiques de la filière trutticole française et plus précisément les voies préférentielles d'administration. En ce qui concerne l'administration par voie orale, il est demandé de préciser si elle se fait via un aliment médicamenteux ou un aliment enrobé.

Les questions sur les pratiques d'enrobage sont centrées sur deux ateliers : l'écloserie et le grossissement. Pour les éleveurs qui possèdent les deux ateliers, les mêmes questions sont posées deux fois car les pratiques peuvent être fondamentalement différentes.

Ces questions permettent de caractériser précisément les pratiques d'enrobage sur le terrain : matériel utilisé, antibiotiques et formes galéniques privilégiés, agents enrobants utilisés et quantités, durées et méthodes de mélange, modalités de conservation et de distribution.

Étant donné la grande diversité des modalités d'enrobage, il est parfois difficile d'envisager toutes les réponses possibles à une question. Ainsi, certaines questions à choix multiples sont suivies d'une CROC pour permettre aux éleveurs de préciser leur réponse dans le cas où aucune des propositions ne saurait rendre compte de leurs pratiques. Dans un souci de gain de temps pour les éleveurs, il est possible, en version numérique comme en version papier, de sauter l'une ou l'autre des sous-parties en fonction de ce qui est pratiqué dans l'élevage.

### (3) Point de vue des éleveurs

Cette dernière partie est constituée de deux questions ouvertes recueillant l'avis des éleveurs sur l'étude en cours, et sur leurs attentes s'ils en ont.

#### b) Diffusion

Le questionnaire a été diffusé sous ses deux formats (document *Word* et lien *Google Forms*) afin de permettre au plus d'éleveurs possible de le compléter. La diffusion a été réalisée par mail par des vétérinaires de la SNGTV partenaires du projet enr-EAU-bage, chaque vétérinaire ayant relayé le questionnaire aux éleveurs de sa clientèle.

#### c) Traitement des réponses

Les réponses reçues sous les deux formats différents ont dû être regroupées pour être analysées. Ainsi les 17 réponses reçues au format *Word* (numérique ou numérisé) ont été transférées manuellement au format *Google Forms* en complétant le questionnaire en ligne comme s'il avait été complété par l'éleveur. Ce logiciel permet ensuite le traitement de la plupart des données sous forme de graphique et notamment les réponses de type QCM.

Concernant les réponses aux CROQ, elles étaient trop disparates pour être traitées telles quelles. Elles ont été transférées dans un tableur *Microsoft Excel* et reformulées pour permettre leur analyse via ce même logiciel. Ce questionnaire étant destiné à rendre compte de la diversité des pratiques d'antibiothérapie en trutticulture française, lorsque plusieurs valeurs numériques étaient citées dans une réponse, le choix a été fait de ne pas en faire une moyenne mais de toutes les comptabiliser comme une réponse. Le même choix a été fait pour le traitement des réponses qualitatives. Le tableau VI ci-dessous permet d'illustrer ces deux cas de figure.

Tableau VI : Conversion des réponses brutes pour l'analyse statistique

	Exemple de question	Exemple de réponse brute		Réponse adaptée à l'analyse de données
<b>Réponse qualitative</b>	Noms déposés d'antibiotiques utilisés	« Florfenikel Diaziprim Diproxin »		Florfenikel (FFN)
				Diaziprim (TMPS)
				Diproxine (TMPS)
<b>Réponse quantitative</b>	Diamètre des aliments utilisés	« 2,5 / 4 / 5 »		2,5 mm
				4 mm
				5 mm

## 2. Résultats

Le questionnaire a été complété par 45 éleveurs, dont 17 sur la version *Word*. Les éleveurs n'ayant pas l'obligation de répondre à tous les items, le nombre de réponses diffère selon les questions, indiqué à chaque fois par un N.

### a) Caractérisation des exploitations

Les principales caractéristiques des exploitations étudiées sont présentées à travers la figure 5 et la figure 6. Elles sont situées en grande majorité en Nouvelle-Aquitaine. La Bretagne vient ensuite suivie de la Normandie. La plupart ne sont constituées que d'un site de production mais 20 % d'entre elles comptent deux sites de production ou plus. Les élevages sont de taille très variable et produisent de 20 à 1000 tonnes par an, avec une moyenne à 274 tonnes (N = 42).

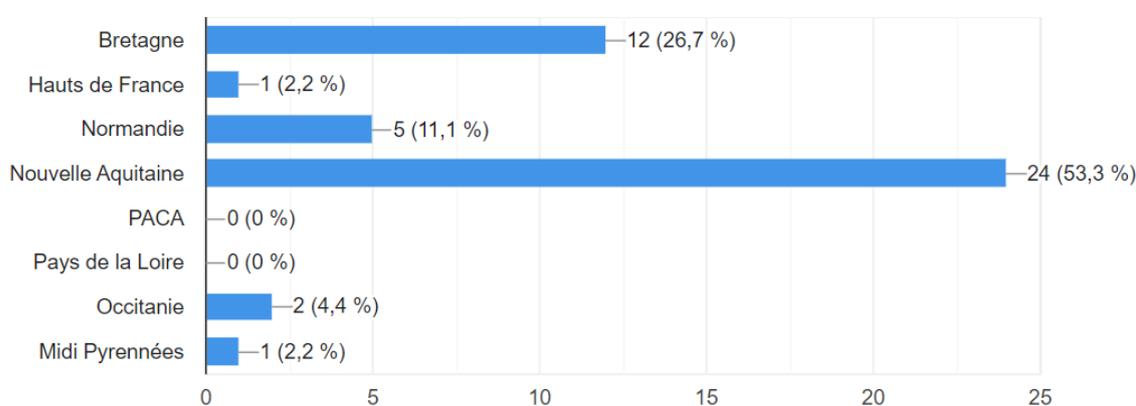


Figure 5 : Répartition géographique des piscicultures étudiées (en abscisse : nombre d'éleveurs concernés) (N = 45)

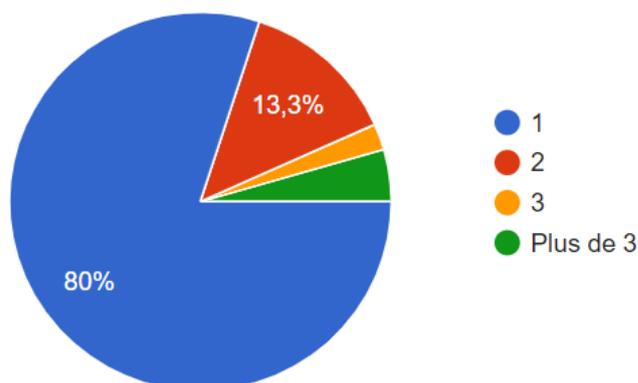


Figure 6 : Nombre de sites exploités par pisciculture (N = 45)

La quasi-totalité des répondants (44 sur 45) élèvent de la truite arc-en-ciel. Certains élèvent également d'autres espèces comme la truite fario ou le saumon atlantique. On compte également un éleveur d'esturgeons (figure 7). La figure 8 permet de rendre compte des catégories de poissons présentes sur l'exploitation. Les éleveurs produisent en grande partie des truites pour la production de filets (81,2 %). Les alevins, truites portions et truites pour fumage sont également produits par une majorité de pisciculteurs. L'élevage de truite pour la production d'œufs ou de poissons reproducteurs sont en revanche des pratiques moins représentées.

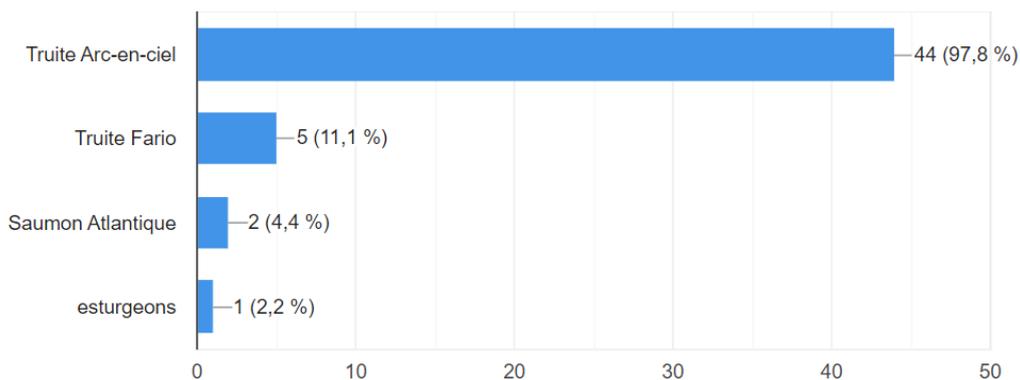


Figure 7 : Espèces présentes sur l'exploitation (en abscisse : nombre d'éleveurs concernés) (N = 45)

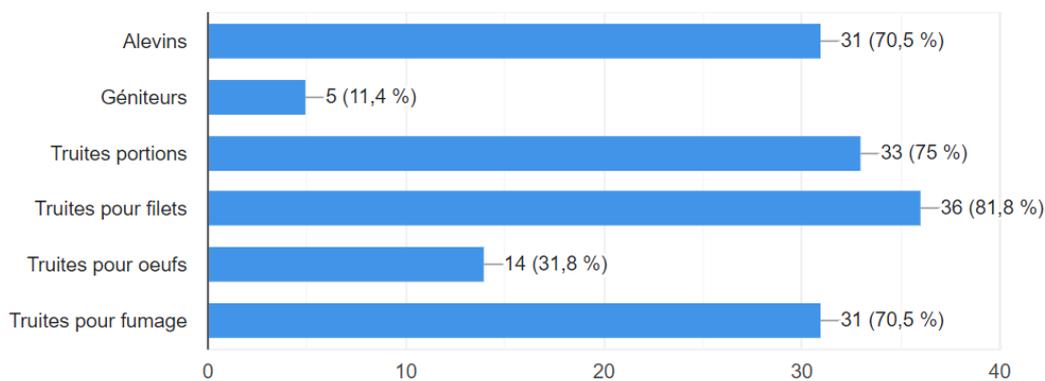


Figure 8 : Catégories de poissons présentes sur l'exploitation (en abscisse : nombre d'éleveurs concernés) (N = 44)

En ce qui concerne la ploïdie des truites arc-en-ciel, plus de 60 % des pisciculteurs élèvent exclusivement ou majoritairement des truites triploïdes. Un peu moins de 30 % des élevages répondants produisent majoritairement ou exclusivement des truites diploïdes (figure 9).

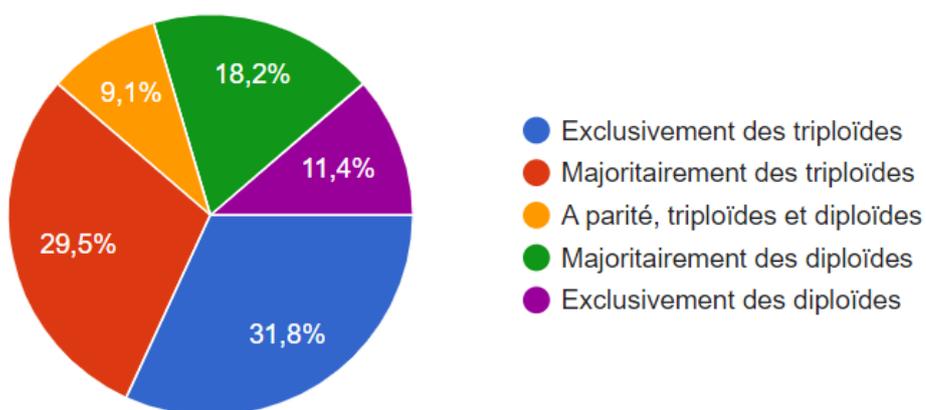


Figure 9 : Ploïdie des truites arc-en-ciel produites (N = 44)

## b) Utilisation des antibiotiques

Concernant les traitements des poissons avec des antibiotiques, presque tous les éleveurs (44 sur 45) ont déjà réalisé un enrobage d'aliment avec de l'antibiotique directement à la ferme. En revanche, moins de la moitié des pisciculteurs ont déjà fait appel à une usine pour la préparation d'un aliment médicamenteux (figure 10 et figure 11).

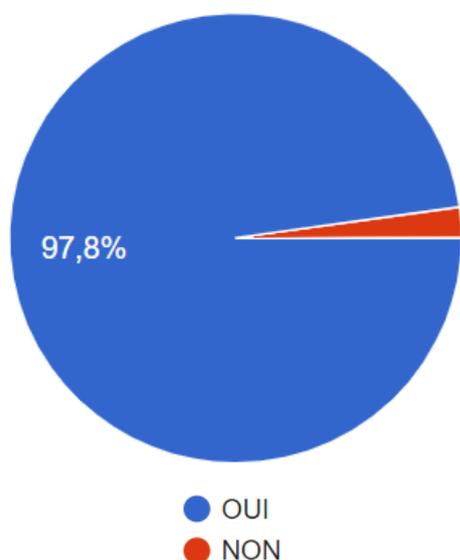


Figure 10 : Pisciculteurs ayant déjà réalisé un enrobage d'aliment à la ferme (N = 45)

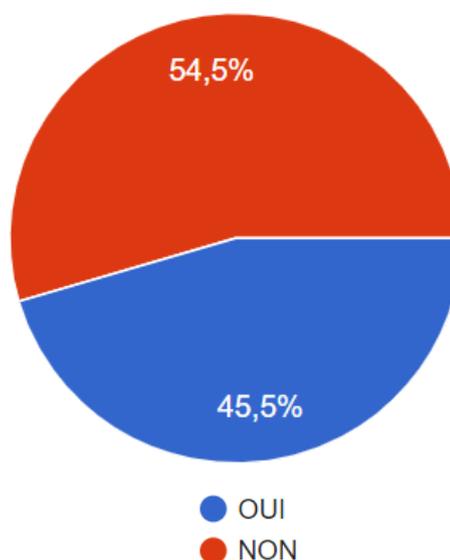


Figure 11 : Pisciculteurs ayant déjà fait fabriquer un aliment médicamenteux (N = 44)

Pour ce qui est des autres voies d'administration, sept éleveurs sur 45 ont déjà réalisé des traitements injectables sur leurs poissons (figure 12). Les profils des poissons traités sont divers, allant du géniteur à l'alevin de 15 grammes. Une proportion moins importante d'éleveurs (3 sur 45) a déjà eu recours à la balnéation, uniquement dans le cadre de traitement d'alevins (figure 13).

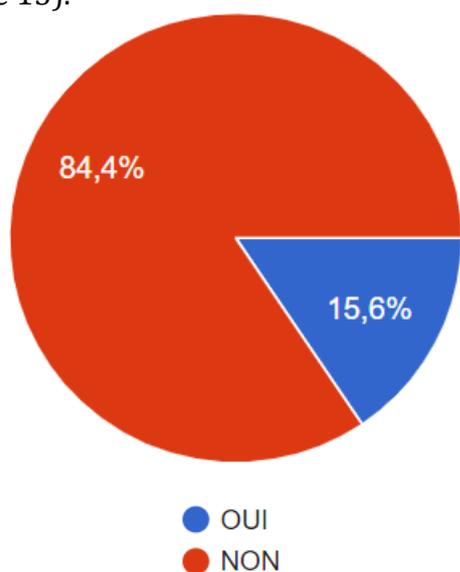


Figure 12 : Pisciculteurs ayant déjà eu recours aux injections (N = 45)

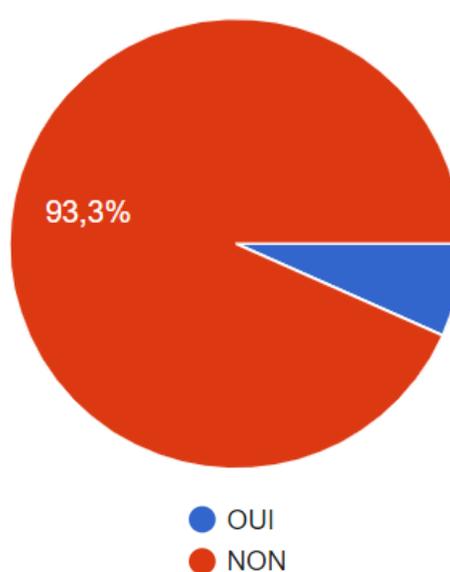


Figure 13 : Pisciculteurs ayant déjà eu recours à la balnéation (N = 45)

### c) Pratiques d'enrobage

Le questionnaire sur les pratiques d'enrobage est divisé en deux parties, d'abord en atelier éclosionerie puis en atelier grossissement. Les résultats seront présentés ici de front, dans un souci de comparaison. Tous les éleveurs répondants n'exploitent pas à la fois un atelier éclosionerie et grossissement, et tous n'ont pas recours aux antibiotiques dans ces ateliers. Au final, 22 éleveurs ont répondu au questionnaire sur leurs pratiques d'enrobage en éclosionerie et 26 sur leurs pratiques d'enrobage en grossissement (figure 14).

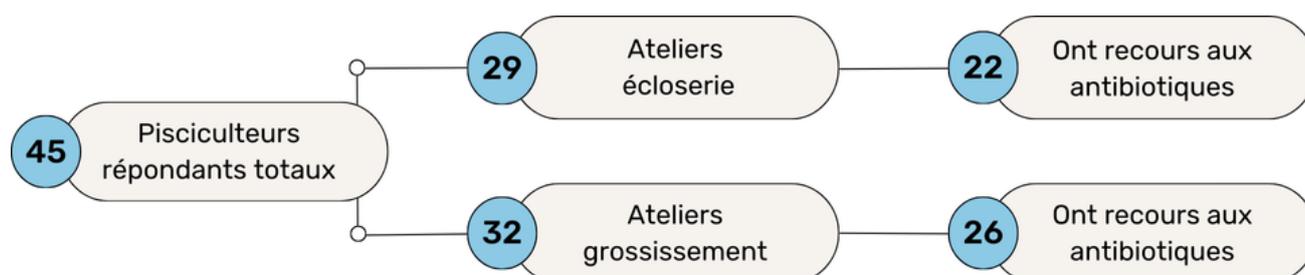


Figure 14 : Nombre de pisciculteurs répondant aux questionnaires sur les pratiques d'enrobage en fonction de l'atelier

#### (1) Antibiotiques utilisés

Les résultats concernant les molécules administrées préférentiellement en éclosionerie et en grossissement sont présentés respectivement en figure 15 et figure 16. Il a été demandé aux éleveurs de classer les antibiotiques par ordre d'utilisation préférentielle, le 1 étant l'antibiotique le plus utilisé et le 4 celui utilisé le moins couramment, toutes affections confondues. Les maladies présentes dans les différentes fermes peuvent donc impacter les antibiotiques privilégiés.

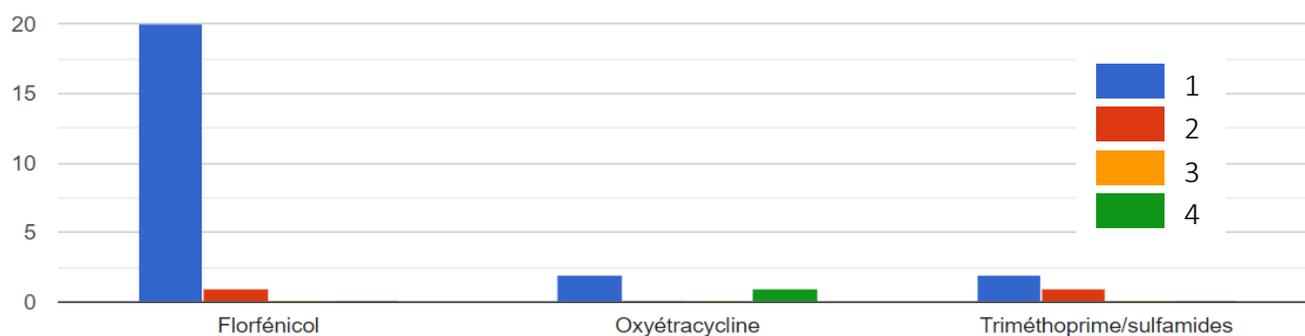


Figure 15 : Molécules les plus utilisées en éclosionerie (N = 21)

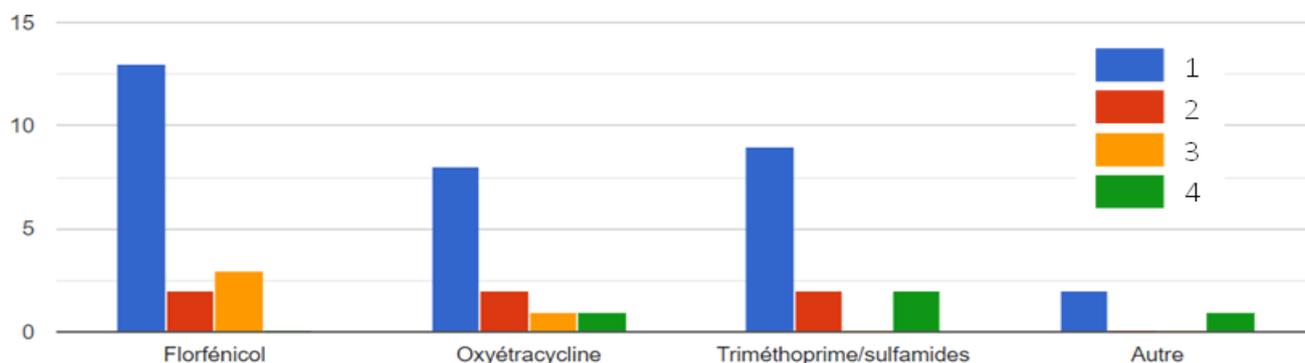


Figure 16 : Molécules les plus utilisées en grossissement (N = 24)

On remarque que l'antibiotique le plus utilisé en éclosion est le florfenicol. Ainsi, 20 éleveurs déclarent l'utiliser le plus fréquemment. Dans les ateliers de grossissement, si le florfenicol reste très utilisé, l'association sulfamides et triméthoprime et l'oxytétracycline sont également beaucoup cités.

Il y a une grande diversité de noms déposés d'antibiotiques cités par les éleveurs. On compte cinq spécialités différentes à base de florfenicol, qui sont toutes des solutions injectables. Quatre spécialités à base de sulfamides sont mentionnées, toutes sous forme de solution buvable sauf le Trisulmix<sup>NDV</sup> qui existe à la fois sous forme de poudre et de solution (RCP Trisulmix poudre 2021). Les deux spécialités nommées contenant de l'oxytétracycline sont quant à elles sous forme de poudre.

Il a ensuite été demandé aux pisciculteurs sous quelle forme étaient les antibiotiques utilisés. En atelier éclosion, la forme solution est la plus utilisée avec plus de 90 % des réponses. Ce n'est pas le cas en atelier grossissement, où la forme poudre est également très utilisée (52,4% des médicaments employés).

## (2) Aliments utilisés

Les éleveurs ont décrit le type d'aliment sur lequel ils réalisaient régulièrement des enrobages d'antibiotiques. Les résultats sont présentés dans le tableau VII ci-dessous.

Tableau VII : Caractéristiques des aliments utilisés pour l'enrobage et taux de rationnement appliqué

	Taux de rationnement		Tailles des granulés		Teneur en matière grasse	
	Éclosion N = 19	Grossissement N = 22	Éclosion N = 21	Grossissement N = 22	Éclosion N = 17	Grossissement N = 21
<b>Moyenne</b>	1,85 %	0,88 %	1,34 mm	4,29 mm	16,92 %	24,28 %
<b>Écart type</b>	1,16 %	0,43 %	1,02 mm	2,56 mm	3,69 %	5,76 %
<b>Minimum</b>	1 %	0,4 %	0,4 mm	0,5 mm	13 %	15 %
<b>Maximum</b>	5 %	2,5 %	5 mm	9 mm	27 %	38 %

On remarque une tendance à la diminution des taux de rationnement appliqués en grossissement par rapport à ceux appliqués en éclosion. La taille des granulés et leur teneur en matière grasse ont au contraire tendance à augmenter dans les ateliers de grossissement.

### (3) Agent enrobant utilisé

Il a premièrement été demandé aux éleveurs s'ils utilisaient de l'huile comme agent enrobant. Les résultats sont présentés à travers la figure 17 ci-après.

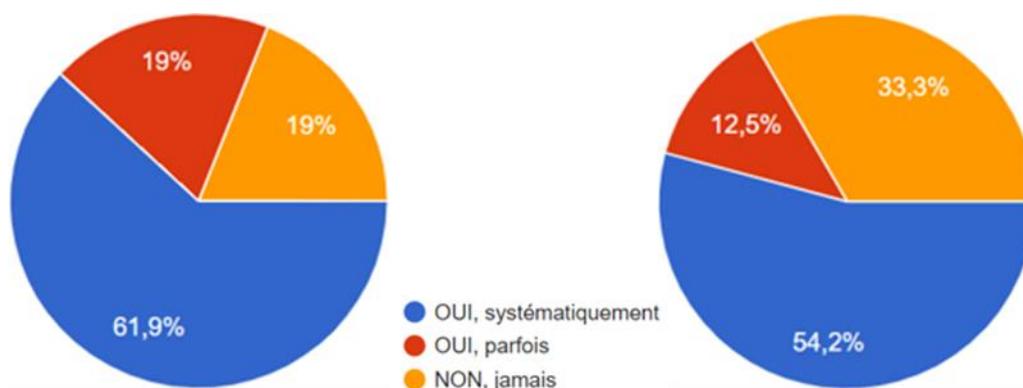


Figure 17 : Utilisation d'huile comme agent enrobant, en éclosion (à gauche, N = 21) et en grossissement (à droite, N = 24)

On constate que la majorité des éleveurs utilisent systématiquement de l'huile lors d'enrobage d'aliments à la ferme avec des antibiotiques. On remarque cependant que cette proportion est plus élevée en atelier éclosion qu'en atelier grossissement, où un tiers des pisciculteurs n'utilisent jamais d'huile. En ce qui concerne de type d'huile utilisé, les éleveurs ont renseigné s'ils utilisaient préférentiellement de l'huile végétale et de l'huile de poisson. Les réponses à cette question sont présentées à travers la figure 18.

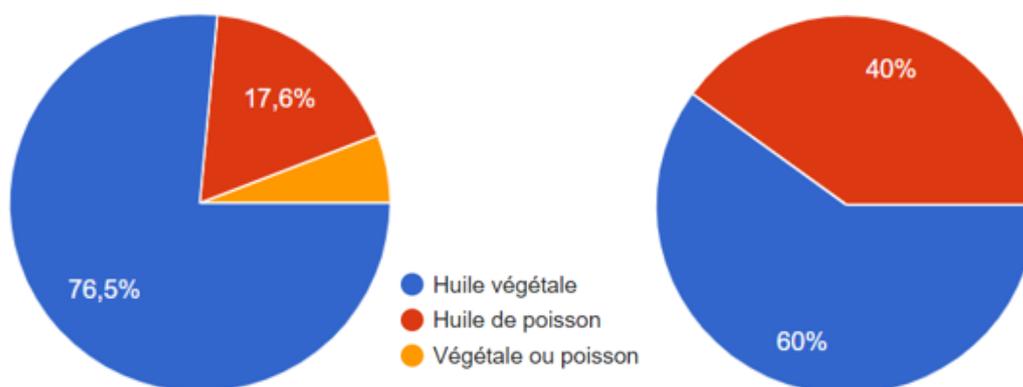


Figure 18 : Type d'huile utilisé pour l'enrobage d'aliments en éclosion (à gauche, N = 17) et en grossissement (à droite, N = 15)

Le type d'huile utilisé le plus fréquemment est l'huile végétale, pour 60 % des éleveurs en éclosion et pour plus de trois quarts d'entre eux en grossissement. L'huile de poisson quant à elle est utilisée par plus d'un tiers des éleveurs en éclosion, mais par moins d'un quart d'entre eux en grossissement.

Les huiles végétales les plus utilisées sont les huiles de colza et de tournesol, avec 45 % à 58 % d'éleveurs citant l'huile de tournesol et 27 % à 33 % citant d'huile de colza selon l'atelier. Concernant les huiles de poisson, la seule mentionnée par les pisciculteurs est l'huile de foie de morue.

L'utilisation d'agents enrobants autres que l'huile a également été citée par plus d'un quart des éleveurs en éclosion et en grossissement, comme le montre la figure 19.

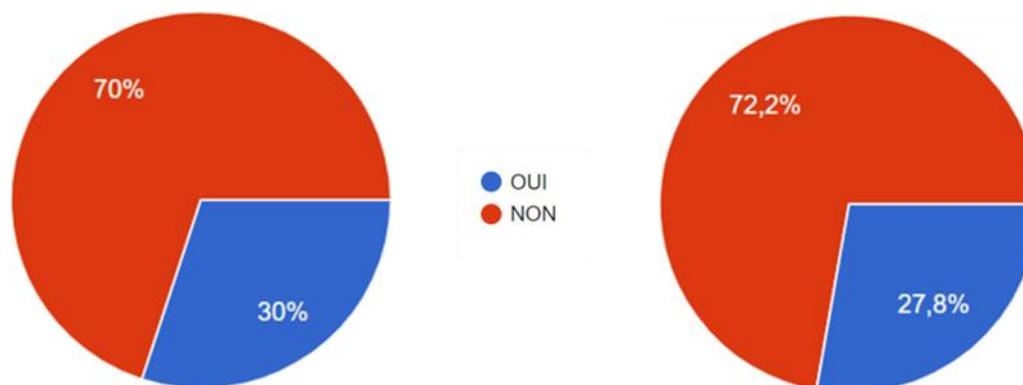


Figure 19 : Proportion de pisciculteurs utilisant un autre agent enrobant que de l'huile en éclosion (à gauche, N = 20) et en grossissement (à droite, N = 18)

L'agent enrobant autre que l'huile le plus cité par les éleveurs est le propylène glycol, cité quatre fois pour l'enrobage en éclosion et deux fois pour l'enrobage en grossissement. Il est suivi par l'éthanol et le glycérol, chaque produit ayant été cité deux fois, tous ateliers confondus. L'utilisation d'eau comme agent d'enrobage en grossissement est mentionnée une fois.

La quantité d'agent enrobant incorporée est particulièrement variable selon les pisciculteurs, comme l'illustre le tableau VIII. On remarque que les quantités varient de 5 ml/kg d'aliment à 80 ml/kg d'aliment en éclosion, soit une très grande disparité des pratiques. La disparité est également marquée en grossissement, où les quantités ajoutées vont de 1 ml/kg à 20 ml/kg. On peut également remarquer que l'ajout d'agent enrobant semble plus important en éclosion, avec 18,4 ml/kg en moyenne contre 7,6 ml/kg en moyenne en grossissement.

Tableau VIII : Quantité d'agent enrobant incorporé au mélange, en millilitres par kilogramme d'aliment préparé

	Éclosion (N = 14)	Grossissement (N = 14)
<b>Moyenne</b>	18,4 ml/kg	7,6 ml/kg
<b>Écart type</b>	23,5 ml/kg	4,7 ml/kg
<b>Minimum</b>	5 ml/kg	1 ml/kg
<b>Maximum</b>	80 ml/kg	20 ml/kg

Les figures 20 et 21 illustrent l'étape à laquelle l'agent enrobant est le plus généralement incorporé au mélange et son mode de versement.



Figure 20 : Ordre de versement de l'agent enrobant et de l'antibiotique sur l'aliment en éclosionerie (à gauche, N = 20) et en grossissement (à droite, N = 19)

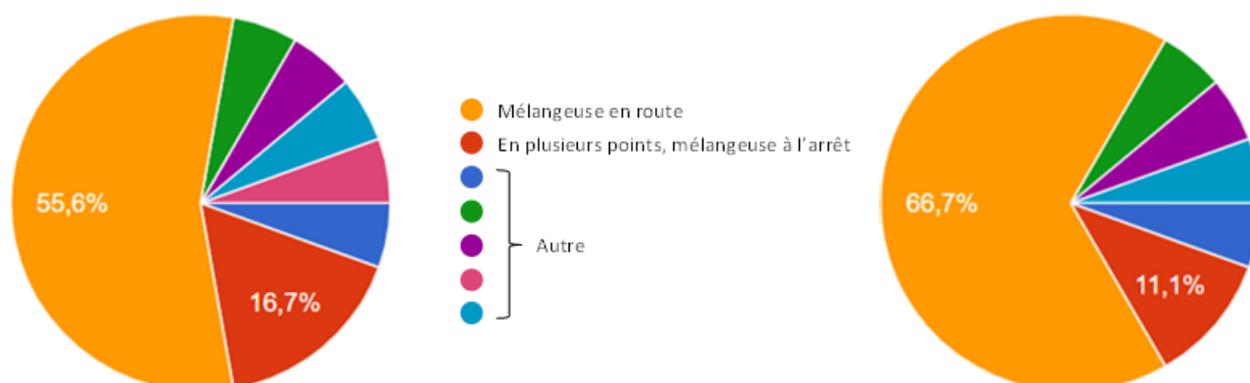


Figure 21 : Mode de versement de l'agent enrobant sur l'aliment en éclosionerie (à gauche, N = 18) et en grossissement (à droite, N = 18)

On remarque ainsi que le mélange préalable de l'huile et de l'agent enrobant est la technique la plus utilisée, par trois quarts des éleveurs en éclosionerie et un peu moins de la moitié d'entre eux en grossissement. En grossissement, presque un tiers des pisciculteurs mélangent l'antibiotique avant d'ajouter l'agent enrobant, pratique rare en éclosionerie.

L'agent enrobant est très majoritairement ajouté sur l'aliment pendant que la mélangeuse est en mouvement, en éclosionerie comme en grossissement. S'il est versé lorsque la mélangeuse est à l'arrêt, il est dans la plupart des cas réparti en plusieurs points.

#### (4) Réalisation du mélange

Cette portion du questionnaire porte sur les modalités de la réalisation du mélange. Les pisciculteurs ont d'abord renseigné les quantités de mélange préparées habituellement, ces résultats sont présentés dans le tableau IX. On note encore une fois une grande variabilité avec des quantités d'aliments préparées qui vont de 100 g à 300 kg en éclosionerie et de 5 kg à 100 kg en grossissement. Les moyennes des volumes préparés en éclosionerie et grossissement sont en revanche relativement proches, avec 29,9 kg et 44,8 kg respectivement.

Tableau IX : Quantité d'aliment enrobé préparé habituellement

	Écloserie (N = 20)	Grossissement (N = 24)
<b>Moyenne</b>	29,9 kg	44,8 kg
<b>Écart type</b>	62,1 kg	26,2 kg
<b>Minimum</b>	0,1 kg	5 kg
<b>Maximum</b>	300 kg	100 kg

En ce qui concerne le matériel utilisé pour la préparation du mélange, la majorité des pisciculteurs en éclosion utilisent une mélangeuse rotative de type bétonnière. Près d'un tiers d'entre eux utilisent préférentiellement le mélange manuel (figure 22). En grossissement en revanche, la totalité des éleveurs utilisent une mélangeuse de type bétonnière. Un tiers des mélangeuses utilisées dans cet atelier ne sont pas réservées à cet usage et servent également à préparer du béton.

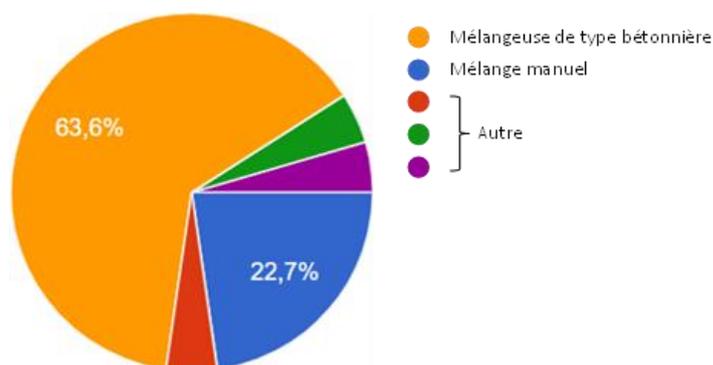


Figure 22 : Matériel utilisé pour la réalisation d'aliment enrobé en éclosion (N = 22)

Les figures 23 et 24 ci-après rendent compte du mode de versement de l'antibiotique dans le mélange, selon qu'il soit sous forme de solution ou de poudre, respectivement. Quelle que soit la forme galénique de l'antibiotique et l'atelier concerné, l'incorporation est faite majoritairement lorsque la mélangeuse est en mouvement. Lorsqu'elle ne l'est pas, la solution est répartie en plusieurs points ou pulvérisée sur l'aliment. Concernant le versement d'antibiotique sous forme de poudre en éclosion, seuls quatre éleveurs ont répondu à la question. Trois la versent pendant le fonctionnement de la mélangeuse, le quatrième ne précise pas sa technique.

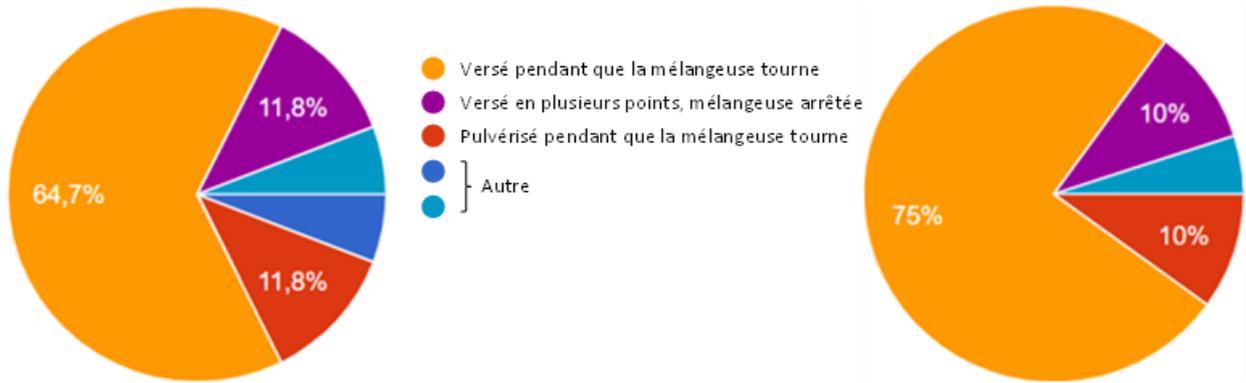


Figure 23 : Mode de versement de l'antibiotique dans le cadre d'une solution, en éclosion (à gauche, N = 17) et en grossissement (à droite, N = 20)

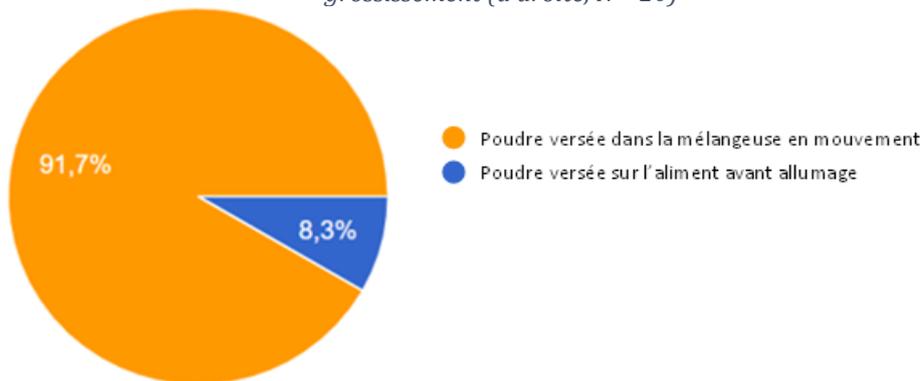


Figure 24 : Mode de versement de l'antibiotique dans le cadre d'une poudre, en grossissement (N = 12)

L'attention est ensuite portée sur le temps de mélange. Majoritairement de cinq minutes en éclosion et de 10 minutes en grossissement, il peut aller d'une à trente minutes selon les pisciculteurs (figure 25).



Figure 25 : Temps de mélange, en éclosion (à gauche, N = 22) et en grossissement (à droite, N = 23)

Au cours de ce brassage, la majorité des éleveurs ne changent pas le sens de rotation de la mélangeuse (figure 26). Cependant plus d'un tiers des éleveurs le font en éclosionerie, et près d'un quart en grossissement.

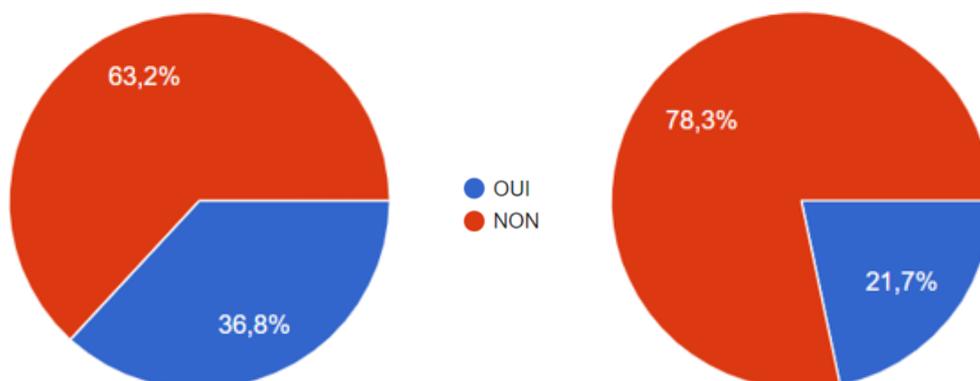


Figure 26 : Changement de rotation de la mélangeuse au cours du mélange, en éclosionerie (à gauche, N = 19) et en grossissement (à droite, N = 23)

### (5) Séchage du mélange

Après la réalisation du mélange, une pratique commune est de laisser sécher celui-ci avant de le distribuer aux poissons. Ainsi, dans la majorité des cas, l'aliment enrobé est distribué au moins 12 heures après sa préparation (figure 27). Dans près d'un quart des cas en revanche il est donné immédiatement, en éclosionerie comme en grossissement.

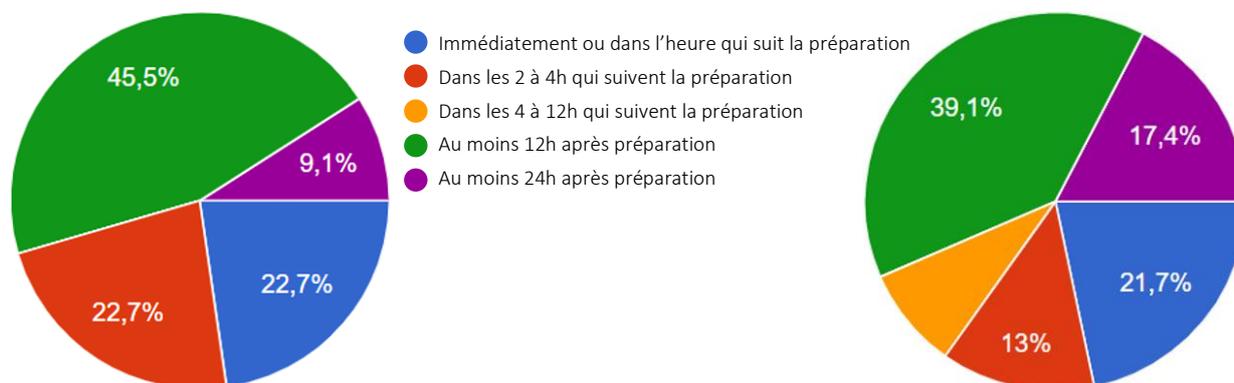


Figure 27 : Moment de la distribution par rapport à la réalisation du mélange, en éclosionerie (à gauche, N = 22) et en grossissement (à droite, N = 23)

### (6) Conservation du mélange

La dernière partie traitant des pratiques d'enrobage concerne les modalités de conservation du mélange réalisé. Les éleveurs ont d'abord renseigné la durée de conservation moyenne de leurs aliments enrobés ainsi que les spécificités de conservation et de distribution lors de l'astreinte du week-end. Les résultats sont présentés à travers la figure 28.

Les aliments sont majoritairement gardés moins de 24 heures, et plus des trois quarts de éleveurs les conservent quatre jours ou moins, tous ateliers confondus. Cependant certains éleveurs rapportent les conserver plus de dix jours. Majoritairement les pisciculteurs conservent les mêmes pratiques le week-end.



Figure 28 : Durées de conservation du mélange, en éclosion (à gauche, N = 22) et en grossissement (à droite, N = 23)

Pour la conservation des aliments, les pratiques en termes de température et de protection contre les rayons ultraviolets (UV) sont présentées à travers la figure 29 et la figure 30 ci-après.

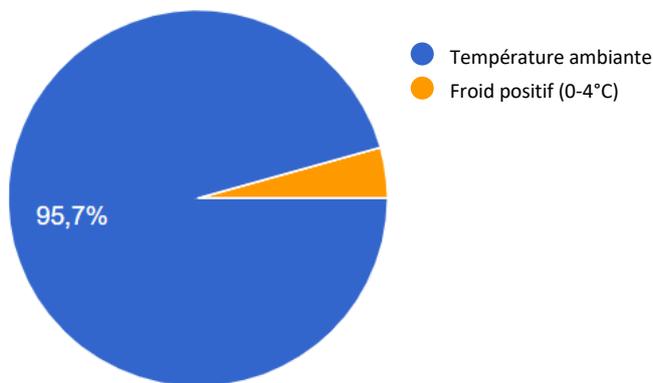


Figure 29 : Température de conservation des aliments en grossissement (N = 23)

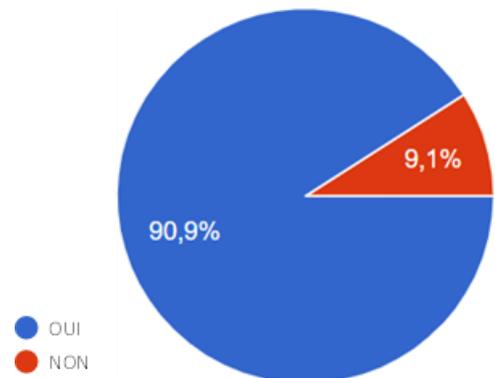


Figure 30 : Conservation de l'aliment à l'abri des rayons ultra-violets (UV) en éclosion et en grossissement (N = 22)

Les aliments enrobés sont conservés à température ambiante par une écrasante majorité des pisciculteurs en atelier grossissement. Dans le cadre de l'atelier éclosion, c'est la totalité des éleveurs qui stockent ainsi leurs aliments.

La quasi-totalité des éleveurs protège ses aliments enrobés des rayons UV pour les conserver. Cette proportion est identique en éclosion et en grossissement.

#### d) Avis et attentes des éleveurs

Les deux dernières questions sont ouvertes, et leur but est premièrement de mieux comprendre les attentes des pisciculteurs vis-à-vis d'un tel projet et secondement de recueillir leurs remarques.

Les réponses à la première question sont relativement nombreuses et plutôt homogènes. Plusieurs éleveurs font ainsi part de leurs attentes quant à une harmonisation et une optimisation des pratiques d'enrobage et mentionnent leur intérêt pour un guide de bonnes pratiques reprenant les conseils de leurs vétérinaires. Leurs objectifs sont de valider leurs techniques d'enrobage, d'optimiser leur utilisation des antibiotiques voire de limiter leurs traitements. Certains mentionnent un besoin d'information sur le matériel et les équipements de protection individuelle (EPI).

La deuxième question a récolté bien moins de réponses, un éleveur fait part de ses difficultés à adapter ses pratiques en fonction des lots traités (taille des poissons, température de l'eau). Deux éleveurs font aussi part de leur diminution d'utilisation d'antibiotiques ces dernières années.

### 3. Discussion

#### *a) Représentativité du sondage*

Les 45 éleveurs ayant répondu à ce sondage constituent près de 15 % des 307 piscicultures produisant de la truite et autres salmonidés destinés à la consommation en France (Agreste 2022). Le temps relativement court nécessaire pour compléter ce questionnaire a ainsi permis à une proportion de pisciculteurs satisfaisante de répondre.

Quarante et un des quarante-cinq pisciculteurs répondants sont basés dans l'Ouest de la France, soit en Nouvelle Aquitaine, soit en Bretagne - Normandie. Ces élevages représentent ainsi 38 % et 33 % des piscicultures de leurs zones respectives (Agreste 2022). La zone de production des Hauts de France est la grande absente de ce questionnaire, avec seulement un éleveur représenté sur 26, soit moins de 4 % des élevages. Or cette région est la première zone de production française de truites et autres salmonidés en termes de tonnage (Agreste 2022). Cette sur-représentation de l'Ouest de la France est probablement liée aux vétérinaires qui ont assuré la diffusion des questionnaires.

Pour qualifier la représentativité de ce sondage, le nombre d'éleveurs répondants, mais également le nombre de réponses par questions, doivent être considérés. Ainsi, si 45 éleveurs ont répondu au questionnaire, 22 ont rempli la partie éclosion et 26 la partie grossissement. Au sein de ces parties, certaines questions facultatives, et dépendantes des réponses précédentes, ont reçu très peu de réponses. Ainsi, seulement six éleveurs déclarent utiliser de l'huile de poisson en éclosion, et seulement trois d'entre eux précisent de quel type d'huile il s'agit.

Tous ces facteurs considérés, il est évident que ce questionnaire ne saurait servir d'inventaire exhaustif et parfaitement représentatif des pratiques d'enrobage à travers la France. Il nous permet cependant de dégager des tendances quant aux pratiques préférentiellement utilisées.

#### *b) Biais de méthodologie*

La formulation des questions d'un questionnaire ainsi que son paramétrage sont essentiels pour limiter les incompréhensions et garantir les réponses les plus précises et les plus exploitables. Si de nombreux efforts ont été faits dans ce sens lors de la réalisation du questionnaire, plusieurs biais demeurent, qui ont conduit à des réponses incohérentes.

D'abord en termes de paramétrage, à la question où les éleveurs choisissent les antibiotiques qu'ils utilisent par ordre de fréquence, le questionnaire en ligne permet d'attribuer plusieurs fois la note de 1 (le plus utilisé). Certains répondants ont ainsi attribué à deux antibiotiques ou plus la même note. Ainsi en éclosion, sur 21 éleveurs répondants, 20 disent utiliser le florfenicol le plus souvent, mais deux disent également utiliser l'oxytétracycline le plus souvent et deux encore disent utiliser l'association sulfamide et triméthoprime le plus souvent, ce qui peut sembler incohérent.

Toujours en termes de paramétrage, il a été choisi de ne pas répéter les questions afin de ne pas alourdir le questionnaire. Cela mène à une incohérence de réponses notamment pour des questions distantes les unes des autres dans le formulaire. Ceci peut expliquer que, bien qu'un seul éleveur déclare avoir utilisé un antibiotique sous forme de poudre pour de l'enrobage en éclosion, ce sont quatre éleveurs qui décrivent leurs pratiques d'enrobage à la question « Si vous utilisez un antibiotique sous forme de poudre solide, comment le disposez-vous dans la mélangeuse ? », toujours dans le chapitre éclosion.

Concernant la formulation des questions cette fois, l'utilisation de termes techniques doit être accompagnée d'une définition pour s'assurer la compréhension des répondants et limiter le biais de jargonage. Ce biais peut notamment intervenir lorsque l'on demande aux pisciculteurs de préciser si la solution utilisée est liposoluble ou hydrosoluble, ou encore dans le cadre de la différenciation entre éclosion et grossissement, par exemple.

### *c) Dichotomie éclosion et grossissement*

Le choix a été fait, lors de la rédaction de ce questionnaire, de diviser la phase d'élevage des truites arc-en-ciel en deux parties. D'abord la phase d'éclosion puis la phase de grossissement. Or, comme présenté en partie I.B.2.a), l'élevage de la truite arc-en-ciel est séparable en trois parties, éclosion, alevinage et grossissement, exclusion faite de la reproduction qui ne concerne que les poissons géniteurs (CIPA).

Ainsi il est possible que les éleveurs aient complété le questionnaire de deux façons différentes :

- Éclosion et alevinage puis grossissement
- Éclosion puis alevinage et grossissement

Ce constat peut permettre d'expliquer quelques réponses. Par exemple à la question portant sur la taille des granulés les plus couramment enrobés, certains éleveurs déclarent enrober des aliments allant jusqu'à 5 millimètres de diamètre en éclosion, quand d'autres déclarent enrober des aliments de 0,5 millimètres en grossissement. Il est ainsi probable que les premiers aient considéré l'alevinage comme faisant partie de l'éclosion et les seconds comme faisant partie du grossissement.

Ce biais méthodologique limite fortement la possibilité de comparaison entre les pratiques d'enrobage décrites en éclosion et en grossissement, comme il est probable que la dichotomie entre ces deux phases d'élevage ne soit pas la même pour tous les éleveurs. Il n'empêche cependant pas de dresser des tendances sur l'éventail des pratiques d'enrobage.

Pour la suite de cette étude, il a été décidé de regrouper l'éclosion et l'alevinage. Ainsi le terme éclosion désigne l'ensemble des deux phases.

### *d) Utilisation des antibiotiques et enrobage*

Conformément à ce qui est observé de manière générale en aquaculture, les antibiotiques sont majoritairement distribués aux poissons par voie orale et notamment *via* l'enrobage d'aliments directement à la ferme (Park *et al.* 2012 ; Barreto *et al.* 2018). Ces résultats sont également cohérents avec une étude menée en France sur le traitement de la furunculose en ferme trutticole (Carabin 2022).

### (1) Antibiotiques

L'antibiotique le plus employé pour l'enrobage par les éleveurs questionnés est le florfenicol, devant les sulfamides et l'oxytétracycline. Ce résultat diffère du sondage de Alday-Sanz *et al.* qui montrait en 2012 dans les trutticultures à travers le monde une utilisation préférentielle de l'oxytétracycline, le florfenicol prenant la deuxième position et les sulfamides la troisième. Cependant, ce sondage concernait le monde entier et se basait sur une majorité de réponses en provenance d'Amérique du Nord et d'Asie, bien que quelques réponses européennes, notamment espagnoles, soient mentionnées. Considérant que la population étudiée est différente et que cette étude prend place plus de dix ans après celle d'Alday-Sanz *et al.*, il n'est pas surprenant que le résultat soit différent.

Par ailleurs, notre sondage portait principalement sur l'utilisation des antibiotiques dans le cadre de l'enrobage d'aliment, ce qui participe à une sous-évaluation des autres formes disponibles, dont l'aliment médicamenteux.

### (2) Aliments enrobés

Les pisciculteurs répondants utilisent des aliments aux propriétés très différentes, d'une granulométrie allant de 0,4 mm à 9 mm pour une teneur en matière grasse allant de 13 % à 38 %. Conformément aux données de la littérature présentées en première partie de ce travail, les aliments de petit diamètre et de faible teneur en matière grasse sont utilisés en éclosérie, contre des aliments plus gros et plus riches en lipide en grossissement. Le taux de rationnement, situé entre 0,4 % et 5 % est plus élevé en éclosérie, conformément à nouveau aux recommandations de la littérature scientifique. Il est probable que les caractéristiques physiques de ces aliments aient une influence sur l'enrobage d'antibiotique. Ainsi il est primordial que des essais soient réalisés sur des aliments différents, bien qu'il ne soit pas possible de tester toutes les gammes d'aliments existantes.

### (3) Agents enrobants

L'utilisation d'agents enrobants décrite par les éleveurs est cohérente par rapport à ce qui est rapporté dans la littérature, bien que quelques réponses apportent des éléments nouveaux. Ainsi, l'agent enrobant le plus utilisé par les éleveurs est l'huile, notamment l'huile de table, mais également l'huile de poisson, telles que cité dans la documentation scientifique (Jarau *et al.* 2019 ; Zanuzzo *et al.* 2022).

Certains pisciculteurs utilisent cependant d'autres agents tels que le glycérol ou le propylène glycol, ce qui n'est pas une pratique couramment décrite dans la littérature. Ainsi, Huang et Nitin décrivent en 2019 l'utilisation du glycérol, mais il s'agit d'une association, notamment avec de l'isolat de protéines sériques (WPI), pour l'enrobage de bactériophages sur de l'aliment destiné aux poissons. Il est à noter que ces produits servent parfois de solvants aux solutions injectables utilisées par les éleveurs. Le glycérol est ainsi un excipient du Florfenikel<sup>NDV</sup> (RCP Florfenikel 2024). Il est possible que ce produit soit alors plutôt utilisé comme diluant que comme véritable agent enrobant.

Certains éleveurs déclarent également utiliser de l'éthanol comme agent enrobant. Bien que cette technique ne soit pas décrite dans le cadre de l'enrobage d'antibiotiques, elle est utilisée notamment pour la dilution d'hormones sexuelles avant leur pulvérisation à la surface des aliments (Treves-Brown 2000).

Les quantités décrites lors d'utilisation d'un agent enrobant sont extrêmement disparates, d'un atelier à l'autre mais aussi au sein d'un même atelier. Ces données illustrent d'abord l'absence d'homogénéisation des pratiques liée à la rareté de la documentation scientifique sur le sujet. On note une tendance à une utilisation d'agents enrobants en plus grande quantité en écloserie par rapport à l'atelier grossissement, où près d'un tiers des éleveurs n'en utilise pas. Si aucune donnée dans la littérature ne détaille ces usages, l'aliment utilisé, notamment sa granulométrie et sa teneur en matières grasses, plus importantes en grossissement, peut expliquer une utilisation d'agent enrobant différente entre ces deux ateliers. Les différentes formes galéniques utilisées, notamment la forme poudre en grossissement, peuvent également expliquer ces résultats, en supposant que le rôle de l'agent enrobant soit nécessaire en moindre quantité pour enrober de la poudre que pour diluer une solution par exemple.

#### (4) Réalisation du mélange

Toutes les bétonnières ne permettent pas un changement du sens de rotation lors du mélange, ce qui explique probablement que la majorité des éleveurs interrogés ne le réalisent pas au cours de l'enrobage des granulés.

Le mélange manuel est réalisé surtout en écloserie, en accord avec des volumes de mélange globalement plus faibles. Ce type de mélange est peu standardisable et très dépendant du manipulateur réalisant le brassage.

On remarque qu'en atelier grossissement, près d'un tiers des éleveurs mélangent l'antibiotique avec l'aliment avant d'ajouter l'agent enrobant, quand presque tous les pisciculteurs en écloserie mélangent préalablement antibiotique et agent enrobant. Cette différence peut peut-être s'expliquer par les différentes formes galéniques utilisées. En effet, comme montré plus tôt dans le questionnaire, les éleveurs utilisent plus d'antibiotique sous forme de poudre en atelier grossissement et plus de solutions en atelier écloserie. On peut ainsi supposer que les antibiotiques sous forme de poudre sont plutôt préalablement mélangés avec l'aliment avant ajout de l'agent enrobant en surface, et que les antibiotiques sous forme liquide sont plutôt préalablement mélangés avec cet agent, ce qui permet également de diluer l'antibiotique. Sur le RCP du produit Aquaflor<sup>NDV</sup>, un prémélange médicamenteux de florfenicol sous forme de poudre, les deux méthodes (mélange préalable avec l'huile ou ajout d'huile dans un second temps) sont proposées pour l'enrobage à la ferme (annexe 1).

En termes de quantité de mélange réalisée pour un même traitement, les réponses sont très variables, ce qui est explicable notamment par les très importants écarts de niveaux de production entre les piscicultures. Les différences s'expliquent également selon le stade physiologique de l'animal, la biomasse à traiter, ou la préparation régulière (chaque jour) ou unique (une préparation pour l'ensemble du traitement) par le pisciculteur. Dans le cas de préparations en petites quantités il est évident que le recours à la fabrication d'un aliment médicamenteux par une usine est impossible.

#### (5) Séchage

Une majorité des éleveurs laissent sécher les aliments enrobés avant de les distribuer. Il est envisageable empiriquement que laisser le temps aux granulés d'absorber l'antibiotique et l'agent enrobant va limiter le lessivage lors de la distribution. Cependant ce paramètre n'est pas

décrit comme un facteur de variation du lessivage d'antibiotique dans la littérature (Treves-Brown 2000 ; Duis *et al.* 1995 ; Barreto *et al.* 2018 ; Xu et Rogers 1994).

## (6) Conservation

Enfin, concernant le mode de conservation des aliments enrobés, les réponses des éleveurs sont globalement très homogènes. Ainsi les aliments sont généralement conservés à l'abri de la lumière et à température ambiante.

L'effet de la lumière, et notamment des UV, sur la dégradation des molécules antibiotiques est relativement bien connue. Ainsi, par exemple, l'oxytétracycline est une molécule qui se dégrade plus rapidement lors d'exposition à la lumière (Doi et Stoskopf 2000 ; Pouliquen *et al.* 2007), elle doit donc être conservée dans le noir (Noga 2010). Pour ce qui est du florfenicol, il est au contraire relativement stable face à l'exposition aux UV (Elimam *et al.* 2017 ; Pouliquen *et al.* 2007). Il est tout de même recommandé par les laboratoires de le conserver à l'abri de la lumière (RCP Florfenikel 2024). Au sujet des associations de sulfamides et base pyrimidique enfin, les deux molécules les plus utilisées par les éleveurs de ce questionnaire que sont la sulfadiazine et le triméthoprime sont stables au regard de l'exposition aux UV (Werner *et al.* 2005 ; Jung *et al.* 2008).

Bien que les modes de conservations soient très homogènes, les durées de conservations citées par les éleveurs sont très disparates. Si la majorité des aliments enrobés ne sont pas conservés plus de quatre jours, certains éleveurs vont jusqu'à dix jours. À titre de comparaison, les aliments médicamenteux réalisés par exemple à partir du prémélange PS Oxytétracycline Aquaculture<sup>NDV</sup> peuvent être conservés six mois. Il est à prendre en compte toutefois que la stabilité des antibiotiques sur l'aliment ou dans l'aliment peut être différente (Kelly 2013).

## Synthèse

Les données récoltées sont globalement en accord avec la littérature en ce qu'elles sont disparates en termes de méthodes de mélange, mais plutôt semblables quant aux matières premières et matériels utilisés. Si ce questionnaire ne saurait être considéré comme une liste exhaustive et parfaitement représentative de l'ensemble des pratiques de l'enrobage d'aliments en trutticulture française, il permet tout de même d'apporter des éléments de réponse à la question préliminaire : « Quelles sont les caractéristiques des piscicultures françaises et quelles sont leurs pratiques en termes d'utilisation des antibiotiques et notamment d'enrobage ? »

Ce travail préliminaire était indispensable à la réalisation du projet enr-EAU-bage, en ce qu'il va permettre de définir les bonnes pratiques en cohérence avec les moyens et les habitudes des pisciculteurs. Les réponses de ce questionnaire ont ainsi servi de base à l'élaboration des protocoles expérimentaux décrits au cours des parties suivantes de cette étude.

Ainsi, ce travail nous a permis de hiérarchiser les éléments à tester, et, dans certains cas, de restreindre les essais à conduire aux principaux usages. Ainsi, en partenariat avec les vétérinaires partenaires du projet, qui représentent une majorité des vétérinaires de la filière aquacole française, ce travail a permis de borner les essais aux éléments suivants :

- Le matériel à utiliser (une mélangeuse de type bétonnière)
- Les aliments à enrober ainsi que les taux de rationnement à appliquer (un aliment type grossissement et un aliment type éclosion)
- L'agent enrobant à incorporer (de l'huile de colza)
- Les antibiotiques retenus et les posologies associées (l'OTC et le FFN)

Cette concertation a également permis de cibler les modalités qu'il était souhaitable d'évaluer, notamment la quantité de mélange réalisable avec une mélangeuse de type bétonnière, les quantités d'agent enrobant à incorporer, les différentes méthodes d'incorporation des antibiotiques dans la mélangeuse ou la durée optimale de mélange.

## B. Détermination préliminaire des procédés inadaptés

L'objectif du projet enr-EAU-bage est de proposer un guide de bonnes pratiques sur la réalisation d'enrobage en ferme. Il n'est toutefois pas possible de tester l'ensemble des pratiques rencontrées sur le terrain. Ainsi, bien que questionnaire ait permis d'effectuer un premier tri des pratiques à tester pour répondre aux besoins de la filière, les questions restent nombreuses sur les modalités à privilégier.

Pour cette deuxième étape, plusieurs séries de tests ont donc été conduites avec pour objectif de déterminer les modalités qui, *via* une évaluation strictement visuelle de l'aliment enrobé, ne permettent pas une bonne qualité du mélange, et sont donc plutôt à déconseiller. Il s'agit donc ici d'essais préliminaires dont l'objectif est d'exclure les procédés les moins efficaces.

Ces essais préliminaires devaient nous permettre de répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les quantités minimales et maximales qu'il est raisonnable d'enrober, en fonction de la capacité de la mélangeuse utilisée ?
- Comment mélanger efficacement l'antibiotique avec l'agent enrobant avant incorporation de l'aliment ?
- Quelle quantité d'agent enrobant semble la plus appropriée en fonction de l'aliment et de l'antibiotique utilisé ?
- Comment déposer l'antibiotique sur l'aliment afin de garantir la meilleure praticité, sécurité mais également homogénéité ?
- Quelles durées de mélange semblent appropriées pour l'obtention d'une préparation homogène, en fonction de l'antibiotique et de l'aliment ?
- Comment nettoyer efficacement le tambour de la mélangeuse et le reste du matériel ?
- Quelle est l'influence du séchage sur le lessivage de l'antibiotique ?
- Quelles sont les pertes d'antibiotiques quantifiables lors de la préparation ?

Les expérimentations suivantes ont été réalisées en partenariat avec la société Halieutica sur son site de Pontivy (56).

### 1. Matériel et méthodes

#### a) *Matières premières et matériel*

##### (1) Médicaments antibiotiques

Tel que montré par le questionnaire, les antibiotiques utilisés par les pisciculteurs français sont majoritairement, voire presque exclusivement en écloserie, des solutions. Cependant, des poudres sont également utilisées, plutôt en grossissement. Le choix a été fait de réaliser les essais à partir de ces deux formes galéniques différentes, afin de répondre aux besoins du terrain.

Le florfénicol a été choisi car il est l'antibiotique le plus utilisé en trutticulture et, notamment, quasiment le seul antibiotique prescrit en écloserie en France. Il est utilisé essentiellement sous forme de solution injectable indiquée pour les animaux de production (porcs, ruminants). Le médicament vétérinaire qui a été retenu pour conduire nos essais est le Florfénicel<sup>NDV</sup>, une solution injectable à la concentration de 300 mg/ml de florfénicol. La posologie la plus

recommandée oscille entre 10 mg/kg et 20 mg/kg (Reimschuessel *et al.* 2013). Pour nos essais, après discussion avec les vétérinaires de la SNGTV sur leurs pratiques, il a été décidé d'un schéma posologique de 15 mg/kg par jour.

Le florfénicol a été mélangé au moyen d'un agitateur magnétique avec un colorant alimentaire liposoluble rouge (marque Décora™) dans le cadre de la réalisation de certains mélanges pour faciliter sa visualisation.

L'oxytétracycline a été sélectionnée pour sa forte utilisation en pisciculture en général, et en trutticulture française en particulier, comme montré dans notre sondage. Elle est utilisée essentiellement sous forme de poudre en France. Le médicament vétérinaire utilisé ici est l'Actitetra B<sup>NDV</sup>, une poudre destinée à être mélangée à l'eau de boisson des animaux de rente, à la concentration de 500 mg/g. Le schéma posologique est mal défini : le RCP du prémélange médicamenteux PS Oxytétracycline Aquaculture<sup>NDV</sup> préconise une posologie de 55 mg/kg, quand la littérature préconise des posologies allant jusqu'à 83 mg/kg (Reimschuessel *et al.* 2013). La plupart des vétérinaires prescripteurs français utilisent plutôt des posologies comprises entre 90 mg/kg et 100 mg/kg. Un travail est en cours au sein de l'équipe de recherche d'APPIFish pour réévaluer ce schéma posologique (projet MEDIC'EAU). La posologie finalement retenue pour la réalisation de nos mélanges est de 90 mg/kg par jour. Ce médicament vétérinaire est coloré en jaune, ce qui facilite l'évaluation visuelle de sa répartition à la surface des granulés.

## (2) Aliments et taux de rationnement

Toujours dans un souci de représenter la diversité des conditions d'enrobage en France, deux aliments ont été sélectionnés pour la réalisation des mélanges : un aliment type éclosion avec une faible granulométrie et une faible teneur en matière grasse, et un aliment type grossissement avec une granulométrie et une teneur en matière grasse plus élevées. Ces aliments sélectionnés sont représentatifs des principaux aliments utilisés sur le terrain. Ce sont tous deux des granulés extrudés, la principale forme utilisée en élevage. Volontairement, ces deux aliments ont été commandés chez 2 fournisseurs distincts (il existe en France 3 grands fournisseurs d'aliments pour truites : BioMar, Skretting et Le Gouessant Aquaculture). Les caractéristiques des aliments commerciaux utilisés sont présentées dans le tableau X ci-après.

Tableau X : Caractéristiques des aliments utilisés, d'après les fiches techniques présentées en annexe 4

	Fournisseur	Gamme	Type	Granulo- métrie	Teneur en matière grasse	Taux de rationnement appliqué
Type éclosion	Skretting	Nutra Sprint	Micro- granulés	0,5 mm	17-19 %	2 %
Type grossissement	Le Gouessant	NEO CDC	Granulés	5 mm	27 %	1 %

Les taux de rationnement appliqués pour les calculs de dose sont différents selon l'aliment utilisé, avec un taux de 2 % retenu pour l'aliment type éclosion et un taux de 1 % pour l'aliment type grossissement, afin d'être représentatif des usages sur le terrain, comme illustré par notre sondage.

Ce taux de rationnement nous permet de calculer la quantité d'antibiotique à incorporer au mélange via la formule présentée ci-après.

### Quantité d'antibiotique à incorporer (g ou ml)

$$= \frac{\text{quantité d'aliment (kg)}}{\text{taux de rationnement}} \times \frac{\text{posologie (mg/kg)}}{\text{concentration (mg/ml ou mg/g)}}$$

#### (3) Agent enrobant

L'agent enrobant utilisé pour la réalisation des mélanges est l'huile, car majoritairement utilisée par les pisciculteurs interrogés. Pour nos essais, l'huile végétale a été privilégiée, et notamment l'huile de colza. En effet, bien que l'huile de tournesol soit la plus utilisée par les éleveurs interrogés, l'huile de colza entre dans la composition des deux aliments utilisés, ce qui est apparu préférable.

#### (4) Matériel utilisé

Les mélanges sont réalisés au moyen d'une bétonnière rotative de 125 litres de capacité. Il s'agit en effet de la méthode de mélange la plus utilisée par les éleveurs, et la seule qui sera testée. Le mélange manuel parfois mentionné en écloserie est trop dépendant du manipulateur pour être inclus dans un protocole standardisé de bonnes pratiques. L'utilisation de robots de cuisine n'est pas apparue suffisamment fréquente pour justifier son évaluation dans ce projet.

Il a également été décidé de ne pas imposer un changement de sens de rotation pendant le mélange, comme ce qui est parfois rapporté. En effet, toutes les machines ne le permettent pas, ce qui pourrait induire une contrainte future pour les élevages déjà équipés qui ne souhaiteraient pas renouveler leur matériel. La machine utilisée avait une inclinaison réglable. Si des procédures de nettoyage ont été étudiées, il n'était pas prévu dans ce protocole de recherche des résidus de contamination croisée. Un nettoyage visuellement réussi nous a semblé suffisant pour l'usage des mélangeuses qui est faite sur le terrain.

Les quantités de matières premières incorporées sont mesurées au moyen de balances adaptées, en fonction des masses pesées, afin d'obtenir la plus grande précision possible. Les quantités de liquides sont mesurées au moyen d'éprouvettes graduées ou de seringues.

#### *b) Modalités de mélange fixées*

Comme montré à travers le questionnaire, le florfénicol est quasiment le seul antibiotique utilisé en écloserie, et sera donc le seul testé sur l'aliment de ce type. Les deux antibiotiques choisis seront en revanche testés sur l'aliment de type grossissement. Conformément aux pratiques les plus fréquemment décrites par les éleveurs et vétérinaires de la SNGTV, l'oxytétracycline sera d'abord mélangée à l'aliment puis enrobée d'huile dans un second temps. Au contraire, le florfénicol, sous forme de solution, sera d'abord mélangé à l'huile avant d'être enrobé sur l'aliment. Ces modalités sont résumées dans le tableau XI ci-après.

Tableau XI : Modalités de mélange sélectionnées

Procédure	Aliment	Antibiotique	Incorporation
A	Grossissement (GROS)	OTC	Antibiotique mélangé seul avec l'aliment avant ajout d'huile et nouveau mélange
B	Grossissement (GROS)	FFN	Antibiotique et huile mélangés ensemble avant dépôt sur l'aliment
C	Écloserie (EC)	FFN	Antibiotique et huile mélangés ensemble avant dépôt sur l'aliment

Cette nomenclature des procédures en fonction de l'aliment utilisé et de l'antibiotique incorporé est conservée tout au long de cette partie expérimentale et des suivantes.

### c) Modalités comparées

À partir des protocoles de mélanges fixes décrites ci-avant, différentes modalités seront testées et comparées afin de répondre à nos objectifs. Toutes les modalités n'ont pas été testées sur toutes les procédures, certains résultats obtenus ayant été considérés comme représentatifs des autres procédures. Les modalités comparées par procédure sont présentées à travers le tableau XII ci-après.

Tableau XII : Modalités de mélange testées lors des essais préliminaires

Procédure	A <i>Aliment GROS + OTC poudre</i>	B <i>Aliment GROS + FFN solution</i>	C <i>Aliment EC + FFN solution</i>
<b>Quantité de mélange réalisé</b>	De 0,5 à 40 kg	10 kg	De 0,5 à 40 kg
<b>Quantité d'huile de colza ajoutée</b>	De 5 à 30 ml/kg	10 ml/kg	De 5 à 50 ml/kg
<b>Méthode de mélange de l'antibiotique et de l'huile</b>		Au fouet	Au fouet
		Dans un récipient fermé secoué	
<b>Mode incorporation de l'antibiotique à l'aliment</b>	Dépôt sur l'aliment mélangeuse à l'arrêt	Dépôt sur l'aliment mélangeuse à l'arrêt	Dépôt sur l'aliment mélangeuse à l'arrêt
	Dépôt sur l'aliment mélangeuse en mouvement		Pulvérisation mélangeuse en fonctionnement
			Pistolet drogueur mélangeuse en fonctionnement
<b>Temps de brassage de l'aliment et de l'antibiotique</b>	5 minutes, 10 minutes et 15 minutes	5 minutes, 10 minutes et 15 minutes	5 minutes, 10 minutes et 15 minutes
<b>Temps de séchage</b>		De 0 à 24 heures	De 0 à 24 heures
<b>Nettoyage</b>	Mécanique	Karcher eau chaude	Karcher eau chaude
	Eau		

## d) Méthodes d'évaluation de l'efficacité

### (1) Appréciation visuelle

L'efficacité des méthodes de mélange est évaluée essentiellement visuellement, en s'intéressant à plusieurs critères :

- L'efficacité du mouvement de brassage, avec l'observation du tambour en rotation en essayant de repérer des portions mal mélangées ou non mélangées, est prise en compte. Des films et photographies ont été réalisés.
- L'aspect du granulé enrobé à l'issue du mélange. Ainsi lors d'utilisation d'oxytétracycline (procédure A), c'est la dispersion de la coloration jaune de la poudre qui est observée. Cette observation est d'abord réalisée par le manipulateur, puis suivie d'une lecture en aveugle réalisée par un manipulateur n'ayant pas réalisé le mélange. La luisance du granulé est aussi observée, au cours des procédures A, B ou C, et lors des essais comparant les quantités d'huiles incorporées. La quantité d'huile déposée sur une feuille de papier soutenant les granulés est notamment observée. Des photos ont été réalisées.
- L'aspect général dans la cuve est également évalué, notamment la présence de grumeaux et de dépôt sur les parois à la fin du mélange. Des photos ont été réalisées également.

Enfin, lors de certaines manipulations de la procédure C avec l'aliment éclosion, les aliments enrobés ont été tamisés afin de visualiser d'éventuels grumeaux.

### (2) Centrifugation

Afin d'évaluer l'impact de la quantité d'huile ajoutée ainsi que du temps de séchage sur la qualité de l'aliment enrobé, de façon plus efficace qu'avec une lecture visuelle, des échantillons de mélange ont été centrifugés. Les manipulations ont été réalisées au moyen d'une mini centrifugeuse LBX Instruments™ de modèle LBX MCEN-L05-001 et de rayon de centrifugation de 8 cm. La taille du culot d'huile ainsi formé est alors évaluée visuellement.

Les vitesses de rotations et temps passé en centrifugation ont été déterminés en fonction de l'aliment. En effet, un culot d'huile est observable très rapidement avec les granulés type grossissement, plus riches en lipides, contrairement à l'aliment type éclosion qui nécessite plus de temps de centrifugation à une vitesse plus élevée.

Les vitesses retenues en tour par minute (tr/min) ainsi que la force de centrifugation relative (FCR) associée sont présentées ci-après, avec les temps de centrifugation retenus.

- 30 secondes à 2000 tr/min (soit une FCR de 258 x g) pour l'aliment de type grossissement (procédures A et B)
- 5 minutes à 5000 tr/min (soit une FCR de 2236 x g) pour l'aliment de type éclosion (procédure C)

Cette centrifugation a été réalisée sur trois échantillons par mélange, immédiatement après enrobage, 12 heures plus tard et 24 heures plus tard.

### (3) Immersion

Dans le but de caractériser l'impact du temps de séchage de l'aliment enrobé sur le lessivage de l'antibiotique, mimant ce qu'il se passe lors de la distribution de l'aliment dans le bassin, une

observation visuelle du dépôt formé à la surface de l'eau lors de l'immersion de l'aliment a été réalisée. Ainsi, pour trois échantillons par mélange, l'aliment enrobé a été placé dans un récipient d'eau, immédiatement après enrobage, 12 heures plus tard et 24 heures plus tard.

## 2. Résultats

### a) Quantités minimales et maximales

Les quantités minimales d'aliments requises pour un mélange visuellement homogène ont été les mêmes, quelle que soit la procédure employée. Ainsi, une quantité de 0,5 kg d'aliment est trop faible pour être correctement brassé dans les pales (figure 31).



Figure 31 : Capture d'écran du film du mélange de 0,5 kg d'aliment EC. Les granulés (flèche bleue) passent sous la pale (flèche orange) sans être mélangés

À partir de deux kilogrammes d'aliment, les résultats sont hétérogènes. En effet le brassage a semblé visuellement correct lorsque la mélangeuse était dans la position la plus horizontale pour l'aliment éclosion. En revanche, sur d'autres essais, notamment avec l'aliment grossissement, le brassage n'apparaissait pas toujours homogène (une partie semblait y échapper et s'écouler le long de la cuve).

Pour des quantités d'aliments allant de 5 kg à 20 kg, que ce soit des aliments type éclosion ou type grossissement, le brassage est visuellement satisfaisant. La répartition de la couleur jaune donnée par l'oxytétracycline à la surface des granules est également visuellement satisfaisante.

À partir de 30 kg d'aliment enrobés, le brassage semble moins efficace, et l'homogénéité observée des granules enrobés avec la poudre jaune d'OTC est moins bonne (ce marqueur jaune est très facilement lisible, contrairement à la solution de florfenicol, même coloré). De plus, à partir de préparations de 30 kg, un nuage d'oxytétracycline est mis en suspension à l'extérieur du tambour au démarrage de la bétonnière (figure 32).

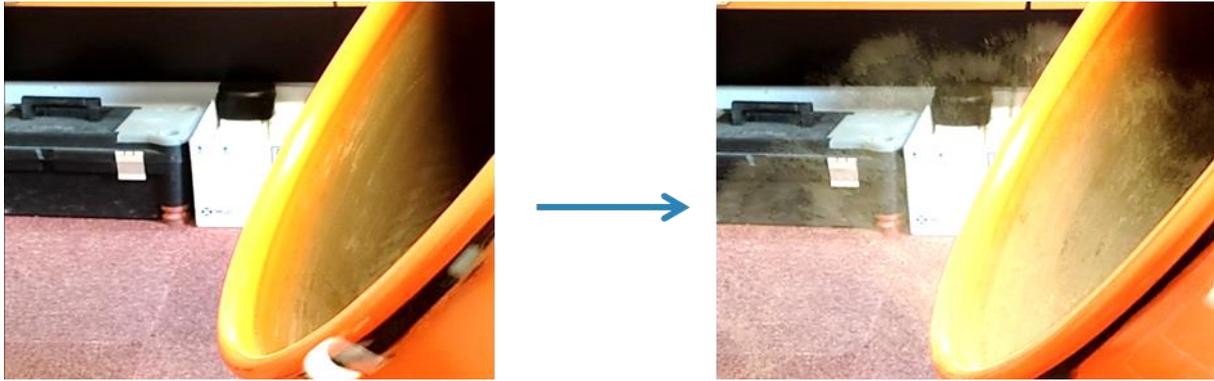


Figure 32 : Mise en évidence du nuage de poudre d'OTC observé en comparant le tambour de la mélangeuse avant (à gauche) et après (à droite) mise en route de celle-ci

### b) Quantité d'huile ajoutée

#### (1) Procédure A : Aliment GROS et OTC poudre

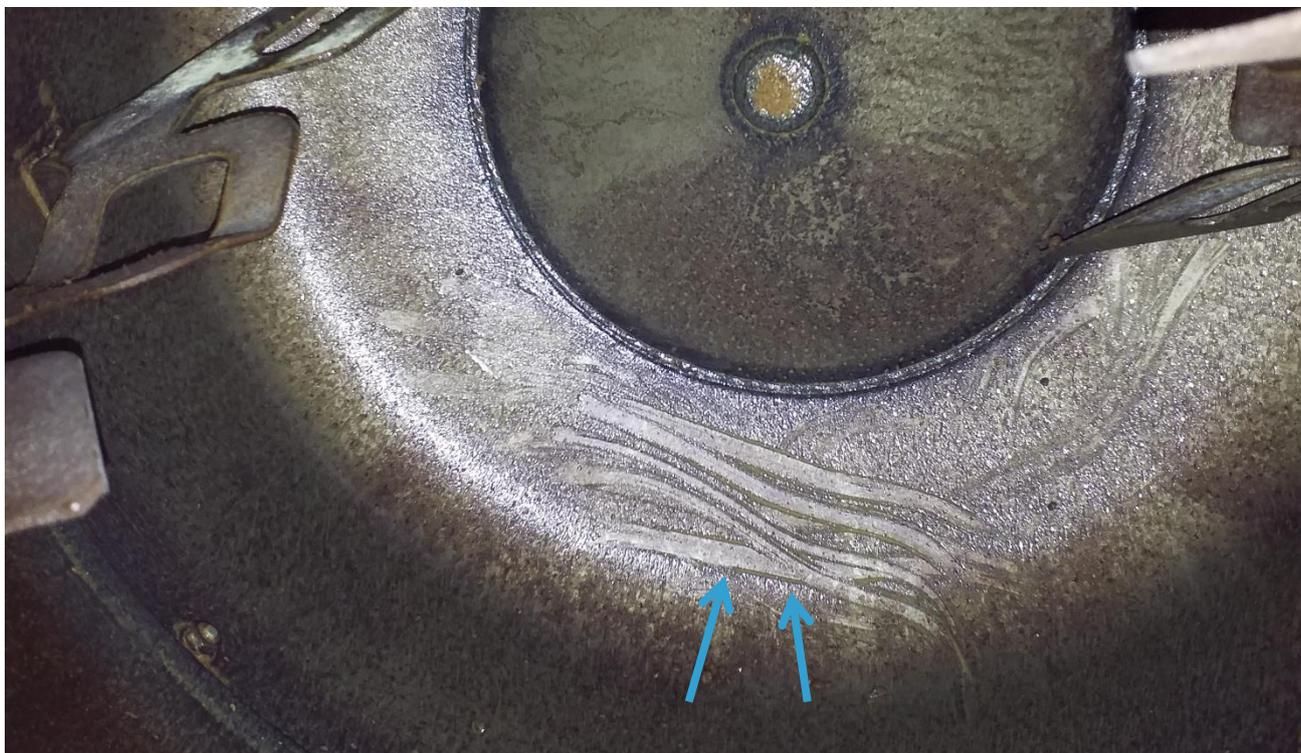
Les mélanges ont été réalisés avec 10 kg d'aliment, mélangés deux fois cinq minutes, avec une observation attentive des granulés entre les deux périodes de mélange. Les quantités d'huiles comparées sont de 5 ml/kg, 10 ml/kg, 15 ml/kg, 20 ml/kg et 30 ml/kg (figure 33).



Figure 33 : Aspect des granulés après mélange, selon la quantité d'huile incorporée (1 : 5 ml/kg, 2 : 10 ml/kg, 3 : 15 ml/kg, 4 : 20 ml/kg et 5 : 30 ml/kg)

Même sans ajouter d'huile, on observe déjà un film huileux sur l'aliment brut. Les granulés enrobés apparaissent de plus en plus luisants avec l'augmentation de la quantité d'huile ajoutée, sans qu'un palier puisse être clairement déterminé. À 30 ml/kg, toutefois, les granulés semblent dégorger d'huile, visiblement en excès.

Concernant l'aspect global du brassage dans la mélangeuse, si un léger film gras est visible sur les parois pour des quantités d'huile ajoutées de 5 à 10 ml/kg d'aliment, cette quantité de dépôt est significativement augmentée à partir de 15ml/kg. Le dépôt formé est d'autant plus visible qu'il est teinté de jaune (figure 34).



*Figure 34 : Dépôt graisseux en fond de tambour (flèches bleues) après mélange avec 20 ml/kg d'huile*

La centrifugation apporte le même constat avec une augmentation progressive de la taille du culot d'huile observé sans effet seuil particulier (30 ml/kg n'a pas été testé en centrifugation). Les résultats sont présentés ci-après, avec 3 échantillons d'un même mélange centrifugé à chaque fois (figure 35). On remarque que, bien que les culots d'huile obtenus soient de taille différente d'un flacon à l'autre au sein d'un même échantillon, la tendance est à l'augmentation de la taille du culot obtenu avec l'augmentation de la quantité d'huile ajoutée.



Figure 35 : Culots obtenus suite à la centrifugation des mélanges de la procédure A (OTC+GROS) (1 : 5 ml/kg, 2 : 10 ml/kg, 3 : 15 ml/kg, 4 : 20 ml/kg)

## (2) Procédure C : Aliment EC et FFN solution

Les mélanges ont été réalisés avec 10kg d'aliment mélangés deux fois cinq minutes, avec une observation attentive des granulés entre les deux périodes de mélange. L'antibiotique est versé sur l'aliment en plusieurs points pendant que la mélangeuse est à l'arrêt. Les quantités d'huiles testées sont les suivantes : 5 ml/kg, 10 ml/kg, 15 ml/kg, 20 ml/kg, 30 ml/kg, 40 ml/kg et 50 ml/kg.

L'aliment de type éclosionerie n'est pas luisant avant l'enrobage, contrairement à l'aliment de type grossissement. En termes d'aspect général du mélange, des grumeaux sont observés dans la cuve dès 5 ml/kg d'huile incorporée. Des plaques d'aliment collé à la cuve sont également notées là où l'huile a été versée directement sur la paroi du tambour. La taille de ces grumeaux semble augmenter progressivement à mesure qu'augmente la quantité d'huile incorporée. À partir de

40 ml/kg d'huile, on observe un dépôt en couronne au fond de la cuve, composé de granulés collés (figure 36).

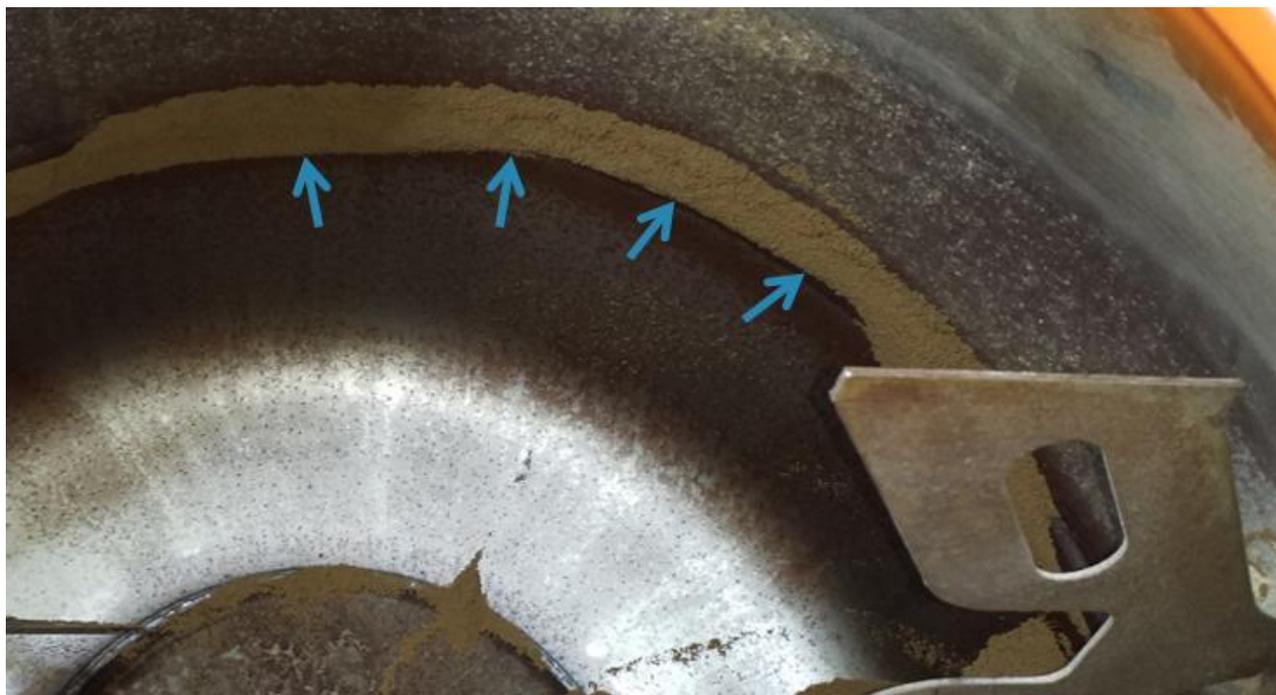


Figure 36 : Dépôt de granulés collés sur les parois (flèches bleues) observable à partir de 40 ml/kg d'huile ajoutée

Concernant l'aspect de l'aliment enrobé, il est visuellement identique à l'aliment vierge jusqu'au palier de 30 ml/kg d'huile ajoutée. À partir de cette quantité d'huile, l'aliment prend un aspect humide proche de celui de sable mouillé qu'il conserve jusqu'au dernier palier de 50ml/kg d'huile ajoutée. Ce changement d'aspect est illustré à travers la figure 37.



Figure 37 : Aliment vierge (à gauche) et aliment mélangé avec 50ml/kg d'huile (à droite)

Lors de la centrifugation des essais mélangés avec cinq, dix, quinze, vingt et trente millilitres d'huile, aucun culot n'est visible après 5 minutes. Un très léger culot est discernable à partir de 40 ml/kg d'huile incorporés et son volume augmente discrètement au palier suivant soit 50 ml/kg (figure 38).



Figure 38 : Culots obtenus suite à la centrifugation des mélanges de la procédure C (FFN+EC) (1 : 30 ml/kg, 2 : 40 ml/kg, 3 : 50 ml/kg)

### c) Méthode de mélange de l'antibiotique et de l'huile

Deux méthodes de mélange du florfénicol et de l'huile préalable à l'incorporation avec l'aliment sont testées, à savoir le mélange avec un fouet dans un saladier ou le secouage dans un récipient fermé (figure 39). L'antibiotique est coloré pour permettre une évaluation visuelle de l'homogénéité du mélange et les volumes d'antibiotiques et d'huile sont calculés selon les quantités nécessaires à la réalisation de la procédure B (aliment GROS et FFN) .

Les deux méthodes fournissent des résultats équivalents, permettant l'obtention d'une solution visuellement homogène en moins de 30 secondes d'agitation. Un léger déphasage des deux solutions est observable à partir de plusieurs heures de repos du mélange.



Figure 39 : Matériel utilisé pour le mélange du florfénicol (coloré en vert) et de l'huile de colza (à gauche le récipient destiné au secouage du mélange après mise en place du bouchon, à droite le saladier et le fouet)

#### d) *Mode de versement de l'antibiotique sur l'aliment*

##### (1) Procédures A et B : aliment GROS et OTC ou FFN

Les mélanges ont été réalisés avec 10 kg d'aliment et 10 ml/kg d'huile de colza.

Un premier essai a été exécuté, où l'oxytétracycline est versée sur l'aliment pendant le fonctionnement de la mélangeuse. Cette technique est peu pratique et ne permet pas de répartir la poudre de manière homogène, notamment parce que l'opérateur doit surtout prendre garde à ne pas toucher les pales en mouvement.

Ensuite, l'antibiotique, seul pour la procédure A, ou mélangé avec l'huile pour la procédure B, a été déposé en plusieurs points sur l'aliment lorsque la mélangeuse était à l'arrêt (figure 40). Ce protocole a permis d'obtenir une homogénéité des granulés visuellement satisfaisante, en termes de distribution de l'antibiotique et de l'huile. Le versement dans la mélangeuse en position verticale a été testé mais s'est révélé non satisfaisant, la poudre pouvant se déposer sur des zones mal brassées par la suite. Un dépôt sur l'aliment dans le positionnement du futur mélange semble être l'approche la plus efficace.



Figure 40 : Répartition de la poudre d'OTC à la surface de l'aliment, mélangeuse à l'arrêt

##### (2) Procédure C : Aliment EC et FFN solution

Les mélanges ont été réalisés avec 5 kg d'aliment et 10 ml/kg d'huile de colza. Le florfenicol a été coloré en rouge pour favoriser sa visibilité.

###### (a) *Versement sur l'aliment, mélangeuse à l'arrêt*

Comme déjà observé lors des essais visant à déterminer la quantité d'huile idéale à incorporer, lorsque le mélange de l'huile et de l'antibiotique est versé sur l'aliment avant la mise en route de la mélangeuse, même en plusieurs points (figure 41), la formation de grumeaux est observée. Les grumeaux se forment dès le début du mélange et ni leur nombre ni leur taille ne semble diminuer au cours du brassage. Ainsi, les grumeaux observés après cinq minutes de mélange (figure 42) sont récupérables sur un tamis à l'issue des dix minutes de mélange (figure 43).



Figure 41 : Versement en plusieurs points de l'huile et de l'antibiotique sur l'aliment



Figure 42 : Grumeaux (flèches bleues) visibles au fond de la mélangeuse après 5 minutes de mélange

À l'ouverture, les granulés contenus dans les grumeaux paraissent huileux et teintés de rouge (figure 44).

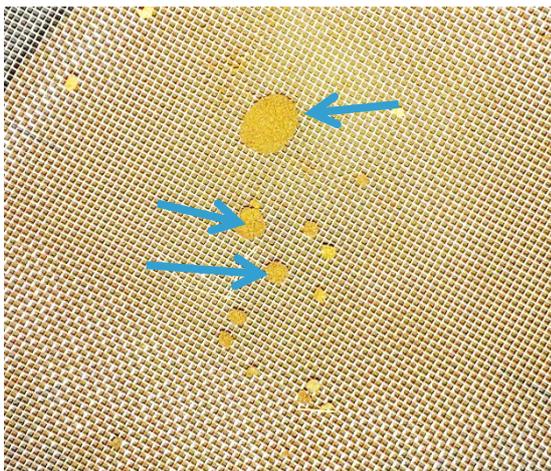


Figure 43 : Grumeaux (flèches bleues pour exemple) récupérables après tamisage des granulés mélangés 10 minutes



Figure 44 : Grumeaux récupérés à l'issue du mélange, après ouverture

Il a également été constaté que lors du versement tel qu'illustré figure 41, il était difficile de ne pas verser de solution directement sur la cuve et non sur l'aliment. Des granulés venaient ensuite s'agglomérer sur la paroi du tambour, là où le produit avait été versé. La plaque demeurait présente malgré dix minutes de mélange (figure 45).



Figure 45 : Plaque de granulés (flèche bleue) formée suite au versement de la solution, après 10 minutes de brassage

(b) Pulvérisation, mélangeuse en fonctionnement

Dans le but de limiter l'apparition de grumeaux, la même procédure a été réalisée au moyen d'un pulvérisateur de jardin, l'antibiotique et l'huile étant envoyés sur l'aliment pendant le brassage de la mélangeuse.

Cette méthode a permis de ne pas obtenir de grumeaux, ce qui a été vérifié ensuite par tamisage de l'ensemble de la cuve. Toutefois, de nombreux dépôts d'huile et d'antibiotiques sur lesquels s'agglomèrent des granulés sont notés sur les pales de la mélangeuse (figure 46).

Cette technique nécessite deux manipulateurs pour incliner le réservoir du pulvérisateur et limiter ainsi au minimum la perte de produit.



Figure 46 : Dépôt sur les pales de la mélangeuse après pulvérisation



Figure 47 : Dépôt sur les pales de la mélangeuse après utilisation du pistolet drogueur

### (c) Projection, mélangeuse en fonctionnement

Une troisième procédure a été testée, avec incorporation du mélange antibiotique et huile pendant le brassage de l'aliment, au moyen d'un pistolet drogueur tel que présenté figure 48.



Figure 48 : Type de pistolet drogueur utilisé (Coveto)

Cette méthode permet également de ne pas observer de grumeaux, y compris après tamisage du mélange. Les dépôts d'antibiotique et d'huile sur lesquels s'agglomèrent des granulés sont également observés sur les pales de la mélangeuse, quoi qu'en moindre quantité par rapport à l'utilisation du pulvérisateur (figure 47).

### e) Durée de fonctionnement de la mélangeuse

Au cours des essais présentés précédemment, les mélanges ont été brassés cinq minutes puis cinq minutes supplémentaires (soit dix minutes au total) puis 5 minutes supplémentaires (soit quinze minutes au total). Une évaluation visuelle est réalisée pour chaque temps de mélange.

#### (1) Procédure A : aliment GROS et OTC

Une légère différence d'homogénéité est observée entre les mélanges brassés cinq minutes et les mélanges brassés 10 min ou 15 min. Ainsi la distribution de la coloration jaune semble plus hétérogène lorsque que le temps de mélange est plus court. Aucune différence n'est notée entre dix et quinze minutes de mélange. La lecture a été effectuée par l'opérateur et en aveugle par une seconde personne.

#### (2) Procédures B et C : FFN et alim GROS ou EC

Aucune différence d'homogénéité n'est visuellement observée entre les échantillons, quel que soit le temps de brassage appliqué, malgré l'utilisation de colorants. Aucune conclusion n'est donc possible pour le FFN.

### f) Temps de séchage

La taille des culots obtenus après centrifugation ainsi que la quantité de dépôt formé à la surface de l'eau lors de l'immersion des granulés ont été comparées pour des mélanges de 10 kg d'aliments avec 10 ml/kg d'huile incorporés.

#### (1) Procédure B : Aliment GROS et FFN

Un culot d'huile est discernable suite à la centrifugation de l'aliment, mais sans différence visible entre un aliment tout juste mélangé, ou laissé à sécher 12 h ou 24 h. Un film gras est visible à la surface de l'eau lors de l'immersion des granulés, encore une fois sans différence visuellement observable entre un aliment tout juste mélangé, ou laissé à sécher 12 h et 24 h (figure 49).

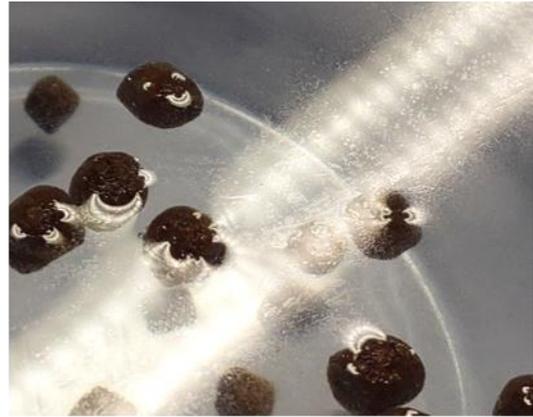
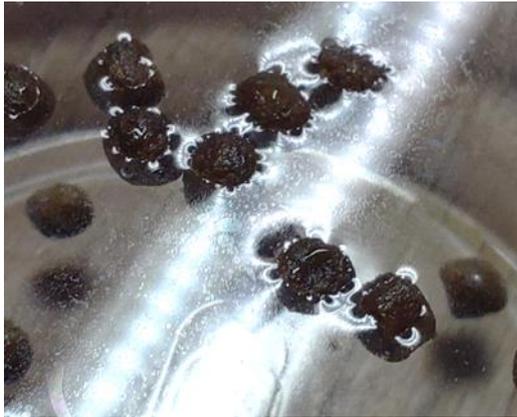


Figure 49 : Film lipidique à la surface de l'eau après immersion d'un même échantillon, immédiatement après sa préparation (à gauche) ou 12 h plus tard (à droite)

## (2) Procédure C : Aliment EC et FFN

Un très léger dépôt d'huile est visible suite à la centrifugation, en quantité identique immédiatement après mélange, après 12 h de séchage et après 24 h de séchage. Aucun film gras n'est visible à la surface de l'eau lors de l'immersion des granulés, quel que soit le temps de séchage appliqué aux aliments (figure 50).



Figure 50 : Absence de film lipidique à la surface de l'eau après immersion d'un même échantillon, immédiatement après sa préparation (à gauche) ou 12h plus tard (à droite)

## g) Nettoyage

Différents essais de nettoyage du tambour de la mélangeuse ont été menés après réalisation de mélanges de la procédure A, la poudre jaune de l'OTC étant facile à visualiser dans la cuve.

### (1) Nettoyage mécanique

Des essais de nettoyage de la bétonnière sont réalisés avec le brassage d'éléments assurant mécaniquement le décapage du fond de cuve.

Premièrement est brassé du son de blé pendant cinq minutes afin d'absorber une partie du film gras présent dans le tambour. Ce son est ensuite éliminé à l'aide d'une balayette. Les agrégats ainsi que le reste de film de gras sont alors retirés au moyen du brassage d'aliment vierge de type grossissement ou de graviers préalablement rincés pendant cinq minutes.

Ces deux essais ont donné lieu à des résultats visuellement insatisfaisants. Ainsi, lors de l'utilisation de l'aliment vierge, un film gras demeure en fond de cuve, et lors de l'utilisation des graviers, un fort dépôt terreux persiste dans la mélangeuse (figure 51).

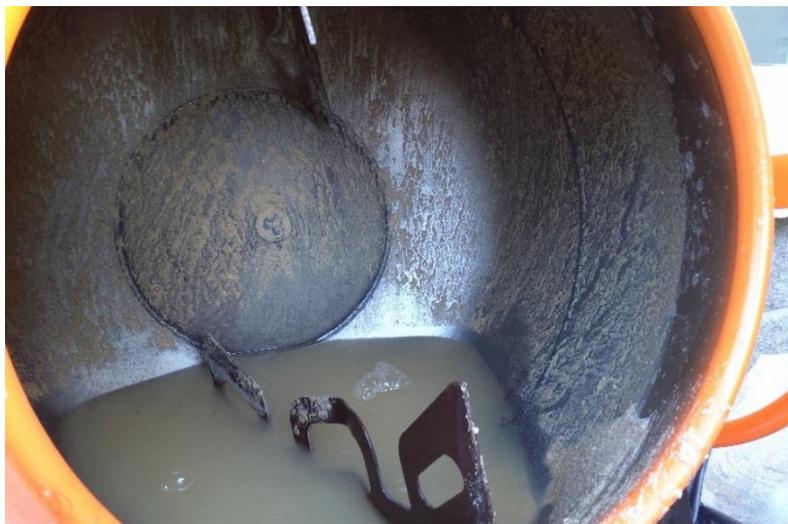


Figure 51 : Tambour de la mélangeuse après nettoyage à l'aide de graviers préalablement rincés

## (2) Nettoyage à l'eau

Lors du nettoyage de la bétonnière à l'eau, plusieurs modalités sont testées. D'abord à l'aide d'un nettoyeur haute pression de type Karcher, à l'eau chaude (45 °C) et à l'eau froide (17 °C), puis à l'éponge à l'aide d'un détergent.

Le nettoyage avec de l'eau envoyée à haute pression a montré des résultats visuellement très satisfaisants. À l'eau chaude comme à l'eau froide, après pulvérisation de l'eau dans la mélangeuse en mouvement, vidange de la cuve et renouvellement cinq fois de l'opération, le fond de cuve et les pales sont visuellement propres et exemptes de film huileux.

Le nettoyage à l'aide d'une éponge et de détergent est en revanche visuellement peu satisfaisant. En effet, après deux passages méticuleux et deux rinçages, de nombreux dépôts sont toujours visibles au niveau des pales et du fond de cuve (figure 52).



Figure 52 : tambour de la mélangeuse après deux nettoyages à l'aide d'une éponge et de détergent. Le dépôt d'OTC est montré par la flèche bleue

Le reste du matériel, tels que le saladier et le pulvérisateur sont nettoyés à l'eau chaude et au détergent. Le résultat est satisfaisant avec une absence de film lipidique sur leur surface à l'issue du nettoyage.

#### *h) Quantification des pertes de médicament*

Au cours de la réalisation des mélanges, une estimation des pertes de médicaments intervenant lors des transvasements a été réalisée en pesant les récipients avant et après utilisation. Pour l'oxytétracycline, la quantité de poudre déposée sur les parois du récipient utilisé pour la pesée est trop faible pour être évaluée. Cette estimation ne concerne donc que l'administration du florfenicol, dont le volume de résidu a été estimé lors de l'utilisation du pistolet drogueur.

Ces pertes ont été quantifiées au cours de deux essais lors de différentes étapes, pour 90 grammes de solution :

- Produit resté au fond du saladier après le mélange de l'antibiotique et de l'huile
- Produit resté au fond du pistolet drogueur après projection du mélange sur l'aliment

Les quantités de produit perdues allaient de 10 grammes à 14 grammes, soit 11 % à 14 % de la masse de solution totale de départ.

Si les quantités de produit restées au fond du saladier étaient constantes selon les essais (3 grammes à chaque fois), la quantité de produit retrouvée dans le pistolet allait de 6 grammes à 4 grammes.

### 3. Discussion

#### *a) Appréciation de l'efficacité des méthodes*

Ces essais avaient pour objectif de limiter le nombre d'essais finaux sur lesquels des dosages onéreux seraient effectués en effectuant un premier tri de certaines procédures inadaptées.

Dans nos essais préliminaires, le principal critère d'évaluation de l'homogénéité et de la qualité des mélanges était l'appréciation visuelle. Qu'elle soit réalisée par le manipulateur, ou à l'aveugle par un autre agent, qu'elle concerne l'aliment, le fond de cuve, le culot d'un échantillon centrifugé ou la surface d'un saladier rempli d'eau, il s'agit d'une méthode d'évaluation subjective et sujette à de nombreux biais.

L'intense coloration jaune de la poudre de l'OTC s'est très bien prêtée à cette lecture visuelle, et a permis facilement de discriminer certaines procédures par rapport à d'autres. *A contrario*, dans le cas du florfenicol, solution incolore et translucide, cette lecture a souvent été décevante. Il n'a ainsi pas été possible d'objectiver visuellement l'homogénéité des mélanges, sauf lorsque ce défaut d'homogénéité était traduit par la présence de grumeaux. Le colorant alimentaire utilisé, translucide également, ne permettait pas une coloration suffisante du produit pour le visualiser à la surface des granulés, malgré l'essai de plusieurs couleurs différentes.

D'autres types de marqueurs existent et leur usage a été envisagé lors de ces essais. Par exemple, les Micro-tracer™ sont des particules de fer colorées par des colorants alimentaires. Elles peuvent ensuite être séparées magnétiquement de l'aliment auquel elles sont mélangées pour obtenir une valeur qualitative ou quantitative du traceur dans l'aliment (Thiex *et al.* 2019 ;

Micro-tracers™). Cette extraction peut être réalisée en moins de deux minutes sur le lieu de la réalisation du mélange. L'utilisation de ces traceurs est ainsi décrite comme un outil efficace de détermination de l'efficacité d'un processus de mélange (Sakhno *et al.* 2020 ; Thiex *et al.* 2019 ; Rocha *et al.* 2015). Leur coût prohibitif a été le principal frein à leur utilisation dans le cadre de ces essais préliminaires. Par ailleurs, leur forme poudre ne répondait pas aux particularités de la solution de florfenicol, mais plutôt aux spécificités de la poudre d'oxytétracycline (Micro-tracers™).

S'il est possible d'utiliser des analogues liquides de méthionine, ou de la L-lysine liquide, comme marqueurs de la qualité de brassage sur des mélanges humides, une analyse de laboratoire est nécessaire pour leur quantification, avec un coût substantiel, ce qui limite leur intérêt dans le cadre de ces essais préliminaires (Rocha *et al.* 2015).

### *b) Intérêt de la centrifugation pour l'évaluation de l'homogénéité*

La centrifugation des aliments a été réalisée afin de comparer les résultats obtenus entre les différentes quantités d'huile et différentes durées de séchage. Cependant, elle a présenté un résultat inattendu qui était une différence de taille de culot obtenu au sein de flacons issus du même échantillon d'aliment. On pourrait ainsi penser que cette différence de taille est le reflet d'une répartition inégale de l'huile et donc, peut-être, du médicament à la surface de l'aliment.

Les flacons utilisés ont une contenance de 7 ml, un volume relativement faible par rapport à la taille des granulés de type grossissement, ce qui correspondait à moins de 20 granulés par tubes. Il est ainsi possible qu'à cause de la faible quantité de granulés, leur répartition spatiale au sein du tube diffère d'un tube à l'autre, ce qui pourrait avoir un impact sur le culot. De plus, les flacons ont été remplis chacun jusqu'à une graduation de 7 ml, mais les granulés n'ont pas été comptés. Ainsi certains flacons contenaient un ou plusieurs granulés de plus que les autres, pouvant également expliquer la différence observée dans la taille des culots. Ces explications ne concernent que l'aliment de type grossissement, mais on a noté une différence de taille de culot moins importante pour l'aliment de type éclosion, moins affecté par ces problèmes.

Ainsi, il semble que les inégalités en termes de taille de culot d'huile observées au sein d'un même échantillon soient plus le reflet d'inégalités de remplissage des tubes que d'un défaut d'homogénéité du mélange.

### *c) Quantité de mélange réalisé*

Les quantités d'aliments permettant une bonne qualité de mélange sont à raisonner en fonction de la taille de la mélangeuse utilisée. Ainsi, puisqu'au-delà de 20 kilogrammes d'aliments préparés dans notre bétonnière de 125 litres de capacité, la qualité du mélange ne semblait pas satisfaisante, il est raisonnable de ne pas réaliser de mélanges représentant plus de 20 % de la mélangeuse en rapport masse sur volume.

Pour les quantités minimales à préparer, le facteur limitant est le volume de granulés nécessaire pour assurer un brassage satisfaisant par les pales. Les éleveurs doivent ainsi s'assurer que le mélange est suffisamment volumineux pour être correctement brassé. Dans notre cas, les résultats des mélanges de 2 kg d'aliment ou moins n'étaient pas toujours satisfaisants. Ainsi, il ne faudrait pas descendre en dessous de 5 kg, soit 4 % des capacités de la mélangeuse en rapport

masse/volume. Par ailleurs, tout particulièrement pour les faibles volumes, l'inclinaison du tambour le plus horizontalement possible permet d'obtenir les meilleurs résultats.

Il est possible d'exprimer ces rapports masse/volume en rapports volume/volume en fonction de la masse volumique des aliments utilisés. La masse volumique mesurée pour l'aliment de type écloserie utilisé est de 614 g/l et de 598 g/l pour l'aliment de type grossissement. Ainsi, la quantité idéale d'aliment à enrober devrait être comprise entre 6,5 % à 6,7 % et 26 % à 27 % de la capacité du tambour de la mélangeuse selon le type d'aliment préparé.

Six éleveurs sur vingt déclarent, au cours du questionnaire, préparer parfois des mélanges de moins de deux kilogrammes, quantité pour laquelle le mélange dans une bétonnière de 125 litres semble inefficace. Les éleveurs déclarent majoritairement mélanger manuellement quand ils n'utilisent pas de bétonnière, mais il est possible aussi d'envisager l'usage d'un robot de cuisine pour ces petits volumes, dont l'usage serait plus facile à standardiser. Pour autant, dans ce projet, il a été décidé de ne pas tester ce type de matériel.

#### *d) Quantité d'huile de colza ajoutée*

Les résultats obtenus lors de la centrifugation des aliments n'ont pas été très probants pour discriminer les quantités d'huile à privilégier.

En revanche, si l'appréciation visuelle de la qualité du mélange de permet pas de trancher en faveur d'une quantité d'huile idéale par procédure, elle permet d'établir des limites à ne pas dépasser. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, ne pas dépasser les seuils de 15 ml/kg sur des aliments de type grossissement et de 40 ml/kg sur des aliments de type écloserie semble pertinent au regard des dépôts observés en fond de tambour.

Cette différence peut s'expliquer par le fait que l'aliment de type écloserie est moins riche en matière grasse que l'aliment de type grossissement, et de plus faible granulométrie, soit avec une surface de contact plus importante par rapport à leur volume. Ces deux facteurs peuvent expliquer la tolérance supérieure de cet aliment en termes de quantité d'huile ajoutée. La modification des propriétés de l'aliment par l'adjonction d'huile et notamment l'adéquation avec les besoins des animaux ou l'appétence sera également à prendre en considération dans les recommandations finales qui seront proposées.

#### *e) Méthode de mélange de l'antibiotique et de l'huile*

Les deux techniques ont montré des résultats similaires, ainsi nous avons choisi de conserver le mélange au saladier pour des questions de praticité, notamment en termes de nettoyage, mais également parce qu'il plus facile de récupérer le dépôt de produit formé sur les parois.

#### *f) Mode incorporation de l'antibiotique à l'aliment*

Le versement de l'antibiotique sur l'aliment avant de mettre en route la mélangeuse n'a pas été un obstacle à l'obtention d'une homogénéité visuellement satisfaisante pour la poudre d'OTC. Le dépôt lors du fonctionnement de la mélangeuse est difficile en raison du risque d'introduire la main dans le mécanisme en fonctionnement. De ce fait, l'opérateur, concentré à ne pas toucher les pales, effectue un versement très aléatoire qui n'est pas en faveur d'un meilleur mélange. Il n'est donc pas apparu pertinent de continuer sur cette voie pour le médicament sous forme de poudre.

Pour le florfénicol sur l'aliment de grossissement, il n'a pas été possible de conclure avec nos essais préliminaires, à cause de l'impossibilité de lire l'homogénéité des mélanges obtenus.

En revanche, lors d'utilisation d'un aliment de plus faible granulométrie, les performances d'un dépôt sur mélangeuse arrêtée n'ont pas été satisfaisantes, conduisant à la réalisation d'essais avec d'autres méthodes d'incorporation. Le tableau suivant résume les performances respectives de chaque méthode.

Tableau XIII : Avantages et inconvénients des différents modes d'incorporation sur l'aliment type éclosion ( - - : mauvaise performance, - : performance médiocre, + : bonne performance, ++ : excellente performance)

Mode d'incorporation	Homogénéité	Perte de produit	Praticité	Sécurité
Versement sur mélangeuse à l'arrêt	- - <i>Grumeaux</i>	+ +	+ +	+ +
Versement sur mélangeuse en mouvement	- <i>Pas de grumeaux Plaques de granulés collés Répartition du produit difficile</i>	+ +	- - <i>Versement difficile surtout lors d'inclinaison du tambour vers le haut</i>	- - <i>Introduction de la main dans la mélangeuse</i>
Pulvérisation	+ <i>Pas de grumeaux Dépôt marqué sur les pales</i>	- - <i>Non adapté aux petits volumes Fortes pertes de produit dans le tuyau</i>	- - <i>Nécessite deux manipulateurs Nettoyage fastidieux</i>	- <i>Prolongement de la main</i>
Projection au pistolet drogueur	+ + <i>Pas de grumeaux Dépôt modéré sur les pales</i>	- <i>Nombreux transvasements</i>	+ + <i>Facile d'emploi et de nettoyage, démontable</i>	- <i>Prolongement de la main</i>

Si le versement dans la mélangeuse à l'arrêt est plus facile, plus pratique et le plus sécuritaire, ses mauvaises performances en termes d'homogénéité ne nous permettent pas de conseiller son utilisation. La meilleure alternative présente, bien qu'imparfaite, est l'utilisation d'un pistolet drogueur. Par extrapolation, il a été considéré que l'utilisation d'un pistolet drogueur devrait être privilégié avec un antibiotique sous forme de solution, y compris pour des aliments de type grossissement.

#### g) Temps de brassage de l'aliment et de l'antibiotique

Pour l'oxytétracycline, il est apparu qu'un mélange de 5 min n'était pas suffisant pour obtenir une bonne homogénéité visuelle. De fait, cette durée de mélange a été exclue des essais finaux. Pour le florfénicol, par contre, aucune conclusion n'a pu être tirée de nos essais.

### h) Temps de séchage

Aucune influence du temps de séchage n'a pu être objectivée visuellement aussi bien sur la rétention de l'huile et de l'antibiotique par le granulé que sur les risques de lessivage lors de la mise dans les bassins. Ce résultat peut s'expliquer par la faible sensibilité des méthodes d'observation visuelle. La pratique du séchage reste très utilisée sur le terrain sans que l'on puisse en confirmer ni en infirmer l'intérêt. Quant à la réalisation de ce séchage, certaines études font mention d'un séchage à l'air libre avec les granulés étalés sur des plaques parfois chauffantes (Barreto *et al.* 2018), contrairement aux échantillons de cet essai, conservés dans des bocal hermétiquement fermés. Il est donc possible que la procédure que nous avons retenue n'ait pas permis un séchage suffisant pour en mesurer visuellement l'intérêt.

Dans le cadre de cette étude, le lessivage n'était pas un critère principal, il ne sera donc pas évalué au-delà de ces essais préliminaires.

### i) Nettoyage

Différentes méthodes de nettoyage ont été testées, au regard de l'inefficacité apparente du nettoyage mécanique. Les avantages et inconvénients de ces méthodes sont présentées à travers le tableau XIV ci-après.

Tableau XIV : Avantages et inconvénients des différents modes de nettoyage (- - : mauvaise performance, - : performance médiocre, + : bonne performance, ++ : excellente performance)

Mode de nettoyage	Résultat	Praticité	Matériel nécessaire
Nettoyage mécanique	- - à - <i>Selon le matériau utilisé</i>	- <i>Peu fastidieux mais long</i>	+ + <i>Matériaux faciles à trouver</i>
Nettoyeur à haute pression	+ +	+ + <i>Relativement court Difficile pour l'opérateur de rester sec</i>	- <i>Achat d'un nettoyeur à haute pression Ne nécessite pas d'eau chaude</i>
Nettoyage à l'éponge	- - <i>Dépôt marqué sur les pâles</i>	- - <i>Fastidieux et long</i>	+ + <i>Matériaux faciles à trouver</i>

Ainsi le nettoyage à l'aide d'un appareil de type Karcher est supérieur en termes de performances. De nombreux pisciculteurs étant déjà équipés de ce type de matériel pour le nettoyage de leurs bassins, cette solution semble adaptée aux fermes aquacoles.

Il n'est pas prévu dans cette étude d'évaluer les risques de contamination croisée suite à un nettoyage du matériel. Nous avons donc considéré qu'un nettoyage visuellement satisfaisant était suffisant. L'utilisation des bétonnières pour d'autres usages que la fabrication d'aliments

enrobés semble une problématique plus importante que le risque de résidus en faible quantité dans une mélangeuse propre. Quelle que soit la méthode de nettoyage privilégiée, la question de la gestion des résidus de lavage, qu'il s'agisse d'eau, de graviers ou de son, reste ouverte quant au risque que présentent ces rejets de molécules antibiotiques dans l'environnement.

### j) Quantification de la quantité d'antibiotique perdue

La pesée des récipients avant et après utilisation nous a permis d'estimer les pertes de produit à 11 % à 14 % de la masse de solution de départ lors de l'utilisation du pistolet drogueur. La densité de la solution de départ étant supposée la même que celle des pertes mesurées, une perte de 11 % à 14 % par rapport à la masse de départ correspond à la perte de la même proportion par rapport au volume de départ. Dans ce volume de solution de départ, la proportion d'antibiotique et d'huile change en fonction de la posologie appliquée, du rationnement des animaux et de la quantité d'huile incorporée. Deux exemples sont présentés à travers le tableau XV à titre d'illustration, pour une posologie de 15 mg/kg de florfénicol et une solution contenant 300 mg/ml d'antibiotique.

Tableau XV : Proportion de volume d'antibiotique sur le volume total de solution en fonction des cas

	Rationnement appliqué	Volume de FFN à peser (par kg d'aliment)	Quantité d'huile ajoutée (par kg d'aliment)	Rapport du volume d'antibiotique sur volume total
<b>Exemple 1</b>	1 %	5 ml	10 ml	33 %
<b>Exemple 2</b>	2 %	2,5 ml	30 ml	7,7 %

Ainsi, selon les cas de figures rencontrés à travers ces essais, le volume de florfénicol peut représenter un tiers de la solution, ou moins de 10 %. De plus, d'autres cas de figures ont été décrits dans le questionnaire présenté en partie A et non testés ici, où l'antibiotique représente 50 % du volume de la solution, voire la totalité quand les pisciculteurs n'utilisent pas d'huile. Une perte de volume de solution de 11 % à 14 % peut alors correspondre à une perte d'antibiotique équivalente s'il n'y a pas d'ajout d'huile, ou une perte de florfénicol bien plus faible, jusqu'à moins de 1 % selon les cas.

Il est primordial cependant de garder en mémoire que cette quantification ne concerne pas toutes les pertes. En effet les dépôts de solution présents au fond du tambour de la mélangeuse n'ont pas pu être pesés. Il faut également demeurer prudents quant à la précision des balances utilisées pour peser des masses de moins de 10 grammes dans des saladiers de plus de 700 grammes. De plus, il ne nous a pas été possible de mesurer les pertes lors de l'utilisation d'OTC, mais elles nous ont semblées moindres par rapport à celles mesurées ici, notamment grâce à un nombre réduit de transvasements.

Ce travail nous a semblé nécessaire pour estimer la pertinence d'une majoration de la dose incorporée dans l'aliment, afin de s'approcher de la teneur cible attendue dans l'aliment. En effet, parallèlement à ces essais, la mise au point analytique par le laboratoire partenaire a révélé des teneurs de l'aliment toutes inférieures aux valeurs cibles. Ces données confirment d'autres données en cours de publication obtenues au sein de l'équipe APPIFish (Viel *et al.* 2024).

## Synthèse

À l'issue de ces essais préliminaires, les procédures présentant les meilleurs résultats en termes de praticité et d'efficacité pour l'enrobage d'antibiotique sur les aliments ont été déterminées, en accord avec les vétérinaires partenaires de la SNGTV.

Ces procédures apparemment efficaces constituent la base de ce qui sera conseillé aux éleveurs mais aussi utilisé lors des essais suivants et sont présentées à travers le tableau suivant.

Tableau XVI : Procédures retenues à l'issue des essais préliminaires

Étape de l'enrobage	Éléments sélectionnés	
Quantité idéale de mélange à réaliser	Entre 4 % et 20 % de la capacité de la bétonnière en rapport masse/volume <i>Soit entre 5 kg et 20 kg d'aliment dans notre cas</i>	
Quantité d'huile de colza à incorporer	Aliment EC	Moins de 40 ml/kg
	Aliment GROS	Moins de 15 ml/kg
Méthode de mélange d'antibiotique et de l'huile	Antibiotique sous forme de solution	Mélange au fouet dans un saladier
Méthode d'incorporation de l'antibiotique sur l'aliment	Antibiotique sous forme de solution	Projection au pistolet drogueur dans le tambour en rotation
	Antibiotique sous forme de poudre	Répartition sur l'aliment avant la mise en route de la mélangeuse
Temps de mélange	Pour l'OTC	Entre 10 et 15 minutes
	Pour le FFN	Entre 5 et 15 minutes
Temps de séchage des aliments enrobés	Non conclusif, pas de tests supplémentaires	
Nettoyage	Du tambour de la mélangeuse	Nettoyeur haute pression, eau chaude ou froide
	Du reste du matériel	Eau chaude et détergent

La quantité d'antibiotique perdue lors de l'enrobage a été estimée entre 1 % et 15 % selon les cas, et probablement sous-évaluée.

## C. Détermination expérimentale de la stabilité des mélanges

Les pisciculteurs français ne conservent généralement pas plus de quelques jours les aliments enrobés. En effet, la majorité des éleveurs répondants au questionnaire présenté en partie A les distribuent dans les quatre jours suivant la fabrication. Bien que les aliments médicamenteux soient prévus pour être conservés plusieurs mois après fabrication (RCP PS oxytétracycline aquaculture), ils ne sont pas identiques aux aliments enrobés à la ferme, en termes de médicament utilisé comme de méthode d'incorporation. Il convient alors de considérer que leur durée de conservation peut être différente. La quasi-totalité des éleveurs conservent les aliments enrobés à température ambiante et protégés des rayons UV. Pour garantir une efficacité optimale des aliments enrobés en ferme, le premier objectif de cette partie est de répondre à cette question :

- La stabilité des antibiotiques enrobés à la surface des aliments est-elle satisfaisante après 15 jours à température ambiante?

Dans le cadre des essais finaux qui seront présentés en partie D, les échantillons d'aliments enrobés seront amenés à être conservés et transportés au laboratoire avant analyse (une durée de 15 jours a été fixée comme délai maximal possible entre la fabrication de l'aliment enrobé et son analyse par le laboratoire). Ces essais auront lieu en août 2024, soit en saison chaude.

L'étude de stabilité a donc comme second objectif de répondre à la question suivante :

- La température de conservation (ambiante, froid positif ou congélation) modifie-t-elle la stabilité des antibiotiques à la surface des aliments enrobés après 15 jours ?

Ces essais ont aussi été utilisés pour valider la méthode analytique, et quantifier de façon plus précise qu'en partie B les pertes d'antibiotiques ayant lieu lors de la préparation des aliments.

Les préparations suivantes ont été réalisées par la société Halieutica à Pontivy (56) et analysées au sein du laboratoire Girpa de Beaucozéz (49).

### 1. Matériel et méthodes

#### a) *Matières premières*

Pour la réalisation de ces essais, les matières premières sont identiques à celles présentées dans la partie B, avec la même nomenclature (procédure A, B et C), rappelées dans le tableau suivant.

Tableau XVII : Rappel de la nomenclature des procédures de mélange mises en place

Procédure	Aliment	Rationnement	Antibiotique	Incorporation
A	Grossissement (GROS)	1 %	OTC	Antibiotique mélangé seul avec l'aliment avant ajout d'huile et nouveau mélange
B	Grossissement (GROS)	1 %	FFN	Antibiotique et huile mélangés ensemble avant dépôt sur l'aliment
C	Écloserie (EC)	2 %	FFN	Antibiotique et huile mélangés ensemble avant dépôt sur l'aliment

L'agent enrobant utilisé est toujours l'huile de colza. La quantité incorporée est de 10 ml/kg d'aliment pour l'aliment de type grossissement et 15 ml/kg pour l'aliment de type éclosion, conformément aux résultats obtenus en partie B.

Les posologies pour les antibiotiques utilisés sont identiques à celles présentées en partie B, soit 90 mg/kg pour l'OTC et 15 mg/kg pour le FFN. En revanche, suite à la quantification des pertes obtenues dans les essais préliminaires, il a été décidé d'une majoration de 10 % de la quantité d'antibiotique ajoutée au mélange. Ainsi, pour préparer 20 kg d'aliments enrobés avec de l'oxytétracycline à la posologie de 90 mg/kg pour des poissons avec un taux de rationnement de 1 %, il aurait fallu peser 360 g de Tetraveto<sup>NDV</sup>. Lors de l'essai stabilité, cette quantité a été majorée de 10 %, et donc 396 g ont été incorporés.

Il a été choisi de réaliser l'enrobage de 10 kg ou 20 kg d'aliment, en fonction de la disponibilité de l'aliment et conformément aux résultats présentés en partie B.

Les modalités de mélange fixes en fonction de chaque procédure sont ainsi présentées à travers le tableau suivant.

Tableau XVIII : Modalités de mélange retenues pour les essais de stabilité

Procédure	Aliment	Antibiotique		Huile
		Quantité de principe actif recherché dans l'aliment	Quantité à peser	
<b>A</b> (Aliment GROS + OTC poudre)	20 kg	9000 mg/kg ou ppm	396 g	10 ml
<b>B</b> (Aliment GROS + FFN solution)	20 kg	1500 ppm	110 ml	10 ml
<b>C</b> (Aliment EC + FFN solution)	10 kg	750 ppm	27,5 ml	15 ml

### b) Modalités de mélange et matériel utilisé

Les mélanges sont réalisés au moyen de la même bétonnière rotative de 125 litres de capacité que celle utilisée pour les essais présentés en partie B, sans changement de sens de rotation au cours du mélange.

Les quantités de matières premières incorporées sont mesurées au moyen de balances adaptées, en fonction des masses pesées, afin d'obtenir la plus grande précision possible. Les quantités de liquides sont mesurées au moyen d'éprouvettes graduées ou de seringues.

Pour la procédure A concernant l'oxytétracycline, la poudre est répartie à la surface de l'aliment avant la mise en marche de la mélangeuse. Elle est alors mélangée 15 minutes avec l'aliment.

L'huile est ensuite répartie sur la surface des granulés pendant l'arrêt de la mélangeuse, et l'ensemble est mélangé de nouveau 5 minutes.

Pour les procédures B et C concernant le florfénicol, le mélange de l'antibiotique et de l'huile préalable à leur incorporation dans l'aliment est réalisé à l'aide d'un fouet dans un saladier jusqu'à l'obtention d'une homogénéité visuellement satisfaisante. L'incorporation du florfénicol est alors réalisée à l'aide du pistolet drogueur présenté en partie B pendant la rotation du tambour, conformément aux résultats satisfaisants obtenus lors des essais préliminaires. Le mélange avec l'aliment est ensuite de 10 minutes, suivi d'un raclage des éventuels dépôts formés notamment sur les pales avec remise de ces dépôts dans la préparation, suivie de 5 minutes de brassage (tableau XIX).

Tableau XIX : Méthodes de mélange appliquée pour la réalisation des essais de stabilité

Procédure	Mélange antibiotique et huile	Incorporation de l'antibiotique	Temps de mélange
<b>A</b> (Aliment GROS + OTC poudre)		Répartition sur l'aliment avant la mise en route de la mélangeuse	15 minutes puis 5 minutes après l'ajout d'huile
<b>B</b> (Aliment GROS + FFN solution)	À l'aide d'un fouet dans un saladier	Projection au pistolet drogueur dans le tambour en rotation	10 minutes puis 5 minutes après raclage des parois
<b>C</b> (Aliment EC + FFN solution)	À l'aide d'un fouet dans un saladier	Projection au pistolet drogueur dans le tambour en rotation	10 minutes puis 5 minutes après raclage des parois

Le tambour de la mélangeuse est lavé entre chaque préparation à l'eau chaude (45 °C) à l'aide d'un nettoyeur à haute pression pendant 5 minutes. Le reste du matériel est lavé à l'eau chaude et au détergent entre chaque préparation.

De nombreux points de contrôle sont mis en place afin de standardiser au maximum les préparations. Ainsi, la température ambiante est suivie, et des pesées de contrôle des contenants sont mises en place afin de limiter les erreurs de dosage. Un exemple des points de contrôle mis en place est disponible en annexe 6.

### c) Réalisation des prélèvements

Neuf prélèvements par procédure sont réalisés au centre de la mélangeuse, en un seul point, de sorte à obtenir les prélèvements les plus homogènes possible. Huit échantillons de 120 grammes et un prélèvement de 1,1 kilogramme servant également à l'évaluation de la méthode analytique, sont prélevés. Ils sont conservés dans des récipients hermétiques à l'abri des UV et analysés entre douze et treize jours après le mélange.

### d) Modalités comparées

Sur les neuf prélèvements réalisés par procédure, trois sont conservés à - 20 °C, trois au froid positif (4 °C) et trois à température ambiante (moins de 30 °C).

### *e) Technique analytique*

La quantité d'antibiotique contenue dans les échantillons, exprimée en milligrammes par kilogramme d'aliment, est déterminée par couplage de chromatographie en phase liquide et de spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Chaque échantillon de 120 grammes subit une extraction suivie de trois procédures de LC-MS/MS. Les trois prélèvements de 1,1 kg servent quant à eux à valider la méthode analytique et subissent dix extractions, chacune suivie de trois injections LC-MS/MS. Le protocole complet d'analyse du laboratoire est présenté en annexe 5.

#### (1) Extraction des échantillons

Cinquante grammes d'échantillon sont homogénéisés 17 heures dans un litre de solution composée de 50 centilitres de méthanol et 50 centilitres d'eau ultra pure.

#### (2) Paramètres chromatographiques

La chromatographie en phase liquide est réalisée au moyen d'une colonne de séparation C18 kinetex 100 x 4,6 ; 2,6  $\mu\text{m}$  (Phenomenex™ ref.00D-4462-E0). Le débit est de 0,7 ml/min, la température du four de 40 °C et le volume d'injection de 2 ml.

#### (3) Spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse triple quadripolaire (Aligent™ modèle ultivo) est utilisé. Les limites de quantification obtenues sont de 200 mg/kg pour le florfénicol et 2000 mg/kg pour l'oxytétracycline.

### *f) Traitement des résultats*

La méthode expérimentale est validée après calcul du coefficient de variation (CV) lié à l'analyse ou CV analytique. Celui-ci correspond à l'écart-type entre les 30 résultats de LC-MS/MS obtenus par échantillon de 1,1 kg, divisé par la moyenne de la quantité d'antibiotique mesurée.

La quantité d'antibiotique recherchée correspond à la quantité cible pour obtenir une posologie de 90 mg/kg pour l'oxytétracycline soit 9000 ppm et 15 mg/kg pour le florfénicol, soit respectivement 1500 ppm pour l'aliment type grossissement et 750 ppm pour l'aliment type éclosion. Elle est ainsi plus faible que la quantité d'antibiotique réellement mélangée à l'aliment.

Les valeurs comparées et présentées dans les résultats sont les quantités d'antibiotique mesurées par échantillon. La valeur attribuée à chaque échantillon correspond à la moyenne des trois résultats des LC-MS réalisées. Les groupes comparés sont donc composés de trois mesures issues de trois échantillons par mode de conservation et par procédure. Le nombre de valeur par groupes est ainsi trop faible pour réaliser une analyse statistique.

## 2. Résultats

L'intégralité des résultats obtenus est disponible en annexe 5.

### a) Validation de la méthode analytique

Les résultats obtenus pour la validation de la méthode analytique sur les trois procédures de mélange sont présentés dans le tableau XX ci-après. Le coefficient de variation analytique se situe entre 3,3 % et 6,4 % selon les procédures. L'écart entre la quantité d'antibiotique recherché et la quantité mesurée est quant à lui situé entre 5,2 % et 11,6 % selon les préparations.

Tableau XX : Résultats obtenus pour la validation de la méthode LC-MS

Procédure	A (OTC + GROS)	B (FFN + GROS)	C (FFN +EC)
Moyenne (mg/kg)	7957	1329	711
CV (%)	4,6	6,4	3,3
Teneur attendue (mg/kg)	9000	1500	750
Écart (%)	11,6	11,4	5,2

### b) Comparaison des méthodes de conservation

Les résultats obtenus en termes de stabilité des échantillons sont résumés à travers les trois graphiques suivants. Les quantités mesurées sont exprimées en milligrammes d'antibiotique par kilogramme d'aliment ou ppm, la valeur cible est représentée par le trait rouge pointillé. Comme aucun test statistique n'a été réalisé, ces résultats sont énoncés sous la forme de tendances et d'appréciation visuelle des diagrammes en boîte.

Pour ce qui est de la procédure A (OTC sur aliment grossissement), on remarque que la congélation semble être la méthode de conservation offrant le plus de stabilité, pour laquelle la teneur médiane semble plus élevée que celle des autres modes de conservation (figure 53). La teneur minimale mesurée est de 7957 ppm et la valeur maximale de 9434 ppm, tous modes de conservation confondus. Ces valeurs correspondent respectivement à 88 % et 105 % de la valeur cible.

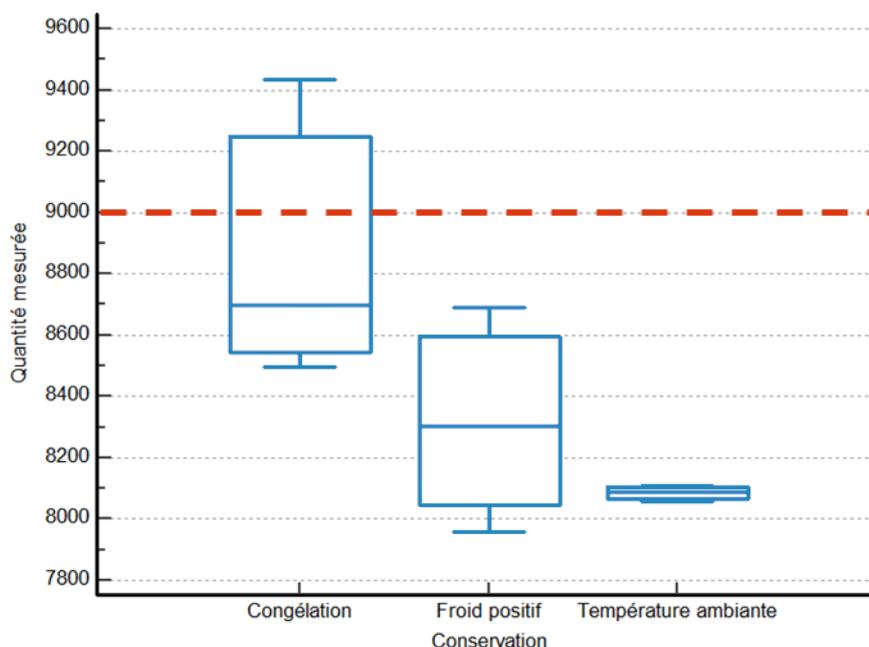


Figure 53 : Quantité d'oxytétracycline mesurée dans les échantillons issus de la procédure A, selon leur mode de conservation (en rouge la quantité cible)

Concernant la procédure B (FFN sur aliment grossissement), les résultats semblent contraires à ceux observés au cours de la procédure A. En effet, dans ce cas, ce sont les échantillons conservés à température ambiante qui paraissent contenir la plus grande quantité de florfénicol (figure 54). La valeur minimale mesurée, tous modes de conservation confondus, est de 1318 ppm soit 88 % de la valeur cible. La valeur maximale quant à elle est de 1625 ppm soit 108 % de la valeur cible.

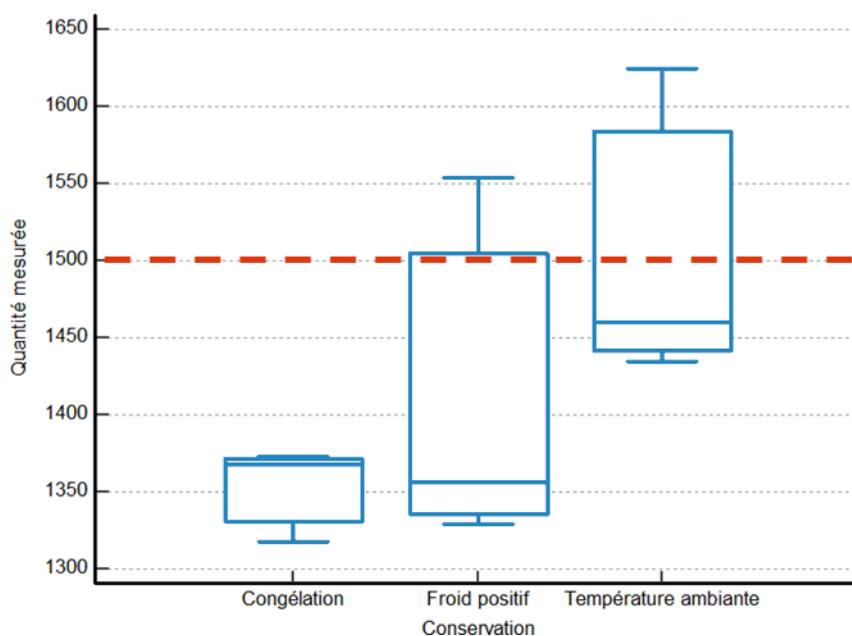


Figure 54 : Quantité de florfénicol mesurée dans les échantillons issus de la procédure B, selon leur mode de conservation (en rouge la quantité cible)

Enfin, les résultats de la procédure C semblent indiquer, comme les résultats de la procédure A, une supériorité de la congélation en termes de conservation. Ainsi, contrairement à la procédure B, les échantillons conservés à - 20 °C semblent contenir la plus grande quantité de florfénicol (figure 55). La valeur minimale mesurée est de 699 ppm soit 93 % de la valeur cible et la valeur maximale est de 769 ppm soit 103 % de la valeur cible, et ce en prenant en compte les trois modes de conservation.

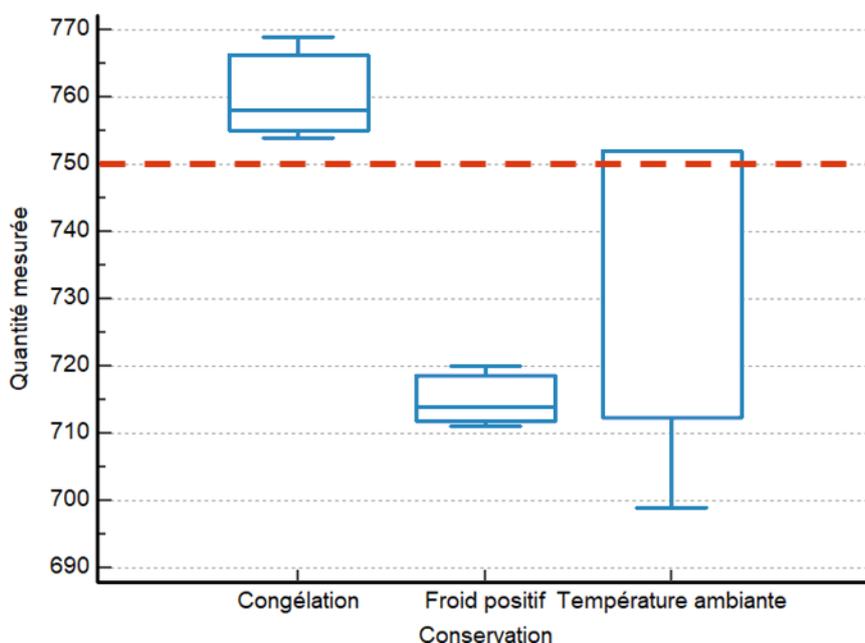


Figure 55 : Quantité de florfénicol mesurée dans les échantillons issus de la procédure C, selon leur mode de conservation (en rouge la quantité cible)

### 3. Discussion

#### a) Méthode analytique

Les méthodes de chromatographie et de spectrométrie couplées permettent respectivement de séparer et d'identifier des traces de molécules dans un échantillon. Cette méthode assure ainsi la détection, l'identification et la quantification d'une molécule. C'est une technique très sensible et spécifique (Le Bizec 2019). Ici, l'utilisation de spectromètres en tandem permet l'augmentation de la spécificité (McLafferty 1981). Cette méthode a été décrite dans la littérature comme valide pour la recherche de certaines molécules antibiotiques dans les aliments destinés aux animaux (De Baere et De Backer 2007).

Le coefficient de variation analytique le plus élevé calculé lors de la validation de la méthode est de 6,4 %. À titre de comparaison, la décision (CE) 2002/657 concernant les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats préconise, dans le cadre d'analyses quantitatives sur des échantillons officiels, un coefficient de variation analytique intralaboratoire n'excédant pas 10 % pour des éléments dont la concentration dans l'échantillon est supérieure à 1 mg/kg. Ces résultats peuvent donc être qualifiés de très bons.

### b) Stabilité de l'oxytétracycline

Le coefficient de variation moyen pour cet essai de stabilité, toutes conservations confondues, est de 1,4 %, soit une valeur inférieure à ce qui a été obtenu pour la validation analytique (4,6 %). Bien que le diagramme en boîte semble suggérer un effet de la température sur la conservation des échantillons, les valeurs mesurées restent très proches, et le nombre limité d'échantillons ne permet pas de conclure à une dégradation des principes actifs au cours du temps significativement différente pour l'une ou l'autre des procédures. Ceci est conforme à la littérature.

Ainsi, bien que cette molécule soit bien identifiée comme thermolabile (Traub et Leonhard 1995), la littérature ne décrit pas de dégradation sur douze jours à moins de 30 °C. De même, si Doi et Stoskopf ont montré en 2000 une augmentation de la dégradation de l'oxytétracycline conservée 21 jours à 43 °C, aucune différence de dégradation à 4 °C et 25 °C n'était rapportée.

Au sujet de la congélation, peu de données sont disponibles. Une étude de Vivienne *et al.* de 2018 rapporte cependant un comportement stable de l'oxytétracycline suite à neuf jours de congélation.

### c) Stabilité du florfenicol

Le coefficient pour cet essai de stabilité, toutes conservations confondues, est de 2,4 % pour le FFN sur l'aliment éclosion, c'est-à-dire similaire à ce qui a été obtenu pour la validation analytique (3,3 %) et de 3,2 % sur l'aliment grossissement, valeur inférieure aux 6,4 % obtenus dans la validation analytique. Encore une fois, la proximité des valeurs mesurées et la taille des groupes comparés ne permet pas de conclure à un effet de la température sur la stabilité du florfenicol sur l'aliment enrobé.

Au regard de la documentation scientifique, le florfenicol est une molécule plutôt résistante à la température, dont la stabilité a été montrée après 14 jours dans l'eau à 8 °C (Pouliquen *et al.* 2007) et suite à un processus de pasteurisation à 72 °C (Power *et al.* 2014). L'effet de la congélation sur la stabilité du florfenicol est peu décrite. En 2014 Power *et al.* mettent en évidence une augmentation de la quantité de florfenicol dans du fromage après congélation, mais cette observation est considérée comme un possible artefact analytique.

L'absence d'effet de la méthode de conservation reste l'hypothèse la plus crédible des variations observées dans notre essai entre les procédures B et C, quoique l'on ne puisse exclure un effet spécifique de l'aliment lui-même.

## Synthèse

Les résultats obtenus suite aux essais présentés dans cette partie permettent d'abord de valider la méthode LC-MS/MS développée pour l'extraction, l'identification et la quantification de l'oxytétracycline et du florfenicol dans les aliments utilisés. Bien qu'un CV analytique oscillant entre 3,3 % et 6,4 % valide notre méthode expérimentale, il reste significatif en regard de nos objectifs, à savoir qualifier notre procédure de fabrication d'aliment enrobé. En effet, selon les référentiels disponibles pour les aliments médicamenteux, en l'absence de référentiel pour les aliments enrobés, le CV de la teneur en principe actif dans l'aliment ne doit pas excéder 10%, et même idéalement 5% (Décision du 12 février 2007 relative aux bonnes pratiques de fabrication et de distribution en gros des aliments médicamenteux ; Arrêté du 9 juin 2004 relatif aux bonnes pratiques de préparation extemporanée des médicaments vétérinaires).

Ces essais semblent confirmer la bonne stabilité des aliments enrobés ainsi produits lorsqu'ils sont conservés à température ambiante, même si le nombre limité d'échantillons incite à la prudence dans l'interprétation des résultats, et si la variabilité analytique pourrait masquer des effets moins marqués.

Par précaution, pour l'étude d'homogénéité, il a été préféré une conservation des échantillons à - 20 °C.

## D. Détermination expérimentale de l'efficacité des mélanges

Les essais préliminaires présentés en partie B nous ont permis d'identifier les protocoles qui nous semblaient les plus performants pour l'enrobage des antibiotiques sur les aliments. Ces résultats ont été discutés avec les vétérinaires partenaires du projet afin de déterminer quels protocoles semblaient les plus pertinents pour figurer dans un guide de bonnes pratiques, sur les plans techniques, zootechniques et organisationnels, considérant les contraintes spécifiques de la ferme aquacole et ses besoins en traitements antibiotiques. Ont notamment été exclus tous les protocoles pour lesquels les résultats préliminaires démontraient une mauvaise qualité de mélange ou pouvaient présenter des difficultés dans leur application sur le terrain. Notre marge de manœuvre financière était limitée au dosage de 150 échantillons maximum, les protocoles de mélange à réaliser dans le cadre de ces essais finaux ont alors été sélectionnés collégialement.

L'objectif de cette dernière expérimentation est de confirmer la pertinence des pratiques sélectionnées, et de mieux caractériser certains éléments pour lesquels les résultats préliminaires n'étaient pas suffisamment probants, comme la durée de mélange ou la quantité d'huile ajoutée. Les éléments étudiés sont la concentration réelle en antibiotique dans l'aliment enrobé, l'homogénéité du mélange et la répétabilité des méthodes testées.

Les préparations ont été réalisées par la société Halieutica à Pontivy (56) et analysées au sein du laboratoire Girpa de Beaucouzé (49).

### 1. Matériel et méthodes

#### a) Choix des modalités

Pour la réalisation des essais d'homogénéité, les matières premières sont identiques à celles utilisées pour les essais préliminaires et les essais de stabilité, avec la même nomenclature (procédures A, B et C), rappelée dans le tableau suivant. L'agent enrobant utilisé est toujours l'huile de colza.

Tableau XXI : Rappel de la nomenclature des procédures de mélange mises en place

Procédure	Aliment	Rationnement	Antibiotique	Incorporation
<b>A</b>	Grossissement (GROS)	1 %	OTC	Antibiotique déposé seul sur l'aliment
<b>B</b>	Grossissement (GROS)	1 %	FFN	Antibiotique et huile de colza mélangés
<b>C</b>	Écloserie (EC)	2 %	FFN	Antibiotique et huile de colza mélangés

Suite à la quantification des pertes dans les essais préliminaires (partie B) et aux concentrations réellement mesurées dans l'aliment lors des essais de stabilité (partie C), il a été décidé de réaliser une majoration de la quantité d'antibiotique ajoutée au mélange. Pour ces essais finaux,

la quantité d'oxytétracycline incorporée dans l'aliment a été majorée de 15 % (contre 10 % pour les essais de stabilité) et la quantité de florfénicol de 10 % (pareillement aux essais de stabilité).

Il a été choisi de réaliser l'enrobage de dix ou vingt kilogrammes d'aliment, en fonction de la disponibilité de l'aliment et conformément aux résultats présentés en partie B.

Les modalités de mélange fixes en fonction de chaque procédure sont ainsi présentées à travers le tableau suivant.

Tableau XXII : Modalités de mélange retenues pour les essais d'homogénéité

Procédure	Aliment	Antibiotique		
	Quantité à préparer	Quantité de principe actif recherché dans l'aliment	Majoration de la quantité	Quantité à peser
<b>A</b> (Aliment GROS + OTC poudre)	20 kg	9000 ppm	15 %	414 g
<b>B</b> (Aliment GROS + FFN solution)	20 kg	1500 ppm	10 %	110 ml
<b>C</b> (Aliment EC + FFN solution)	10 kg	750 ppm	10 %	27,5 ml

#### a) Modalités de mélange et matériel utilisé

Les mélanges sont réalisés au moyen d'une bétonnière rotative de 125 litres de capacité (le même matériel que celui utilisé pour les essais préliminaires et de stabilité). Il n'y a eu aucun changement du sens de rotation au cours du mélange. Les quantités de matières premières incorporées sont mesurées au moyen de balances adaptées, en fonction des masses pesées, afin d'obtenir la plus grande précision possible. Les quantités de liquides sont mesurées au moyen d'éprouvettes graduées ou de seringues.

Pour la procédure A concernant l'oxytétracycline, la poudre est répartie à la surface de l'aliment avant la mise en marche de la mélangeuse.

Pour les procédures B et C, concernant le florfénicol, le mélange de l'antibiotique et de l'huile, préalable à leur incorporation dans l'aliment, est réalisé à l'aide d'un fouet dans un saladier jusqu'à l'obtention d'une homogénéité visuellement satisfaisante. L'incorporation du florfénicol est alors réalisée à l'aide du pistolet drogueur présenté en partie B, pendant la rotation du tambour, conformément aux résultats satisfaisants obtenus lors des essais préliminaires et des essais de stabilité (tableau XXIII).

Tableau XXIII : Méthodes de mélange appliquée pour la réalisation des essais d'homogénéité

Procédure	Mélange antibiotique et huile	Incorporation de l'antibiotique
<b>A</b> (Aliment GROS + OTC poudre)		Répartition sur l'aliment avant la mise en route de la mélangeuse
<b>B</b> (Aliment GROS + FFN solution)	À l'aide d'un fouet dans un saladier	Projection au pistolet drogueur dans le tambour en rotation
<b>C</b> (Aliment EC + FFN solution)	À l'aide d'un fouet dans un saladier	Projection au pistolet drogueur dans le tambour en rotation

Le tambour de la mélangeuse est lavé entre chaque préparation à l'eau chaude (45 °C), à l'aide d'un nettoyeur à haute pression, pendant 5 minutes. Le reste du matériel est lavé à l'eau chaude et au détergent entre chaque préparation. Chaque préparation a été réalisée à partir d'un matériel parfaitement sec.

Les points de contrôle utilisés lors des essais de stabilité et tels que présentés en annexe 6 sont de nouveau mis en place pour la réalisation de ces préparations. La température ambiante lors de la réalisation des mélanges est comprise entre 16 °C et 26 °C.

#### b) Modalités comparées

Les modalités qui ont été testées sont le résultat combiné des essais préliminaires et des discussions avec les vétérinaires aquacoles associés au projet. Selon l'aliment et l'antibiotique utilisé, un nombre plus ou moins important de protocoles a été testé (tableau XXIV). Chaque protocole a été réalisé en triplicat pour évaluer la répétabilité des résultats mesurés.

Dans le cadre de la procédure A, le mélange de l'oxytétracycline avec l'aliment grossissement est préalable à l'ajout d'huile. Ainsi, pour ce type de médicament en poudre, cette dernière a plutôt un rôle de prévention du lessivage de l'antibiotique dans l'eau. Il est donc peu probable que la quantité d'huile ajoutée ait une influence significative sur l'homogénéité de la répartition de l'antibiotique sur les granulés, sauf dans le cas où cette quantité dépasserait la capacité de rétention de l'aliment, formant un dépôt sur les parois de la mélangeuse tels qu'observés en partie B. Les analyses ne nous permettent pas d'évaluer la pertinence de la dose d'huile à privilégier dans la cadre de la prévention du lessivage de l'antibiotique puisqu'aucun test en bassin n'est prévu. Par consensus entre les différents partenaires, une seule quantité d'huile a donc été testée pour cette procédure. Ainsi, seule une comparaison du temps de mélange de l'antibiotique avec l'aliment (10 minutes et 15 minutes) a été réalisée. Dans les deux cas, ce mélange est suivi de l'ajout d'huile et d'un nouveau mélange de 5 minutes. L'huile est alors déposée dans la mélangeuse à l'arrêt et répartie sur l'aliment.

Pour la procédure B, le florfenicol étant mélangé à l'huile préalablement à son mélange avec l'aliment, la durée de mélange et la quantité d'huile peuvent avoir une influence significative sur l'homogénéité du mélange. L'influence de ces deux paramètres a ainsi été étudiée. Les quantités d'huile (5 ml/kg et 10 ml/kg) et les temps de mélange (5 min, 10 min et 15 min) testées ont été

choisis par consensus entre les partenaires du projet. Cinq minutes de mélange semblaient insuffisantes à l'égard des données disponibles, mais il a tout de même été décidé de réaliser une procédure d'enrobage avec cette durée de mélange, afin d'objectiver son inefficacité supposée et ainsi justifier le choix de ne pas conseiller un tel protocole aux éleveurs.

Dans le cadre de l'incorporation du florfénicol sur de l'aliment de type éclosérie (procédure C), il a été décidé de se concentrer sur l'influence de la quantité d'huile, là encore mélangée à l'antibiotique préalablement à son incorporation avec l'aliment. Une durée de mélange de 15 min a été jugée comme faisable par les éleveurs sur le terrain sur ce type de production, et il n'a donc pas été jugé pertinent d'évaluer des durées moindres de mélange. Pour cette procédure, le mélange de 15 minutes s'effectue en deux temps, d'abord 10 minutes de mélange, puis un raclage des éventuels dépôts formés notamment sur les pales avec remise de ces dépôts dans la préparation, suivi de 5 minutes de brassage. Ces dépôts ne sont pas observés avec des aliments plus gros de type grossissement.

Tableau XXIV : Modalités comparées lors des essais d'homogénéité

Procédure	Quantité d'huile	Temps de mélange	Nombre de protocoles distincts
<b>A</b> (Aliment GROS + OTC poudre)	10 ml/kg	10 minutes	<b>2</b>
		15 minutes	
<b>B</b> (Aliment GROS + FFN solution)	10 ml/kg	5 minutes	<b>5</b>
		10 minutes	
		15 minutes	
	5 ml/kg	10 minutes	
		15 minutes	
<b>C</b> (Aliment EC + FFN solution)	5 ml/kg	15 minutes	<b>3</b>
	10 ml/kg		
	22,5 ml/kg		

Ainsi, 10 protocoles différents ont été testés, chacun réalisée en triplicats, ce qui représente un total de 30 préparations.

La mise en place de points de contrôle systématiques, tels que décrits précédemment, a permis, par pesée des récipients avant et après leur utilisation, de quantifier les pertes d'antibiotique objectivées lors des opérations de transvasement lors de l'utilisation du florfénicol, où les manipulations sont nombreuses. Les différences de masses mesurées pour la seringue de prélèvement de l'antibiotique, le saladier de mélange et le pistolet drogueur ont été rapportées au poids de Florfenikel<sup>NDV</sup> incorporé (avec une masse volumique mesurée à 1,22 g/ml) ainsi qu'à

la proportion d'antibiotique dans le mélange avec l'huile de colza, afin d'estimer la quantité de florfenicol perdue au cours des différents transvasements.

### c) Réalisation des échantillons

Chacune des trente préparations est prélevée cinq fois, pour un total de 150 échantillons récoltés. Les échantillons sont réalisés selon la méthode suivante :

À l'aide d'une petite pelle, quatre prélèvements d'environ 30 g aux quatre sommets d'un rectangle à la surface de l'aliment sont prélevés. Ces quatre prélèvements sont déposés dans un même récipient qui constituera le premier échantillon d'environ 120 g. L'échantillon est homogénéisé environ trente secondes à l'aide d'une spatule, puis identifié et placé dans un récipient. Un cinquième de la mélangeuse est alors vidé et la même procédure réalisée, ce jusqu'à obtenir cinq échantillons par préparation.

Les échantillons sont conservés dans des récipients hermétiques et à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur analyse.

### d) Technique analytique

La quantité d'antibiotique contenue dans les échantillons, exprimée en milligrammes par kilogramme d'aliment, est déterminée par couplage de chromatographie en phase liquide et de spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Cette méthode a été décrite et validée au cours de la partie C. Chaque échantillon de 120 g subit une extraction à partir d'un prélèvement de 50 g suivie de trois procédures de LC-MS/MS.

### e) Traitement des résultats

Pour chaque échantillon, une valeur de concentration dans l'aliment a été calculée. Elle correspond à la valeur moyenne des trois résultats des LC-MS/MS réalisées pour une même extraction. Pour un même protocole, on dispose ainsi de quinze valeurs mesurées : cinq échantillons par préparation, et trois préparations par protocole. Ces quinze échantillons ont été traités comme indépendants les uns des autres pour les tests statistiques réalisés. Ainsi, l'effet bétonnière et l'effet position du prélèvement (surface *versus* profondeur) n'ont pas été considérés dans l'analyse statistique de l'homogénéité.

Des tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel *MedCalc* afin de comparer les quantités d'antibiotique obtenues et l'homogénéité des différents mélanges.

Chaque test est précédé d'une vérification de la distribution des valeurs mesurées par un test de Shapiro-Wilks et la réalisation de diagrammes quantile-quantile via le logiciel *Microsoft Excel*. En fonction de la distribution des valeurs, des tests paramétriques ou non paramétriques sont utilisés (voir figures 56 et 57). Les variables étudiées sont considérées comme différentes lorsque la p-value obtenue à l'issue du test est inférieure à 0,05.

La variance est utilisée pour obtenir l'écart-type, qui permet de calculer le coefficient de variation (CV) ou écart-type relatif au sein d'un groupe, exprimé en pourcentage.

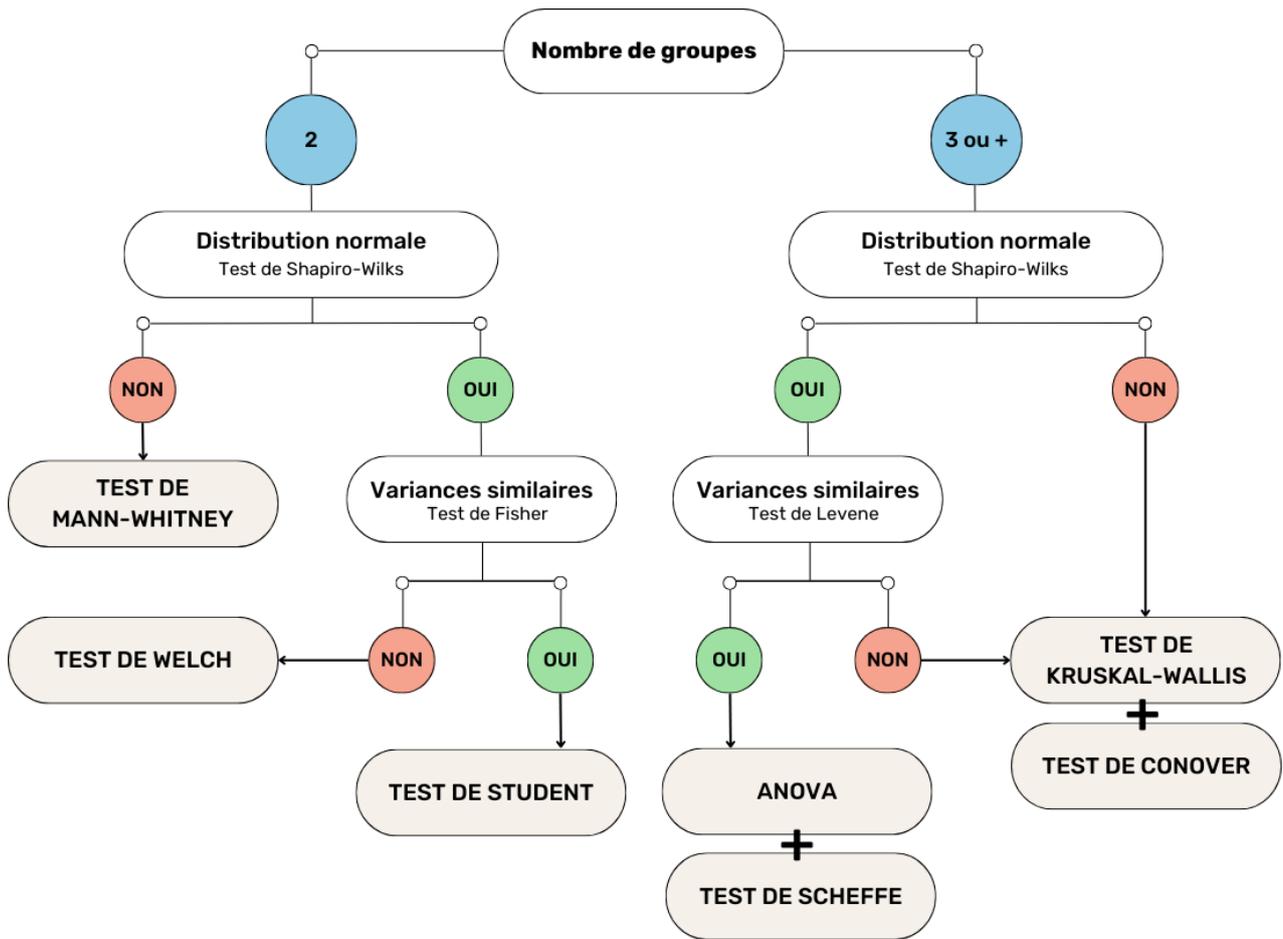


Figure 56 : Tests statistiques utilisés pour la comparaison de la moyenne ou de la médiane des quantités d'antibiotiques mesurées

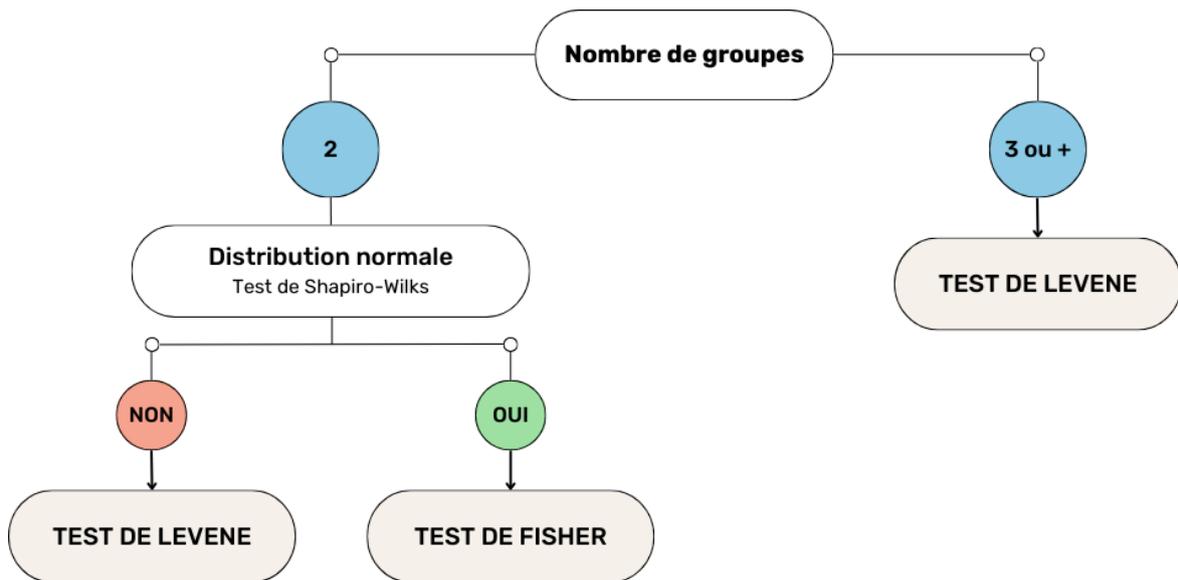


Figure 57 : Tests statistiques utilisés pour la comparaison de variance de quantités d'antibiotiques mesurées

## 2. Résultats

L'intégralité des résultats bruts obtenus est disponible en annexe 5. Les tests statistiques réalisés, et leurs p-values associées, sont présentés en annexe 7. Les quantités mesurées sont exprimées en milligrammes d'antibiotique par kilogramme d'aliment, ou ppm. Dans un souci d'homogénéité de présentation, les teneurs en antibiotique par procédure, protocole de mélange ou réplicat sont exprimées en valeur moyenne, y compris lorsque la distribution des valeurs ne suit pas une loi normale. Les résultats sont d'abord présentés dans leur ensemble, puis les différents protocoles sont comparés, d'abord au regard du temps de mélange et ensuite au regard de la quantité d'huile ajoutée. Une estimation de l'effet des pertes observées lors du mélange sur la teneur mesurée dans l'aliment est également présentée.

### a) Teneur en principe actif

Les résultats obtenus lors de l'analyse des échantillons sont présentés par procédure (A, B ou C) et par protocole de mélange dans le tableau suivant. Les teneurs en antibiotique mesurées sont exprimées en pourcentage de la valeur cible, soit 9000 ppm d'oxytétracycline pour la procédure A, 1500 ppm de florfénicol pour la procédure B et 750 ppm de florfénicol pour la procédure C.

Tableau XXV : Teneur en antibiotique mesurée dans les échantillons d'aliment lors des essais finaux, par rapport à la concentration cible (les calculs sont réalisés à partir des 15 valeurs mesurées par protocole)

Temps de mélange	Quantité d'huile incorporée	Moyenne	CV	Valeur minimale	Valeur maximale
Procédure A (OTC + Aliment GROS)		93,17 %	5,58 %	83,79 %	106,16 %
10 min	10 ml/kg	91,44 %	4,09 %	83,79 %	98,70 %
15 min	10 ml/kg	94,90 %	6,16 %	88,78 %	106,16 %
Procédure B (FFN + Aliment GROS)		91,98 %	6,46 %	73,10 %	106,12 %
5 min	10 ml/kg	93,68 %	6,76 %	79,44 %	106,12 %
10 min	10 ml/kg	87,39 %	7,84 %	73,10 %	94,68 %
15 min	10 ml/kg	90,38 %	4,95 %	82,74 %	98,40 %
10 min	5 ml/kg	92,86 %	2,39 %	89,56 %	97,10 %
15 min	5 ml/kg	95,57 %	5,15 %	87,09 %	103,89 %
Procédure C (FFN + Aliment EC)		97,45 %	6,10 %	89,19 %	120,94 %
15 min	10 ml/kg	100,69 %	7,99 %	92,25 %	120,94 %
15 min	15 ml/kg	97,64 %	3,61 %	92,36 %	106,65 %
15 min	22,5 ml/kg	94,03 %	2,74 %	89,19 %	97,68 %

Ainsi, toutes procédures confondues, la teneur en antibiotique mesurée par échantillon lors de ces essais est située entre 73 % et 120 % de la valeur cible. Les coefficients de variation mesurés entre les différents échantillons par protocole de mélange sont par ailleurs situés entre 3 % et 8 %.

## b) Influence du temps de mélange

### (1) Procédure A

Dans le cadre de la procédure A, des durées de mélange de 10 minutes et 15 minutes ont été testés (figure 58). Le groupe formé par les aliments mélangés dix minutes contient en moyenne 8230 mg/kg d'oxytétracycline, et n'est pas différent statistiquement de celui formé par les aliments mélangés 15 minutes, dont la teneur en OTC moyenne est de 8541 mg/kg (p-value = 0,5667). L'homogénéité des mélanges est en revanche statistiquement différente. En effet, le coefficient de variation associé est plus faible pour les échantillons mélangés 10 minutes, soit 4,2 %, par rapport à celui des échantillons mélangés 15 minutes, de 6,4 % (p-value = 0,0171).

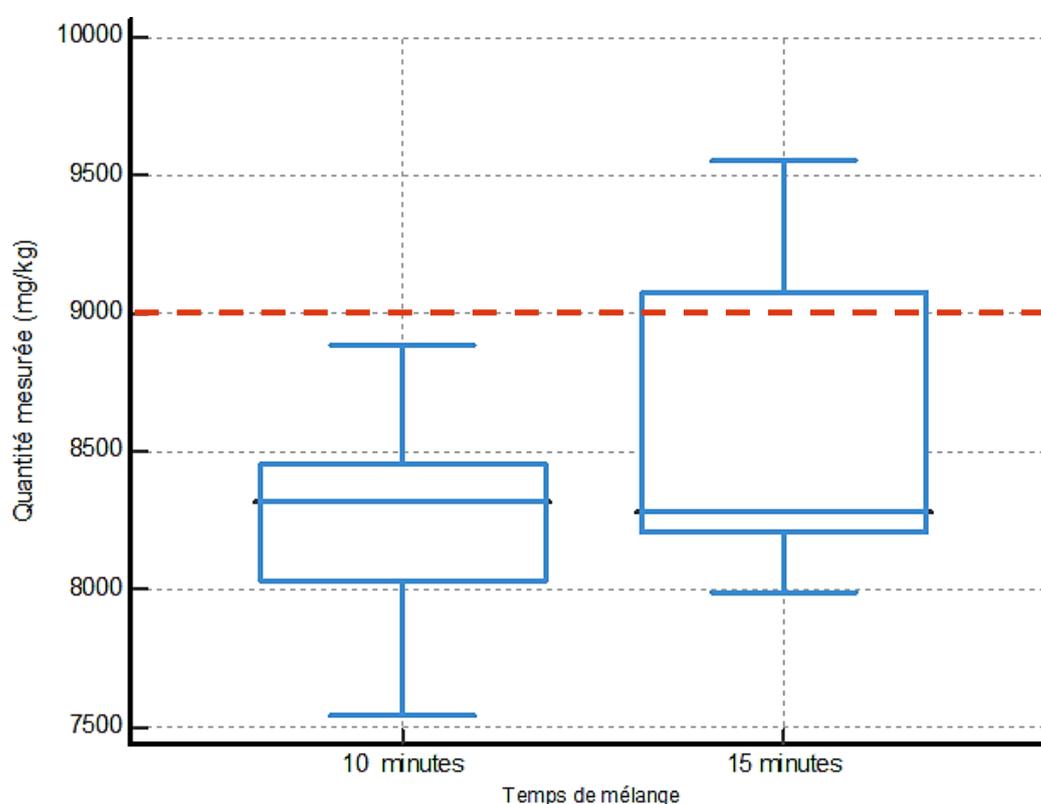


Figure 58 : Quantité d'oxytétracycline (en mg/kg) mesurée dans les échantillons de la procédure A mélangés 10 minutes et 15 minutes (en rouge la quantité cible)

### (2) Procédure B

#### (a) Mélanges préparés avec 5 ml/kg d'huile

Les mélanges brassés 10 minutes contiennent en moyenne 1393 mg/kg de florfénicol pour un coefficient de variation égal à 2,5 %. Quant à ceux brassés quinze minutes, leur concentration en moyenne en florfénicol n'est pas significativement différente, avec 1433 mg/kg (p-value = 0,0776). Leur variance cependant est statistiquement plus élevée (p-value = 0,005) avec un coefficient de variation associé de 5,3% (figure 59).

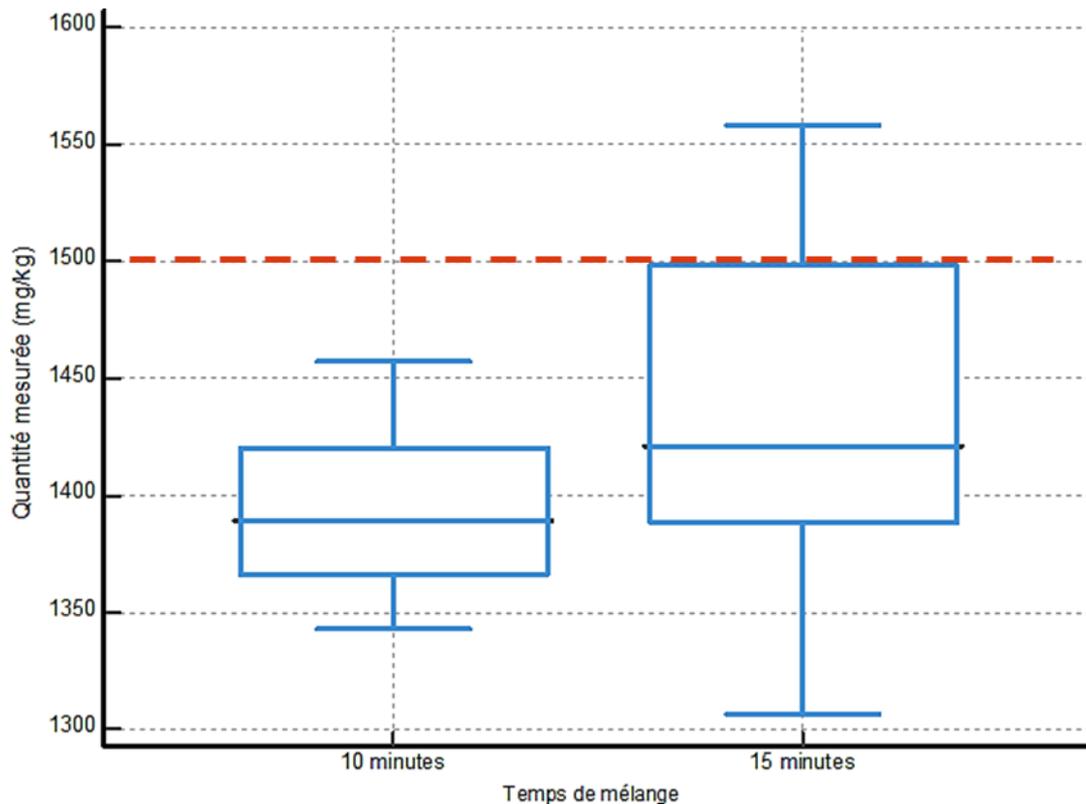


Figure 59 : Quantité de florfénicol (en mg/kg) mesurée dans les échantillons de la procédure B, enrobés avec 5 ml/kg d'huile et mélangés 10 minutes et 15 minutes (en rouge la quantité cible)

#### (b) Mélanges préparés avec 10 ml/kg d'huile

Les mélanges brassés 5 minutes, 10 minutes et 15 minutes ont respectivement une concentration moyenne en florfénicol de 1405 mg/kg, 1311 mg/kg et 1356 mg/kg. Ces valeurs sont significativement différentes. En effet la teneur moyenne en FFN de la préparation mélangée 5 minutes est statistiquement supérieure à celle de la préparation mélangée 10 minutes ( $p$ -value = 0,028). Les variances au sein de ces groupes ne sont quant à elle pas significativement différentes ( $p$ -value = 0,499). Ainsi les coefficients de variation associés sont de 7,0 %, 5,1 % et 8,1 %, pour des brassages de 5 minutes, 10 minutes et 15 minutes respectivement (figure 60).

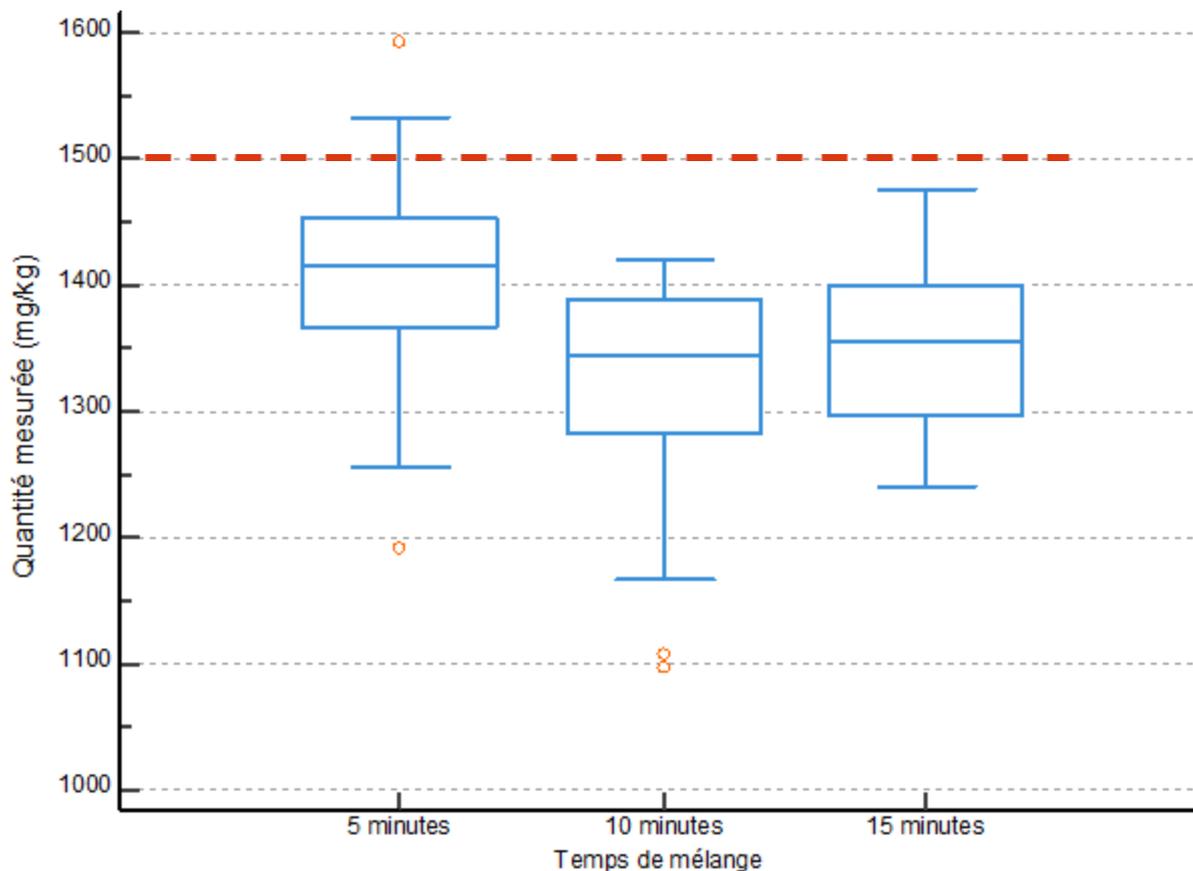


Figure 60 : Quantité de florfénicol (en mg/kg) mesurée dans les échantillons de la procédure B, enrobés avec 10 ml/kg d'huile et mélangés 5 minutes, 10 minutes et 15 minutes (en rouge la quantité cible, les valeurs extrêmes sont représentées par les cercles orange)

### c) Influence de la quantité d'huile

#### (1) Procédure B

Au sein de la procédure B, les différences de performance de mélange liées à la quantité d'huile incorporée sont comparées entre des échantillons identiques par ailleurs.

##### (a) Mélanges brassés 10 minutes

Les aliments enrobés avec 5 ml/kg d'huile contiennent en moyenne 1393 ml/kg de FFN. Ce groupe est statistiquement différent de celui formé par les aliments enrobés avec 10 ml/kg d'huile, présentant une concentration moyenne en FFN de 1311 mg/kg (p-value = 0,0144). Les variances des deux groupes sont également statistiquement différentes (figure 61), avec un coefficient de variation associé égal à 2,5 % pour les aliments enrobés avec 5 ml/kg d'huile contre 8,1 % pour ceux enrobés avec 10 ml/kg d'huile (p-value = 0,0052).

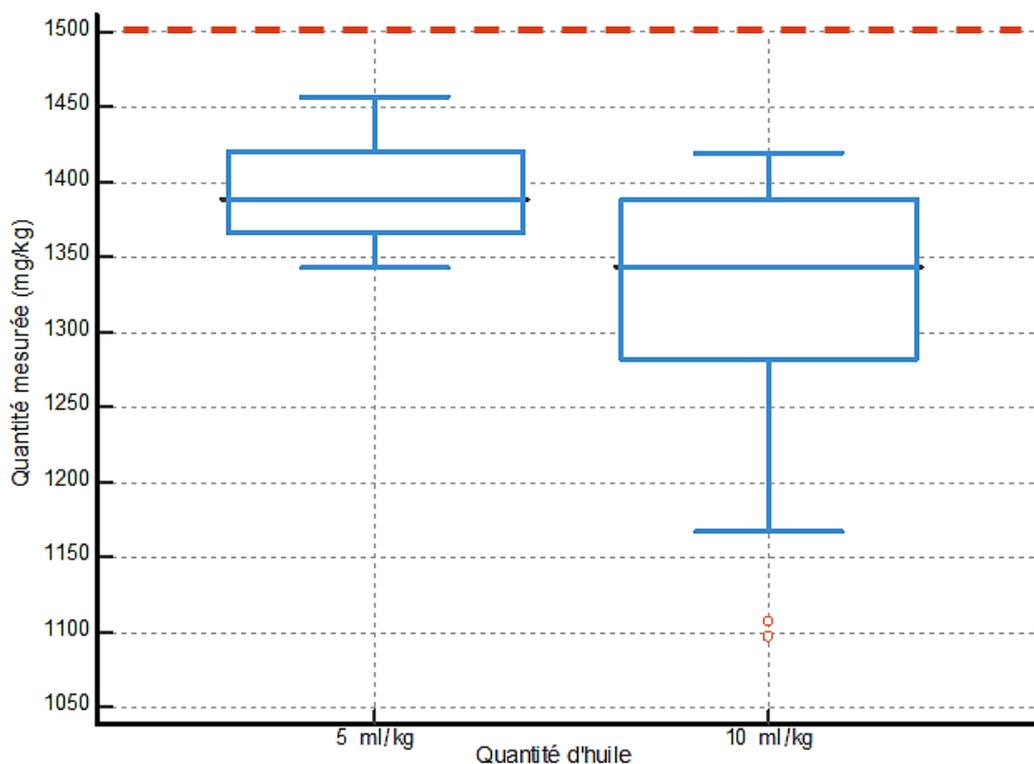


Figure 61 : Quantité de florfénicol (en mg/kg) mesurée dans les échantillons de la procédure B, brassés 10 minutes et enrobés avec 5 ml/kg ou 10 ml/kg d'huile (en rouge la quantité cible)

(b) Mélanges brassés 15 minutes

Les mélanges enrobés avec 5 ml/kg d'huile contiennent en moyenne 1433 ml/kg de florfénicol, contre 1356 mg/kg pour les mélanges enrobés avec 10 ml/kg d'huile (figure 62).

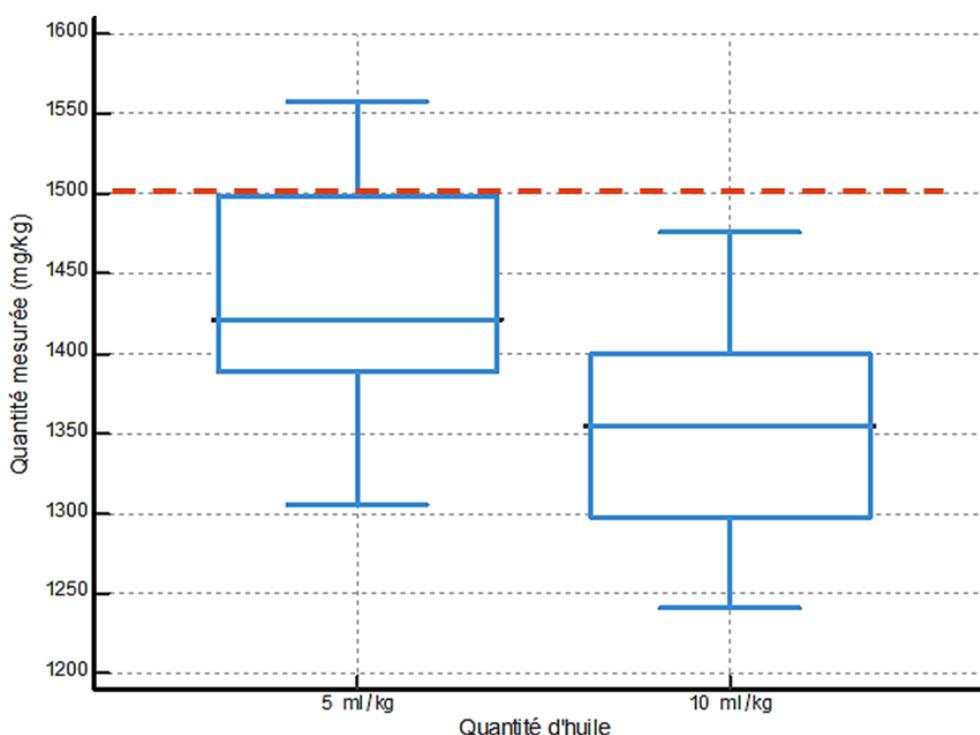


Figure 62 : Quantité de florfénicol (en mg/kg) mesurée dans les échantillons de la procédure B, brassés 15 minutes et enrobés avec 5 ml/kg ou 10 ml/kg d'huile (en rouge la quantité cible)

Ces deux valeurs moyennes sont statistiquement différentes ( $p$ -value = 0,0069). Les variances des deux groupes, au contraire, sont semblables ( $p$ -value = 0,723). Ainsi le coefficient de variation associé aux mélanges enrobés avec 5 ml/kg d'huile est égal à 5,3 % contre 5,1 % pour les mélanges enrobés avec 10 ml/kg d'huile.

## (2) Procédure C

Lors de la procédure C, des mélanges auxquels sont incorporés 10 ml/kg, 15 ml/kg et 22,5 ml/kg d'huile sont testés et comparés (figure 63). Ils ont respectivement une concentration moyenne en florfénicol de 755 mg/kg, 732 mg/kg et 705 mg/kg. Ces trois groupes sont significativement différents, ainsi les échantillons enrobés avec 22,5 ml/kg d'huile ont une teneur en antibiotique inférieure aux deux autres groupes ( $p$ -value = 0,0087).

Les variances au sein de ces groupes sont également significativement différentes ( $p$ -value = 0,006). Ainsi, les mélanges réalisés avec 22,5 ml/kg d'huile ont un coefficient de variation de 2,8 %, inférieur au coefficient de variation des mélanges réalisés avec 10 ml/kg d'huile qui est de 8,2 %. Les mélanges préparés avec 15 ml/kg d'huile ont quant à eux un coefficient de variation de 3,7 %.

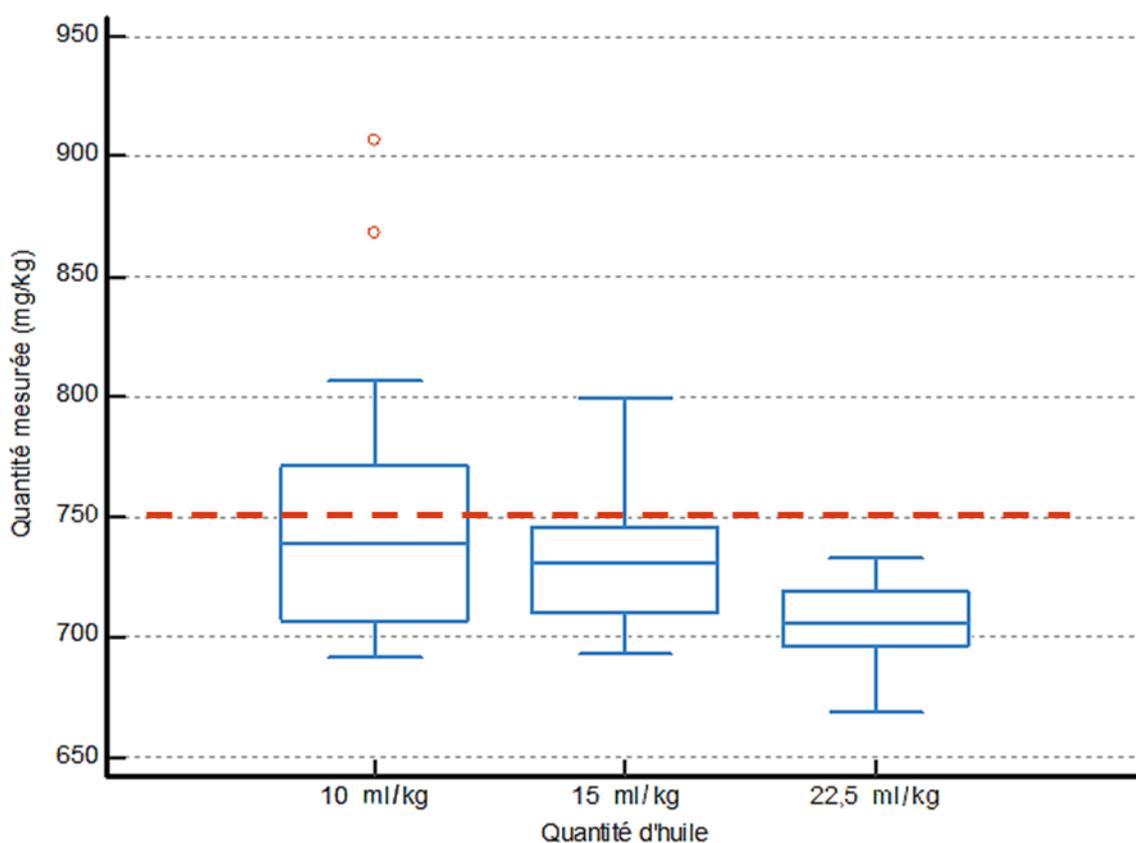


Figure 63 : Quantité de florfénicol (en mg/kg) mesurée dans les échantillons de la procédure C, enrobés 10 ml/kg, 15 ml/kg ou 22,5 ml/kg d'huile (en rouge la quantité cible, les valeurs extrêmes sont représentées par les cercles orange)

#### d) Influence des pertes mesurées sur la teneur en principe actif

Les pertes d'antibiotiques estimées lors de la réalisation de chaque réplicat ont été mises en relation avec les teneurs mesurées dans l'aliment, pour les réplicats correspondants (tableau XXVI). Ces résultats ont permis de calculer les pertes non expliquées, probablement principalement dues aux reliquats d'antibiotique restés au fond du tambour, et présentées dans le même tableau. Ces pertes sont exprimées en pourcentage de la quantité de florfénicol ajoutée lors de la préparation de l'enrobage.

Une corrélation entre les pertes de principe actif estimées lors de la préparation du mélange et la teneur moyenne mesurée dans l'aliment pour chaque réplicat est recherchée graphiquement (figure 64 et figure 65). Visuellement, la répartition des points ne suggère pas clairement de lien entre ces deux paramètres.

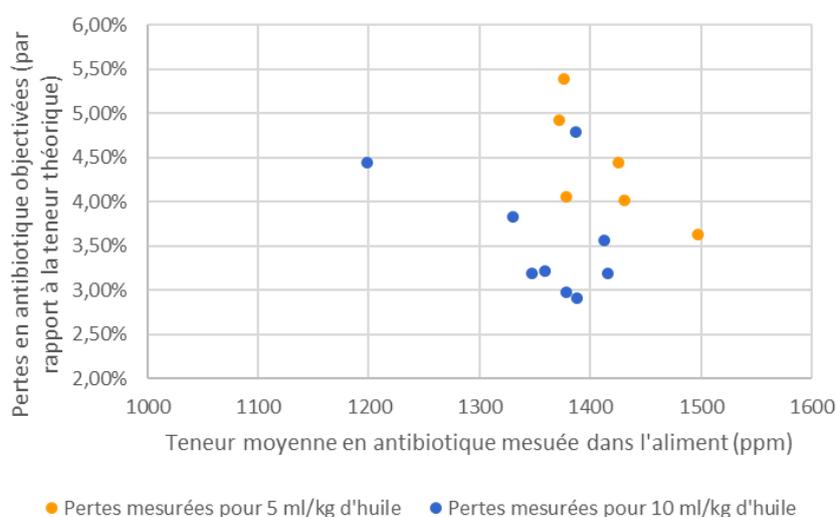


Figure 64 : Teneur moyenne en antibiotique par rapport aux pertes estimées, pour les mélanges de la procédure B

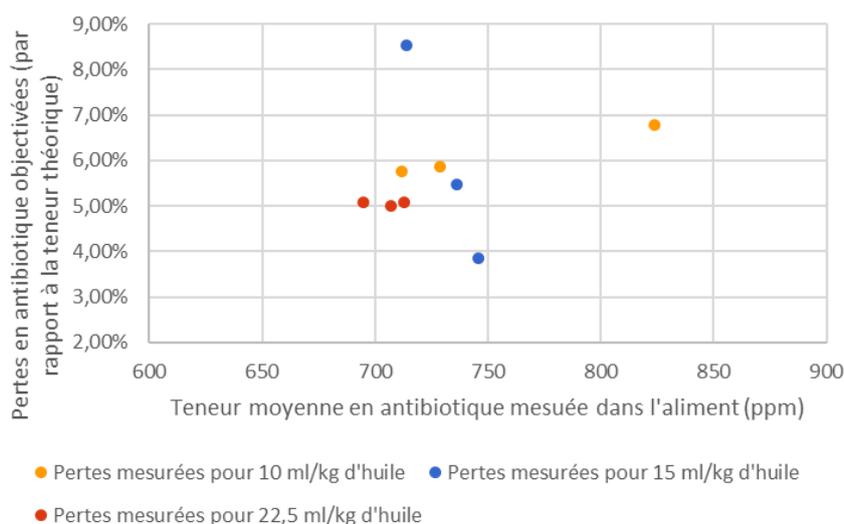


Figure 65 : Teneur moyenne en antibiotique par rapport aux pertes estimées, pour les mélanges de la procédure C

Tableau XXVI : Pertes d'antibiotiques mesurées et pertes non expliquées, par rapport à la teneur en antibiotique théorique (soit ajoutée lors de la préparation du mélange)

Temps de mélange	Quantité d'huile incorporée	Pertes mesurées	Pertes non expliquées	Teneur mesurée (teneur théorique)	Pertes mesurées	Pertes non expliquées	Teneur mesurée (teneur théorique)	Pertes mesurées	Pertes non expliquées	Teneur mesurée (teneur théorique)
<b>Procédure B (FFN + Aliment GROS)</b>		<b>Réplicat 1</b>			<b>Réplicat 2</b>			<b>Réplicat 3</b>		
5 min	10 ml/kg	4,79%	11,90%	1387 ppm (1665 ppm)	3,19%	12,52%	1416 ppm (1680 ppm)	3,56%	10,02%	1413 ppm (1635 ppm)
10 min	10 ml/kg	3,19%	17,34 %	1347 ppm (1695 ppm)	4,44%	24,25 %	1198 ppm (1680 ppm)	2,90%	12,98 %	1388 ppm (1650 ppm)
15 min	10 ml/kg	3,21%	15,89 %	1359 ppm (1680 ppm)	3,83%	16,29 %	1330 ppm (1665 ppm)	2,98%	13,51 %	1378 ppm (1650 ppm)
10 min	5 ml/kg	4,02%	11,56 %	1431 ppm (1695 ppm)	4,92%	14,13 %	1372 ppm (1695 ppm)	5,39%	11,97 %	1376 ppm (1665 ppm)
15 min	5 ml/kg	4,44%	10,74 %	1425 ppm (1680 ppm)	4,06%	13,92 %	1378 ppm (1680 ppm)	3,63%	5,64 %	1497 ppm (1650 ppm)
<b>MOYENNE PROCEDURE B →</b>		<b>Pertes totales :</b>		<b>17,41 %</b>	<b>Pertes mesurées :</b>		<b>3,90 %</b>	<b>Pertes non expliquées :</b>		<b>11,51 %</b>
<b>Procédure C (FFN + Aliment EC)</b>		<b>Réplicat 1</b>			<b>Réplicat 2</b>			<b>Réplicat 3</b>		
15 min	10 ml/kg	5,77%	9,17 %	712 ppm (837 ppm)	5,86%	4,47 %	729 ppm (813 ppm)	6,78%	- 5,23 %	824 ppm (837 ppm)
15 min	15 ml/kg	8,54%	6,15 %	714 ppm (837 ppm)	5,49%	6,58 %	736 ppm (837 ppm)	3,86%	7,01 %	746 ppm (837 ppm)
15 min	22,5 ml/kg	5,01%	10,52 %	707 ppm (837 ppm)	5,07%	9,44 %	695 ppm (813 ppm)	5,07%	7,71 %	713 ppm (813 ppm)
<b>MOYENNE PROCEDURE C →</b>		<b>Pertes totales :</b>		<b>11,92 %</b>	<b>Pertes mesurées :</b>		<b>5,72 %</b>	<b>Pertes non expliquées :</b>		<b>6,20 %</b>

Une comparaison des pertes mesurées lors de la réalisation des mélanges de la procédure B par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis permet d'objectiver une différence significative ( $p$ -value = 0,026) entre les aliments enrobés avec 5 ml/kg d'huile (4,4 % de pertes en moyenne) et ceux préparés avec 10 ml/kg (3,6 % de pertes en moyenne).

### 3. Discussion

Il n'existe à ce jour aucune norme quant aux spécificités auxquelles un aliment enrobé doit répondre. Ce type d'aliment est en effet propre à l'aquaculture. Comme il a été montré lors de la description du contexte scientifique et réglementaire entourant cette pratique, le règlement européen reconnaît la possibilité de réaliser des enrobages d'aliments pour répondre aux besoins spécifiques des fermes aquacoles. Cependant l'élaboration de lignes directrices de bonnes pratiques incombe aux états membre, et de tels guides n'existent pas encore aujourd'hui.

À défaut de lignes directrices spécifiques à l'enrobage d'aliments par des antibiotiques, cette étude a retenu comme références les critères utilisés dans la réglementation sur l'aliment médicamenteux. Selon le règlement (UE) 2019/4 du 11 décembre 2018 concernant la fabrication, la mise sur le marché et l'utilisation d'aliments médicamenteux pour animaux, la fabrication doit veiller « à la dispersion homogène du médicament vétérinaire dans l'aliment médicamenteux [...] ». Les critères applicables à l'homogénéité dans ce règlement s'appuient sur les caractéristiques (notamment l'AMM) des prémélanges utilisés, et sur des techniques de mélange non applicables pour nos travaux. Pour évaluer la qualité de nos résultats dans le cadre d'une utilisation hors AMM d'antibiotiques en fermes aquacoles, nous avons privilégié la décision du 12 février 2007 relative aux bonnes pratiques de fabrication et de distribution en gros des aliments médicamenteux et l'arrêté du 9 juin 2004 relatif aux bonnes pratiques de préparation extemporanée des médicaments vétérinaires.

#### a) Évaluation du protocole expérimental

La rédaction de protocoles expérimentaux précis et le contrôle systématique d'un certain nombre de points critiques au cours des expérimentations, en incluant le transport et l'analyse des échantillons, garantit la qualité, la reproductibilité et l'intégrité des données générées au cours de nos essais, dans une philosophie proche des bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Le matériel était vérifié *a minima* quotidiennement (température des congélateurs, étalonnage des balances, contrôle de la température ambiante en continu). Chaque étape réalisée était scrupuleusement consignée dans un document de suivi des procédures (voir annexe 6), avec des points de contrôle pour limiter tout risque d'erreur ou de déviation au protocole. Ces procédures ont par exemple permis d'identifier très précocement une erreur de pesée qui a ainsi pu être corrigée rapidement. De fait, nous sommes très confiants dans la qualité de nos essais expérimentaux.

Tous les mélanges ont été réalisés par la même personne et avec le même matériel, afin de limiter les biais associés.

Chaque échantillon analysé est constitué de quatre prélèvements réalisés aux sommets d'un rectangle à la surface de l'aliment, avec des vidanges réalisées entre chaque échantillon. Ce choix permet de produire des échantillons les plus représentatifs possible de l'ensemble du mélange, y compris en étudiant la potentielle stratification de la teneur en principe actif. La quantité

minimale d'aliment à prélever diverge selon les référentiels consultés. Les échantillons de 120 grammes prélevés dans notre étude correspondent à la ligne directrice particulière n°1 de la décision du 12 février 2007 relative aux bonnes pratiques de fabrication et de distribution en gros des aliments médicamenteux, qui précise qu'un prélèvement ne peut être en quantité inférieure à 100 grammes. En revanche, il est précisé dans les lignes directrices II A de l'arrêté du 9 juin 2004 relatif aux bonnes pratiques de préparation extemporanée que les prélèvements doivent peser au moins 500 grammes. Ces mesures sont prévues pour des fabrications en usines d'aliments, pour des productions de plusieurs centaines de kilos généralement. Proportionnellement, nos 5 échantillons de 120 grammes représentent au total entre 3 % pour l'aliment grossissement et 6 % pour l'aliment éclosion du mélange réalisé. Par ailleurs, l'échantillonnage doit être « représentatif de la ration journalière d'un animal d'une espèce de destination », soit 30 grammes pour une truite de 3 kg rationnée à 1 %. Quant au nombre d'échantillons à prélever pour un lot donné, les deux textes précités prévoient un minimum de 10 échantillons. Par rapport à la quantité d'aliment enrobé produite, nous nous sommes limités à cinq échantillons par bétonnière, bien que chaque échantillon soit déjà un mélange de 4 points distincts de prélèvement. L'échantillonnage a été étalé sur 5 étapes de vidange de la bétonnière, ce qui correspond aux recommandations de la décision du 12 février 2007 relative aux bonnes pratiques de fabrication et de distribution en gros des aliments médicamenteux.

La méthode d'analyse de laboratoire est la même que celle qui a été mise en place et validée en partie C pour la recherche de l'OTC et du FFN dans les aliments utilisés. Dans le cadre de l'analyse des échantillons de ces essais, les CV analytiques mesurés sont toujours inférieurs à 10 %, tel que requis par la décision (CE) 2002/657.

Pour l'analyse statistique, le choix a été fait d'utiliser la moyenne des trois valeurs de LC-MS/MS données pour un échantillon par le laboratoire, soit d'utiliser une seule valeur par échantillon. Ce choix permet théoriquement de s'affranchir de la variance analytique, afin de ne comparer que les variances relatives aux échantillons. Cette analyse comporte cependant des biais notables. En effet, les échantillons ont été traités comme indépendants, mais les données analysées sont hiérarchisées, car les 15 échantillons sont prélevés au sein de 3 réplicats différents. De plus, il est possible que la position du prélèvement (en surface ou en profondeur, après vidange d'une partie de la bétonnière) ait une influence sur le résultat obtenu, ce qui n'a pas été pris en compte ici. L'analyse statistique réalisée permet ainsi une approche limitée, mais constituait le modèle applicable le plus facilement et le plus rapidement. La réalisation d'une étude de répétabilité par modèle linéaire à effets mixtes, qui prendra en compte ces liens, est programmée en vue de la publication des résultats.

L'estimation de la quantité d'antibiotique perdue lors de la réalisation du mélange est limitée par la précision des instruments de mesure pour la pesée de masses de l'ordre du gramme, qui peut parfois être insuffisante. Le résultat obtenu doit ainsi être traité comme une estimation et non une mesure exacte.

## b) Performances des méthodes de mélange

### (1) Teneur en principe actif

#### (a) Comparaison aux lignes directrices

L'efficacité des protocoles d'enrobage sélectionnés peut être évaluée en comparant la teneur moyenne en principe actif mesurée par mélange à la teneur cible. Ainsi, la ligne directrice n°1 de la décision du 12 février 2007 relative aux bonnes pratiques de fabrication et de distribution en gros des aliments médicamenteux prévoit une concentration moyenne comprise entre 80 % et 110 % de la concentration cible, contre une concentration moyenne entre 90 % et 110 % de la concentration cible prévues par la ligne directrice II A de l'arrêté du 9 juin 2004 relatif aux bonnes pratiques de préparation extemporanée des médicaments vétérinaires.

Les teneurs en antibiotiques moyennes minimales et maximales mesurées pour chaque protocole de mélange sont présentées dans le tableau XXVII. On observe ainsi que deux mélanges ne répondent pas aux critères de validité des préparations extemporanées d'aliments médicamenteux vétérinaires (en gras) et qu'un seul ne correspond pas non plus aux critères de validité d'un aliment médicamenteux (en rouge).

Tableau XXVII : Teneur en antibiotique moyenne par réplikat minimale et maximale en fonction des protocoles de mélange (les teneurs inférieures à 90 % sont présentées en gras, celle inférieure à 80 % en rouge)

Temps de mélange	Quantité d'huile incorporée	Minimum	Maximum
<b>Procédure A (OTC + Aliment GROS)</b>			
10 min	10 ml/kg	90,23 %	92,31 %
15 min	10 ml/kg	90,50 %	102,78 %
<b>Procédure B (FFN + Aliment GROS)</b>			
5 min	10 ml/kg	92,46 %	94,37 %
10 min	10 ml/kg	<b>79,87 %</b>	92,52 %
15 min	10 ml/kg	<b>88,67 %</b>	91,86 %
10 min	5 ml/kg	91,44 %	95,41 %
15 min	5 ml/kg	91,88 %	99,83 %
<b>Procédure C (FFN + Aliment EC)</b>			
15 min	10 ml/kg	94,93 %	109,89 %
15 min	15 ml/kg	95,19 %	99,53 %
15 min	22,5 ml/kg	92,65 %	95,12 %

Ces deux préparations aux valeurs minimales considérées comme invalides au regard des référentiels disponibles sont issues de la procédure B. Pour la procédure 15 min de mélange avec 10 ml/kg d'huile, les trois réplikat présentent des teneurs en antibiotiques relativement proches. Il existe par contre des échantillons moins concentrés, situés plutôt en surface de l'aliment enrobé (voir partie II.D.3.b)(2)). En revanche, pour la procédure 10 min de mélange avec 10 ml/kg d'huile, le réplikat n°2 présente une teneur moyenne en antibiotique basse.

Pour ce réplicat, le taux de perte estimé en partie dédiée est de 4,44 % de la quantité d'antibiotique incorporée. Ce taux de pertes est proche de la moyenne observée pour les mélanges de la procédure B, qui est de 3,90 %. Ainsi, une erreur de manipulation qui aurait pu entraîner des pertes supérieures aux autres mélanges lors des différents transvasements ne semble pas être à l'origine de la faible teneur en antibiotique mesurée dans cet aliment.

Les résultats détaillés avec les teneurs mesurées par échantillon pour le réplicat n°2 du mélange réalisé avec 10 ml/kg d'huile et mélangé 10 minutes mélange sont présentés à travers le tableau XXVIII. Il est à noter qu'il existe deux séries de mesure pour cette préparation. En effet, une erreur analytique ayant mené à un résultat aberrant sur un échantillon du réplicat n°3 du même protocole, tous les échantillons des trois réplicats de ce mélange ont été analysés à nouveau. La première analyse n'a alors pas été prise en compte dans les résultats.

*Tableau XXVIII : Teneur en antibiotique mesurée dans les échantillons d'un mélange de la procédure B (FFN + Aliment GROS) (la valeur cible est de 1500 ppm de florfénicol)*

<b>Protocole</b>	<b>10 ml/kg d'huile 10 minutes de mélange</b>	<b>10 ml/kg d'huile 10 minutes de mélange</b>
Réplicat	Réplicat 2 : analyse n°1	Réplicat 2 : analyse n°2
Échantillon 1	1137 ppm	1097 ppm
Échantillon 2	1098 ppm	1107 ppm
Échantillon 3	1265 ppm	1167 ppm
Échantillon 4	1354 ppm	1303 ppm
Échantillon 5	1288 ppm	1315 ppm
Moyenne	1229 ppm	1198 ppm
Par rapport à la valeur cible	<b>81,93 %</b>	<b>79,87 %</b>

On remarque d'abord qu'aucun échantillon des deux séries d'analyse ne présente de résultat aberrant pouvant entraîner une baisse drastique de la teneur observée, écartant l'hypothèse d'une erreur d'échantillonnage ou d'analyse pour expliquer ces résultats. Cela est d'autant plus vrai que les résultats présentés pour le réplicat n°2 du protocole avec un mélange de 10 minutes sont cohérents d'une analyse à l'autre, avec une teneur moyenne basse par rapport aux autres mélanges analysés lors de ces essais.

Ensuite, il est possible de noter lors de l'observation des résultats une tendance à l'augmentation de la teneur en antibiotique de l'échantillon 1 à l'échantillon 5. Cet effet est analysé dans la partie II.D.3.b)(2) ci-après et pourrait expliquer une teneur moyenne en antibiotique faible pour ce mélange.

### (b) Comparaison à la littérature scientifique

Certaines études décrites en page 34 présentent des protocoles d'enrobage d'aliments à destination de poissons avec des antibiotiques, ainsi que les résultats obtenus en termes d'écart par rapport à la valeur cible. Cependant elles ne font état que d'enrobage réalisés avec des antibiotiques sous forme de poudre, sur des granulés de 1,4 mm à 4 mm de diamètre. Il est ainsi prudent de ne comparer ces résultats qu'aux teneurs moyennes obtenues dans la procédure A (OTC + aliment GROS). Pour cette procédure, les écarts mesurés entre la valeur cible et la teneur moyenne en antibiotique mesurée par réplicat vont de - 10 % à + 3 %. Ces résultats semblent alors très satisfaisants par rapport à ce qui est décrit dans la littérature. En effet, Zanuzzo *et al.* décrivent en 2022 un pourcentage de perte de 18 % à 20 %, Barreto *et al.* un pourcentage de perte de 7 % à 27 % en 2018 et enfin Jarau *et al.* une perte allant de 4,8 % à 10,2 % en 2019.

Cependant, il est important de préciser que ces résultats sont exprimés en pourcentage de perte par rapport à la quantité cible, et non par rapport à la quantité d'antibiotique incorporée, majorée de 15 % pour nos essais dans le cas de l'oxytétracycline. Le tableau suivant propose des valeurs de pourcentage de perte par rapport aux quantités réellement incorporées. Celles-ci sont calculées à partir des quantités d'antibiotiques pesées pour le mélange et de la concentration en principe actif des spécialités utilisées.

Tableau XXIX : Écarts de la teneur moyenne mesurée par réplicat par rapport à la valeur cible et à la quantité d'antibiotique incorporée, maximaux et minimaux, pour la procédure A (OTC + aliment GROS)

Antibiotique	Valeur cible (ppm)	Écart par rapport à la valeur cible		Quantité incorporée (ppm)	Écart par rapport à la quantité incorporée	
		Minimum	Maximum		Minimum	Maximum
<b>OTC</b>	9000	- 2,8 %	9,77 %	10350	10,62%	21,54%

On remarque que les valeurs corrigées sont plus proches de ce qui est habituellement cité dans la littérature. Ainsi, si les procédures de mélange permettent d'obtenir une perte d'antibiotique par rapport à la valeur cible plutôt moins élevée que ce qui est présenté dans la littérature, on peut supposer que c'est bien grâce à la majoration des doses réalisée lors de la préparation du mélange.

### (2) Homogénéité

Zarza suggère en 2012 qu'un coefficient de variation inférieur à 10 % représente un critère de qualité suffisant pour attester de l'homogénéité de l'enrobage d'antibiotique sur des aliments à destination des poissons. Dans le cadre des textes réglementaires en revanche, un coefficient de variation inférieur à 5 % est requis pour les préparations extemporanées d'aliment médicamenteux et les aliments médicamenteux fabriqués en gros, bien qu'un coefficient de variation allant jusqu'à 10 % soit toléré dans ce dernier cas, sous réserve d'analyse et de mesures correctives (décision du 12 février 2007 relative aux bonnes pratiques de fabrication et de distribution en gros des aliments médicamenteux, arrêté du 9 juin 2004 relatif aux bonnes pratiques de préparation extemporanée des médicaments vétérinaires).

Les coefficients de variation calculés par mélanges se situent entre 0,8 % et 9,9 % (tableau XXX). Ainsi, tous les mélanges réalisés présentent une homogénéité conforme au regard du seuil proposé par Zarza, et acceptable au regard du seuil appliqué à la préparation d'aliment médicamenteux en gros. Cependant, sept de ces mélanges (en gras) présentent un CV compris entre 5 % et 10 %, donc non conformes au regard du seuil applicable à la préparation extemporanée d'aliments médicamenteux vétérinaires.

Tableau XXX : Coefficient de variation calculé par réplikat en fonction des protocoles de mélange (les CV supérieurs à 5 % sont présentées en gras)

Temps de mélange	Quantité d'huile incorporée	Réplikat 1	Réplikat 2	Réplikat 3
Procédure A (OTC + Aliment GROS)				
10 min	10 ml/kg	<b>6,19 %</b>	1,83 %	2,55 %
15 min	10 ml/kg	2,50 %	0,76 %	1,42 %
Procédure B (FFN + Aliment GROS)				
5 min	10 ml/kg	<b>5,42 %</b>	<b>9,93 %</b>	2,40 %
10 min	10 ml/kg	3,42 %	<b>7,86 %</b>	2,00 %
15 min	10 ml/kg	<b>6,50 %</b>	3,28 %	3,72 %
10 min	5 ml/kg	1,47 %	1,64 %	0,91 %
15 min	5 ml/kg	1,18 %	3,87 %	<b>5,17 %</b>
Procédure C (FFN + Aliment EC)				
15 min	10 ml/kg	2,71 %	2,16 %	<b>6,66 %</b>
15 min	15 ml/kg	1,25 %	2,21 %	4,63 %
15 min	22,5 ml/kg	2,56 %	2,71 %	2,24 %

La variabilité analytique, avec un CV entre 3 % et 6 %, rend difficile l'objectif d'un CV de la teneur d'antibiotique mesurée dans l'aliment inférieur à 5 %. En effet, le coefficient de variation analytique devrait être inférieur au coefficient de variation requis dans le mélange (Calderôn *et al.* 2000). Ainsi, un CV inférieur à 10 % peut être considéré comme un seuil pertinent à l'égard des résultats analytiques obtenus.

L'utilisation de marqueurs pouvant présenter un CV analytique plus faible, comme Micro-tracer™, favorise l'atteinte des objectifs fixés dans la réglementation pour l'évaluation de l'homogénéité des mélanges (soit un CV inférieur à 5 %). Nous avons cependant privilégié une méthode de mesure directe, d'une part parce que cet outil n'était pas pertinent pour des médicaments sous forme de solution, et d'autre part parce que nous voulions mesurer la teneur réelle de l'aliment enrobé en antibiotique dans les conditions applicables en ferme, et pas seulement qualifier la procédure de mélange.

Concernant les mélanges présentant un CV supérieur à 5 %, aucune erreur de manipulation n'a été relevée lors de leur réalisation. À l'analyse des résultats obtenus par échantillons, aucune

valeur aberrante, qui aurait pu résulter d'une erreur d'échantillonnage ou d'analyse, n'est repérée.

En revanche, un gradient de concentration d'antibiotique de l'échantillon 1 vers l'échantillon 5 tel que décrit dans l'analyse de la teneur en principe actif est de nouveau observé pour certains des mélanges présentant un CV supérieur à 5 % (tableau XXXI).

Tableau XXXI : Teneur en antibiotique mesurée dans les échantillons de certains mélanges de la procédure A et B

Procédure	A (OTC + Aliment GROS)		B (FFN + Aliment GROS)	
	10 ml/kg d'huile 10 minutes de mélange		10 ml/kg d'huile 10 minutes de mélange	10 ml/kg d'huile 15 minutes de mélange
Réplicat	Réplicat 1		Réplicat 2	Réplicat 1
Échantillon 1	7621 ppm		1096 ppm	1281 ppm
Échantillon 2	7541 ppm		1107 ppm	1241 ppm
Échantillon 3	8126 ppm		1167 ppm	1365 ppm
Échantillon 4	8882 ppm		1303 ppm	1431 ppm
Échantillon 5	8430 ppm		1315 ppm	1476 ppm
Moyenne	8120 ppm		1198 ppm	1359 ppm
Coefficient de variation	6,19 %		7,86 %	6,50 %

Il faut alors rappeler que les échantillons sont systématiquement prélevés dans le même ordre. Le premier est prélevé en surface du mélange, le deuxième après vidange d'un cinquième du contenu du tambour et ainsi de suite. Les granulés situés au fond de la mélangeuse présenteraient ainsi une teneur en antibiotique supérieure par rapport à ceux situés en surface. Ce phénomène pourrait s'expliquer par un ruissellement de l'huile et de l'antibiotique à la surface des granulés, vers le fond de la cuve, par effet de gravité. Un tel ruissellement pourrait alors être mise en cause en cas de défaut d'homogénéité, mais également en cas de teneur en antibiotique faible, car il pourrait majorer le dépôt d'antibiotique sur les parois du tambour.

Il est alors possible d'imaginer que ce phénomène de ruissellement augmente si les aliments enrobés demeurent longtemps immobiles dans le tambour. Dans le cadre de nos essais, l'arrêt du mélange était séparé de cinq à dix minutes du prélèvement du premier échantillon, chaque prélèvement étant également séparé de cinq à dix minutes du précédent, temps correspondant à la vidange du cinquième du contenu du tambour. Il n'y a pas eu de différence notée dans le temps d'échantillonnage entre les différentes procédures, mais le temps de prise d'échantillon n'avait pas été identifié comme point de contrôle pertinent. Ce phénomène est notable pour plusieurs réplicats de la procédure B réalisés avec 10 ml/kg d'huile, mais pas dans le cas des aliments enrobés avec 5 ml/kg d'huile.

Deux mélanges issus de la procédure B, avec 10 ml/kg d'huile et mélangés 5 minutes, présentent un coefficient de variation supérieur à 5 % (tableau XXX). Dans les deux cas, l'effet de gradient de concentration présenté ci-avant n'est pas mis en évidence. Cependant, à l'analyse des résultats obtenus par échantillon, on observe un écart entre la teneur mesurée dans l'échantillon n°1 et celle trouvée dans les autres échantillons (tableau XXXII).

Tableau XXXII : Teneur en antibiotique mesurée dans les échantillons de deux mélanges de la procédure B

Procédure	B (FFN + Aliment GROS)	
Protocole	10 ml/kg d'huile 5 minutes de mélange	
Réplicat	Réplicat 1	Réplicat 2
Échantillon 1	<b>1256 ppm</b>	<b>1192 ppm</b>
Échantillon 2	1481 ppm	1533 ppm
Échantillon 3	1364 ppm	1355 ppm
Échantillon 4	1415 ppm	1407 ppm
Échantillon 5	1418 ppm	1592 ppm
Moyenne	1387 ppm	1416 ppm
Coefficient de variation	5,42%	9,93 %

La présence de ce défaut d'homogénéité entre la surface de l'aliment enrobé et le reste du tambour, observé pour deux préparations sur trois mélangées cinq minutes, peut-être un argument en défaveur de l'utilisation d'un tel temps de mélange. Les préparations sont néanmoins conformes au regard du seuil choisi, soit un CV inférieur à 10 %.

### c) Comparaison des modalités de mélange

#### (1) Temps de mélange

L'homogénéité du mélange est un facteur de qualité essentiel à la mise en œuvre du traitement des animaux. L'efficacité des traitements dépend notamment de la dose administrée à chaque animal. C'est une problématique majeure notamment lors de la fabrication d'aliments enrobés à la ferme (Park *et al.* 2012 ; Daniel 2009). Dans cette étude, la durée optimale de mélange avait besoin d'être précisée selon les médicaments et aliments utilisés. Une durée trop longue pourrait ne pas être respectée par les éleveurs, une durée trop brève pourrait au contraire ne pas assurer un mélange suffisamment homogène.

L'étude de l'influence du temps de mélange fournit ici des résultats variables selon les aliments et médicaments considérés. L'interprétation de ces résultats doit toutefois rester prudente, le nombre d'échantillons restant limité, et les coefficients de variations comparés entre les différents mélanges étant du même ordre de grandeur que le CV analytique.

Pour les médicaments sous forme de poudre, comme l'OTC dans la procédure A, sur un aliment type grossissement, un temps de mélange de l'aliment et de l'antibiotique de 10 minutes paraît plus pertinent qu'un mélange de 15 minutes. Pour les éleveurs, si l'on compte les 5 minutes de mélange supplémentaires pour l'huile, cela représente une durée totale de mélange de 15 minutes, ce qui est proche des habitudes déjà en place dans les élevages. En effet les éleveurs répondant au questionnaire présenté en partie A déclarent majoritairement mélanger les aliments enrobés entre 10 minutes et 15 minutes en atelier de grossissement. Fondamentalement, les deux durées de mélange testées permettent de qualifier les aliments enrobés comme de qualité suffisante.

Pour les médicaments sous forme de solution, comme le florfenicol dans la procédure B, sur un aliment de type grossissement, les résultats ne permettent pas de conclusion nette. Pour les aliments enrobés avec 5 ml/kg d'huile, la durée de mélange de 10 minutes semble également plus pertinente, avec un coefficient de variation plus faible. Les résultats sont plus disparates avec 10 ml/kg d'huile. Cependant, bien que aucune différence statistiquement significative ne soit notée entre les variances de ces préparations, deux réplicats sur trois du protocole avec 5 minutes de brassage présentent un CV supérieur à 5 %, allant jusqu'à près de 10 % pour le réplicat 2. Ce résultat est un argument pour déconseiller une durée de mélange de 5 minutes seulement.

Pour les médicaments sous forme de solution, comme le florfenicol dans la procédure C, sur un aliment de type éclosion, seule une durée de 15 minutes a été testée. Pour tous les mélanges réalisés, les résultats en termes de qualité de mélange après 15 minutes assurent une qualité suffisante de l'aliment enrobé.

## (2) Quantité d'huile

L'influence de la quantité d'huile utilisée pour réaliser l'enrobage est différente d'abord selon la nature de l'aliment.

Pour l'aliment de type grossissement, la quantité de 10 ml/kg d'huile semble être une quantité maximale. Dans les résultats observés sur la procédure A, une préparation sur les six effectuées semble présenter un gradient de concentration entre la surface et le fond de la cuve, quoique dans une moindre mesure par rapport à la procédure B. Pour cette dernière, cette stratification a été également décrite dans la partie précédente, notamment avec 10 ml/kg d'huile ajoutée au mélange (tableau XXVIII et tableau XXXI). Avec l'augmentation de la quantité d'huile ajoutée, la fraction qui n'est pas retenue par l'aliment augmente, et, avec elle, le ruissellement entraînant potentiellement l'antibiotique en partie décline. Ainsi, une quantité d'huile importante semble délétère à la teneur en antibiotique moyenne et à l'homogénéité du mélange. Ce constat est d'autant plus important dans le cadre d'enrobage avec du florfenicol, car le volume de solution d'antibiotique s'ajoute à celui de l'huile ajoutée. Ainsi, lors de la préparation, 10 ml/kg d'huile sont mélangés avec 5,5 ml/kg de florfenicol, ce qui fait un total de 15,5 ml/kg. Une quantité qui augmente probablement les risques de ruissellement de l'antibiotique avec l'huile. Avec 5 ml/kg d'huile dans la procédure B, le volume de liquide mélangé à l'aliment est de 10,5 ml/kg, une valeur plus proche de ce qui a été réalisé dans la procédure A. Pour cet aliment, un enrobage d'un maximum 10 ml/kg de solution lipophile semble l'approche à privilégier.

L'aliment de type éclosion est très différent de l'aliment de type grossissement, sa teneur en matière grasse étant plus faible et sa granulométrie très inférieure. Sa surface de contact par rapport à son volume et sa capacité d'absorption de l'huile sont donc supérieures à celles de l'aliment de type grossissement. Cela peut expliquer qu'il soit nécessaire de réaliser une dilution de l'antibiotique dans une quantité d'huile plus importante pour assurer une répartition homogène de celui-ci. De plus, les taux de rationnement étant plus élevés en éclosion, la quantité d'antibiotique incorporée est plus faible relativement à la quantité d'aliment, et nécessite une dilution supérieure. La quantité de 10 ml/kg d'huile semble insuffisante dans ce cadre pour garantir la meilleure homogénéité, avec un coefficient de variation significativement plus important, et notamment certaines valeurs très différentes des autres. Il est ainsi possible d'observer, pour le troisième mélange réalisé avec ce protocole, une teneur finale en antibiotique qui dépasse la teneur théorique à laquelle on a retranché les pertes mesurées (voir tableau XXVI). Cela aboutit artificiellement à des pertes non expliquées négatives, phénomène qui peut être considéré comme le reflet d'une répartition inégale du produit. Pour 15 ml/kg et 22,5 ml/kg d'huile incorporée, les valeurs mesurées dans les différents échantillons sont plus homogènes. Une tendance au ruissellement d'antibiotique est cependant visible dans les résultats d'analyse du premier réplicat du protocole incorporant 22,5 ml/kg d'huile, bien que cela ne mène pas à une non-conformité du mélange au regard de l'homogénéité et de la teneur en antibiotique.

L'adjonction de quantités d'huiles importantes peut être questionnée au regard de la composition des aliments, et de leur adéquation avec le stade physiologique des poissons. Ainsi, pour 10 ml/kg d'huile ajoutée, la teneur en matière grasse de l'aliment distribué augmente de 1 %, et peut le rendre moins adapté aux besoins des animaux. Les durées de traitement étant de l'ordre d'une à deux semaines, cet effet peut probablement être considéré comme négligeable.

Une quantité d'huile ajoutée trop importante pourrait en revanche être délétère pour l'appétence de l'aliment, notamment avec des huiles végétales. Ainsi, Geurden *et al.* ont montré en 2005 que les truites arc-en-ciel discriminaient les aliments en fonction de la source d'huile utilisée, en faveur des huiles de poissons par rapport aux huiles végétales. L'huile de colza était cependant la moins discriminée des trois huiles végétales proposées. Le recours à une huile de poisson pourrait permettre d'améliorer l'appétence de l'aliment enrobé, surtout lorsque les quantités d'huile sont importantes. Une moindre appétence va se traduire par une prise alimentaire moins complète et moins rapide, favorisant le lessivage de l'aliment enrobé.

L'ajout d'huile permet, dans le cas des solutions médicamenteuses liposolubles, de diluer le principe actif et ainsi par exemple de limiter les pertes en antibiotique lors des transvasements. Cela explique une perte mesurée lors de la réalisation du mélange supérieure dans le cas de mélanges préparés avec 5 ml/kg d'huile par rapport à ceux préparés avec 10 ml/kg, comme ce qui est montré sur l'aliment grossissement avec du florfenicol. Cela permet également de limiter le lessivage après dépôt de l'aliment dans l'eau. Pour mieux définir la quantité optimale d'huile à privilégier, des essais portant sur le lessivage pourraient être pertinents.

#### *d) Application sur le terrain*

Si l'homogénéité et la conformité des mélanges testés se révèlent satisfaisantes, il faut questionner la reproductibilité de ces résultats en condition d'utilisation par les pisciculteurs.

##### (1) Matériel et matières premières

L'intérêt de la construction de cette partie expérimentale est d'adapter les recommandations formulées aux matières premières et matériels employés le plus couramment au sein des piscicultures françaises. Cependant, il n'était pas possible de tester l'ensemble des pratiques rencontrées sur le terrain. Par exemple, certains pisciculteurs utilisent des matières premières non testées comme agent enrobant, par exemple le glycérol. Nos recommandations ne permettront pas un positionnement par rapport à ces pratiques.

##### (2) Température

Il est connu que la température ambiante peut avoir une influence sur les résultats obtenus lors de l'enrobage des antibiotiques. En effet, l'huile a tendance à devenir plus liquide et moins visqueuse avec l'augmentation de la température (Herschel 1922). Les préparations étudiées ont été réalisées en été, en intérieur, avec une température ambiante moyenne oscillant entre 16 °C et 26 °C. Il est probable que de tels mélanges réalisés en hiver par un temps plus froid ou en été par un temps plus chaud ne se comportent pas de la même façon.

##### (3) Autres aliments

Nous avons vu que les performances des diverses méthodes de mélange testées sont différentes selon le type d'aliment utilisé. Or il est possible d'envisager l'utilisation en élevage d'aliments de nature différente. D'abord de granulés de diamètre différent ou d'aliments de nature différente, notamment de miettes de granulés et non de micro-granulés.

Concernant la granulométrie des aliments utilisés, le choix a été fait de tester deux aliments pour apprécier les différentes problématiques posées par la taille des granulés. Il est raisonnable d'envisager que les aliments de petite taille auront un comportement similaire à nos micro-granulés pour écloserie et les aliments de grande taille un comportement similaires à nos granulés de gamme grossissement. Les granulés de taille intermédiaire auraient alors un comportement intermédiaire.

Au sujet de la nature des aliments, la forme de miettes de granulés n'a pas été testée. Bien que comportant les mêmes caractéristiques que les micro-granulés en termes de taille et donc de surface de contact mais également en termes de teneur en matière grasse, il est difficile d'assurer que leur comportement lors d'enrobage sera similaire. Un essai est prévu dans le cadre du projet enr-EAU-bage afin d'évaluer le comportement macroscopique des miettes de granulés lors du mélange et pourra être complété de mesures de laboratoire afin de confirmer que les résultats obtenus sur les micro-granulés sont transposables.

##### (4) Autres formes galéniques

Le choix a été réalisé de réduire les essais à deux formes galéniques, une forme poudre et une forme de solution liposoluble. Bien que ce choix ait révélé des problématiques inhérentes aux formes de poudres et aux formes liquides, il est possible de s'interroger sur la transposabilité de ces résultats à certaines formes galéniques, notamment aux solutions aqueuses. En effet, il est

montré en partie A que de nombreux pisciculteurs français utilisent l'association d'antibiotiques de la famille des sulfamides associé au triméthoprime. Or la majorité des spécialités citées sont des solutions buvables à mélanger à l'eau de boisson. Il est peu probable que ces solutions aqueuses se comportent de la même manière que les solutions lipophiles testées (notamment parce qu'elles ne sont pas miscibles dans l'huile au départ). Par ailleurs, le lessivage lors de la distribution de l'aliment dans le bassin devrait avoir également une influence très forte sur la dose ingérée par chaque poisson. En conclusion, sauf à conduire de nouveaux essais avec ces formes galéniques spécifiques, il est plutôt recommandé de privilégier les formes poudre pour le recours à ce type de traitement.

#### (5) Habitude du manipulateur

Enfin il est primordial de rappeler que ces essais ont été menés dans des conditions expérimentales contrôlées, par un personnel formé ayant réalisé de nombreuses opérations d'enrobage. Plusieurs points de contrôle tels que décrits en partie II.C.1.a) et présentés en annexe 6 ont été mis en place pour limiter au maximum les erreurs de manipulation. Ces points de contrôle ont ainsi permis de révéler une erreur de mesure de volume de florfenicol lors de la préparation d'une procédure et de corriger immédiatement la préparation.

Dans le cadre d'une pisciculture, l'enrobage d'aliments avec des antibiotiques est une opération ponctuelle, ce qui explique qu'une partie des éleveurs ne possède pas de matériel dédié, tel que montré à travers le questionnaire. On peut ainsi estimer que l'utilisation d'un matériel moins adapté conjugué à un manque d'habitude du manipulateur et au manque de points de contrôle pourra conduire à des résultats moins bons que ceux obtenus lors de ces essais.

L'enjeu de ce projet est alors précisément de transmettre aux vétérinaires prescripteurs et par leur biais aux pisciculteurs, l'expérience acquise lors de ces manipulations. Ainsi la réalisation de fiches de bonnes pratiques mais également de films explicatifs permettra de pallier au maximum le manque d'habitude des pisciculteurs et de les accompagner vers le choix des méthodes leur permettant d'obtenir des aliments enrobés de bonne qualité. De tels outils seront produits en 2025.

## Synthèse

Les résultats obtenus permettent de qualifier la majorité des méthodes de mélange testées comme adaptées au regard de la conformité et de l'homogénéité des mélanges produits.

En effet, un seul des mélanges réalisés présentait une teneur en antibiotique insuffisante. Six autres mélanges présentent une teneur en antibiotique ou un coefficient de variation peu satisfaisants, bien qu'acceptables au regard des lignes directrices retenues.

Quelques mélanges présentaient un gradient de concentration en antibiotique depuis la surface vers le fond de la cuve. Cet effet de gradient peut être expliqué par une quantité d'huile incorporée trop importante. Il apparaît ainsi qu'un volume de solution total de 10 ml/kg soit un maximum pour un aliment de type grossissement. L'enrobage avec un antibiotique sous forme de solution lipophile tel que le florfénicol doit amener à diminuer la quantité d'huile à incorporer pour ne pas dépasser significativement 10 ml/kg. Dans le cadre d'un aliment de type éclosion, la dilution de l'antibiotique avec au moins 15 ml/kg d'huile semble nécessaire pour atteindre une homogénéité satisfaisante.

Ces essais n'ont pas montré de façon certaine la supériorité d'un temps de mélange par rapport à un autre. Toutefois, un temps de mélange de 5 minutes semble insuffisant pour l'enrobage d'un aliment de type grossissement avec du florfénicol.

La variété d'aliments et d'antibiotiques testés permet de transposer ces résultats à un grand nombre de situations en élevage. Toutefois, certaines modalités, telles que l'utilisation de miettes de granulés, ou d'antibiotique sous forme de solutions aqueuses, ou de mélangeurs de type robots de cuisine, demandent à être explorées.

Enfin, la transmission de l'expérience et des bonnes pratiques de fabrication construites au fur et à mesure de la réalisation de ces essais est primordiale pour garantir sur le terrain d'aussi bons résultats que ceux obtenus au cours de ce projet. Des vidéos et des documents spécifiques sont prévus par le projet et devront être construits à l'issue de ce travail.

## Conclusion

La première partie de ce projet enr-EAU-bage permet de mettre en lumière les conditions d'utilisation des antibiotiques par les trutticole. Ainsi, le recours à la distribution par voie orale via la réalisation d'aliments enrobés à la ferme est majoritaire. Les méthodes de réalisation de ces mélanges sont en revanche disparates, en cohérence avec une absence de guidelines sur le sujet dans la littérature. De grandes tendances sont en revanche discernables, ainsi les aliments sont majoritairement enrobés avec de l'huile végétale, au moyen d'une mélangeuse de type bétonnière. Les antibiotiques principalement utilisés à cet effet sont le florfenicol, les sulfamides associés à du triméthoprime et l'oxytétracycline. La majorité des éleveurs versent l'antibiotique sur l'aliment durant le fonctionnement de la mélangeuse, ce qui ne saurait être conseillé pour des raisons de sécurité.

Les essais préliminaires ont ensuite permis d'éliminer des procédés de mélange manifestement inadaptés. Ainsi, la réalisation d'une quantité de mélange supérieure à 25 % de la capacité du tambour (masse/volume) est à déconseiller, de la même façon que la réalisation d'un mélange de trop faible volume pour permettre son brassage. La qualité de ce dernier semble être favorisée par l'inclinaison de la mélangeuse le plus horizontalement possible dans le cas de mélanges de faible volume. Le versage de l'antibiotique sur l'aliment avant le démarrage de la mélangeuse permet d'obtenir un mélange visuellement homogène dans le cas d'un aliment de gros diamètre (5mm) mais pas dans le cas d'un aliment de plus faible granulométrie (0,5mm). Dans ce cadre, la projection de l'antibiotique à l'aide d'un pistolet drogueur pendant la rotation du tambour semble fournir de meilleurs résultats. Le décapage de la cuve à l'aide d'un nettoyeur à haute pression semble efficace, tant avec de l'eau chaude que de l'eau froide, bien qu'une recherche de contaminations croisées eût-été nécessaire pour le confirmer.

La partie suivante a d'abord permis de valider la méthode LC-MS/MS développée pour l'extraction, l'identification et la quantification de l'oxytétracycline et du florfenicol dans les aliments utilisés, avec un coefficient de variation analytique inférieur à 10 %. L'analyse de neuf échantillons ne permet en revanche pas de conclure quant à une relation entre la température de conservation et la stabilité des antibiotiques en surface des aliments après quinze jours. Ainsi, bien que la littérature suggère une stabilité de ces deux antibiotiques à température ambiante, des essais complémentaires peuvent être envisagés pour le confirmer et conseiller aux vétérinaires prescripteurs des conditions et durées optimales de conservation pour les aliments enrobés.

Enfin, l'analyse de 150 échantillons issus de dix méthodes d'enrobage de florfenicol ou d'oxytétracycline sur deux aliments différents a permis de qualifier ces méthodes comme adaptées au regard de la conformité et de l'homogénéité des produits. Ainsi, la majoration de 10 % à 15 % des quantités d'antibiotiques incorporées permet d'atteindre une concentration en antibiotique dans l'aliment satisfaisante par rapport à la littérature. L'homogénéité est satisfaisante pour des durées de mélange situées entre quinze et dix minutes. Le dépôt de l'antibiotique sous forme de poudre sur l'aliment avant le démarrage de la mélangeuse et la projection de l'antibiotique sous forme liquide à l'aide d'un pistolet drogueur pendant la rotation du tambour permettent tous deux d'obtenir une homogénéité satisfaisante. Ces analyses suggèrent que les aliments de type écloserie tolèrent un enrobage avec une quantité d'huile plus

importante que les aliments de type grossissement, probablement en lien avec la surface de contact et la teneur en matière grasse de ces granulés. Une étude approfondie sur le lessivage de l'antibiotique lors de la distribution des aliments serait pertinente pour compléter nos recommandations en termes de quantité d'huile à adjoindre mais également en termes d'intérêt du temps de séchage de l'aliment après enrobage.

L'enjeu de ce projet est ensuite de garantir la transmission de ces informations aux éleveurs par le biais des vétérinaires prescripteurs. En effet il est primordial d'assurer la communication des résultats mais également des points de contrôle mis en place pour assurer la qualité des mélanges analysés, afin d'assurer une reproductibilité de ces résultats dans les piscicultures françaises. La rédaction de fiches de bonnes pratiques illustrées associées à un tutoriel vidéo est ainsi prévue suite à cette thèse.

# Bibliographie

AGENCE EUROPÉENNE DES MÉDICAMENTS. Aquaflor 500 mg premix for medicated feeding stuff. Veterinary medicines [en ligne]. [Consulté le 22 octobre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://medicines.health.europa.eu/veterinary/fr/600000044077>

AGRESTE, 2022. Enquête aquaculture 2022 [en ligne]. [Consulté le 9 septembre 2024]. CHIFFRES ET DONNEES. Disponible à l'adresse : <https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/disaron/Chd2403/detail/>

ALDAY-SANZ, V., CORSIN, F., IRDE, E. et BONDAD-REANTASO, M.G., 2012. Survey on the use of veterinary medicines in aquaculture. BONDAD-REANTASO, M.G, ARTHUR J.R. & SUBASINGHE R.P., (eds.) Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. 2012. N° 547, pp. 29-44.

ANMV, 2024. Gaps thérapeutiques en filière Poissons [en ligne], Audition du 31 mai 2024. [Consulté le 2 décembre 2024]. Disponible à l'adresse : [https://www.reseau-francais-sante-animale.net/wp-content/uploads/2024/11/public-2024-05-31\\_CR-audition-gaps-therapeutiques-en-filiere-Poisson\\_-VF.pdf](https://www.reseau-francais-sante-animale.net/wp-content/uploads/2024/11/public-2024-05-31_CR-audition-gaps-therapeutiques-en-filiere-Poisson_-VF.pdf)

ANSES, 2024. Index des RCP. Index des Médicaments vétérinaires autorisés en France [en ligne]. 13 septembre 2024. [Consulté le 13 septembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.ircp.anmv.anses.fr/>

ANSES, 2015. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la « hiérarchisation des dangers sanitaires exotiques ou présents en France métropolitaine chez les poissons d'élevage ». [en ligne]. 29 Septembre 2015. [Consulté le 2 décembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT2013sa0049-05.pdf>

BARRETO, F.M., DA SILVA, M.R., BRAGA, P.A.C., BRAGOTTO, A.P.A., HISANO, H. et REYES, F.G.R., 2018. Evaluation of the leaching of florfenicol from coated medicated fish feed into water. Environmental Pollution. novembre 2018. Vol. 242, pp. 1245-1252. DOI 10.1016/j.envpol.2018.08.017.

BERNARDET, J.-F. et MICHEL, C., 2018. Bactéries et bactérioses des poissons [en ligne]. INRA. [Consulté le 4 septembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://hal.inrae.fr/hal-02790140>

BIANCHINI, A.E. et BALDISSEROTTO, B., 2021. General introduction to pharmacology of aquatic animals. In : Aquaculture Pharmacology [en ligne]. Elsevier. pp. 113-129. [Consulté le 3 septembre 2024]. ISBN 978-0-12-821339-1. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012821339100009X>

BJÖRKLUND, H. V. et BYLUND, G., 1991. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Xenobiotica. janvier 1991. Vol. 21, n° 11, pp. 1511-1520. DOI 10.3109/00498259109044401.

BONDAD-REANTASO, M.G., ARTHUR, J.R., SUBASINGHE, R.P., et FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (éd.), 2012. Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO fisheries and aquaculture technical paper, 547. ISBN 978-92-5-106975-2. SH171 .F36 2009

BRETON, B., 2005. La truite et son élevage. Paris Londres New York : Éd. Tec & doc. Aquaculture-pisciculture. ISBN 978-2-7430-0738-6. 639.375 7

BROWN, L. (éd.), 1993. Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine. 1. pr. Oxford : Pergamon Press. Pergamon veterinary handbook series. ISBN 978-0-08-040835-4.

CALDERÔN, J.F., AMBROZIO, M., MACHADO, M., MELÉNDREZ, J., PEREIRA, A. et ZINN, R.A, 2000. Use of microtracers as a reliable and inexpensive tool for rapid assessment of microingredient distribution in diets for feedlot cattle: molasses- and forage-level effects. Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science. 2000. Vol. 51, pp. 5.

CARABIN, T., 2022. Évaluation de l'efficacité des traitements antibiotiques contre la furonculose (*Aeromonas salmonicida subsp salmonicida*) en élevage truiticole. Thèse de doctorat vétérinaire. Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Agroalimentaire et de l'Alimentation : UFR de médecine de l'université de Nantes.

CARTER, K., 2005. The Effects of Temperature on Steelhead Trout, Coho Salmon, and Chinook Salmon Biology and Function by Life Stage. [en ligne]. 2005. [Consulté le 9 septembre 2023]. Disponible à l'adresse : [https://www.waterboards.ca.gov/northcoast/water\\_issues/programs/tmdls/shasta\\_river/060707/28appendixaetheeffectsoftemperatureonsteelheadtroutcohosalmonandchinooksalmonbiologyandfunction.pdf](https://www.waterboards.ca.gov/northcoast/water_issues/programs/tmdls/shasta_river/060707/28appendixaetheeffectsoftemperatureonsteelheadtroutcohosalmonandchinooksalmonbiologyandfunction.pdf)

ÇIFTCI, İ. et ERCAN, A., 2003. Effects of diets of different mixing homogeneity on performance and carcass traits of broilers. Journal of Animal and Feed Sciences. 2 janvier 2003. Vol. 12, n° 1, pp. 163-171. DOI 10.22358/jafs/67693/2003.

COMITÉ INTERPROFESSIONNEL DES PRODUITS DE L'AQUACULTURE. Les techniques d'élevages en eau douce. CIPA [en ligne]. [Consulté le 13 septembre 2024]. Disponible à l'adresse : [https://www.poisson-aquaculture.fr/les-techniques-delevages-en-eau-douce/#:~:text=L'alevinage%20commence%20g%C3%A9n%C3%A9ralement%20un,adulte%20BB%20\(170%20g\).](https://www.poisson-aquaculture.fr/les-techniques-delevages-en-eau-douce/#:~:text=L'alevinage%20commence%20g%C3%A9n%C3%A9ralement%20un,adulte%20BB%20(170%20g).)

COVETO. Pistolet drogueur manulel Labélevage. COVETO, le partenaire vétérinaire [en ligne]. [Consulté le 8 novembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.coveto.fr/fiche-produit-735418-735456-srub-20-468-469.html>

COYNE, R., SAMUELSEN, O., KONGSHAUG, H., ANDERSEN, K., DALSGAARD, I., SMITH, P. et BERGH, Ø., 2004. A comparison of oxolinic acid concentrations in farmed and laboratory held rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following oral therapy. Aquaculture. septembre 2004. Vol. 239, n° 1-4, pp. 1-13. DOI 10.1016/j.aquaculture.2003.11.034.

- CRAVEDI, J.-P., CHOUBERT, G. et DELOUS, G., 1987. Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. *Aquaculture*. février 1987. Vol. 60, n° 2, pp. 133-141. DOI 10.1016/0044-8486(87)90305-X.
- DANIEL, P., 2009. Drugs and chemicals in aquafeeds: The problems and solutions. RODGERS, C. et BASURCO, B. (éd.), *The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*. 2009. N° 86, pp. 85-94.
- DE BAERE, S. et DE BACKER, P., 2007. Quantitative determination of amoxicillin in animal feed using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*. mars 2007. Vol. 586, n° 1-2, pp. 319-325. DOI 10.1016/j.aca.2006.10.036.
- DEFOIRDT, T., SORGELOOS, P. et BOSSIER, P., 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*. 1 juin 2011. Vol. 14, n° 3, pp. 251-258. DOI 10.1016/j.mib.2011.03.004.
- DELANOUE, E. et ROGUET, C., 2015. Acceptabilité sociale de l'élevage en France : recensement et analyse des principales controverses à partir des regards croisés de différents acteurs. *INRAE Productions Animales*. 15 avril 2015. Vol. 28, n° 1, pp. 39-50. DOI 10.20870/productions-animales.2015.28.1.3009.
- DGAL, 2023. Prescription du médicament vétérinaire : mise en œuvre de la « cascade » prévue aux articles 112 à 115 du règlement 2019/6 relatif aux médicaments vétérinaires et à l'article L. 5143-4 du code de la santé publique (CSP), 2023 [en ligne]. Instruction technique. [Consulté le 2 décembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://info.agriculture.gouv.fr/boagri/instruction-2023-390/telechargement>
- DOI, A.M. et STOSKOPF, M.K., 2000. The Kinetics of Oxytetracycline Degradation in Deionized Water under Varying Temperature, pH, Light, Substrate, and Organic Matter. *Journal of Aquatic Animal Health*. septembre 2000. Vol. 12, n° 3, pp. 246-253. DOI 10.1577/1548-8667(2000)012<0246:TKOODI>2.0.CO;2.
- DOUET, D.-G., LE BRIS, H. et GIRAUD, E., 2009. Environmental aspects of drug and chemical use in aquaculture: An overview. 2009. N° 86.
- DUBALD, M., 2016. Etude et criblages des paramètres d'un procédé d'enrobage en turbine. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Faculté de pharmacie : Université de Limoges.
- DUIS, K., INGLIS, V., BEVERIDGE, M.C.M. et HAMMER, C., 1995. Leaching of four different antibacterials from oil- and alginate-coated fish-feed pellets. *Aquaculture Research*. août 1995. Vol. 26, n° 8, pp. 549-556. DOI 10.1111/j.1365-2109.1995.tb00945.x.
- ELIMAM, M.M., SHANTIER, S.W., GADKARIEM, E.A., MOHAMED, M.A. et OSMAN, Z., 2017. Stability studies on florfenicol using developed derivative spectrophotometric methods. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. janvier 2017. Vol. 75, n° 1, pp. 40-44. DOI 10.1016/j.pharma.2016.07.003.
- EUROSTAT, 2024. Production from aquaculture excluding hatcheries and nurseries (from 2008 onwards), 2024. [en ligne]. fish\_aq2a. [Consulté le 13 septembre 2024]. Disponible à l'adresse : [https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/fish\\_aq2a/default/table?lang=en](https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/fish_aq2a/default/table?lang=en)

FAO, 2012. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2012. [en ligne] Rome, Italy : FAO, 2012. [Consulté le 2 décembre 2024] ISBN : 978-92-5-207225-6. Disponible à l'adresse : <https://www.fao.org/4/i2727f/i2727f.pdf>

FAO, 2022a. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2022. [en ligne]. Rome, Italy : FAO, 2022. [Consulté le 4 septembre 2024]. ISBN 978-92-5-136461-1. Disponible à l'adresse : <http://www.fao.org/documents/card/fr/c/cc0461fr>

FAO, 2022b. Résumé de La Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2022. [en ligne]. Rome, Italy : FAO, 2022. [Consulté le 24 juin 2024]. DOI : <https://doi.org/10.4060/cc0463fr>. Disponible à l'adresse : <http://www.fao.org/documents/card/fr/c/cc0463fr>

FAO, 2023. La transformation bleue - Synthèse. [en ligne]. Rome, Italy : FAO, 2023. [Consulté le 2 décembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/e7008a58-ac34-47d6-81d4-c71764e35352/content>

FAO, 2024a. La Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2024. [en ligne]. Rome, Italy : FAO, 2024. [Consulté le 4 septembre 2024]. ISBN 978-92-5-138814-3. Disponible à l'adresse : <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cd0683fr>

FAO, 2024b. Résumé de La Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2024. [en ligne]. Rome, Italy : FAO, 2024. [Consulté le 24 juin 2024]. DOI : <https://doi.org/10.4060/cd0690fr>. Disponible à l'adresse : <http://www.fao.org/documents/card/fr/c/cc0463fr>

FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO, 2024. Résumé de L'État de la sécurité alimentaire et de la nutrition dans le monde 2024, 2024. [en ligne].; [Consulté le 20 octobre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cd1276fr>

GEURDEN, I., CUVIER, A., GONDOUIN, E., OLSEN, R., RUOHONEN, K., KAUSHIK, S. et BOUJARD, T., 2005. Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiology & Behavior*. 2 juin 2005. Vol. 85, n° 2, pp. 107-114. DOI 10.1016/j.physbeh.2005.03.010.

GROUPEMENT DE DÉFENSE SANITAIRE BRETAGNE, 2024. Rapport d'activité 2023 [en ligne]. [Consulté le 4 novembre 2024]. Disponible à l'adresse : [https://www.gds-bretagne.fr/wp-content/uploads/2024/06/rapport185x275\\_BDed03-1.pdf](https://www.gds-bretagne.fr/wp-content/uploads/2024/06/rapport185x275_BDed03-1.pdf)

HARDY, R.W. et BARROWS, F.T., 2003. Diet Formulation and Manufacture. In : *Fish Nutrition* [en ligne]. Elsevier. pp. 505-600. [Consulté le 10 septembre 2024]. ISBN 978-0-12-319652-1. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123196521500100>

HERSCHEL, W.H., 1922. The Change in Viscosity of Oils with the Temperature. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry*. 1 août 1922. Vol. 14, n° 8, pp. 715-722. DOI 10.1021/ie50152a014.

HEUER, O.E., KRUSE, H., GRAVE, K., COLLIGNON, P., KARUNASAGAR, I. et ANGULO, F.J., 2009. Human Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*. 15 octobre 2009. Vol. 49, n° 8, pp. 1248-1253. DOI 10.1086/605667.

HILTON, J.W., CHO, C.Y. et SLINGER, S.J., 1981. Effect of extrusion processing and steam pelleting diets on pellet durability, pellet water absorption, and the physiological response of rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*. août 1981. Vol. 25, n° 2-3, pp. 185-194. DOI 10.1016/0044-8486(81)90180-0.

HUANG, K. et NITIN, N., 2019. Edible bacteriophage based antimicrobial coating on fish feed for enhanced treatment of bacterial infections in aquaculture industry. *Aquaculture*. mars 2019. Vol. 502, pp. 18-25. DOI 10.1016/j.aquaculture.2018.12.026.

HUSTVEDT, S.O., STOREBAKKEN, T. et SALTE, R., 1991. Does oral administration of oxolinic acid or oxytetracycline affect feed intake of rainbow trout ? *Aquaculture*. janvier 1991. Vol. 92, pp. 109-113. DOI 10.1016/0044-8486(91)90012-V.

INGLIS, V., 2000. Antibacterial chemotherapy in aquaculture: review of practice, associated risks and need for action. In ARTHUR, J.R., LAVILLA-PITOGO, C. R., et SUBASINGHE R.P. (éds.), *Use of Chemicals in Aquaculture in Asia: Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia* (pp. 7-22). Tigbauan, Iloilo, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.

INGLIS, V., YIMER, E., BACON, E. J. et FERGUSON, S., 1993. Plasmid-mediated antibiotic resistance in *Aeromonas salmonicida* isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. *Journal of Fish Diseases*. 1993. Vol. 16, n° 6, pp. 593-599. DOI 10.1111/j.1365-2761.1993.tb00896.x.

JARAU, M., MACINNES, J.I. et LUMSDEN, J.S., 2019. Erythromycin and florfenicol treatment of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*. mars 2019. Vol. 42, n° 3, pp. 325-334. DOI 10.1111/jfd.12944.

JOHNSTONE, R., SIMPSON, T.H. et YOUNGSON, A.F., 1978. Sex reversal in salmonid culture. *Aquaculture*. février 1978. Vol. 13, n° 2, pp. 115-134. DOI 10.1016/0044-8486(78)90106-0.

JUNG, J., KIM, Y., KIM, J., JEONG, D.-H. et CHOI, K., 2008. Environmental levels of ultraviolet light potentiate the toxicity of sulfonamide antibiotics in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*. janvier 2008. Vol. 17, n° 1, pp. 37-45. DOI 10.1007/s10646-007-0174-9.

KAMALAM, B.S., RAJESH, M. et KAUSHIK, S., 2020. Nutrition and Feeding of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). In : NINAWA, A.S., DHANZE, J.R., DHANZE, R. et INDULKAR, S.T., *Fish Nutrition and Its Relevance to Human Health* [en ligne]. 1. CRC Press. pp. 299-332. [Consulté le 13 septembre 2024]. ISBN 978-1-00-310758-3. Disponible à l'adresse : <https://www.taylorfrancis.com/books/9781000219692/chapters/10.1201/9781003107583-12>

KELLY, A.M., 2013. *Medicated Feed for Food Fish*. Southern Regional Aquaculture Center. Publication n°, octobre 2013. [en ligne]. [Consulté le 13 septembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://extension.rwfm.tamu.edu/wp-content/uploads/sites/8/2013/09/SRAC-Publication-No.-473-Medicated-Feed-for-Food-Fish.pdf>

- KENDALL, N.W., MCMILLAN, J.R., SLOAT, M.R., BUEHRENS, T.W., QUINN, T.P., PESS, G.R., KUZISHCHIN, K.V., MCCLURE, M.M. et ZABEL, R.W., 2015. Anadromy and residency in steelhead and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a review of the processes and patterns. BRADFORD, M. (éd.), Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. mars 2015. Vol. 72, n° 3, pp. 319-342. DOI 10.1139/cjfas-2014-0192.
- KIM, J.H., GO, J., CHO, C.R., KIM, J.I., LEE, M.S. et PARK, S.C., 2013. First Report of Human Acute Acalculous Cholecystitis Caused by the Fish Pathogen *Lactococcus garvieae*. Journal of Clinical Microbiology. février 2013. Vol. 51, n° 2, pp. 712-714. DOI 10.1128/JCM.02369-12.
- KOONSE, B., 2012. Good aquaculture practices to minimize bacterial resistance. In BONDAD-REANTASO, M.G., ARTHUR J.R. et SUBASINGHE R.P., (éds). Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. 2012. N° 547, pp. 25-28.
- LABBÉ, L., LEFÈVRE, F., BUGEON, J., FOSTIER, A., JAMIN, M. et GAUMÉ, M., 2014. Conception d'un système innovant de production de truites en eau recirculée. INRAE Productions Animales. 2 juin 2014. Vol. 27, n° 2, pp. 135-146. DOI 10.20870/productions-animales.2014.27.2.3061.
- LE BIZEC, Bruno, 2019. Couplage chromatographie – Spectrométrie de masse : Le dosage de traces dans des matrices biologiques complexes. 2019. Nantes : Oniris.
- LILLEHAUG, A., LUNESTAD, B. et GRAVE, K., 2003. Epidemiology of bacterial diseases in Norwegian aquaculture - a description based on antibiotic prescription data for the ten-year period 1991 to 2000. Diseases of Aquatic Organisms. 2003. Vol. 53, pp. 115-125. DOI 10.3354/dao053115.
- LIMBU, S.M. , CHEN, L.-Q., ZHANG, M.-L. et DU, Z.-Y., 2021. A global analysis on the systemic effects of antibiotics in cultured fish and their potential human health risk: a review. Reviews in Aquaculture. mars 2021. Vol. 13, n° 2, pp. 1015-1059. DOI 10.1111/raq.12511.
- LOVELL, R.T., 2003. Diet and Fish Husbandry. In : Fish Nutrition [en ligne]. Elsevier. pp. 703-754. [Consulté le 13 septembre 2024]. ISBN 978-0-12-319652-1. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123196521500148>
- MAKLAKOVA, M.E., KONDRATIEVA, I.A., MIKHAILOVA, E.S., STUPIN, R.V., KHAPCHAEV, S.Y. et KASUMYAN, A.O., 2011. Effect of antibiotics on immunophysiological status and their taste attractiveness for rainbow trout *Parasalmo (=Oncorhynchus) mykiss* (Salmoniformes, Salmonidae). Journal of Ichthyology. décembre 2011. Vol. 51, n° 11, pp. 1133-1142. DOI 10.1134/S0032945211110063.
- MCBRIDE, J., STRASDINE, G. et FAGERLUND, U.H.M., 1975. Acute Toxicity of Kanamycin to Steelhead Trout ( *Salmo gairdneri* ). Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 1 avril 1975. Vol. 32, n° 4, pp. 554-558. DOI 10.1139/f75-070.
- MCLAFFERTY, F.W., 1981. Tandem Mass Spectrometry. Science. 16 octobre 1981. Vol. 214, n° 4518, pp. 280-287. DOI 10.1126/science.7280693.
- MICRO-TRACERS. Product Description. Micro-tracers [en ligne]. [Consulté le 3 octobre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://microtracers.com/products/#sigtracers>

- MULCAHY, D.M., 2011. Antibiotic use during the intracoelomic implantation of electronic tags into fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. mars 2011. Vol. 21, n° 1, pp. 83-96. DOI 10.1007/s11160-010-9190-6.
- NICOLAS, J.L., GATESOUBE, F.J., FROUEL, S., BACHERE, E. et GUEGUEN, Y., 2007. Quelles stratégies alternatives aux antibiotiques en aquaculture ? *INRAE Productions Animales*. 7 septembre 2007. Vol. 20, n° 3, pp. 253-258. DOI 10.20870/productions-animales.2007.20.3.3465.
- NOGA, E.J., 2010. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment* [en ligne]. 1. Wiley. [Consulté le 13 septembre 2024]. ISBN 978-0-8138-0697-6. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118786758>
- OH, W.T., GIRI, S.S., YUN, S., KIM, H.J., KIM, S.G., KIM, S.W., KANG, J.W., HAN, S.J., KWON, J., JUN, J.W. et PARK, S.C., 2019. Emergence of Rickettsial Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry Displaying the Appearance of Red Mark Syndrome in Korea. *Microorganisms*. 29 août 2019. Vol. 7, n° 9, pp. 302. DOI 10.3390/microorganisms7090302.
- OMS, 2020. Résistance aux antibiotiques. [en ligne]. Organisation mondiale de la santé, 2020. [Consulté le 20 octobre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- PARK, Y.H., HWANG, S.Y., HONG, M.K. et KWON, K.H., 2012. Use of antimicrobial agents in aquaculture. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. 1 avril 2012. Vol. 31, n° 1, pp. 189-197. DOI 10.20506/rst.31.1.2105.
- POULIQUEN, H., DELÉPÉE, R., LARHANTEC-VERDIER, M., MORVAN, M.-L. et LE BRIS, H., 2007. Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions. *Aquaculture*. février 2007. Vol. 262, n° 1, pp. 23-28. DOI 10.1016/j.aquaculture.2006.10.014.
- POWER, C., SAYERS, R., DANAHER, M., MOLONEY, M., O'BRIEN, B., FUREY, A. et JORDAN, K., 2014. Investigation of the persistence of florfenicol residues in bovine milk and fate during processing. *International Dairy Journal*. décembre 2014. Vol. 39, n° 2, pp. 270-275. DOI 10.1016/j.idairyj.2014.07.012.
- 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.
- QUINN, T.P. et MYERS, K.W., 2004. Anadromy and the marine migrations of Pacific salmon and trout: Rounsefell revisited. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. décembre 2004. Vol. 14, n° 4, pp. 421-442. DOI 10.1007/s11160-005-0802-5.
- RANJAN, A., 2017. Prospects of Medicated Feed in Aquaculture. *Nutrition & Food Science International Journal* [en ligne]. 25 octobre 2017. Vol. 3, n° 4. [Consulté le 4 novembre 2024]. DOI 10.19080/NFSIJ.2017.03.555617. Disponible à l'adresse : <https://juniperpublishers.com/nfsij/NFSIJ.MS.ID.555617.php>

- REESE, D.A., FOLTZ, K.L. et MORITZ, J.S., 2017. Effect of mixing and sampling method on pelleted feed nutrient analysis and diet formulation validation. *Journal of Applied Poultry Research*. juin 2017. Vol. 26, n° 2, pp. 219-225. DOI 10.3382/japr/pfw065.
- REIMSCHUESSEL, R., MILLER, R.A. et GIESEKER, C.M., 2013. Antimicrobial Drug Use in Aquaculture. In : GIGUÈRE, S., PRESCOTT, J.F. et DOWLING, P.M. (éd.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* [en ligne]. 1. Wiley. pp. 645-661. [Consulté le 11 septembre 2024]. ISBN 978-0-470-96302-9. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118675014.ch39>
- RENAULT, T. et GUICHARD, B., 2007. Facteurs de risque d'apparition et d'émergence des maladies infectieuses en aquaculture. *INRAE Productions Animales*. 7 septembre 2007. Vol. 20, n° 3, pp. 219-222. DOI 10.20870/productions-animales.2007.20.3.3459.
- ROBERTS, R.J. et SHEPHERD, C. Jonathan, 1997. *Handbook of trout and salmon diseases*. 3rd ed. Oxford ; Cambridge, Mass : Fishing News Books. ISBN 978-0-85238-244-8. SH179.T8 R635 1997
- ROCHA, A.G., MONTANHINI, R.N., DILKIN, P., TAMIOSSO, C.D. et MALLMANN, C.A., 2015. Comparison of different indicators for the evaluation of feed mixing efficiency. *Animal Feed Science and Technology*. novembre 2015. Vol. 209, pp. 249-256. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2015.09.005.
- RODGERS, C J et FURONES, M D, 2009. Antimicrobial agents in aquaculture: Practice, needs and issues. 2009. N° 86.
- ROGSTAD, A., HORMAZABAL, V., ELLINGSEN, O.F. et RASMUSSEN, K.E., 1991. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in fish. I. Absorption, distribution and accumulation in rainbow trout in freshwater. *Aquaculture*. août 1991. Vol. 96, n° 3-4, pp. 219-226. DOI 10.1016/0044-8486(91)90151-V.
- ROKEY, G.J., PLATTNER, B. et SOUZA, E.M.D., 2010. Feed extrusion process description. *Revista Brasileira de Zootecnia*. juillet 2010. Vol. 39, n° suppl spe, pp. 510-518. DOI 10.1590/S1516-35982010001300055.
- ROLFE, L.A., HUFF, H.E. et HSIEH, F., 2001. Effects of Particle Size and Processing Variables on the Properties of an Extruded Catfish Feed. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. septembre 2001. Vol. 10, n° 3, pp. 21-34. DOI 10.1300/J030v10n03\_03.
- SAKHNO, T., SEMENOV, A. et BARASHKOV, N., 2020. Assessing the quality of homogeneity of pet food using ferromagnetic microtracers. *Grain Products and Mixed Fodder's*. 15 juillet 2020. Vol. 20, n° 2, pp. 32-37. DOI 10.15673/gpmf.v20i2.1763.
- SANTOS, A.C.D. et CUNHA, M.A.D., 2021. International legislation on drugs and biological products used in the sanitary management of aquatic animals. In : *Aquaculture Pharmacology* [en ligne]. Elsevier. pp. 347-392. [Consulté le 3 septembre 2024]. ISBN 978-0-12-821339-1. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128213391000118>
- SCHMIDT, A.S., BRUUN, M.S., DALSGAARD, I., PEDERSEN, K. et LARSEN, J.L., 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.

- SEKKIN, S. et KUM, C., 2011. Antibacterial Drugs in Fish Farms: Application and Its Effects. In : ARAL, Faruk (éd.), Recent Advances in Fish Farms [en ligne]. InTech. [Consulté le 11 septembre 2024]. ISBN 978-953-307-759-8. Disponible à l'adresse : <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-fish-farms/antibacterial-drugs-in-fish-farms-application-and-its-effects>
- SEYFRIED, E.E., NEWTON, R.J., RUBERT, K.F., PEDERSEN, J.A. et MCMAHON, K.D., 2010. Occurrence of Tetracycline Resistance Genes in Aquaculture Facilities with Varying Use of Oxytetracycline. *Microbial Ecology*. mai 2010. Vol. 59, n° 4, pp. 799-807. DOI 10.1007/s00248-009-9624-7.
- SHEEHAN, R.J., SHASTEEN, S.P., SURESH, A.V., KAPUSCINSKI, A.R. et SEEB, J.E., 1999. Better Growth in All-Female Diploid and Triploid Rainbow Trout. *Transactions of the American Fisheries Society*. mai 1999. Vol. 128, n° 3, pp. 491-498. DOI 10.1577/1548-8659(1999)128<0491:BGIAFD>2.0.CO;2.
- SMITH, P., 2008. A cost-benefit analysis of the application of pharmacokinetic/pharmacodynamic-based approaches to setting disc diffusion breakpoints in aquaculture: A case study of oxolinic acid and *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*. novembre 2008. Vol. 284, n° 1-4, pp. 2-18. DOI 10.1016/j.aquaculture.2008.07.029.
- ST-HILAIRE, S., PRICE, D., CHAMLER, W.H. et MCCLURE, J., 2020. Understanding Antibiotic Treatment Failures in Salmon Aquaculture. *Asian Fisheries Science* [en ligne]. 25 décembre 2020. Vol. 33S. [Consulté le 16 septembre 2024]. DOI 10.33997/j.afs.2020.33.S1.006. Disponible à l'adresse : <https://www.asianfisheriessociety.org/publication/downloadfile.php?id=1323&file=Y0dSbUx6QTR0akUyTkRrd01ERTJNRGc0T1RNeU1EWXVjR1Jt>
- SUTILI, F.J. et GRESSLER, L.T., 2021. Antimicrobial agents. In : *Aquaculture Pharmacology* [en ligne]. Elsevier. pp. 131-168. [Consulté le 3 septembre 2024]. ISBN 978-0-12-821339-1. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128213391000040>
- SVEC, A.L., CONSTANTINE, G.H., LARSON, R.E. et MEYERS, T.R., 1982. Single-dose aminoglycoside nephrotoxicity and lethality in rainbow trout. *Toxicology and Applied Pharmacology*. août 1982. Vol. 65, n° 1, pp. 153-161. DOI 10.1016/0041-008X(82)90373-8.
- SWINKELS, A.F., FISCHER, E.A.J., KORVING, L., CHRISTODOULOU, R., WAGENAAR, J.A. et ZOMER, A.L., 2024. Flumequine, a fluoroquinolone in disguise. *npj Antimicrobials and Resistance*. 3 octobre 2024. Vol. 2, n° 1, pp. 28. DOI 10.1038/s44259-024-00044-5.
- THIEX, N., CARLSON, M., KIEFFER, R., KIEFFER, A., EISENBERG, D., BARASHKOV, N. et RAMSEY, C., 2019. Evaluation of the Use of Microtracers™ in a Proficiency Testing Program. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 1 mai 2019. Vol. 102, n° 3, pp. 767-775. DOI 10.5740/jaoacint.18-0354.
- TRAUB, W.H. et LEONHARD, B., 1995. Heat stability of the antimicrobial activity of sixty-two antibacterial agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1995. Vol. 35, n° 1, pp. 149-154. DOI 10.1093/jac/35.1.149.

TREVES-BROWN, K. M., 2000. Applied Fish Pharmacology [en ligne]. Dordrecht : Springer Netherlands. [Consulté le 4 novembre 2024]. ISBN 978-90-481-4014-5. Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-0761-9>

VIEL, A., CHAILLEUX, A., BACHELET, F., PINEAU, L., CALVEZ, S. et ROSTANG, A., 2024. Population PK modeling of OTC in rainbow trout: impact of water temperature and routes of administration. In 13th International Conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine (AAVM), Athens, Greece 2024.

VIVIENNE, E.E., JOSEPHINE, O.-K.O. et ANAELOM, N.J., 2018. Effect of temperature (cooking and freezing) on the concentration of oxytetracycline residue in experimentally induced birds. *Veterinary World*. février 2018. Vol. 11, n° 2, pp. 167-171. DOI 10.14202/vetworld.2018.167-171.

WEINSTEIN, M.R., LITT, M., KERTESZ, D.A., WYPER, P., ROSE, D., COULTER, M., MCGEER, A., FACKLAM, R., OSTACH, C., WILLEY, B.M., BORCZYK, A. et LOW, D.E., 1997. Invasive Infections Due to a Fish Pathogen, *Streptococcus iniae*. *New England Journal of Medicine*. 28 août 1997. Vol. 337, n° 9, pp. 589-594. DOI 10.1056/NEJM199708283370902.

WERNER, J.J., BOREEN, A.L., EDHLUND, B., WAMMER, K.H., MATZEN, E., MCNEILL, K et ARNOLD, W.A., 2005. Photochemical Transformation of Antibiotics in Minnesota. *CURA REPORTER*. 2005. Vol. 35, n° 2, pp. 1-5.

XU, D. et ROGERS, W.A., 1994. Leaching Loss from Oxytetracycline Medicated Feeds. *Journal of Applied Aquaculture*. juillet 1994. Vol. 4, n° 1, pp. 29-38. DOI 10.1300/J028v04n01\_03.

YANONG, R.P., 2003. Use of Antibiotics in Ornamental Fish Aquaculture. *EDIS* [en ligne]. 2003. Vol. 2003, n° 3. [Consulté le 6 septembre 2024]. DOI 10.32473/edis-fa084-2003. Disponible à l'adresse : <https://journals.flvc.org/edis/article/view/108644>

YOSHIMIZU, M., KASAI, H., AOKI, T., OTOTAKE, M., SAKAI, M., JUNG, T.-S., HIKIMA, J.-I., OKAMOTO, N., SAKAMOTO, T., OZAKI, A. et YAZAWA, R., 2017. Prevention and treatment of diseases caused by fish pathogens. In : TAKASHI A. (éd) *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. [en ligne]. 2017. Vol 1. Pp. 1-83. [Consulté le 12 septembre 2024]. ISBN 978-1-78021-540-2. Disponible à l'adresse : <https://www.eolss.net/sample-chapters/c10/E5-05-35-02.pdf>

ZANUZZO, F.S., PERONI, E.D.F.C., SANDRELLI, R.M., ST-HILAIRE, S., O'BRIEN, N. et GAMPERL, A.K., 2022. Temperature has considerable effects on plasma and muscle antibiotic concentrations in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. janvier 2022. Vol. 546, pp. 737372. DOI 10.1016/j.aquaculture.2021.737372.

ZARZA, C., 2012. Oral delivery of veterinary medicines through aquafeed in Mediterranean aquaculture. In : BONDAD-REANTASO, M.G, ARTHUR J.R. & SUBASINGHE R.P., (éds.) *Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production*. 2012. N° 547, pp. 127-140.

Arrêté du 9 juin 2004 relatif aux bonnes pratiques de préparation extemporanée des médicaments vétérinaires. *JORF* n°160 du 11/07/2004. [en ligne]. [Consulté le 19 novembre 2024]. Disponible à l'adresse :

<https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2004/6/9/SANP0422019A/jo/texte>

Arrêté du 18 mars 2016 fixant la liste des substances antibiotiques d'importance critique prévue à l'article L. 5144-1-1 du code de la santé publique et fixant la liste des méthodes de réalisation du test de détermination de la sensibilité des souches bactériennes prévue à l'article R. 5141-117-2. JORF n°0072 du 25/03/2016. [en ligne]. [Consulté le 1 décembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2016/3/18/AGRG1526116A/jo/texte>

Code de la santé publique. Entré en vigueur le 07 octobre 1953. Version du 29 novembre 2024. [en ligne]. [Consulté le 1 décembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.legifrance.gouv.fr/download/pdf/legiOrKali?id=LEGITEXT000006072665.pdf&size=15.5%20Mo&pathToFile=/LEGI/TEXT/00/00/06/07/26/65/LEGITEXT000006072665/LEGITEXT000006072665.pdf&title=Code%20de%20la%20sant%C3%A9%20publique>

Communication du 20 mai 2020 de la commission au parlement européen, au conseil, au comité économique et social européen et au comité des régions : une stratégie « De la ferme à la table » pour un système alimentaire équitable, sain et respectueux de l'environnement [en ligne]. COM(2020) 381. [Consulté le 9 septembre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A52020DC0381>

Décision (CE) 2002/657 du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [notifiée sous le numéro C(2002) 3044]. JOUE L 221 du 17/08/2002, pp. 0008 - 0036. [en ligne]. [Consulté le 9 octobre 2024]. Disponible à l'adresse : <http://data.europa.eu/eli/dec/2002/657/oj>

Décision du 12 février 2007 relative aux bonnes pratiques de fabrication et de distribution en gros des aliments médicamenteux. JORF n°80 du 04/04/2007. [en ligne]. [Consulté le 19 novembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decision/2007/2/12/AGRD0700539S/jo/texte>

Plan national « aquacultures d'avenir », 2022. [en ligne]. Plan stratégique national pour l'aquaculture durable 2021-2027. [Consulté le 9 septembre 2023]. Disponible à l'adresse : [https://www.mer.gouv.fr/sites/default/files/2022-03/20220311\\_PLAN%20AQUACULTURES%20AVENIR%20version%20finale%20sign%C3%A9e%20post%20SIA.pdf](https://www.mer.gouv.fr/sites/default/files/2022-03/20220311_PLAN%20AQUACULTURES%20AVENIR%20version%20finale%20sign%C3%A9e%20post%20SIA.pdf)

RCP florfenikel 300 mg/ml solution injectable pour bovins et porcins, 2024. [en ligne]. [Consulté le 21 octobre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=FLORFENIKEL+300+MG%2FML+SOLUTION+INJECTABLE+POUR+BOVINS+ET+PORCINS>

RCP PS oxytetracycline aquaculture, 2019. [en ligne]. [Consulté le 11 novembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=PS+OXYTETRACYCLINE+AQUACULTURE#:~:text=L'oxyt%C3%A9tracycline%20est%20un%20antibiotique,l'oxyt%C3%A9tracycline%20a%20%C3%A9t%C3%A9%20rapport%C3%A9e>

RCP trisulmix poudre, 2021. [en ligne]. [Consulté le 18 octobre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=TRISULMIX+POUDRE>

Règlement (CE) 470/2009 du parlement européen du 6 mai 2009 établissant des procédures communautaires pour la fixation des limites de résidus des substances pharmacologiquement actives dans les aliments d'origine animale, abrogeant le règlement (CEE) n°2377/90 du Conseil et modifiant la directive 2001/82/CE du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n° 726/2004 du Parlement européen et du Conseil. JOUE L 152 du 16/06/2009, p. 11. [en ligne]. [Consulté le 5 novembre 2024]. Disponible à l'adresse :

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02009R0470-20090616>

Règlement (CE) 710/2009 de la Commission du 5 août 2009 modifiant le règlement (CE) 889/2008 portant modalités d'application du règlement (CE) 834/2007 du Conseil en ce qui concerne la production biologique d'animaux d'aquaculture et d'algues marines. JOUE L 204 du 06/08/2009, pp. 15-34. [en ligne]. [Consulté le 2 décembre 2024]. Disponible à l'adresse : <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/710/oj>

Règlement délégué (UE) 2024/1159 de la Commission du 7 février 2024 complétant le règlement (UE) 2019/6 du Parlement européen et du Conseil en établissant des règles relatives aux mesures appropriées pour assurer l'utilisation efficace et sûre des médicaments vétérinaires autorisés et prescrits pour administration par voie orale autres que les aliments médicamenteux administrés par le détenteur des animaux aux animaux producteurs d'aliments. JOUE L 2024/1159 du 19/04/2024. [en ligne]. Disponible à l'adresse : [http://data.europa.eu/eli/reg\\_del/2024/1159/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_del/2024/1159/oj)

Règlement (UE) 2019/4 du Parlement européen et du Conseil du 11 décembre 2018 concernant la fabrication, la mise sur le marché et l'utilisation d'aliments médicamenteux pour animaux, modifiant le règlement (CE) 183/2005 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la directive 90/167/CEE du Conseil. JOUE L 4 du 07/01/2019, pp. 1-23. [en ligne]. [Consulté le 19 novembre 2024]. Disponible à l'adresse : <http://data.europa.eu/eli/reg/2019/4/oj>

Règlement (UE) 2019/6 du parlement européen et du conseil du 11 décembre 2018 relatif aux médicaments vétérinaires et abrogeant la directive 2001/82/CE JO L 004 du 07/01/2019, p. 43 ; modifié en dernier lieu par le règlement (UE) 2023/183. JOUE L 26 du 30/01/2023, p. 7. [en ligne]. [Consulté le 13 septembre 2024]. Disponible à l'adresse : <http://data.europa.eu/eli/reg/2019/6/2022-01-28>

Règlement (UE) 37/2010 de la commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale. JOUE L 015 du 20/01/2010, p. 1. [en ligne]. [Consulté le 5 novembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:02010R0037-20240408>

# Annexe 1 : RCP du produit Aquaflor<sup>NDV</sup>

Proprietär-Proprietary

*[Version 9,03/2022] corr. 11/2022*

## ANNEX I

### SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS

## 1. NAME OF THE VETERINARY MEDICINAL PRODUCT

Aquaflor 500 mg/g premix for medicated feeding stuff for trouts  
Finland: Aquaflor vet 500 mg/g premix for medicated feeding stuff for rainbow trouts  
Aquaflor 500 mg premix for medicated feeding stuff

## 2. QUALITATIVE AND QUANTITATIVE COMPOSITION

Each g contains:

### Active substance:

Florfenicol 500 mg

### Excipients:

Qualitative composition of excipients and other constituents
--

Lactose monohydrate
---------------------

Povidone K29/32
-----------------

A white free flowing powder.

## 3. CLINICAL INFORMATION

### 3.1 Target species

Trout - Golden/Rainbow/Redband/Steelhead (*Oncorhynchus mykiss*).

### 3.2 Indications for use for each target species

For the treatment and metaphylaxis of furunculosis in rainbow trout caused by *Aeromonas salmonicida* susceptible to florfenicol in freshwater fisheries. The presence of the disease should be established in the holding unit before initiating the treatment.

### 3.3 Contraindications

Do not use in broodstock.

Do not use in cases of hypersensitivity to the active substance or to any of the excipients.  
Do not administer together with other antimicrobial products.

### 3.4 Special warnings

In order to maximize feed uptake throughout the population to be treated, medicated feed should be administered following the same feeding regimen as was used prior to treatment, to the greatest degree possible.

To minimize stress and ensure that all medicated feed is consumed in the infected shoal, daily feed may be reduced compared to the usual feeding rates.

Care should be taken when administering medicated feed by hand that feed pellets are widely dispersed to minimize hierarchical feeding behavior.

### 3.5 Special precautions for use

#### Special precautions for safe use in the target species:

Use of the veterinary medicinal product should be based on susceptibility testing of the bacteria isolated from the animal. If this is not possible, therapy should be based on local (regional, farm level) epidemiological information about susceptibility of the target bacteria.

Use of the veterinary medicinal product deviating from the instructions given in the SPC may increase the prevalence of bacteria resistant to florfenicol.

The veterinary medicinal product should only be used in freshwater fisheries for the treatment of furunculosis in trout. A full benefit-risk analysis has not been performed for use in marine aquaculture, especially with regards to the environmental risk. The use of the veterinary medicinal product should always be combined with good management practices of the freshwater fisheries (e.g. vaccination programmes, biosecurity, water quality and site hygiene).

#### Special precautions to be taken by the person administering the veterinary medicinal product to animals:

This veterinary medicinal product may cause hypersensitivity reactions (allergy) People with known hypersensitivity to florfenicol should avoid contact with the veterinary medicinal product.

Avoid inhalation of dust. Wear either a disposable half-mask respirator conforming to European standard EN 149 or a non-disposable half-mask respirator to European Standard EN 140 with a filter to EN 143

Avoid contact with the skin and eyes. Wear chemically resistant gloves, protective overalls and safety glasses while incorporating the premix into the feed.

Wear gloves and do not smoke, drink or eat while handling the product or medicated feed. Wash hands thoroughly with soap and water after use of the product or medicated feed. Clean thoroughly all equipment used for medicating feed.

In case of accidental self-ingestion seek medical advice immediately and show the package leaf-let or the label to the physician.

#### Special precautions for the protection of the environment:

Not applicable.

### 3.6 Adverse events

None known.

Reporting adverse events is important. It allows continuous safety monitoring of a veterinary medicinal product. Reports should be sent, preferably via a veterinarian, to either the marketing authorisation holder <or its local representative> or the national competent authority via the national reporting system. See the package leaflet for respective contact details.

### 3.7 Use during pregnancy, lactation or lay

Not applicable.

### 3.8 Interaction with other medicinal products and other forms of interaction

None known.

### 3.9 Administration routes and dosage

In-feed use. For the preparation of medicated feeding stuff.

The premix should be mixed into or on feed to deliver a total daily dose rate of 10 mg of florfenicol per kg body weight during 10 consecutive days.

The entire daily ration of medicated feed should be administered first for each day of the 10-day dosing period. If the feeding rate exceeds 0.4% of the biomass, non-medicated feed may be administered after the medicated ration, or a lower incorporation rate may be chosen for the preparation of medicated feed. If the feeding rate is  $\leq 0.4\%$  of the biomass, then the daily ration should consist of only medicated feed and be administered at one time.

Administration of medicated feed should begin immediately following diagnosis to ensure that fish are able to consume the complete medicated ration.

This veterinary medicinal product should be incorporated by licensed feed manufacturers only. An incorporation rate of 0.5% or 5 kg premix/ton feed is recommended; however, lower mixing rates can be used when higher feeding rates need to be covered. The concentration of medicated premix in feed should be  $\geq 0.04\%$  or 0.4 kg premix/ton feed.

#### **Mixing Instructions:**

During the preparation of medicated feed, the premix is either coated onto the surface of the pellet or incorporated into the feed ingredient mash prior to extrusion or pelleting.

#### **Top-coating:**

**Method 1:** The dry premix is thoroughly mixed with feed which typically contains 24 – 38% w/w lipid. Approximately 0.5 % w/w oil is then added to the premix/feed mixture to improve both premix adhesion and palatability.

- a) Add known quantity of fish feed into a mixer.
- b) Weigh the premix.
- c) Mix premix with feed pellets.
- d) Medicated feed pellets are mixed/coated with a predetermined amount of fish or vegetable oil.
- e) At the completion of mixing, the veterinary medicinal product is transferred to a storage tank for packaging or transport.

**Method 2:** The dry premix is mixed with oil. The premix/oil preparation is then added to the feed to produce palatable medicated feed pellets.

- a) Weigh out fish or vegetable oil into a bucket.
- b) Weight out the premix and mix thoroughly with oil in the bucket
- c) Add a known quantity of fish feed into a mixer.
- d) Add the premix and oil mixture to the feed in the mixer, slowly, while the mixer is running at low speed. At the completion of mixing, the veterinary medicinal product is transferred to a storage tank for packaging or transport.

#### **Extrusion or Pelleting:**

The dry premix is added directly to the feed ingredient mash and mixed thoroughly. Water and steam are added, and the complete mixture is then extruded or pelleted, dried and packed.

- a) The premix is added directly to the feed ingredient mash and mixed thoroughly to ensure homogeneity.
- b) The mixture is steam pelleted and or extruded and the pellets are dried.
- c) Medicated feed pellets are mixed/coated with a pre-determined amount of fish or vegetable oil.
- d) At the completion of mixing, the veterinary medicinal product is transferred to a storage tank for packaging or transport

**Recommended premix inclusion rate for preparation of medicated feed**

Feeding Rate	Amount of premix per metric ton of feed	Amount of florfenicol per feed in mg/kg	Kilograms of fish medicated per metric ton of feed for 10-d treatment period
% biomass	kg	mg	kg
0.2	10	5000	50,000
0.3	6.7	3333	33,333
0.4	5	2500	25,000
0.5	4	2000	20,000
1.0	2	1000	10,000
2.0	1	500	5,000
3.0	0.66	330	3,300
5.0	0.40	200	2,000

The formula for calculation of the amount of premix to be added to feed to produce medicated feed at  $\geq 0.4$  kg premix/ton feed is as follows:

$$\frac{20 \text{ mg premix (= 10 mg florfenicol) per kg body weight and day} \times \text{Average fish weight (kg)}}{\text{Average daily feed intake (kg/fish)}} = \text{mg premix per kg of feed}$$

### 3.10 Symptoms of overdose (and where applicable, emergency procedures and antidotes)

No adverse reactions were observed after treatment of rainbow trout with 5 times the recommended dose of florfenicol.

### 3.11 Special restrictions for use and special conditions for use, including restrictions on the use of antimicrobial and antiparasitic veterinary medicinal products in order to limit the risk of development of resistance

This veterinary medicinal product is intended to be used for the preparation of medicated feed.

### 3.12 Withdrawal periods

135 degree days

## 4. PHARMACOLOGICAL INFORMATION

### 4.1 ATCvet code : QJ01BA90

### 4.2 Pharmacodynamics

Florfenicol is a synthetic broad-spectrum antibiotic effective against most Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from domestic animals. Florfenicol acts by inhibiting protein synthesis at the ribosomal level. Laboratory tests have shown that florfenicol is active against the most commonly isolated bacterial pathogens involved in fish diseases notably *Aeromonas salmonicida*. Florfenicol is considered to be a bacteriostatic agent, but *in vitro* studies show that florfenicol demonstrate time-dependent bactericidal activity against *Aeromonas salmonicida*.

At present there are no accepted interpretive criteria for florfenicol MIC data of bacteria from aquaculture. However, a value of  $\leq 4$   $\mu\text{g/mL}$  has been adopted by CLSI (2020) as the epidemiological

cut-off value for the determination of the wild-type population. *Aeromonas salmonicida* strains with a MIC  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$  are considered susceptible to florfenicol throughout Europe.

Surveillance data of the susceptibility of target field isolates from fish collected between 2012 and 2015 across Europe show a MIC range of 0.12 – 32  $\mu\text{g/ml}$  and a MIC<sub>90</sub> of 1  $\mu\text{g/ml}$  and low percentage of non-wild-type isolates.

Florfenicol resistance in Gram-negative bacteria has been detected and is related to plasmid transfer of the flo gene. This gene codes for a membrane-associated exporter protein that promotes efflux of chloramphenicol and florfenicol. This can be located on plasmids carrying resistance to antimicrobials from other classes, therefore use of the veterinary medicinal product can select for co-resistance.

Cross-resistance is limited due to the substitution of a hydroxyl group with a fluorine molecule. Therefore, florfenicol is less susceptible to resistance from bacteria expressing chloramphenicol acetyl transferase enzymes.

#### 4.3 Pharmacokinetics

Pharmacokinetic studies have been conducted with florfenicol following a single oral administration of 10 mg/kg body weight to rainbow trout at 10° C and 16° C. After oral administration of medicated feed containing florfenicol, peak plasma concentrations of respectively 3.0 and 3.7  $\mu\text{g/ml}$  were reached 13.7 and 10.9 hours after administration at 10°C and 16° C. Florfenicol had an oral bioavailability of 73.9% at 10° C and 66.3% at 16° C.

Pharmacokinetic parameters following a single intravenous administration of 10 mg/kg body weight were: apparent volume of distribution at steady state  $V_{d(ss)}$  of 0.909 l/kg, total body clearance  $Cl_T$  of 0.075 l/h and the elimination half-life  $T_{1/2\beta}$  of 8.8 hours. These values indicate the drug was well distributed.

### 5. PHARMACEUTICAL PARTICULARS

#### 5.1 Major incompatibilities

In the absence of compatibility studies, this veterinary medicinal product must not be mixed with other veterinary medicinal products.

#### 5.2 Shelf life

Shelf life of the veterinary medicinal product as packed for sale: 2 years

Shelf life after first opening the immediate packaging: 3 months

Shelf life after incorporation into meal or pelleted feed: 3 months

#### 5.3 Special precautions for storage

Premix: The medicinal product does not require any special temperature storage conditions.

Store in a dry place.

Keep separate from feeds and foodstuffs.

Medicated feed: Do not store at temperatures above 25° C.

#### 5.4 Nature and composition of immediate packaging

2 kg laminated bag consisting of polypropylene/ low density polyethylene/ aluminium foil/ Surlyn ionomer heat sealant.

#### Pack sizes

Bag of 2 kg.

**5.5 Special precautions for the disposal of unused veterinary medicinal products or waste materials derived from the use of such products**

Medicines should not be disposed of via wastewater or household waste.

Use take-back schemes for the disposal of any unused veterinary medicinal product or waste materials derived thereof in accordance with local requirements and with any national collection systems applicable to the veterinary medicinal product concerned.

**6. NAME OF THE MARKETING AUTHORISATION HOLDER**

**7. MARKETING AUTHORISATION NUMBER(S)**

**8. DATE OF FIRST AUTHORISATION**

{DD month YYYY}

**9. DATE OF THE LAST REVISION OF THE SUMMARY OF THE PRODUCT CHARACTERISTICS**

{DD month YYYY}

**10. CLASSIFICATION OF VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS**

Veterinary medicinal product subject to prescription.

Detailed information on this veterinary medicinal product is available in the [Union Product Database \(https://medicines.health.europa.eu/veterinary\)](https://medicines.health.europa.eu/veterinary).

*Figure 66 : Extraits du RCP de la spécialité Aquaflor<sup>NDV</sup> (Agence européenne des médicaments)*

## Annexe 2 : Spécialités disponibles en France

Tableau XXXIII : Spécialités contenant du florfénicol (ANSES 2024)

Nom du médicament	Titulaire de l'AMM	Date d'AMM	Forme pharmaceutique	Substances actives	Espèces cibles
AMPHEN 200 MG/G GRANULES POUR ADMINISTRATION DANS L'EAU DE BOISSON POUR PORCS	HUVEPHARMA	15/11/2019	Granulés pour administration dans l'eau de boisson	Florfénicol	Porcins
AMPHEN 200 MG/ML SUSPENSION POUR ADMINISTRATION DANS L'EAU DE BOISSON POUR PORCINS	HUVEPHARMA	20/03/2024	Suspension pour administration dans l'eau de boisson	Florfénicol	Porcins
CADOREX 300 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS OVINS ET PORCINS	LIVISTO INT'L S.L.	28/02/2017	Solution injectable	Florfénicol	Bovins, Ovins, Porcins
CALFLOR 300 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS ET PORCINS	LABORATORIOS CALIER S.A.	03/09/2013	Solution injectable	Florfénicol	Bovins, Porcins
FLORDOFEN 300 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS ET PORCINS	DOPHARMA RESEARCH B.V.	16/10/2013	Solution injectable	Florfénicol	Bovins, Porcins
FLORFENIKEL 300 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS ET PORCINS	KELA	02/02/2012	Solution injectable	Florfénicol	Bovins, Porcins
FLORFENIS 300 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS OVINS ET PORCINS	LABORATORIOS SYVA S.A.	15/01/2021	Solution injectable	Florfénicol	Bovins, Ovins, Porcins
FLORFLU 300/16,5 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS	KRKA TOVARNA ZDRAVIL D.D. NOVO MESTO	07/12/2020	Solution injectable	Florfénicol, Flunixinine méglumine	Bovins
FLORGANE 300 MG/ML SUSPENSION INJECTABLE POUR BOVINS ET PORCINS	EMDOKA	08/04/2010	Suspension injectable	Florfénicol	Bovins, Porcins
FLORKEM 300 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS ET PORCINS	CEVA SANTE ANIMALE	02/07/2009	Solution injectable	Florfénicol	Bovins, Porcins
FLORON 300 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS ET PORCINS	KRKA TOVARNA ZDRAVIL D.D. NOVO MESTO	05/01/2015	Solution injectable	Florfénicol	Bovins, Porcins
FLORON 40 MG/G PREMELANGE MEDICAMENTEUX POUR PORCS	KRKA TOVARNA ZDRAVIL D.D. NOVO MESTO	12/05/2010	Prémélange médicamenteux	Florfénicol	Porcins

FLORON 450 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS	KRKA TOVARNA ZDRAVIL D.D. NOVO MESTO	10/07/2014	Solution injectable	Florfénicol	Bovins
FLORTEKXIN 300 MG/ML + 16,5 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS	LABORATORIOS KARIZOO S.A.	01/03/2024	Solution injectable	Florfénicol, Flunixine méglumine	Bovins
KEFLORIL 300 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS ET PORCINS	VETOQUINOL	20/07/2010	Solution injectable	Florfénicol	Bovins, Porcins
MYCOFLOR 200 MG/ML SOLUTION POUR ADMINISTRATION DANS L'EAU DE BOISSON POUR PORCINS	SP VETERINARIA	22/04/2016	Solution pour administration dans l'eau de boisson	Florfénicol	Porcins
MYCOFLOR 300 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS ET PORCINS	SP VETERINARIA	22/12/2011	Solution injectable	Florfénicol	Bovins, Porcins
NEPTRA SOLUTION EN GOUTTES AURICULAIRES POUR CHIENS	ELANCO ANIMAL HEALTH GMBH.	10/12/2019	Solution auriculaire en gouttes	Chlorhydrate de terbinafine, Florfénicol, Furoate de mométasone monohydraté	Chien
NIFENCOL 100 MG/ML SOLUTION POUR ADMINISTRATION DANS L'EAU DE BOISSONS POUR PORCINS	VETPHARMA ANIMAL HEALTH S.L.	02/06/2014	Solution pour administration dans l'eau de boisson	Florfénicol	Porcins
NIFENCOL 300 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS ET PORCINS	VETPHARMA ANIMAL HEALTH	03/09/2013	Solution injectable	Florfénicol	Bovins, Porcins
NUFLOR 300 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS ET OVINS	INTERVET	03/11/2011	Solution injectable	Florfénicol	Bovins, Ovins
NUFLOR 450 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS	INTERVET INTERNATIONAL	17/09/2008	Solution injectable	Florfénicol	Bovins
OSURNIA GEL AURICULAIRE POUR CHIENS	DECHRA REGULATORY B.V.	31/07/2014	Gel auriculaire	Bétaméthasone (sous forme d'acétate), Florfénicol, Terbinafine	Chien
RESFLOR SOLUTION INJECTABLE	INTERVET	06/01/2006	Solution injectable	Florfénicol, Flunixine méglumine	Bovins
SELECTAN	LABORATORIOS HIPRA S.A.	18/12/2007	Solution injectable	Florfénicol	Bovins, Porcins
ZELERIS SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS	CEVA SANTE ANIMALE	15/05/2017	Solution injectable	Florfénicol, Méloxicam	Bovins

Tableau XXXIV : Spécialités contenant de l'oxytétracycline (ANSES 2024)

Nom du médicament	Titulaire de l'AMM	Date d'AMM	Forme pharmaceutique	Substances actives	Espèces cibles
ACTI-TETRA B	LABORATOIRES BIOVE	24/07/1992	Poudre pour solution buvable	Chlorhydrate d'oxytétracycline	Agneau, Chevreau, Lapins, Porcins, Veau, Volailles
ACTI-TETRA I	LABORATOIRES BIOVE	06/05/1988	Solution injectable	Chlorhydrate d'oxytétracycline	Bovins, Caprins, Chat, Cheval, Chien, Ovins, Porcins
CK 5 - OXYTETRACYCLINE 500 MG/G	HUVEPHARMA SA	22/06/1992	Poudre pour solution buvable	Oxytétracycline (sous forme de chlorhydrate)	Agneau, Lapins, Porcins, Veau, Volailles
CK6 - SOLU OXYTETRACYCLINE 500 MG/G	HUVEPHARMA SA	30/06/2010	Poudre pour administration dans l'eau de boisson	Chlorhydrate d'oxytétracycline	Porcins, Poules
COMPOMIX V NEOSTARTER	HUVEPHARMA SA	15/01/1990	Poudre pour solution buvable	Chlorhydrate d'oxytétracycline, Sulfate de néomycine	Agneau, Bovins, Lapins, Ovins, Porcins, Veau, Volailles
CYCLOFIN 300 MG/ML + 20 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS	DECHRA REGULATORY B.V.	09/06/2023	Solution injectable	Flunixinine méglumine, Oxytétracycline dihydratée	Bovins
CYCLOSOL 200 LA SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS OVINS ET PORCINS	EUROVET ANIMAL HEALTH B.V.	03/04/1985	Solution injectable	Oxytétracycline dihydratée	Bovins, Ovins, Porcelet, Porcins
DUPHACYCLINE LA	ZOETIS FRANCE	02/11/1983	Solution injectable	Oxytétracycline (sous forme de dihydrate)	Bovins, Caprins, Ovins, Porcins
DURACYKLINE	ELANCO	20/07/1993	Solution injectable	Oxytétracycline dihydratée	Bovins
ENGEMYCINE 10 %	INTERVET	17/06/1987	Solution injectable	Chlorhydrate d'oxytétracycline	Bovins, Caprins, Ovins, Porcins
HEXASOL LA	NORBROOK LABORATORIES (IRELAND)	20/10/2004	Solution injectable	Flunixinine méglumine, Oxytétracycline dihydratée	Bovins
K-VET OTC 500 MG/G POUDRE POUR ADMINISTRATION DANS L'EAU DE BOISSON, LE LAIT ET L'ALIMENT D'ALLAITEMENT	HUVEPHARMA SA	07/02/2020	Poudre pour administration dans l'eau de boisson ou le lait	Oxytétracycline (sous forme de chlorhydrate)	Agneau, Chevreau, Lapins, Porcins, Veau, Volailles

K-VET OXYTETRACYCLINE 50 % POUDRE	HUVEPHARMA SA	26/06/2017	Poudre pour solution buvable	Oxytétracycline (sous forme de chlorhydrate)	Agneau, Lapins, Porcins, Veau, Volailles
LONGICINE SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS OVINS ET PORCINS	VETOQUINOL	27/09/1989	Solution injectable	Oxytétracycline dihydratée	Bovins, Ovins, Porcelet, Porcins
NEOXYNE	LABORATOIRES BIOVE	23/05/1989	Poudre pour solution buvable	Chlorhydrate d'oxytétracycline, Sulfate de néomycine	Agneau, Bovins, Ovins, Porcins, Veau, Volailles
OTC 50 HVP	HUVEPHARMA SA	02/10/2002	Poudre pour solution buvable	Chlorhydrate d'oxytétracycline	Agneau, Lapins, Porcins, Veau, Volailles
OXYTETRACYCLINE 10 % VETOQUINOL	VETOQUINOL	07/03/1984	Solution injectable	Oxytétracycline dihydratée	Bovins, Caprins, Cheval, Ovins, Porcins
OXYTETRACYCLINE 100- CR PORC ET AGNEAU- CHEVREAU SEVRES	HUVEPHARMA SA	15/06/1992	Prémélange médicamenteux	Oxytétracycline	Agneau, Chevreau, Porcins
OXYTETRACYCLINE 20 % INOUKO	LAPROVET	04/12/1998	Solution injectable	Oxytétracycline	Bovins, Porcins
OXYTETRACYCLINE 40- CR LAPIN-VOLAILLE- PORC ET AGNEAU- CHEVREAU SEVRES	HUVEPHARMA SA	15/06/1992	Prémélange médicamenteux	Oxytétracycline	Agneau, Caille, Canard, Caprins, Chevreau, Dinde, Faisan, Lapins, Oie, Ovins, Perdrix, Pintade, Porcins, Poules
OXYTETRACYCLINE 5 % VETOQUINOL	VETOQUINOL	22/06/1988	Solution injectable	Oxytétracycline dihydratée	Bovins, Chat, Cheval, Chien, Ovins, Porcins
OXYTETRIN P	INTERVET	06/04/1988	Solution pour pulvérisation cutanée	Chlorhydrate d'oxytétracycline	Bovins, Caprins, Equins, Lapins, Ovins, Porcins
OXYVETO-50 S	VMD	03/01/2017	Poudre pour solution buvable	Chlorhydrate d'oxytétracycline	Agneau, Chevreau, Lapins, Porcins, Veau, Volailles
PNEUMOBIOTIQUE	LABORATOIRE BIARD	22/06/1992	Poudre pour solution buvable	Chlorhydrate d'oxytétracycline, Spiramycine	Porcins, Veau, Volailles
PREMELANGE MEDICAMENTEUX Z 27	HUVEPHARMA SA	15/06/1992	Prémélange médicamenteux	Oxytétracycline, Sulfadimidine	Agneau, Bovins, Ovins, Porcins, Veau
PREMELANGE MEDICAMENTEUX Z 29	HUVEPHARMA SA	30/06/1992	Prémélange médicamenteux	Oxytétracycline, Sulfadiméthoxine	Lapins, Ovins

PRIMOX	HUVEPHARMA SA	10/09/2014	Poudre pour administration dans l'eau de boisson	Oxytétracycline (sous forme de chlorhydrate)	Agneau, Chevreau, Lapins, Porcins, Veau, Volailles
PS OXYTETRACYCLINE AQUACULTURE	HUVEPHARMA SA	23/06/1992	Prémélange médicamenteux	Chlorhydrate d'oxytétracycline	Anguille, Bar, Carpe, Daurade, Salmonidés, Turbot
REMACYCLINE L.A. SOLUTION INJECTABLE	DOPHARMA FRANCE	01/08/1991	Solution injectable	Oxytétracycline (sous forme de dihydrate)	Bovins, Porcins
TENALINE L.A.	CEVA SANTE ANIMALE	08/01/1993	Solution injectable	Oxytétracycline dihydratée	Bovins, Ovins, Porcelet, Porcins
TERRALON 20 % LA	VIRBAC	17/03/1986	Solution injectable	Oxytétracycline (sous forme de dihydrate)	Bovins, Ovins, Porcins
TERRAMYCINE LONGUE ACTION	ZOETIS FRANCE	22/06/1979	Solution injectable	Oxytétracycline (sous forme de dihydrate)	Bovins, Ovins, Porcelet
TERRAMYCINE SOLUTION INJECTABLE	ZOETIS FRANCE	08/05/1980	Solution injectable	Chlorhydrate d'oxytétracycline	Bovins, Caprins, Equins, Ovins, Porcins
TETRASOLUB	LABORATOIRES BIOVE	19/03/2007	Poudre pour solution buvable	Chlorhydrate d'oxytétracycline	Agneau, Chevreau, Lapins, Porcins, Veau, Volailles
TETRAVAL 50 % POUDRE POUR SOLUTION BUVABLE POUR VEAUX PORCINS ET VOLAILLES	CEVA SANTE ANIMALE	20/07/2006	Poudre pour solution buvable	Chlorhydrate d'oxytétracycline	Porcins, Veau, Volailles
TETRAVETO	LABORATOIRES BIOVE	31/08/2016	Poudre pour solution buvable	Chlorhydrate d'oxytétracycline	Agneau, Chevreau, Lapins, Porcins, Veau, Volailles
TETROXY VET 200 MG/ML SOLUTION INJECTABLE POUR BOVINS OVINS ET PORCINS	BIMEDA ANIMAL HEALTH	05/02/2016	Solution injectable	Oxytétracycline (sous forme de dihydrate)	Bovins, Ovins, Porcins
VET-OXY 5 % INJECTABLE	LABORATOIRES BIOVE	31/01/2017	Solution injectable	Chlorhydrate d'oxytétracycline	Bovins, Caprins, Chat, Cheval, Chien, Ovins, Porcins

# Annexe 3 : Questionnaire

Tableau XXXV : Script du questionnaire transmis aux éleveurs

Ce questionnaire a pour but d'évaluer l'utilisation des antibiotiques dans la filière salmonicole en France. Les antibiotiques peuvent être administrés par plusieurs voies (orale, injectable, balnéation) et la voie orale reste la plus utilisée dans cette filière, soit à partir d'aliments médicamenteux produits en usines spécialisées, soit à partir d'aliments enrobés d'antibiotiques et produits directement en ferme par l'éleveur lui-même. Notre objectif est de mieux comprendre les usages rencontrés sur le terrain pour proposer des guides de bonnes pratiques à destination de la filière qui soient réellement pertinents. Il n'y a donc pas de bonne ou de mauvaise réponse.

Les données de ce questionnaire seront anonymisées lors de leur traitement et de leur utilisation. Merci d'avance du temps que vous prendrez pour y répondre.

## Situation générale

Dans quelle région se trouve votre exploitation ? cocher plusieurs cases si plusieurs sites distincts	<input type="checkbox"/> Bretagne <input type="checkbox"/> Hauts de France <input type="checkbox"/> Normandie <input type="checkbox"/> Nouvelle Aquitaine <input type="checkbox"/> PACA <input type="checkbox"/> Pays de la Loire <input type="checkbox"/> Autres (préciser) .....
Combien de sites exploitez-vous ?	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> Plus de 3
Quelles espèces élevez-vous ?	<input type="checkbox"/> Truite Arc-en-ciel <input type="checkbox"/> Truite Fario <input type="checkbox"/> Saumon Atlantique <input type="checkbox"/> Autres (préciser) .....
Si vous élevez des truites Arc-en-ciel, quel(s) type(s) d'animaux élevez-vous ?	<input type="checkbox"/> Exclusivement des triploïdes <input type="checkbox"/> Majoritairement des triploïdes <input type="checkbox"/> A parité, triploïdes et diploïdes <input type="checkbox"/> Majoritairement des diploïdes <input type="checkbox"/> Exclusivement des diploïdes
Quelle(s) catégorie(s) de poissons sont présentes sur votre site ?	<input type="checkbox"/> Alevins <input type="checkbox"/> Géniteurs <input type="checkbox"/> Truites portion <input type="checkbox"/> Truites pour filets <input type="checkbox"/> Truites pour œufs <input type="checkbox"/> Truites pour fumage
Quelle est votre production annuelle moyenne ?	.....

## Traitements antibiotiques

Avez-vous déjà réalisé un enrobage d'antibiotique sur vos aliments directement à la ferme ?	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON
Avez-vous déjà fait préparer un aliment médicamenteux en usine pour traiter vos poissons ?	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON
Avez-vous déjà administré des antibiotiques par voie injectable sur vos poissons ?	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON
Si oui, pour l'injectable, précisez sur quelles catégories de poisson et pour quelles maladies (si possible)	
Avez-vous déjà administré des antibiotiques par balnéation sur vos poissons ?	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON
Si oui, pour la balnéation, précisez sur quelles catégories de poisson et pour quelles maladies (si possible)	

**Écloserie** *Si vous n'avez pas d'écloserie, passez directement à l'onglet grossissement*

<p>Avez-vous recours à l'utilisation d'antibiotiques enrobés sur l'aliment en écloserie ?</p>	<p><input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON</p>
<p>Quelle forme galénique utilisez-vous préférentiellement pour traiter vos poissons en écloserie avec des antibiotiques ?</p>	<p><input type="checkbox"/> Aliment médicamenteux → préparé en usine d'aliment <input type="checkbox"/> Enrobage d'antibiotiques sur l'aliment → réalisé directement à la ferme <input type="checkbox"/> Autre (préciser) .....</p>
<p>A quel(s) antibiotique(s) avez-vous habituellement recours en écloserie ? Précisez si possible les noms déposés Plusieurs réponses possibles, numérotez le cas échéant du plus fréquemment utilisé (1) au moins fréquemment utilisé (2,3 ou 4)</p>	<p><input type="checkbox"/> Florfénicol..... <input type="checkbox"/> Oxytétracycline..... <input type="checkbox"/> Triméthoprim/Sulfamides..... <input type="checkbox"/> Autre (préciser) .....</p>
<p>Quelles formes galéniques avez-vous déjà enrobé sur vos aliments en écloserie ? Indiquer éventuellement les noms déposés (si connus)</p>	<p><input type="checkbox"/> Poudre ..... <input type="checkbox"/> Solution lipophile ..... <input type="checkbox"/> Solution hydrophile ..... <input type="checkbox"/> Autre (préciser) .....</p>
<p>Quelle est approximativement le diamètre du ou des aliments utilisé(s) pour enrober des antibiotiques (en mm) ?</p>	<p>Aliment 1 : ..... Aliment 2 : ..... Aliment 3 : .....</p>
<p>Quelle est approximativement la teneur en matière grasse du ou des aliments utilisé(s) pour enrober des antibiotiques ( en %) ? indiquez la référence commerciale actuellement utilisée si possible</p>	<p>Aliment 1 : ..... Aliment 2 : ..... Aliment 3 : .....</p>
<p>Quel est habituellement votre rationnement pour les animaux qui reçoivent un traitement médicamenteux en écloserie (en %) ?</p>	

<b>Huile</b>	
Ajoutez-vous une huile lors du mélange ?	<input type="checkbox"/> OUI, systématiquement <input type="checkbox"/> OUI, parfois : quand ? ..... <input type="checkbox"/> NON, jamais
Si oui quel type d'huile ?	<input type="checkbox"/> Végétale (préciser) ..... <input type="checkbox"/> Huile de poisson (préciser) ..... <input type="checkbox"/> Autre (préciser) .....
Ajoutez-vous un liquide au mélange qui ne soit pas de l'huile ?	<input type="checkbox"/> OUI (préciser)..... <input type="checkbox"/> NON <b>Si oui, complétez les questions suivantes avec vos pratiques concernant ce produit et non l'huile.</b>
Si oui quelle quantité d'huile ajoutez-vous ? (en mL/kg aliment)	.....
Si vous utilisez de l'huile, comment la distribuez-vous dans l'aliment	<input type="checkbox"/> Vous déposez l'huile directement avec une seringue (ou équivalent) dans la mélangeuse, en un seul point <input type="checkbox"/> Vous déposez l'huile directement avec une seringue (ou équivalent) dans la mélangeuse, mais vous le faites en plusieurs points <input type="checkbox"/> Vous déposez l'huile directement avec une seringue (ou équivalent) dans la mélangeuse, mais progressivement, et pendant que la mélangeuse fonctionne <input type="checkbox"/> Vous pulvérisez l'huile (avec un pulvérisateur) sur l'aliment pour obtenir une homogénéité plus grande au départ <input type="checkbox"/> Autre (préciser) ..... .....
Si vous utilisez de l'huile, quand la distribuez-vous dans l'aliment	<input type="checkbox"/> Vous mélangez l'huile et l'antibiotique ensemble avant de mélanger avec l'aliment <input type="checkbox"/> Vous déposez simultanément l'antibiotique et l'huile dans la mélangeuse, mais sans les avoir mélangés ensemble préalablement <input type="checkbox"/> Vous mélangez d'abord l'aliment et l'antibiotique, puis, dans un second temps, vous ajoutez de l'huile dans la mélangeuse
<i>Utilisez cet espace libre si vous souhaitez apporter des précisions aux réponses précédentes</i>	

<b>Mélange</b>	
Quelle quantité d'aliment médicamenteux préparez-vous habituellement à chaque mélange ? (en kg)	.....
Pour enrober l'antibiotique sur l'aliment, quel matériel utilisez-vous ?	<input type="checkbox"/> Mélange manuel <input type="checkbox"/> Mélangeur type robot de cuisine <input type="checkbox"/> Mélangeuse type bétonnière <input type="checkbox"/> Autre (préciser).....
Cette « mélangeuse » a-t-elle d'autres utilisations que la préparation d'aliments médicamenteux ?	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON
Si oui, précisez ici quels usages	
Combien de temps dure le mélange ?	<input type="checkbox"/> 5 minutes <input type="checkbox"/> 10 minutes <input type="checkbox"/> 15 minutes <input type="checkbox"/> Autre (préciser).....
Si besoin, précisez ici les éléments qui vous semblent pertinents quant à la durée du mélange	
Alternez-vous le sens de rotation de votre mélangeuse pendant la préparation ?	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON
Si vous utilisez un antibiotique sous forme de poudre solide comment le disposez-vous dans la mélangeuse ?	<input type="checkbox"/> Vous mettez d'abord l'aliment dans la mélangeuse, puis la poudre d'antibiotique par-dessus, avant de lancer le mélange <input type="checkbox"/> Vous mettez d'abord la poudre d'antibiotique dans la mélangeuse, puis l'aliment dessus, avant de lancer le mélange <input type="checkbox"/> Vous mettez d'abord l'aliment dans la mélangeuse, puis, une fois celle-ci en fonctionnement, vous ajoutez progressivement la poudre d'antibiotique en essayant de la répartir de manière homogène <input type="checkbox"/> Autre (précisez) ..... .....

<p>Si vous utilisez un antibiotique sous forme de solution liquide, comment le disposez-vous dans la mélangeuse ?</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Vous le déposez directement avec une seringue (ou équivalent) dans la mélangeuse, en un seul point</li> <li><input type="checkbox"/> Vous le déposez directement avec une seringue (ou équivalent) dans la mélangeuse, mais vous le faites en plusieurs points</li> <li><input type="checkbox"/> Vous le déposez directement avec une seringue (ou équivalent) dans la mélangeuse, mais progressivement, et pendant que la mélangeuse fonctionne</li> <li><input type="checkbox"/> Vous le pulvérisez (avec un pulvérisateur) sur l'aliment pour obtenir une homogénéité plus grande au départ, avant de lancer la mélangeuse</li> <li><input type="checkbox"/> Vous le pulvérisez (avec un pulvérisateur) sur l'aliment pour obtenir une homogénéité plus grande au départ, pendant que la mélangeuse fonctionne</li> <li><input type="checkbox"/> Autre (préciser) ..... .....</li> </ul>
<p><i>Utilisez cet espace libre si vous souhaitez apporter des précisions aux réponses précédentes</i></p>	
<p><b>Conservation</b></p>	
<p>Combien de temps après la fin de la préparation l'aliment est-il distribué aux animaux pour la première fois en général ?</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Immédiatement ou dans l'heure qui suit la préparation</li> <li><input type="checkbox"/> Dans les 2 à 4h qui suivent la préparation</li> <li><input type="checkbox"/> Dans les 4 à 12h qui suivent la préparation</li> <li><input type="checkbox"/> Au moins 12h après la préparation (la veille pour le lendemain par exemple)</li> <li><input type="checkbox"/> Au moins 24h après la préparation</li> </ul>
<p>Pendant combien de temps conservez-vous l'aliment ainsi mélangé en général ? (hors week end)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> L'aliment enrobé d'antibiotique est distribué dans la journée (= une préparation par jour)</li> <li><input type="checkbox"/> L'aliment enrobé d'antibiotiques est gardé 48h (= une préparation pour 2 jours de traitement)</li> <li><input type="checkbox"/> L'aliment enrobé d'antibiotique est gardé 3 jours (= une préparation pour 3 jours de traitement)</li> <li><input type="checkbox"/> L'aliment enrobé d'antibiotique est gardé 4 jours (= une préparation pour 4 jours de traitement)</li> <li><input type="checkbox"/> Autre (préciser) .....</li> </ul>

<p>Quelle est votre politique sur les traitements devant être conduits durant le week-end ?</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Pas de différence avec le reste de la semaine</li> <li><input type="checkbox"/> Pas de traitement le dimanche (pas d'alimentation le dimanche)</li> <li><input type="checkbox"/> Pas de traitement le samedi et le dimanche (pas d'alimentation du week-end)</li> <li><input type="checkbox"/> L'aliment enrobé d'antibiotique peut être distribué le week-end. Toutefois, il n'est pas préparé comme le reste de la semaine, mais en avance, avec stockage</li> </ul>
<p>Comment conservez-vous l'aliment mélangé ?</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> A température ambiante</li> <li><input type="checkbox"/> Au réfrigérateur (0-4°C)</li> <li><input type="checkbox"/> Autre (préciser) .....</li> </ul>
<p>Les aliments enrobés d'antibiotique stockés sont-ils protégés des rayons UV ?</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> OUI</li> <li><input type="checkbox"/> NON</li> </ul>

**Grossissement** *Si vous ne faites pas de grossissement, passez directement à l'onglet final*

<p>Avez-vous recours à l'utilisation d'antibiotiques enrobés sur l'aliment en engraissement ?</p>	<p><input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON</p>
<p>Quelle forme galénique utilisez-vous préférentiellement pour traiter vos poissons en engraissement avec des antibiotiques ?</p>	<p><input type="checkbox"/> Aliment médicamenteux → préparé en usine d'aliment <input type="checkbox"/> Enrobage d'antibiotiques sur l'aliment → réalisé directement à la ferme <input type="checkbox"/> Autre (préciser) ..... .</p>
<p>A quel(s) antibiotique(s) avez-vous habituellement recours en engraissement ? Précisez si possible les noms déposés Plusieurs réponses possibles, numérotez le cas échéant du plus fréquent (1) au moins fréquent (2,3,4)</p>	<p><input type="checkbox"/> Florfénicol..... <input type="checkbox"/> Oxytétracycline..... <input type="checkbox"/> Triméthoprim/Sulfamides..... <input type="checkbox"/> Autre (préciser) .....</p>
<p>Quelles formes galéniques avez-vous déjà enrobé sur vos aliments en engraissement ? Indiquez éventuellement les noms déposés si connus</p>	<p><input type="checkbox"/> Poudre ..... <input type="checkbox"/> Solution lipophile ..... <input type="checkbox"/> Solution hydrophile ..... <input type="checkbox"/> Autre (préciser) .....</p>
<p>Quelle est approximativement le diamètre du ou des aliments utilisé(s) pour enrober des antibiotiques (en mm)</p>	<p>Aliment 1 : ..... Aliment 2 : ..... Aliment 3 : .....</p>
<p>Quelle est approximativement la teneur en matière grasse du ou des aliments utilisé(s) pour enrober des antibiotiques (en %). Indiquez la référence commerciale actuellement utilisée si possible</p>	<p>Aliment 1 : ..... Aliment 2 : ..... Aliment 3 : .....</p>
<p>Quel est habituellement votre rationnement pour les animaux qui reçoivent un traitement médicamenteux en grossissement (en %) ?</p>	<p>.....</p>

<p>Avez-vous déjà répondu à la description de vos pratiques d'enrobage en ferme dans la partie éclosion ? (huile, mélange, conservation)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Oui, et la préparation des aliments médicamenteux est la même que celle décrite précédemment en éclosion =&gt; <b>prenez directement à l'onglet final</b></li> <li><input type="checkbox"/> Oui mais la préparation ou la conservation des aliments enrobés d'antibiotiques est différente en engraissement par rapport à ce que j'ai décrit en éclosion =&gt; <b>continuez ce questionnaire</b></li> <li><input type="checkbox"/> NON et je continue ce questionnaire</li> </ul>
<p><b>Huile</b></p>	
<p>Ajoutez-vous une huile lors du mélange ?</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> OUI</li> <li><input type="checkbox"/> NON</li> </ul>
<p>Si oui quel type d'huile ?</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Végétale (préciser) .....</li> <li><input type="checkbox"/> Huile de poisson (préciser) .....</li> <li><input type="checkbox"/> Autre (préciser) .....</li> </ul>
<p>Ajoutez-vous du liquide au mélange qui ne soit pas de l'huile ?</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> OUI (préciser).....</li> <li><input type="checkbox"/> NON</li> </ul> <p><b>Si oui, complétez les questions suivantes avec vos pratiques concernant ce produit et non l'huile.</b></p>
<p>Si oui quelle quantité d'huile ajoutez-vous ? (en mL/kg d'aliment)</p>	<p>.....</p>
<p>Si vous utilisez de l'huile, comment la distribuez-vous dans l'aliment</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Vous déposez l'huile directement avec une seringue (ou équivalent) dans la mélangeuse, en un seul point</li> <li><input type="checkbox"/> Vous déposez l'huile directement avec une seringue (ou équivalent) dans la mélangeuse, mais vous le faites en plusieurs points</li> <li><input type="checkbox"/> Vous déposez l'huile directement avec une seringue (ou équivalent) dans la mélangeuse, mais progressivement, et pendant que la mélangeuse fonctionne</li> <li><input type="checkbox"/> Vous pulvérisez l'huile (avec un pulvérisateur) sur l'aliment pour obtenir une homogénéité plus grande au départ</li> <li><input type="checkbox"/> Autre (préciser)</li> </ul>

Si vous utilisez de l'huile, quand la distribuez-vous dans l'aliment	<input type="checkbox"/> Vous mélanger l'huile et l'antibiotique ensemble avant de mélanger avec l'aliment <input type="checkbox"/> Vous déposez simultanément l'antibiotique et l'huile dans la mélangeuse, mais sans les avoir mélangés ensemble préalablement <input type="checkbox"/> Vous mélangez d'abord l'aliment et l'antibiotique, puis, dans un second temps, vous ajoutez de l'huile dans la mélangeuse
<i>Utilisez cet espace libre si vous souhaitez apporter des précisions aux réponses précédentes</i>	
<b>Mélange</b>	
Quelle quantité d'aliment médicamenteux préparez-vous habituellement à chaque mélange ? (en kg)	.....
Pour enrober l'antibiotique sur l'aliment, quel matériel utilisez-vous ?	<input type="checkbox"/> Mélange manuel <input type="checkbox"/> Mélangeur type robot de cuisine <input type="checkbox"/> Mélangeuse type bétonnière <input type="checkbox"/> Autre (préciser) .....
Cette « mélangeuse » a-t-elle d'autres utilisations que la préparation d'aliments médicamenteux ?	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON
Si oui, précisez ici quels usages	
Combien de temps dure le mélange ?	<input type="checkbox"/> 5 minutes <input type="checkbox"/> 10 minutes <input type="checkbox"/> 15 minutes Autre (préciser).....
Si besoin, précisez ici les éléments qui vous semblent pertinents quant à la durée du mélange	

<p>Alternez-vous le sens de rotation de votre mélangeuse pendant la préparation ?</p>	<p><input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON</p>
<p>Si vous utilisez un antibiotique sous forme de poudre solide comment le disposez-vous dans la mélangeuse ?</p>	<p><input type="checkbox"/> Vous mettez d'abord l'aliment dans la mélangeuse, puis la poudre d'antibiotique par-dessus, avant de lancer le mélange</p> <p><input type="checkbox"/> Vous mettez d'abord la poudre d'antibiotique dans la mélangeuse, puis l'aliment dessus, avant de lancer le mélange</p> <p><input type="checkbox"/> Vous mettez d'abord l'aliment dans la mélangeuse, puis, une fois celle-ci en fonctionnement, vous ajoutez progressivement la poudre d'antibiotique en essayant de la répartir de manière homogène</p> <p><input type="checkbox"/> Autre (précisez) .....</p>
<p>Si vous utilisez un antibiotique sous forme de solution liquide, comment le disposez-vous dans la mélangeuse ?</p>	<p><input type="checkbox"/> Vous le déposez directement avec une seringue (ou équivalent) dans la mélangeuse, en un seul point</p> <p><input type="checkbox"/> Vous le déposez directement avec une seringue (ou équivalent) dans la mélangeuse, mais vous le faites en plusieurs points</p> <p><input type="checkbox"/> Vous le déposez directement avec une seringue (ou équivalent) dans la mélangeuse, mais progressivement, et pendant que la mélangeuse fonctionne</p> <p><input type="checkbox"/> Vous le pulvérisez (avec un pulvérisateur) sur l'aliment pour obtenir une homogénéité plus grande au départ, avant de lancer la mélangeuse</p> <p><input type="checkbox"/> Vous le pulvérisez (avec un pulvérisateur) sur l'aliment pour obtenir une homogénéité plus grande au départ, pendant que la mélangeuse fonctionne</p> <p><input type="checkbox"/> Autre (préciser) ..... .....</p>
<p><i>Utilisez cet espace libre si vous souhaitez apporter des précisions aux réponses précédentes</i></p>	

<b>Conservation</b>	
Combien de temps après la fin de la préparation l'aliment est-il distribué aux animaux pour la première fois en général ?	<input type="checkbox"/> Immédiatement ou dans l'heure qui suit la préparation <input type="checkbox"/> Dans les 2 à 4h qui suivent la préparation <input type="checkbox"/> Dans les 4 à 12h qui suivent la préparation <input type="checkbox"/> Au moins 12h après la préparation (la veille pour le lendemain par exemple) <input type="checkbox"/> Au moins 24h après la préparation
Pendant combien de temps conservez-vous l'aliment ainsi mélangé en général ? (hors week-end)	<input type="checkbox"/> L'aliment enrobé d'antibiotique est distribué dans la journée (= une préparation par jour) <input type="checkbox"/> L'aliment enrobé d'antibiotiques est gardé 48h (= une préparation pour 2 jours de traitement) <input type="checkbox"/> L'aliment enrobé d'antibiotique est gardé 3 jours (= une préparation pour 3 jours de traitement) <input type="checkbox"/> L'aliment enrobé d'antibiotique est gardé 4 jours (= une préparation pour 4 jours de traitement) <input type="checkbox"/> Autre (préciser) .....
Quelle est votre politique sur les traitements devant être conduits durant le week-end ?	<input type="checkbox"/> Pas de différence avec le reste de la semaine <input type="checkbox"/> Pas de traitement le dimanche (pas d'alimentation le dimanche) <input type="checkbox"/> Pas de traitement le samedi et le dimanche (pas d'alimentation du week-end) <input type="checkbox"/> L'aliment médicamenteux peut être distribué le week-end. Toutefois, il n'est pas préparé comme le reste de la semaine, mais en avance, avec stockage
Comment conservez-vous l'aliment mélangé ?	<input type="checkbox"/> A température ambiante <input type="checkbox"/> Au réfrigérateur (0-4°C) <input type="checkbox"/> Autre (préciser) .....
Les aliments enrobés d'antibiotique stockés sont-ils protégés des rayons UV ?	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON

## Votre point de vue

<p>Qu'espérez-vous retirer de cette étude ?</p>	
<p>Avez-vous des remarques à nous faire parvenir ?</p>	

# Annexe 4 : Aliments utilisés



## Nutra Sprint

### COMPLETE EXTRUDED STARTER FEED FOR TROUT

**Nutra Sprint** is a complete range of starter feeds, including all the nutritional solutions resulting from the intensive Research and Development studies conducted by Skretting. Developed from raw materials selected according to our strict quality and safety criterias, and produced according to a controlled manufacturing process, the **Nutra Sprint** range offers all the necessary guarantees for aquaculture production.

The quantity of food fed should be adjusted according to the performance objectives, biomass and environmental conditions of the farming practises. Your Skretting technical team can provide more information on what is the correct strategy for you.

**Nutra Sprint 0.5 to 1.8** include **Protec** concept, our nutritional solution for the best fish health.

### COMPOSITION AND CHARACTERISTICS

Please refer to the label for detailed composition. The **Nutra Sprint** range does not contain GMO's and complies with the specifications for the production of Trout.

	0.3	0.5	0.7	1.0	1.5	1.8
Diameter (mm)	0.2-0.4	0.4-0.6	0.6-0.8	0.8-1.2	1.3-1.7	1.6-2.0
Fish weight (g)	<0.2	0.2-0.5	0.5-1	1-3	3-6	6-15
Proteins (%)	52-54	52-54	52-54	52-54	52-54	52-54
Fat (%)	17-19	17-19	17-19	17-19	17-19	17-19
Ash (%)	10	10	10	10	10	10
Fiber (%)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Phosphorus (%)	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Digestible Energy Skretting (MJ/kg)	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0
Vitamin A (UI/Kg)	7500	7500	7500	7500	7500	7500
Vitamin D (UI/Kg)	1125	1125	1125	1125	1125	1125
Vitamin C (mg/Kg)	860	1075	1075	1075	1075	1075
Vitamin E (mg/Kg)	575	575	575	575	575	575

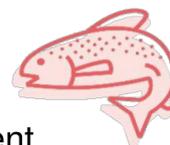
While every effort is made to ensure accuracy, the information provided in this sheet is only a guideline. Skretting reserves the right to modify it without prior notice. Analytical constituents as prescribed by Regulation (EC) 767/2009 art.3.1 (t) are to be found on the bag label. This information sheet is not to be considered as a "label" as referred to in Regulation (EC) 767/2009 art.3.1 (t). [skrettingfrance@skretting.com](mailto:skrettingfrance@skretting.com)





\* Sans PAT: Protéines Animaux Terrestres

## GAMME NEO CDC



Aliments extrudés pour le grossissement des **Truites**

- Aliments d'un très haut niveau d'énergie digestible
- Forte teneur en produits d'origine marine, sélectionnés pour leur haut niveau de digestibilité
- Garantit un bon équilibre nutritionnel sur l'ensemble du cycle
- Gamme disponible avec ou sans pigments

	NEO 19 CDC		NEO 20 CDC	NEO 21 CDC
Ref. Commerciale	3	4 / 5	5 / 7 / 9	7 / 9 / 11
Diamètre (mm)	3,2	4 / 5,5	5,5 / 7,5 / 9,5	7,5 / 9,5 / 11,5
Présentation	Granulé			
Poids vifs	10 à 50 g	50 à 400 g	100 à 2 500 g	400 à 3 500 g

### CONDITIONNEMENT

Sac de 15, 20, 25 kg, big bag ou vrac  
Stocker l'aliment dans un endroit propre, frais et sec.

### FLOTTAISON

Coulant, semi-flottant ou flottant

### PROFIL NUTRITIONNEL INDICATIF

		NEO 19 CDC		NEO 20 CDC	NEO 21 CDC
		3	4 / 5	5 / 7 / 9	7 / 9 / 11
<b>Protéine</b>	(%)	<b>45</b>	<b>40</b>	<b>39</b>	<b>38</b>
<b>Lipides</b>	(%)	<b>21</b>	<b>23</b>	<b>27</b>	<b>30</b>
<b>Energie Digestible (ED)</b>	(MJ/Kg)	<b>19,6</b>	<b>19,5</b>	<b>20,6</b>	<b>21,6</b>
<b>PD / ED</b>	(g/MJ)	21,3	18,9	17,5	16,2
<b>Energie Brute</b>	(MJ/Kg)	22,6	22,7	23,7	24,6
<b>Cellulose</b>	(%)	1,8	2,5	2,3	1,5
<b>Cendres</b>	(%)	6,8	6,8	6	5,7
<b>Phosphore</b>	(%)	0,95	0,95	0,9	0,9

### VITAMINES INCORPORÉES

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

### DURABILITÉ

Chez Le Gouessant nous pensons que l'aquaculture est durable si elle allie performance, qualité et préservation des ressources marines, c'est pourquoi nous sommes certifiés Global GAP.



S.A.S LE GOUESSANT AQUACULTURE - Z.I. des Noës - B.P. 40228 - 22400 LAMBALLE  
Tél. : +33 (0)2 96 30 74 74 - Fax : +33 (0)2 96 30 74 32 - E mail : contact.aqua@legouessant.fr - www.aqua.legouessant.com

Figure 68 : Caractéristiques de l'aliment type grossissement utilisé (NEO 20 ; 5 mm de diamètre)

Valeurs indicatives et non contractuelles, se référer à l'étiquette produit pour la composition détaillée. DLUO de 10 mois à partir de la date de fabrication.

Septembre 2022

# Annexe 5 : Analyse des échantillons

GIRPA	Protocole méthode BPL	08/ENRG/GEST METHO/002	Date d'application : 25/09/23	version 7	1/5
-------	-----------------------	------------------------	----------------------------------	-----------	-----

## Analyse de florfénicol (FF) et oxytétracycline (OTC) dans les aliments enrobés pour poissons

### **Considérations métrologiques :**

Sauf mentions contraires,

- Accélération (g) : la tolérance sur les accélérations indiquées est de 10 %,
- Durées : la tolérance sur les durées indiquées est de 10 %,
- Masses : la tolérance sur les masses indiquées est de 5%,  
Attention, la tolérance de la prise d'essai d'un échantillon est de 1 %,
- Température : la tolérance sur les températures indiquées est de +/- 5°C,
- Volumes :
  - o La verrerie jaugée et graduée est de classe A,
  - o La tolérance sur les volumes indiqués est de 5% lors de l'utilisation de la verrerie de laboratoire graduée,
  - o Les tolérances sur les instruments volumétriques à piston sont normatives.

Mentions particulières :

- Si la mention « environ » est présente, aucune tolérance n'est associée à la valeur cible,
- Si une des mentions « au moins », « pas plus de », « maximum » ou « minimum » est présente, aucune tolérance n'est associée à en-deçà ou au-delà de la valeur cible.  
La tolérance par défaut de la grandeur s'applique à la valeur du côté de la restriction (par exemple, peser au moins 10 g : une pesée de 9,6 g sera valide car une tolérance de 5 % est acceptée sur les pesées).

### **Code de la méthode de base :**

- -

### **Remarques / points critiques de la méthode :**

- Blancs matrices utilisés lors des essais :
  - o Aliment blanc « le Gouessant », diamètre 5mm,
  - o Aliment blanc « Skretting », diamètre 0,5mm.
- La concentration de l'oxytétracycline est exprimée en oxytetracycline hydrochloride dès la préparation de la solution mère.

### **Solutions de calibration :**

- Réaliser les solutions mères de florfénicol et d'oxytétracycline à 1 g.L<sup>-1</sup> dans le méthanol.

### **Gammes de calibration :**

- **Gamme solvant** : Réaliser une gamme solvant, 10 fois plus concentrée que la gamme matrice dans méthanol/eau ultra pure 50/50 ; v/v,
- **Gamme matrice** : Réaliser une gamme matrice en ajoutant 100 µL des points de calibration solvant correspondants à 900 µL de matrice blanche extraite :
  - o **Gamme florfénicol** : 100, 280, 460, 640, 820 et 1000 µg/l,
  - o **Gamme oxytétracycline** : 1000, 1500, 2400, 3600, 4800 et 6000 µg/l.

GIRPA	Protocole méthode BPL	08/ENRG/GEST METHO/002	Date d'application : 25/09/23	version 7	2/5
-------	-----------------------	------------------------	----------------------------------	-----------	-----

### **Matériel :**

- Agitateur d'ampoules (Ika Labortechnik),
- Bac à ultrasons (Fisherbrand),
- Bac à ultrasons (VWR),
- Balance MSA66P-000-DH (incertitude +/- 1 µg) (Sartorius),
- Système chromatographie Liquide (LC-MS/MS Ultivo) :
  - Autosampler / Pump / Column Oven : 1290 Infinity II (Agilent),
  - Triple quadrupole detector : ULTIVO (Agilent),
  - Workstation : MassHunter V10.0.
- Colonne : C18 kinetex, 100 x 4,6 ; 2,6 µm (Phenomenex ref.00D-4462-E0),
- Pré-colonne : C18 2mm (Phenomenex ref. AJ0-7510),
- Pipettes automatiques,
- Support pré-colonne (Phenomenex ref. AJ0-9000),
- Système d'eau ultra pure (Millipore®),
- Verrerie de laboratoire,
- Vial gradué 2 mL en verre (Agilent ref 5190-9100),
- Vortex (Bioblock).

### **Réactifs:**

- Acétonitrile gradient grade HPLC (SDS CARLO ERBA ref. 412392000),
- Acide formique 99% (SDS CARLO ERBA ref. 405792),
- Méthanol de qualité LC-MS grade (VWR ref. 83638.320),
- Huile de colza BIO (U BIO 50 cl),
- Eau ultra-pure.

### **Partie préparation des échantillons**

#### **Homogénéisation avant analyse (sauf matrices blanches) :**

1. Sortir l'échantillon du congélateur,
2. Homogénéiser 30 secondes en position horizontale sur un agitateur mécanique à 300 rpm minimum,
3. Procéder à la prise d'essai (cf protocole ci-dessous).

#### **Protocole :**

1. Peser 50 g ± 0,5 g d'échantillon enrobé dans un flacon en PEHD de 2 L,
2. Pour le blanc matrice ajouter, à l'aide d'une pipette automatique, de l'huile de colza comme suit :
  - Type H5 : 0,25 g d'huile de colza,
  - Type H10 : 0,5 g d'huile de colza,
  - Type H15 : 0,75 g d'huile de colza,
  - Type H22 : 1,125 g d'huile de colza,
3. A l'aide d'une éprouvette, ajouter 500 ml d'eau ultra-pure,
4. A l'aide d'une éprouvette, ajouter 500 ml de méthanol,
5. Fermer l'opercule puis le bouchon à vis,
6. Homogénéiser 17h (+/- 1h) en position inclinée sur un agitateur mécanique à 120 rpm minimum,
7. Attendre minimum 5 minutes,

GIRPA	Protocole méthode BPL	08/ENRG/GEST METHO/002	Date d'application : 25/09/23	version 7	3/5
-------	-----------------------	------------------------	----------------------------------	-----------	-----

8. A l'aide d'une pipette automatique, transférer 1 ml de surnageant dans une fiole jaugée de 100 ml,
  9. Compléter au trait de jauge avec le mélange méthanol/eau ultra pure (50/50 ; v/v),
  10. Homogénéiser vigoureusement manuellement environ 5 secondes,
  11. Transférer une aliquote dans un vial de 2 ml en verre pour injection LC-MSMS (RE = 1/2000).
- Limite de quantification :
    - 200 mg.kg<sup>-1</sup> pour le florfenicol,
    - 2000 mg.kg<sup>-1</sup> pour l'OTC.
  - Nombre d'échantillons par jour : 20

### Partie Analytique

#### Injection :

- Conditionnement : 3 injections minimum du blanc matrice
  - Gamme de calibration matrice - injection 1
  - Echantillon 1- injection 1
  - Echantillon 2 - injection 1
  - ...
  - Echantillon x - injection 1
- } Maximum 15 échantillons
- Gamme de calibration matrice - injection 2
  - Echantillon 1 - injection 2
  - Echantillon 2 - injection 2
  - ...
  - Echantillon x - injection 2
  - Gamme de calibration matrice - injection 3
  - Echantillon 1 - injection 3
  - Echantillon 2 - injection 3
  - ...
  - Echantillon x - injection 3
  - Gamme de calibration – injection 4

#### Retraitement des données :

- **Modèle de régression :** Quadratique pondérée en 1/x,
- **Domaine de calibration :**
  - De 100 à 1000 µg/l pour le florfenicol,
  - De 1000 à 6000 µg/l pour l'oxytétracycline.
- **Critères d'acceptation des points de calibration :** dérive maximale de 20% sur chaque point.

GIRPA	Protocole méthode BPL	08/ENRG/GEST METHO/002	Date d'application : 25/09/23	version 7	4/5
-------	-----------------------	------------------------	----------------------------------	-----------	-----

- Quantifier chaque répétition d'injections indépendamment. Chaque bloc de répétition d'injection est quantifié par les 2 gammes de calibration qui l'encadre.

### **Conditions Instrumentales :**

#### **Paramètres chromatographiques :**

- Colonne : C18 kinetex, 100 x 4,6 ; 2,6 µm (Phenomenex),
- Pré-colonne : C18 2mm (Phenomenex),
- Eluant A : eau ultra-pure + 0,1% acide formique (v/v),
- Eluant B : acétonitrile + 0,1% acide formique (v/v),
- Volume d'injection : 1 µl,
- Température du four : 40°C,
- Débit : 0,7 ml.min<sup>-1</sup>,
- Gradient :

Temps (min)	% Eluant A	% Eluant B
0	95	5
3	0	100
5	0	100
5.1	95	5
7	95	5

- Temps de rétention attendus :
  - Oxytétracycline : environ 2,2 minutes,
  - Florfenicol : environ 2,8 minutes.

#### **Paramètres spectrométrie de masse :**

- Gas temperature : 300°C,
- Gas flow : 8 L/min,
- Nebulizer : 35 psi,
- Sheath gas temperature : 400°C,
- Sheath gas flow : 12 L/min,
- Capillary Voltage : 2000 V (Positive) / 3500 V (Negative),
- Nozzle Voltage : 0V (Positive) / 1000 V (Negative).

Compound name	Precursor (m/z)	MS1 res	Product (m/z)	MS2 res	Dwell (ms)	Fragmentor (V)	CE (V)	Polarity	Type
Florfenicol_1	358	Unit	169	Unit	200	93	44	Negative	quantification
Florfenicol_2	358	Unit	187	Unit	200	93	16	Negative	qualification
Oxytetracycline_1	461	Unit	98	Unit	100	107	20	Positive	quantification
Oxytetracycline_2	461	Unit	268	Unit	100	107	30	Positive	qualification

GIRPA	Protocole méthode BPL	08/ENRG/GEST METHO/002	Date d'application : 25/09/23	version 7	5/5
-------	-----------------------	------------------------	----------------------------------	-----------	-----

*Cadre réservé à l'usage du service développement*

- Données spectrales (full scan, product ion scan...) disponibles : oui / non
- Bases de données internes (optimisations) à jour : oui / non
  
- Historique des modifications suite au changement de version (si besoin) :
  - V2 (GM le 02/08/24) : Ajout d'une procédure d'homogénéisation des échantillons avant analyse.
  - V3 (GM le 26/09/24) : Précisions analytiques.

*Figure 69 : Protocole d'extraction et d'analyse des échantillons d'aliments enrobés*

Tableau XXXVI : Résultats obtenus lors de la validation de la méthode

Échantillon		Procédure C (conservation froid positif)			Procédure A (conservation froid positif)			Procédure B (conservation froid positif)		
Numéro répétition analyse	Numéro répétition analyse LC-MS	Teneur retrouvée ( mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée ( mg/kg)	CV (en %)	Teneur retrouvée ( mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée ( mg/kg)	CV (en %)	Teneur retrouvée ( mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée ( mg/kg)	CV (en %)
1	1	716	707	1,7	8426	8456	0,6	1544	1447	5,2
	2	690			8523			1437		
	3	714			8420			1361		
2	1	769	770	0,4	7986	8166	1,6	1467	1395	3,8
	2	768			8284			1375		
	3	774			8228			1341		
3	1	695	696	0,3	8455	8483	1,0	1332	1305	2,0
	2	693			8399			1312		
	3	699			8595			1270		
4	1	734	727	1,4	7883	7894	0,8	1231	1161	4,3
	2	712			7980			1123		
	3	735			7820			1128		
5	1	732	711	2,2	8082	8073	0,5	1360	1312	2,7
	2	702			8122			1273		
	3	698			8014			1304		
6	1	714	715	1,4	8168	7901	3,0	1185	1235	2,8
	2	727			7936			1264		
	3	703			7599			1254		
7	1	714	707	2,1	8014	8010	0,7	1334	1389	3,1
	2	719			8074			1391		
	3	686			7942			1441		
8	1	704	685	2,1	7963	7876	0,8	1342	1376	1,7
	2	669			7857			1392		
	3	681			7807			1393		
9	1	692	687	1,3	7420	7374	0,5	1221	1266	2,5
	2	695			7371			1288		
	3	674			7330			1289		
10	1	691	705	1,5	7287	7342	0,9	1411	1406	0,7
	2	718			7433			1416		
	3	706			7307			1392		

Tableau XXXVII : Résultats obtenus lors des essais de stabilité

Mode de conservation	Échantillon		Procédure C			Procédure A			Procédure B			
	Numéro d'échantillon	Numéro répétition analyse LC-MS	Teneur retrouvée ( mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée ( mg/kg)	CV (en %)	Teneur retrouvée ( mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée ( mg/kg)	CV (en %)	Teneur retrouvée ( mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée ( mg/kg)	CV (en %)	
Température ambiante	3	1	670	699	3,1	8029	8090	0,6	1544	1625	3,5	
		2	707			8139			1671			
		3	722			8102			1661			
	6	1	743	752	2,4	8010	8056	0,6	1391	1435	2,2	
		2	736			8127			1456			
		3	778			8029			1459			
	9	1	745	752	1,4	8042	8109	1,1	1469	1460	1,8	
		2	744			8233			1425			
		3	767			8050			1486			
Froid positif	1	Validation de la méthode		711	3,3	Validation de la méthode		7957	4,6	Validation de la méthode		
	4	1	694	720	2,7	8576	8692	1,0	1524	1554	1,5	
		2	742			8706			1582			
		3	723			8795			1557			
	7	1	696	714	2,6	8295	8303	1,3	1277	1356	4,8	
		2	707			8176			1356			
		3	739			8437			1435			
	Congélation	2	1	744	758	1,9	9269	9434	1,2	1294	1373	4,1
			2	751			9500			1404		
3			778	9531			1421					
5		1	761	754	1,2	8710	8697	0,6	1321	1368	2,4	
		2	741			8629			1396			
		3	758			8751			1387			
8		1	738	769	3,1	8356	8495	1,2	1287	1318	1,7	
		2	775			8607			1327			
		3	795			8521			1340			

Tableau XXXVIII : Résultats obtenus lors des essais d'homogénéité, pour la procédure A

		Procédure A						
Réplicat	Échantillon		10 minutes de mélange			15 minutes de mélange		
	Numéro d'échantillon	Numéro répétition analyse LC-MS	Teneur retrouvée ( mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée ( mg/kg)	CV (en %)	Teneur retrouvée ( mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée ( mg/kg)	CV (en %)
1	1	1	7697	7621	1,9	9052	8947	1,1
		2	7421			8971		
		3	7746			8818		
	2	1	7736	7541	1,9	9301	9150	1,8
		2	7478			9221		
		3	7410			8928		
	3	1	8365	8126	2,1	9502	9486	0,1
		2	7990			9469		
		3	8024			9487		
	4	1	8868	8883	1,9	8865	9116	2,4
		2	9096			9392		
		3	8685			9090		
	5	1	8536	8430	3,6	9483	9554	0,5
		2	8733			9603		
		3	8022			9576		
2	1	1	8408	8314	3,2	8404	8226	1,5
		2	8583			8125		
		3	7952			8147		
	2	1	8062	8003	1,9	8506	8278	1,9
		2	8156			8169		
		3	7790			8159		
	3	1	8228	8210	3,6	8421	8213	1,8
		2	8565			8069		
		3	7837			8150		
	4	1	8520	8320	3,3	8084	8122	0,7
		2	8507			8198		
		3	7932			8084		
	5	1	8895	8459	4,3	8514	8301	3,1
		2	8469			8446		
		3	8012			7943		
3	1	1	8068	7919	3,0	8306	7990	2,8
		2	8101			7864		
		3	7588			7801		
	2	1	8471	8317	4,1	8228	8282	1,2
		2	8638			8194		
		3	7843			8423		
	3	1	8394	8309	3,8	8338	8223	1,3
		2	8651			8248		
		3	7883			8083		
	4	1	8664	8525	2,1	8133	8026	1,5
		2	8644			7861		
		3	8266			8083		
	5	1	8647	8471	2,3	8285	8204	1,9
		2	8566			7987		
		3	8200			8341		

Tableau XXXIX : Résultats obtenus lors des essais d'homogénéité, pour la procédure B avec ajout de 5ml/kg d'huile

			Procédure B + 5ml/kg d'huile					
Réplicat	Échantillon		10 minutes de mélange			15 minutes de mélange		
	Numéro d'échantillon	Numéro répétition analyse LC-MS	Teneur retrouvée ( mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée ( mg/kg)	CV (en %)	Teneur retrouvée ( mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée ( mg/kg)	CV (en %)
1	1	1	1477	1430	2,5	1420	1414	1,2
		2	1390			1392		
		3	1423			1431		
	2	1	1493	1447	2,6	1373	1406	1,9
		2	1401			1408		
		3	1446			1437		
	3	1	1444	1457	2,6	1426	1443	1,6
		2	1508			1427		
		3	1418			1476		
	4	1	1470	1395	4,1	1458	1448	1,1
		2	1329			1459		
		3	1385			1426		
	5	1	1456	1428	1,5	1368	1415	2,4
		2	1406			1431		
		3	1422			1445		
2	1	1	1405	1394	2,2	1433	1421	0,7
		2	1424			1422		
		3	1352			1408		
	2	1	1343	1343	0,2	1371	1383	0,8
		2	1346			1378		
		3	1341			1399		
	3	1	1427	1387	2,2	1342	1331	0,7
		2	1356			1334		
		3	1377			1319		
	4	1	1429	1389	2,2	1280	1306	1,9
		2	1357			1339		
		3	1382			1300		
	5	1	1360	1345	1,7	1437	1449	0,7
		2	1362			1449		
		3	1313			1461		
3	1	1	1349	1373	1,5	1324	1345	1,2
		2	1399			1360		
		3	1372			1351		
	2	1	1377	1364	1,3	1528	1558	1,6
		2	1375			1558		
		3	1339			1589		
	3	1	1393	1397	0,8	1510	1525	1,5
		2	1412			1508		
		3	1385			1558		
	4	1	1366	1364	0,8	1538	1543	0,2
		2	1375			1544		
		3	1349			1546		
	5	1	1397	1383	0,9	1521	1515	0,9
		2	1367			1496		
		3	1385			1530		

Tableau XL : Résultats obtenus lors des essais d'homogénéité, pour la procédure B avec ajout de 10ml/kg d'huile

		Procédure B + 10ml/kg d'huile									
Réplicat	Échantillon		5 minutes de mélange			10 minutes de mélange			15 minutes de mélange		
	Numéro d'échantillon	Numéro répétition analyse LC-MS	Teneur retrouvée ( mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée ( mg/kg)	CV (en %)	Teneur retrouvée ( mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée ( mg/kg)	CV (en %)	Teneur retrouvée ( mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée ( mg/kg)	CV (en %)
1	1	1	1290	1256	2,6	1340	1383	4,0	1290	1282	0,6
		2	1211			1461			1272		
		3	1268			1347			1283		
	2	1	1524	1481	3,5	1265	1275	2,4	1250	1241	0,5
		2	1408			1316			1234		
		3	1512			1244			1240		
	3	1	1386	1364	1,3	1331	1351	1,7	1375	1366	3,7
		2	1344			1383			1422		
		3	1360			1338			1299		
	4	1	1447	1415	1,7	1397	1406	2,9	1501	1432	3,5
		2	1388			1460			1407		
		3	1410			1361			1388		
	5	1	1445	1418	1,4	1295	1320	2,0	1484	1476	0,7
		2	1397			1357			1482		
		3	1410			1309			1462		
2	1	1	1206	1192	1,9	1052	1097	2,9	1337	1285	2,8
		2	1160			1125			1261		
		3	1208			1113			1259		
	2	1	1546	1533	4,1	1056	1107	3,3	1343	1341	0,5
		2	1450			1142			1348		
		3	1603			1123			1333		
	3	1	1370	1355	2,1	1113	1167	3,3	1296	1292	0,8
		2	1314			1192			1303		
		3	1380			1197			1277		
	4	1	1407	1407	2,6	1283	1304	1,1	1436	1407	1,6
		2	1362			1317			1403		
		3	1451			1311			1382		
	5	1	1552	1592	3,7	1280	1315	3,0	1328	1324	0,2
		2	1549			1369			1323		
		3	1674			1295			1322		
3	1	1	1413	1417	4,1	1388	1420	2,0	1396	1378	1,3
		2	1348			1416			1385		
		3	1490			1456			1354		
	2	1	1374	1372	2,0	1282	1344	3,4	1489	1470	0,9
		2	1338			1391			1466		
		3	1404			1360			1456		
	3	1	1371	1378	3,9	1350	1371	1,4	1373	1355	3,0
		2	1315			1397			1393		
		3	1447			1365			1299		
	4	1	1462	1458	2,8	1438	1413	1,6	1305	1314	2,4
		2	1406			1383			1356		
		3	1506			1416			1280		
	5	1	1438	1441	2,0	1430	1391	2,1	1380	1372	0,6
		2	1408			1388			1375		
		3	1477			1357			1362		

Tableau XLI : Résultats obtenus lors des essais d'homogénéité, pour la procédure C

Réplicat	Échantillon		Procédure C								
			10 ml/kg d'huile			15 ml/kg d'huile			22,5 ml/kg d'huile		
	Numéro d'échantillon	Numéro répétition analyse LC-MS	Teneur retrouvée (mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée (mg/kg)	CV (en %)	Teneur retrouvée (mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée (mg/kg)	CV (en %)	Teneur retrouvée (mg/kg)	Teneur moyenne retrouvée (mg/kg)	CV (en %)
1	1	1	653	699	4,7	696	714	2,7	668	675	0,7
		2	719			706			676		
		3	726			741			679		
	2	1	720	731	1,9	706	701	2,0	673	703	3,2
		2	723			682			709		
		3	750			716			726		
	3	1	697	692	0,7	697	709	2,8	683	714	3,3
		2	692			694			718		
		3	686			737			740		
	4	1	742	739	1,0	702	717	2,3	711	721	1,2
		2	730			740			720		
		3	747			708			732		
	5	1	686	699	1,4	732	728	0,4	733	725	0,8
		2	700			727			723		
		3	710			726			719		
2	1	1	720	741	2,3	752	731	2,0	699	700	0,1
		2	740			725			701		
		3	762			717			699		
	2	1	651	699	4,9	777	756	3,0	666	677	1,3
		2	728			765			688		
		3	717			725			677		
	3	1	715	740	2,4	738	740	0,2	661	669	1,9
		2	758			741			658		
		3	746			742			687		
	4	1	727	732	1,2	747	747	0,5	703	715	1,3
		2	724			742			716		
		3	744			751			725		
	5	1	723	736	1,7	717	708	3,3	697	714	1,7
		2	733			731			723		
		3	753			676			721		
3	1	1	881	868	1,1	707	693	1,8	705	706	1,5
		2	856			694			693		
		3	867			677			720		
	2	1	884	907	1,9	724	738	1,5	710	733	3,1
		2	910			738			725		
		3	927			751			763		
	3	1	773	766	3,4	773	758	1,4	720	732	1,5
		2	732			754			730		
		3	794			748			747		
	4	1	744	807	5,5	814	800	1,6	698	695	0,3
		2	835			783			694		
		3	840			802			692		
	5	1	767	773	0,8	743	744	0,6	704	702	2,0
		2	782			749			683		
		3	771			739			718		

# Annexe 6 : Point de contrôle

Tableau XLII : Exemple de points de contrôle mis en place lors des essais de stabilité

étape n°	opération				
<b>au préalable</b>					
1	vérifier fonctionnement stockage froid < 0	HAL THR 57	voir photo		
2	vérifier fonctionnement stockage froid > 0	HAL BMP 284	voir enreg		
3	démarrer enregistreur de température froid > 0				
4	démarrer enregistreur de température ambiante	HAL BMP 285	voir enreg		
5	identifier les flacons		voir photo		
<b>pesée aliment et vérifications</b>					
6	peser bac aliment vide (répéta = 3)	1,725 kg	1,725 kg	1,725 kg	moyenne = 1,725 kg (1)
7	peser <b>10 kg d'aliment SKRETTING</b>	10 kg (2)			sac entamé le : 04/07/2024
8	peser bac aliment plein (pour validation) (répéta = 3)	11,6 kg	11,7 kg	11,7 kg	moyenne = 11,667 kg (3)
	validation pesée aliment ((4) = (3) - (1))				9,942 kg
	écart ((4) / (2))				-0,058 kg
	solde sac (pesée pour vérification)	10,2 kg			-0,58 %
9	verser aliment dans le mélangeur (ouverture vers le haut)	OK			
	incliner le mélangeur (deuxième cran - le plus à l'horizontale)	OK			
<b>préparation huile et FF, et vérifications</b>					
10	peser bécher huile vide	95,075 g	résultat essai n - 1	/	
11	peser [seringue + aiguille] FF avant usage	9,760 g	résultat essai n - 1	/	
12	peser [saladier + fouet] avant usage	907 g	résultat essai n - 1	/	
13	peser drogueur avant usage	314 g	résultat essai n - 1	/	
14	doser <b>150 ml d'huile</b>	OK			bouteille entamée le : 04/07/2024
15	verser huile dans saladier	OK			
16	doser <b>27,5 ml de FF</b> (en 2 prises : seringue de 20 ml)	17,0 ml	27,5 ml	flacon entamé le : 04/07/2024	
		10,5 ml			
17	verser FF dans saladier	OK			
18	mélanger au fouet (environ 1 mn)	OK			
19	remplir pistolet drogueur	OK			
<b>mélange</b>					
20	démarrer le mélangeur	OK			
21	déclencher chronomètre	HAL CHR 297			
22	déposer mélange [huile + FF] sur l'aliment (# 1 mn)	OK			
23	après <b>10 minutes</b> de mélange, arrêter le mélangeur	OK			
24	dépôts ?	oui			
	grumeaux ?	non			
	râcler l'intérieur du mélangeur	OK			
25	démarrer le mélangeur	OK			
26	déclencher chronomètre	HAL CHR 297			
27	après <b>5 minutes</b> arrêter le mélangeur	OK			
	dépôts ?	non			
	grumeaux ?	non			
<b>échantillonnage</b>					
28	procéder aux 9 prélèvements	OK			
29	peser flacons pleins : voir ci-après	OK			
30	stocker les flacons selon modalités prévues	OK			
<b>vérifications pertes huile et FF</b>					
31	peser bécher huile après usage	96,122 g			exploitation : voir tableau ci-dessous
32	peser [seringue + aiguille] après usage	9,938 g			
33	peser [saladier + fouet] après usage	913 g			
34	peser drogueur après usage	323 g			
<b>nettoyages et lectures</b>					
35	recupérer l'aliment enrobé	OK			
36	mettre Kärcher en service	OK			
37	nettoyages / vaisselle	OK			
38	air comprimé drogueur	OK			
39	recupérer données de température ambiante	HAL BMP 285	arrêté		
	recupérer données de température froid > 0	HAL BMP 284	laissé en enregistrement		
40	éditer graphes températures	NOK			
41	recupération photos	NOK			
42	classement photos	NOK			

estimation des quantités d'aliment prélevées pour confectionner les échantillons				
en flacons de 1 000 ml				
poids moyen d'un flacon de 1 000 ml vide avec bouchon (sur 4 pesées)	44,945 g	44,434 g	44,365 g	moyenne = 44,665 g
poids flacon 1-1 plein				
poids prélevé 1-1				
poids flacon 1-2 plein				
poids prélevé 1-2				
poids total prélevé en flacons de 1 000 ml (11)				
flacons de 125 ml				
poids moyen d'un flacon de 125 ml vide avec bouchon (sur 4 pesées)	17,238 g	17,284 g	17,352 g	moyenne = 17,295 g
flacon plein 2	soit un poids prélevé de	80,769 g		
flacon plein 3		79,363 g		
flacon plein 4		77,690 g		
flacon plein 5		78,900 g		
flacon plein 6		81,070 g		
flacon plein 7		80,992 g	minimum conditionné	77,690 g
flacon plein 8		78,841 g	maximum conditionné	81,070 g
flacon plein 9		79,160 g	moyenne conditionnée	79,598 g
poids total prélevé en flacons de 125 ml (12)			636,783 g	
poids total échantillonné (11 + 12)	1 942 g			
poids total préparé (aliment + huile + FF)	10,170 kg		masse volumique de l'huile mesurée à 910 g/l	masse volumique du FF mesurée à 1 230 g/l
le poids échantillonné correspond à	19,1 % du poids total préparé			

estimation des pertes en préparation							
aliment	huile de colza	antibiotique	volume total		ratio	durée mélange	
SKRETTING 0,5 mm	150 ml	FF	27,5 ml	177,5 ml		17,75 ml/kg	10 mn + 5 mn
	poids bécher avant	poids seringue avant	9,760 g	poids [saladier + fouet] avant	907 g		
	poids bécher après	poids seringue après	9,938 g	poids [saladier + fouet] après	913 g		
	perte huile	perte FF (1)	0,178 g	perte	6 g		
			0,65 %	soit perte en FF (2)	0,93 g		
				drogueur avant	314 g		
				drogueur après	323 g		
				perte	9 g		
				soit perte FF (3)	1,39 g		
perte totale FF ((1) + (2) + (3))					2,502 g		
soit en % [poids / volume]					9,1 %		

## Annexe 7 : Statistiques

Tableau XLIII : Analyse statistique des essais d'homogénéité (l'hypothèse de normalité est rejetée -en rouge- pour une p-value du test de Shapiro-Wilks  $<0,05$  ou un Q-Q plot non normal), les résultats indiqués en gras sont considérés comme statistiquement significatifs, avec rejet de l'hypothèse  $H_0$  des variances ou moyennes égales, respectivement

Procédure réalisée	Modalités comparées	Résultat du test de Shapiro-Wilks	Aspect du Q-Q plot	Test de comparaison de variance effectué	Résultat	Test de comparaison de moyennes effectué	Résultat
Procédure A	10 minutes de brassage	0,1466	Normal	Test de Levene	<b>0,0171</b>	Test de Mann-Whitney	0,5667
	15 minutes de brassage		Non normal				
Procédure B 5ml/kg d'huile	10 minutes de brassage	0,6095	Normal	Test de Fisher	<b>0,005</b>	Test de Welch	0,0776
	15 minutes de brassage		Normal				
Procédure B 10ml/kg d'huile	5 minutes de brassage	0,0958	Normal	Test de Levene	0,499	ANOVA	<b>0,028</b>
	10 minutes de brassage		Normal				
	15 minutes de brassage		Normal				
Procédure B 10 minutes de mélange	5 ml/kg d'huile	0,0026	Normal	Test de Levene	<b>0,0052</b>	Test de Mann-Whitney	<b>0,0144</b>
	10 ml/kg d'huile		Normal				
Procédure B 15 minutes de mélange	5 ml/kg d'huile	0,3445	Normal	Test de Fisher	0,723	Test de Student	<b>0,0069</b>
	10 ml/kg d'huile		Normal				
Procédure C	10 ml/kg d'huile	0,0001	Non normal	Test de Levene	<b>0,006</b>	Test de Kruskal-Wallis	<b>0,0087</b>
	15 ml/kg d'huile		Normal				
	22,5 ml/kg d'huile		Normal				

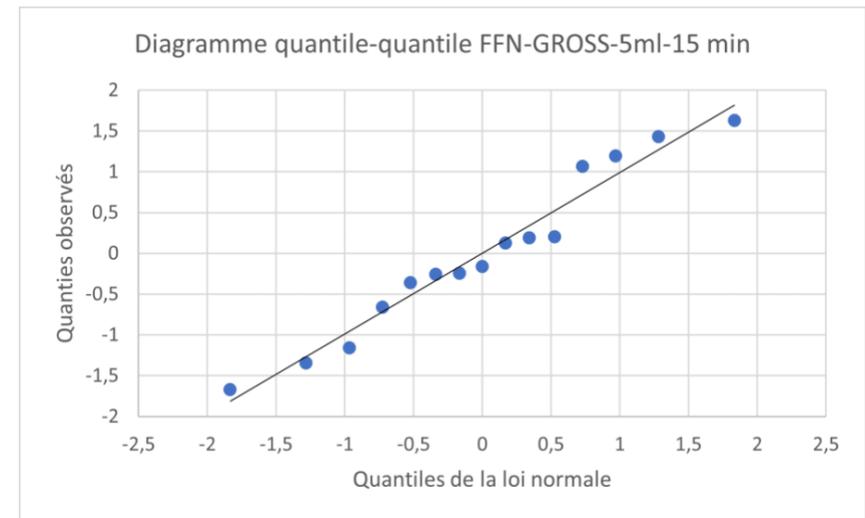
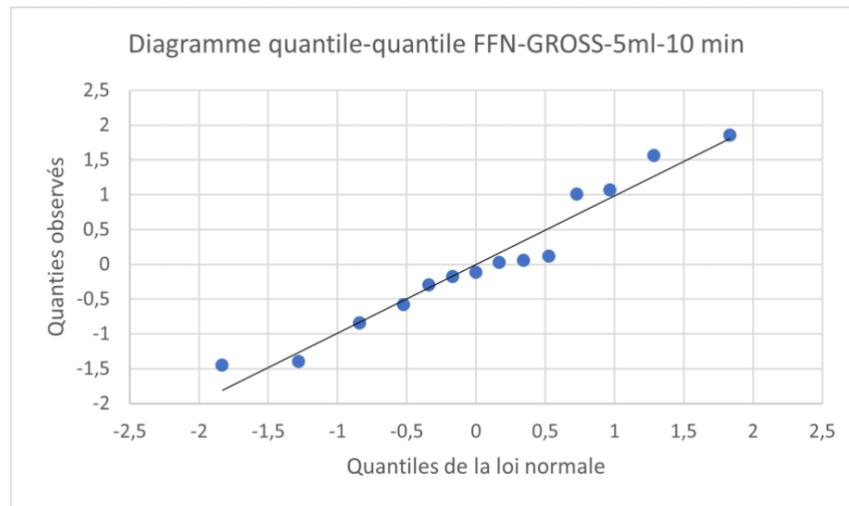
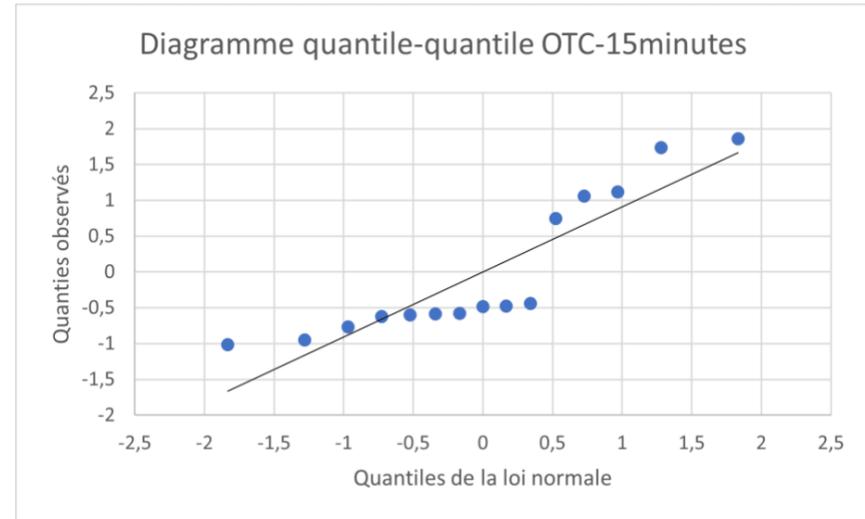
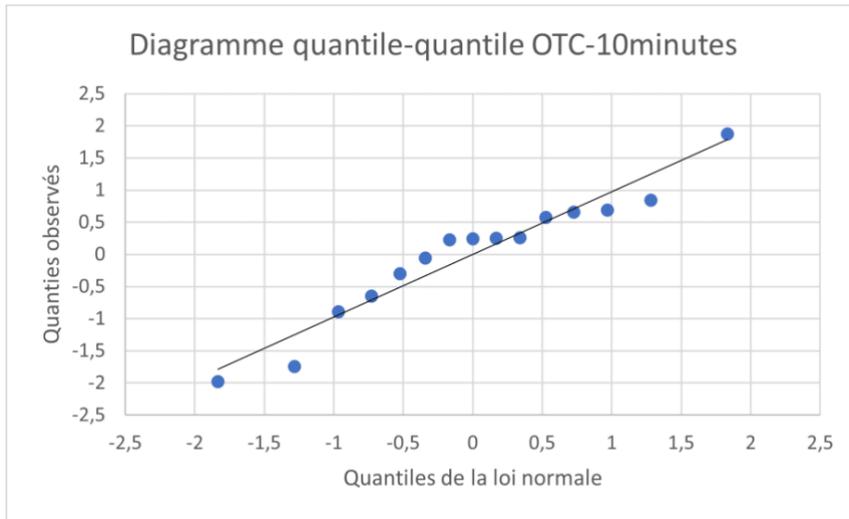


Figure 70 : Diagrammes quantile-quantile ou Q-Q plots des essais de stabilité, partie 1  
 Nomenclature du titre des graphiques : Diagramme quantile-quantile ANTIBIOTIQUE-ALIMENT-Quantité d'huile (dans le cas du FFN)-Temps de mélange

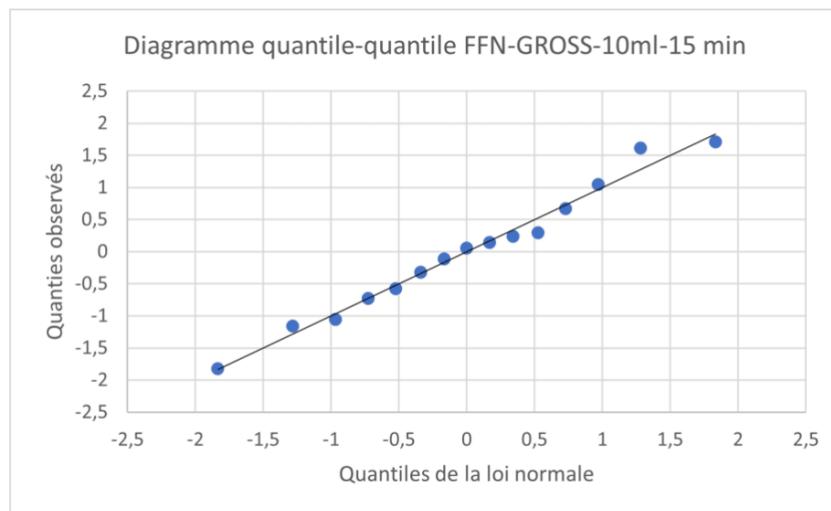
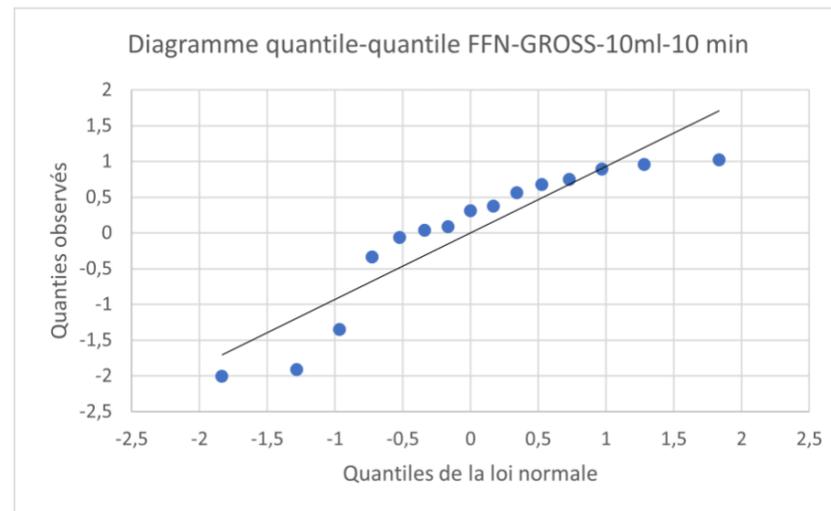
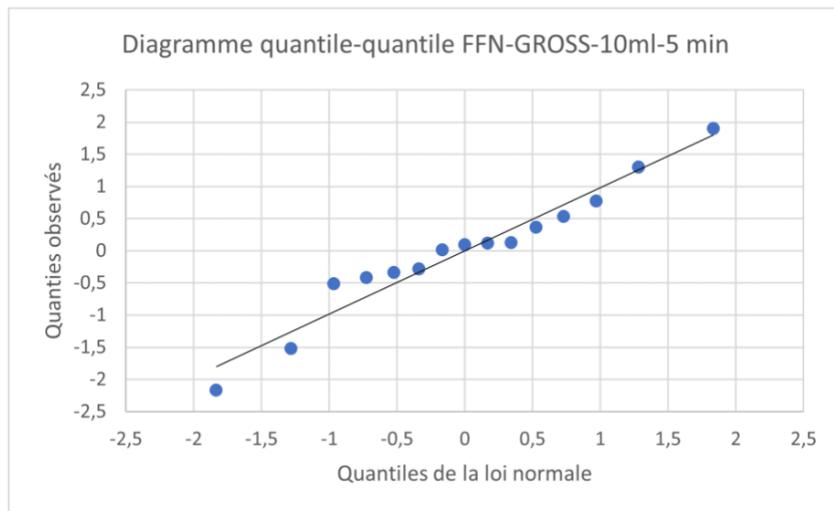


Figure 71 : Diagrammes quantile-quantile ou Q-Q plots des essais de stabilité, partie 2  
 Nomenclature du titre des graphiques : Diagramme quantile-quantile ANTIBIOTIQUE-ALIMENT-Quantité d'huile-Temps de mélange

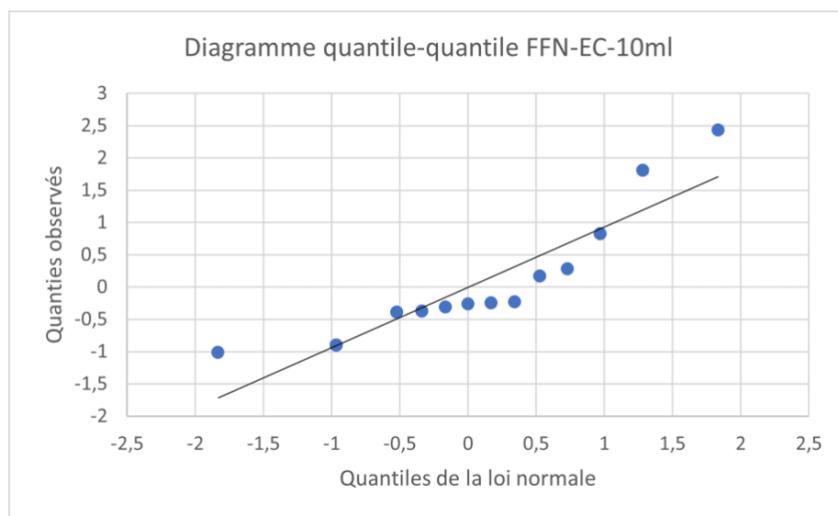
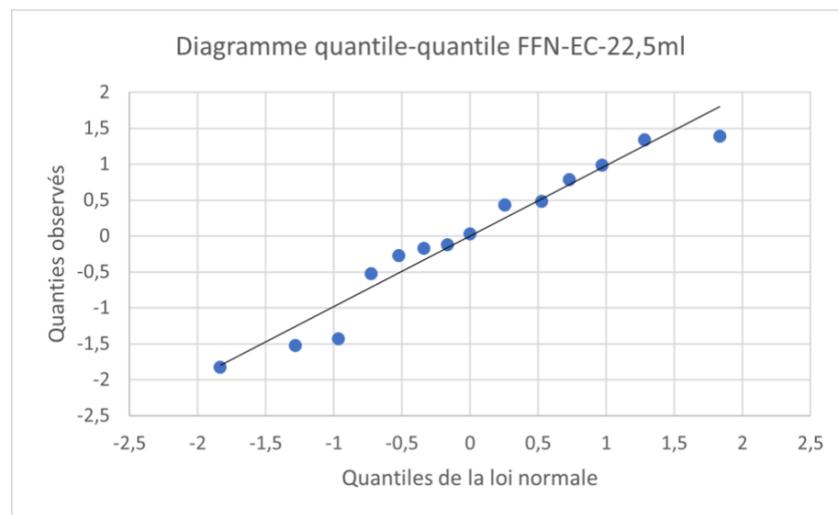
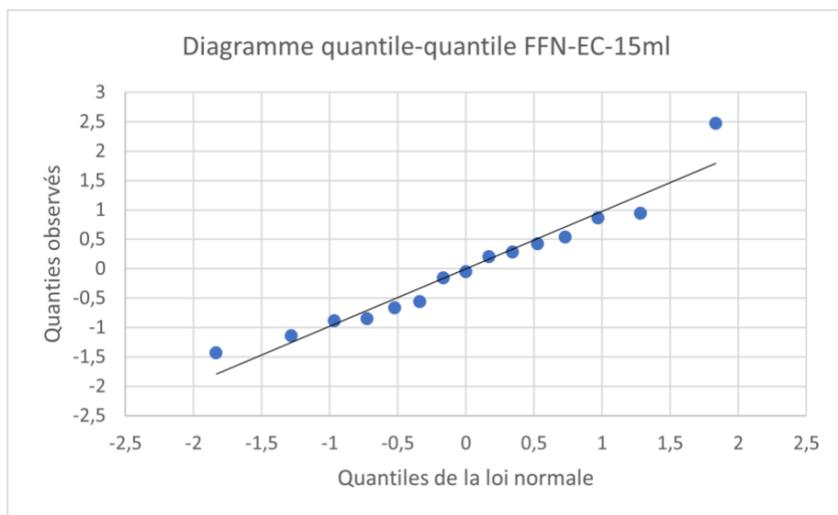


Figure 72 : Diagrammes quantile-quantile ou Q-Q plots des essais de stabilité, partie 3  
 Nomenclature du titre des graphiques : Diagramme quantile-quantile ANTIBIOTIQUE-ALIMENT-Quantité d'huile





**LUCIE MENAGER**

**DETERMINATION EXPERIMENTALE DES BONNES PRATIQUES DE FABRICATION ET DE CONSERVATION D'ALIMENTS ENROBES AVEC DES ANTIBIOTIQUES, DANS LE CADRE DES CONTRAINTES SPECIFIQUES DES FERMES TRUTTICOLES FRANÇAISES**

**Experimental determination of good practices for the manufacturing and storage of antibiotic-top-coated fish feed, within the specific constraints of French trout farms**

**Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire : Nantes, le 20/12/2024**

**RESUME**

L'enrobage des aliments avec des antibiotiques directement à la ferme est une pratique majoritaire en France dans le cadre du traitement des bactérioses des truites. Bien que cela soit autorisé par la réglementation européenne, il n'existe pas à ce jour de lignes directrices pour garantir la qualité du produit fini. Pour pallier ce manque, ce travail a d'abord caractérisé cette pratique, au moyen d'un questionnaire complété par 45 trutticulteurs de l'Ouest de la France. La suite a consisté en l'évaluation de l'efficacité des méthodes d'enrobage majoritairement employées par les éleveurs, en termes de teneur en principe actif et d'homogénéité de l'aliment enrobé. Les essais ont porté sur l'enrobage dans une mélangeuse de type bétonnière d'un aliment de type éclosion et d'un aliment de type grossissement, avec deux antibiotiques très utilisés par les trutticulteurs : l'oxytétracycline et le florfenicol, et de l'huile de colza comme agent enrobant. La quantité d'aliments, le volume d'huile, le mode d'incorporation de l'antibiotique ou le temps de mélange des matières premières ont été évalués, d'abord par une appréciation visuelle de la qualité du résultat obtenu, puis par le dosage des antibiotiques dans les aliments par chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse. Les protocoles de mélange permettant d'obtenir un résultat optimal sont alors identifiés, en fonction de l'aliment et de l'antibiotique concerné. La suite de ce travail doit porter sur la rédaction de fiches de bonnes pratiques et de vidéos pédagogiques à destination des vétérinaires prescripteurs, afin de transposer ces résultats satisfaisants dans le cadre des fermes trutticoles françaises.

**MOTS CLES**

TRUITE  
ANTIBACTERIEN  
ENROBAGE  
ALIMENT MEDICAMENTEUX  
EXPLOITATION AGRICOLE  
EXPERIMENTATION  
BONNE PRATIQUE DE FABRICATION  
CONSERVATION DES ALIMENTS

**DATE DE SOUTENANCE : 20 décembre 2024**