



Diversité et plasticité des petits plasmides d'*Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*

Mémoire

Sabrina Attéré

Maîtrise en microbiologie
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

©Sabrina Attéré, 2018

**Diversité et plasticité des petits plasmides
d'*Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida***

Mémoire

Sabrina Attéré

Sous la direction de :

Steve Charette, directeur de recherche
Michel Frenette, codirecteur de recherche

RÉSUMÉ

Les plasmides confèrent aux bactéries qui les possèdent diverses fonctions pouvant accroître leurs chances de survie dans des environnements défavorables. C'est le cas d'*Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, bactérie à l'origine de la furonculose chez les salmonidés. Elle possède trois petits plasmides (pAsa1, pAsa2 et pAsa3) qui sont cryptiques c'est-à-dire sans fonction connue. Pour compléter son plasmidome standard, s'ajoutent aux précédents, deux autres plasmides fréquemment retrouvés, pAsa11 et pAsa5, porteurs de gènes codant pour le système de sécrétion de type III, important facteur de virulence pour ce microorganisme. Enfin, ce ne sont pas moins de 17 plasmides porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques et quatre supportant des facteurs de virulence qui ont été mis en évidence au cours des 30 dernières années pour cette bactérie. La propagation des gènes de résistance aux antibiotiques pose un problème dans le contexte vétérinaire puisqu'elle constitue, pour le moment, un obstacle au traitement efficace et durable contre la bactérie et conséquemment contre la furonculose. L'étude des petits plasmides d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* s'inscrit dans cette démarche d'une meilleure connaissance de leur plasticité et de leur diversité. Ce projet a donc permis de mettre en évidence la présence de trois nouveaux petits plasmides : pAsa10, pAsaXI et pAsaXII. pAsa10 est la preuve supplémentaire que la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques se poursuit, notamment par l'entremise du transposon Tn1721. L'analyse des séquences de pAsaXI et pAsaXII a permis de mettre en évidence des plasmides porteurs de nouvelles fonctionnalités pour *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, et des dérivés respectifs des plasmides cryptiques pAsa3 et pAsa2, très présents dans la bactérie, mais sans utilité apparente. Enfin, la haute capacité de transfert de ce microorganisme est encore démontrée, car ces plasmides sont identiques à d'autres retrouvés dans *Shewanella baltica* et *Aeromonas bivalvium*, respectivement.

ABSTRACT

Plasmids confer to the bacteria that possess them various functions that increase their chances of survival in adverse environments. This is the case with *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, a bacterium which causes furunculosis in salmonids. It has three small plasmids (pAsa1, pAsa2 and pAsa3) that are cryptic that is to say without a known function. To supplement its standard plasmidome, two other frequently found plasmids, pAsa11 and pAsa5, which are carriers of genes coding for the type III secretion system, an important virulence factor of this microorganism. Finally, there are no less than 17 plasmids with genes coding for antibiotic resistance and 4 bearing virulence factors that have been demonstrated over the last 30 years for this bacterium. The spread of antibiotic resistance poses a problem in the veterinary context, since it is currently an obstacle to effective and sustainable treatment against the bacterium and consequently to furunculosis. The study of the small plasmids of *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* is part of this process of a better knowledge of their plasticity and diversity. This project highlighted the presence of three new small plasmids: pAsa10, pAsaXI and pAsaXII. pAsa10 is a new evidence that propagation of antibiotic resistance genes continues, notably through the transposon Tn1721. The analysis of pAsaXI and pAsaXII sequences allowed to identify plasmids carrying new functionalities for *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, and derivatives of cryptic plasmids pAsa3 and pAsa2, respectively, very present in the bacterium but without apparent utility. Finally, the high transfer capacity of this microorganism is further demonstrated because these plasmids are identical to others found in *Shewanella baltica* and *Aeromonas bivalvium*, respectively.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
REMERCIEMENTS	XI
AVANT-PROPOS	XII

CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 Les plasmides	1
1.1.1. Généralités	1
1.1.2. La répllication des plasmides	2
1.1.2.1 Les réplicons de type ColE1 et ColE2.....	2
1.1.2.2 Incompatibilité des réplicons de type ColE1 et ColE2.....	3
1.1.3. Les plasmides mobilisables.....	3
1.1.4. Les systèmes toxine-antitoxine	4
1.1.5. Autres éléments d'ADN mobiles : les IS et les transposons.....	7
1.2 Aquaculture, pisciculture et salmoniculture	9
1.2.1. Définition et quelques chiffres.....	9
1.2.1. Pisciculture mondiale et salmoniculture au Canada et au Québec.....	10
1.3 La furonculose.....	13
1.3.1. Description de la maladie et diagnostic au Québec	13
1.3.2. Traitements possibles	15
1.3.3. <i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i> , agent étiologique de la furonculose.....	16
1.4 Le plasmidome d' <i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i>	16
1.4.1. Les grands plasmides.....	17
1.4.2. Les petits plasmides.....	18
1.4.2.1 Les plasmides cryptiques.....	19
1.4.2.2 Les plasmides portant des facteurs de virulence	22
1.4.2.3 Les plasmides supports de la résistance aux antibiotiques	23
1.5 Problématique et objectifs spécifiques	25

CHAPITRE 2	27
LE RÔLE DES PETITS PLASMIDES CRYPTIQUES EN TANT QUE VECTEURS MODELABLES POUR L'INNOVATION GÉNÉTIQUE CHEZ <i>AEROMONAS SALMONICIDA</i> SSP. <i>SALMONICIDA</i> 27	
2.1. Résumé	27
THE ROLE FOR THE SMALL CRYPTIC PLASMIDS AS MOLDABLE VECTORS FOR GENETIC INNOVATION IN <i>AEROMONAS SALMONICIDA</i> SUBSP. <i>SALMONICIDA</i>	28
2.2. Abstract.....	29

2.3.	Introduction	29
2.4.	Material and methods	31
2.4.1.	<i>Growth of bacterial strains</i>	31
2.4.2.	<i>Plasmid profile</i>	32
2.4.3.	<i>PCR for small plasmids and antibiotic resistance</i>	32
2.4.4.	<i>Determination of the minimum inhibitory concentration for formaldehyde</i>	32
2.4.5.	<i>Plasmid sequencing and bioinformatics analyses</i>	33
2.5.	Results and discussion	33
2.5.1.	<i>Plasmid Repertoire</i>	33
2.5.2.	<i>pAsa10</i>	35
2.5.3.	<i>pAsaXI</i>	38
2.5.4.	<i>pAsaXII</i>	41
2.6.	Cryptic Plasmids: a Way for Genetic Innovation in <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>?	43
2.7.	Conclusion	46
2.8.	Author Contributions	47
2.9.	Funding	47
2.10.	Acknowledgments	47
2.11.	Supplementary material	48
	CHAPITRE 3	51
	DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	51
3.1.	Les plasmides cryptiques, vecteurs modelables pour l'innovation génétique chez <i>A. salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i> ?	52
3.1.1.	<i>De nouveaux dérivés des plasmides cryptiques</i>	52
3.1.2.	<i>Perspectives</i>	54
3.2.	Mutations dans les petits plasmides standards	55
3.2.1.	<i>Polymorphismes récurrents</i>	55
3.2.2.	<i>Perspectives</i>	58
3.3.	La propagation de Tn1721 au Québec à surveiller ?	58
3.3.1.	<i>Tn1721, un transposon en expansion ?</i>	58
3.3.2.	<i>Perspectives</i>	59
3.4.	Capacité de transfert d'<i>A. salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i>	60
	BIBLIOGRAPHIE	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Production mondiale des dix groupes de poissons les plus élevés en pisciculture en 2014.....	11
Tableau II : Liste des antibiotiques employés au Québec.	16
Tableau III : Grands plasmides d' <i>A. salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i> classés suivant leur fonction... 18	
Tableau IV : Petits plasmides d' <i>A. salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i> classés suivant leur fonction.....	19
Table S1: Characterization of 22 Canadian isolates of <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> for their small plasmids and antibiotic resistance genes	48
Table S2: Assembly information about the three plasmids.	49
Table S3: Sequence differences (SNPs and InDels) found in the small plasmids of the three strains further analyzed in this study.	49
Tableau V : Polymorphismes récurrents dans les petits plasmides standards de différentes souches.	56

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Système TA de type II : organisation de l'opéron et son fonctionnement.	6
Figure 2 : Organisation d'une IS.	7
Figure 3 : Transposons composites et non composites.	8
Figure 4 : Productions halieutique et aquacole mondiales de 1950 à 2014.	10
Figure 5 : Production aquacole mondiale en 2014.	11
Figure 6 : Production salmonicole au Canada de 2000 à 2015.	12
Figure 7 : Exemple de furoncle sur un poisson infecté.	13
Figure 8 : Maladies diagnostiquées chez les poissons par la FMV entre 2011 et 2016.	14
Figure 9 : Les trois plasmides cryptiques d' <i>A. salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i>	21
Figure 10 : Comparaison de pAsal1 et de ses variants pAsal1B, pAsal1C et pAsal1D.	23
Figure 11 : Cartes de pAsa2 et de pAsa7.	24
Figure 12 : Atypical small plasmid profiles of strains HER1084, 2004-208.	34
Figure 13 : Map of the pAsa10 plasmid found in strain SHY15-2743.	35
Figure 14 : Formation of transposon Tn1721 and atypical orientation of its IRs.	37
Figure 15 : Comparison of the known and sequenced Tn1721 in plasmids.	38
Figure 16 : Map of the pAsaXI plasmid.	40
Figure 17 : Map of pAsaXII plasmid.	43
Figure 18 : Sequence comparisons of some ColE1- and ColE2-plasmids of <i>A. salmonicida</i>	46
Figure S1 : Predicted structures of the duplication of 43 bp in the modified-pAsa2 of strain HER1084.	50

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
DR(s)	<i>Direct repeat sequences</i> (Séquences directes répétées)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)
FMV	Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal
InDels	<i>Insertions and Deletions</i> (Insertions et délétions)
IR(s)	<i>Inverted repeats sequences</i> (Séquences inversées répétées)
IS(s)	<i>Insertion sequence</i> (Séquence d'insertion)
oriT	<i>Origin of transfer</i> (Origine de transfert)
oriV	<i>Origin of vegetative replication</i> (Origine de réplication végétative)
SNPs	<i>Single-Nucleotide Polymorphisms</i> Polymorphismes d'un seul nucléotide
SSTT	Système de Sécrétion de Type III (Type Three Secretion system, TTSS)
Système TA	Système toxine-antitoxine
Tn	Transposon

*À mon mari, passionné par la science, qui a
toute mon admiration et mon amour;
à Marie, indéfectible soutien jusqu'à son
dernier souffle l'année dernière*

REMERCIEMENTS

Pour leurs conseils avisés tout au long de ce projet ainsi que pour le temps précieux accordé, je tiens à remercier chacun des membres de mon comité aviseur, à savoir les professeurs Steve Labrie, Sylvain Moineau, Michel Frenette et Steve Charette.

Pour leur soutien financier tout au long de ce projet, je souhaiterais remercier les organismes subventionnaires : le CRSNG pour l'obtention de ma bourse de maîtrise et le RAQ pour le soutien apporté pour le congrès FEMS 2017.

À tous les membres du laboratoire Charette, je tiens à exprimer ma reconnaissance pour leur soutien, idées et conseils, tout au long de cette maîtrise. Cela fut vraiment très apprécié. Un merci tout particulier à Valérie pour sa grande disponibilité, son efficacité, son dynamisme et pour les nombreuses discussions fertiles.

À Steve Charette, mon directeur de recherche, je veux exprimer ma profonde gratitude pour son accueil au sein de son laboratoire. Merci pour ta disponibilité et ton leadership qui ont fait de ces deux dernières années une occasion de pouvoir explorer les multiples facettes de la recherche : parfois rugueuses, d'autres fois plus lisses mais toujours fructueuses ! Merci pour cette expérience de vie de laquelle je ressors enrichie. Merci d'avoir été ce facilitateur dans mon intégration à la vie québécoise particulièrement.

À ma famille et mes amis qui ont participé, de près ou de loin, à ce projet par leur soutien et leurs marques d'affection malgré la distance et les années : un gros merci !

À Antony, mon étoile dans la nuit, mon roc dans la tempête. Sans ton soutien, ta patience et par-dessus tout ton amour, l'aboutissement de ce projet aurait été tout autre. Les mots me semblent bien faibles pour te dire toute ma reconnaissance pour les moments où tu as dû me porter alors que je n'en avais plus le courage et où tu as dû éclairer ma lanterne. Simplement merci, d'être cet homme passionné, généreux et aimant qui cherche chaque jour à m'amener à être meilleure. *Mwen enmen, Doudou en mwen.*

AVANT-PROPOS

L'article « The role for the small cryptic plasmids as moldable vectors for genetic innovation in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* » constitue le chapitre 2 du présent mémoire. Il a été publié dans le journal *Frontiers in Genetics* (#307850) le 15 décembre 2017 et fait partie du *topic research* intitulé *Horizontal Gene Transfer and Genetic Diversity in Bacteria*.

Ce chapitre traite du potentiel rôle des plasmides cryptiques en tant que vecteurs d'évolution utilisés par la bactérie *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* pour faire face aux divers environnements auxquels elle peut être confrontée. Les manipulations ayant permis d'écrire cet article ont été réalisées, en partie, par Mégane Paccaud que j'ai supervisée lors de son stage et par moi-même. J'ai réalisé l'analyse des plasmides conjointement avec Antony T. Vincent. Enfin, j'ai réalisé la rédaction de l'ensemble de cet article qui a été complété par Antony T. Vincent, Michel Frenette et Steve J. Charette ; l'ensemble de la supervision de ce projet ayant été assuré par ce dernier.

Cet article, pour lequel je suis première auteure, a donc été co-écrit avec Antony T. Vincent, Mégane Paccaud, Michel Frenette et Steve J. Charette. Tous, excepté Michel Frenette rattaché au Groupe de Recherche en Écologie Buccale (GREB), sont affiliés à l'Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS) de l'Université Laval.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 LES PLASMIDES

1.1.1. Généralités

Depuis leur découverte au milieu du XX^e siècle, les plasmides ont été désignés de façons différentes parmi lesquelles pangènes, bioplastes, plasmagènes, plastogènes, chondriogènes, cytogènes ou encore provirus ; jusqu'à ce qu'en 1952, Joshua Lederberg propose qu'ils soient nommés « plasmides » (Lederberg, 1952). Les plasmides sont des molécules d'ADN extra-chromosomiques, autonomes et généralement circulaires. Ils sont retrouvés dans les bactéries, archaeobactéries, mais également chez certains eucaryotes comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Gubbins *et al.*, 1977). Il faut attendre, d'un côté la découverte des enzymes de restriction, et de l'autre, une collaboration fructueuse entre plusieurs chercheurs, en 1972, pour que l'utilisation des plasmides comme outils de biologie moléculaire voie le jour. En effet, ces chercheurs ont transformé la bactérie *Escherichia coli* avec deux plasmides, pSC101 et pSC102, porteurs de gènes de résistance à la tétracycline et à la kanamycine respectivement, et ont sélectionné les transformants possédant simultanément les deux résistances (Cohen *et al.*, 1973). pSC101 a été le premier plasmide d'intérêt biotechnologique créé (Cohen and Chang, 1973) et, à partir de cette expérience, l'emploi des plasmides comme outils de biologie moléculaire bouleversa la manière de faire de la recherche. D'ailleurs, le système CRISPR-Cas9, qui est un des ciseaux moléculaires qui permet de cibler avec le plus de facilité des régions d'intérêt n'importe où dans le génome étudié, est également porté par des plasmides dans sa version employée en recherche.

Dans les bactéries, un des rôles majeurs des plasmides est de supporter des fonctions accessoires, généralement non-essentiels à leur survie, mais qui leur confèrent la capacité de croître dans des conditions environnementales défavorables. Historiquement, ils étaient classés suivant les phénotypes associés à leur présence. Ainsi, il était possible de répertorier : les plasmides supportant des résistances aux antibiotiques, aux métaux lourds (plasmide R ou facteur R), ceux supportant des facteurs de virulence, des bactériocines (par

exemple, ColE1, ColE2), des gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme ou encore les plasmides intervenant dans la conjugaison (plasmide F ou facteur F). Il existe cependant d'autres classifications, dont celles qui sont en fonction de leurs caractéristiques intrinsèques : nombre de copies dans la cellule, type de réplication, mode de transfert, taille ou encore groupe d'incompatibilité. Dans le présent mémoire, seules quelques-unes des particularités des plasmides seront abordées.

1.1.2. La réplication des plasmides

La réplication peut se faire suivant trois mécanismes chez les plasmides circulaires : par cercle roulant, par déplacement de brin ou encore par réplication thêta (θ) (del Solar *et al.*, 1998). Cette dernière tire son nom de la ressemblance existant entre les intermédiaires de réplication et la lettre grecque (Lilly and Camps, 2015). Elle peut être uni- ou bidirectionnelle, à partir de l'origine de réplication végétative (*oriV*). Tout comme pour le chromosome, la réplication se déroule en trois étapes (l'initiation, l'élongation et la terminaison) qui font intervenir des régions spécifiques des plasmides ainsi que la machinerie cellulaire de l'hôte. La région comprenant l'origine de réplication assure plusieurs fonctions importantes pour les plasmides. Elle comprend les gènes et ARN déterminants, entre autres, pour le nombre de copies de plasmides par cellule, pour le contrôle de la réplication ou encore pour les groupes d'incompatibilité.

1.1.2.1 Les réplicons de type ColE1 et ColE2

Les plasmides ColE1 et ColE2 (pColE1 et pColE2) tirent leur nom de la colicine qui est une bactériocine découverte pour la première fois en 1925 chez *Escherichia coli* (Gratia, 1925). Parmi les éléments qui les distinguent, il est possible de noter leurs modes de réplication avec la régulation de cette dernière. Également retrouvés dans les bactéries d'autres espèces, les réplicons de type ColE1 et ColE2 présentent des spécificités identiques ou similaires à ces plasmides au niveau de la région comprenant l'origine de réplication. Les réplicons de type ColE1 sont particulièrement employés en biologie moléculaire à cause de leur haut nombre de copies (Camps, 2010; del Solar *et al.*, 1998).

Le plasmide pColE1 et les réplicons de la même famille sont caractérisés par une réplication de type θ qui démarre notamment par la synthèse d'un ARN II, amorce du brin avancé (del Solar *et al.*, 1998; Takechi *et al.*, 1995). L'inhibition de la réplication nécessite

la synthèse d'un ARN complémentaire (ARN I) qui s'hybridera à l'ARN II. Ce *kissing complex* sera ensuite accessoirement stabilisé par la protéine Rop et le duplex ainsi formé empêchera le commencement de la réplication (Tomizawa *et al.*, 1981). En biologie moléculaire, ce mécanisme de régulation fait des réplicons ColE1 un atout, puisque leur nombre de copies par cellule, déjà élevé, peut être encore augmenté par modification de ce mécanisme (Camps, 2010).

En ce qui concerne les réplicons de type ColE2, l'initiation de la réplication est différente puisqu'elle dépend d'une protéine, Rep, qui est une primase indispensable afin de pouvoir la démarrer (del Solar *et al.*, 1998). Tout comme les réplicons de type ColE1, l'inhibition de la réplication est assurée par un ARN complémentaire (ARN I). Plus précisément, celui-ci agit sur la synthèse de la protéine Rep en allant se lier à l'ARN messager du gène *rep* transcrit (Takechi *et al.*, 1994). De plus, tout comme les plasmides de type ColE1, ils sont en haut nombre de copies par cellule.

1.1.2.2 *Incompatibilité des réplicons de type ColE1 et ColE2*

Certains plasmides peuvent s'exclure mutuellement dans la même bactérie et sont alors classés dans le même groupe d'incompatibilité. Ainsi, l'incompatibilité traduit le fait que des plasmides partageant, entre autres, un même système de réplication ne puisse demeurer de façon stable ensemble dans une même cellule (Carattoli, 2009). Toutefois, plusieurs études ont montré qu'une incompatibilité pouvait être surmontée en présence d'une pression de sélection ou encore lorsque des mutations surviennent dans des régions particulières de l'un des plasmides. C'est le cas des réplicons de type ColE1 qui peuvent coexister lorsque ces mutations surviennent, par exemple, dans la région où se trouve les ARN régulateurs (ARN I et II) (Camps, 2010). En ce qui concerne l'incompatibilité de réplicons de type ColE2 entre eux, la littérature est très peu abondante à ce sujet et il est par conséquent difficile de savoir quels sont les mécanismes qui, à l'image des pColE1, pourraient faciliter une telle cohabitation.

1.1.3. **Les plasmides mobilisables**

Il arrive que les plasmides puissent être échangés entre des espèces de bactéries différentes et qu'ils contribuent ainsi à l'évolution desdites bactéries par transferts horizontaux (Ochman *et al.*, 2000). La conjugaison est un des mécanismes par lequel ces échanges

peuvent être réalisés. Les modes de transmission des plasmides sont également une façon de les distinguer. Les plasmides auto-transmissibles, possédant les gènes nécessaires à leur transfert (gènes *tra*), se différencient de ceux qui ont besoin d'eux pour pouvoir être transmis. Ces derniers sont alors qualifiés de plasmides mobilisables. Ils ont généralement des tailles inférieures à 30 kb (Smillie *et al.*, 2010) et possèdent une région mobilisable (*mob*) comprenant l'origine de transfert (*oriT*) ainsi que les gènes codant pour les composants du relaxosome (Francia *et al.*, 2004). Plusieurs organisations de ces gènes sont possibles et, puisque la relaxase (MobA) est déterminante pour le transfert de plasmides, elle a été choisie afin de déterminer une classification des plasmides suivant cette caractéristique (Francia *et al.*, 2004). Par conséquent, quatre superfamilles de plasmides mobilisables ont été délimitées suivant, en premier lieu, la séquence primaire en acides aminés de la relaxase : MOB_Q, ColE1 (MOB_{HEN}, MOB_P), pMV158, CloDF13 (Francia *et al.*, 2004).

1.1.4. Les systèmes toxine-antitoxine

Historiquement trouvés chez les plasmides, les systèmes toxine-antitoxine (systèmes TA) jouent, entre autres, un rôle important dans le maintien de ces derniers dans les cellules hôtes. Ils peuvent être également présents sur le chromosome des bactéries et des archaebactéries. Ils sont composés de deux molécules : la toxine, de nature protéique, généralement stable, et l'antitoxine, plutôt labile, avec pour rôle de contrôler l'activité de la toxine, qui peut être soit aussi une protéine, soit un petit ARN non codant, et qui a pour rôle de contrôler l'activité de la toxine (Schuster and Bertram, 2013). Ainsi, ce système « d'addiction/dépendance » fonctionne de telle sorte que les bactéries qui n'ont pas intégré le plasmide porteur du système TA sont détruites par la toxine alors que pour les autres, l'antitoxine neutralise l'action de la toxine, assurant ainsi le maintien du plasmide au cours des générations suivantes par transfert vertical.

À ce jour, cinq types de systèmes TA ont été mis en évidence, différenciés par l'architecture des gènes constituant le système ainsi que par le mode d'action de l'antitoxine sur l'activité de la toxine (Schuster and Bertram, 2013). Le système de type II fait intervenir une toxine et une antitoxine de nature protéique et semble être le plus fréquemment trouvé chez les bactéries (Hayes and Van Melderen, 2011). Les gènes sont

organisés sous la forme d'un opéron de telle sorte que, généralement, le gène codant pour l'antitoxine précède celui de la toxine. Toutefois, il est possible que cette organisation puisse être inversée (toxine avant l'antitoxine) ou, plus rarement, que l'opéron soit composé de trois gènes au lieu de deux, le troisième gène codant pour un régulateur transcriptionnel (Haliez *et al.*, 2010; Schuster and Bertram, 2013).

Dans les systèmes TA de type II, la toxine et l'antitoxine sont produites de façon constitutive. Dans une bactérie où le plasmide est présent, la formation du complexe TA neutralise l'effet de la toxine. En revanche, lorsque le plasmide n'est pas transmis, l'antitoxine est dégradée par une protéase et la toxine, plus stable, peut détruire la cellule hôte (Figure 1). L'autre rôle de l'antitoxine est également de pouvoir réguler le niveau de transcription de l'opéron du système TA. Parmi les exemples de système TA de ce type, les toxines des familles RelE et ParE semblent être les plus largement répandues, notamment dans les γ -protéobactéries (Fiebig *et al.*, 2010; Hayes and Van Melderren, 2011). RelE est l'antitoxine du système *relEB* (Gottfredsen and Gerdes, 1998) tandis que ParE est celle du système *parED* (Oberer *et al.*, 2002). Bien qu'ayant des séquences primaires similaires, les deux toxines n'ont pas la même cible cellulaire : RelE inhibe l'ADN gyrase et donc la réplication, alors que ParE inhibe la traduction en coupant l'ARNm localisé sur le ribosome (Fiebig *et al.*, 2010).

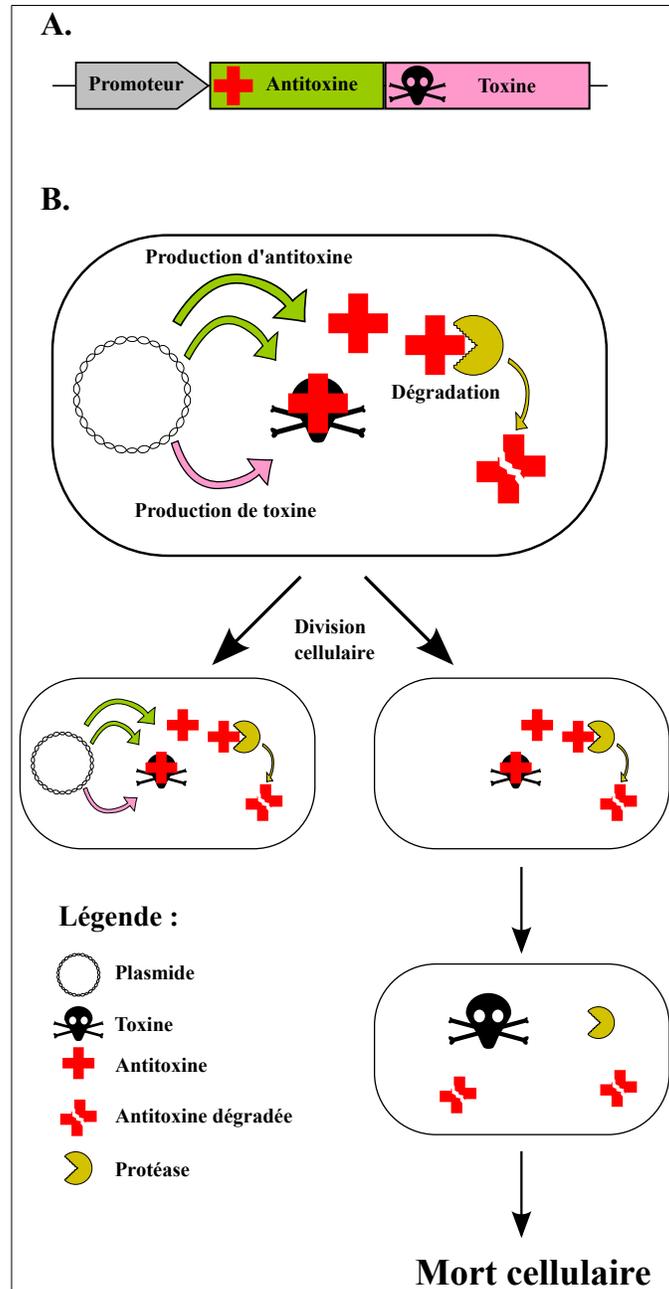


Figure 1 : Système TA de type II : organisation de l'opéron et son fonctionnement.

A. Organisation en opéron bicistronique d'un système TA de type II. **B.** Fonctionnement du système de type II dans une cellule en cours de division cellulaire. Figure adaptée de Yannick Bailly, domaine public, Wikimedia Commons.

1.1.5. Autres éléments d'ADN mobiles : les IS et les transposons

Avec les plasmides, d'autres éléments d'ADN mobiles tels que les séquences d'insertion (IS) et les transposons (Tn), jouent des rôles importants dans la plasticité des génomes bactériens (Mahillon and Chandler, 1998). Ces éléments d'ADN mobiles ont la capacité de se déplacer, de façon autonome, dans un même génome ou dans un autre. Hormis cette capacité à transposer, les IS sont de petits fragments d'ADN, compris entre 700 et plus de 3000 pb environ (Siguier *et al.*, 2014), qui ne supportent aucune autre fonction. Ainsi, elles sont composées d'un ou deux cadres de lecture dans le(s)quel(s) est/sont encodé(s) une transposase (Mahillon and Chandler, 1998). Des séquences inversées répétées (IR) se trouvent de part et d'autre de ces cadres de lecture. Enfin, la transposition occasionne dans l'ADN cible la formation de séquences directes répétées (DR) de chaque côté de l'IS (Figure 2) (Mahillon and Chandler, 1998).

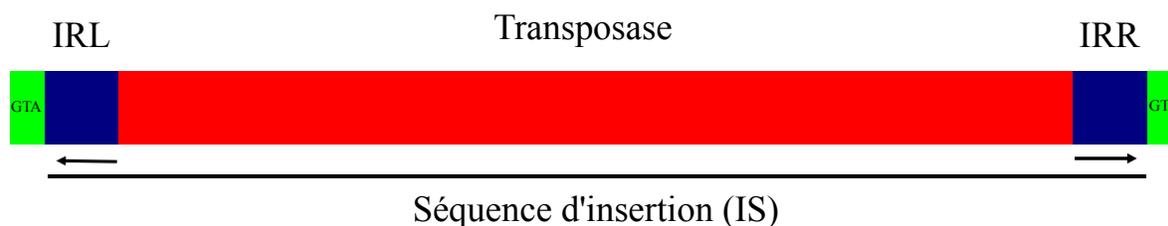


Figure 2 : Organisation d'une IS.

En rouge, le gène codant pour la transposase avec, de part et d'autre, les séquences inversées répétées gauche (IRL) et droite (IRR) (en bleu). Les flèches indiquent l'orientation des IR. Les séquences répétées directes (en vert) entourent l'IS.

Les IS sont classées en différentes familles et des outils bio-informatiques tels que ISfinder permettent de les mettre en évidence dans les génomes (Siguier *et al.*, 2006). Lorsqu'elles s'insèrent dans les gènes, certaines IS peuvent, suivant leur orientation, modifier l'expression de gènes adjacents (Mahillon and Chandler, 1998). De plus, elles peuvent jouer un rôle prépondérant dans les réarrangements génomiques (Siguier *et al.*, 2014).

Les IS peuvent aussi faire partie intégrante d'éléments d'ADN mobiles plus grands. Ainsi, elles délimitent le cadre des transposons composites qui sont constitués de deux IS identiques qui encadrent, généralement, un ou plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques (Tansirichaiya *et al.*, 2016). Des fonctionnalités accessoires telles que des résistances aux métaux lourds ou encore la capacité à utiliser une source de carbone particulière, sont également propagées par les transposons. Il existe une autre catégorie de transposons : les transposons non composites. Ces derniers présentent la même structure que les composites, à l'exception que les IS sont absentes. Ils sont donc généralement composés des gènes de résistance aux antibiotiques et des IR. Comme pour les précédents, la transposition occasionne la formation de DR.

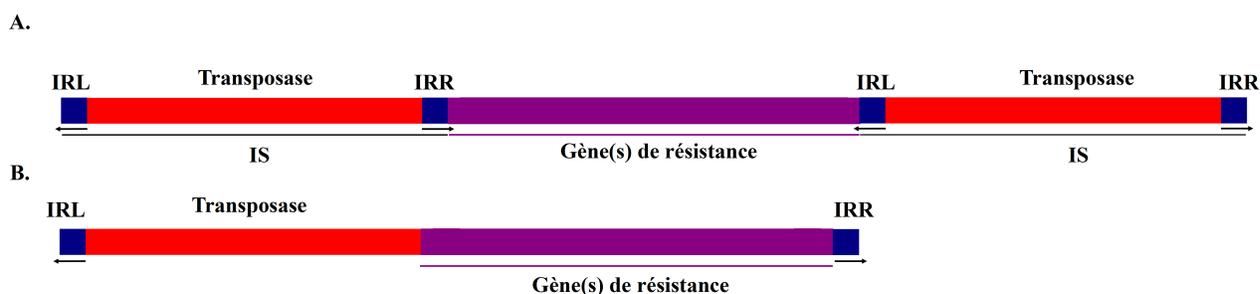


Figure 3 : Transposons composites et non composites.

A. Représentation schématique d'un transposon composite.
B. Représentation schématique d'un transposon non composite. Dans un cas comme dans l'autre, les DR (non représentées) se trouvent de part et d'autre des éléments mobiles. En rouge, le gène codant pour la transposase avec, de chaque côté, les séquences inversées répétées gauche (IRL) et droite (IRR) (en bleu). Les flèches indiquent l'orientation des IS. Les gènes de résistance sont en violet.

Les plasmides contribuent grandement à la plasticité des génomes bactériens. Ils ont, avec les autres éléments d'ADN mobiles, un rôle majeur dans la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques. À ce titre, et pour l'étude des plasmides en général, le plasmidome de la bactérie *Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida* constitue un modèle intéressant à investiguer.

1.2 AQUACULTURE, PISCICULTURE ET SALMONICULTURE

Manger, boire, survivre, se reproduire, se reposer et avoir mal. Tels sont les besoins physiologiques propres à l'individu et présentés comme étant à la base de tous les autres par le psychologue Abraham Maslow dans sa théorie des besoins de l'être humain (Maslow, 1943). D'après le dernier rapport de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), ces besoins fondamentaux devront être comblés pour environ 9 milliards de personnes d'ici 2050 (FAO, 2016). Ainsi, toujours selon ce rapport, nourrir l'ensemble de la planète constituera, dans les années à venir, un défi de taille dont l'une des solutions passe par l'aquaculture.

1.2.1. Définition et quelques chiffres

Pratiquée depuis l'Antiquité, l'aquaculture regroupe l'ensemble des activités liées à la production animale ou végétale en milieu aquatique. Elle peut se dérouler sur différentes surfaces aquatiques existantes (les étangs, les rivières ou la mer) ou artificielles. Elle permet d'obtenir, notamment pour les consommations humaine ou animale, les animaux et végétaux suivants : les poissons (pisciculture), les algues (alguoculture), les coquillages (conchyliculture), les crustacés (carcinoculture) ou les grenouilles (raniculture). De plus en plus importante, l'industrie aquacole est une alternative à la pêche de capture dont le recours est limité afin d'assurer un renouvellement durable des stocks restants. L'aquaculture est également le moyen de pourvoir à la demande grandissante en produits aquacoles au niveau mondial (Figure 4) (FAO, 2016). Par exemple, ce secteur est devenu tellement important depuis les années 70, qu'en 2014, sa contribution a dépassé pour la première fois celle de la pêche traditionnelle en ce qui concerne l'offre proposée pour les poissons en termes de consommation humaine (FAO, 2016). D'ailleurs, la demande en poisson est en constante progression à travers le monde, passant d'une consommation de 9,9 kg de poisson par habitant dans les années 60 à environ 20 kg en 2014 (FAO, 2016). Ainsi, en 2013, le poisson contribuait à près de 20 % à l'apport moyen en protéines animales chez 3,1 milliards d'individus à travers le monde (FAO, 2016).

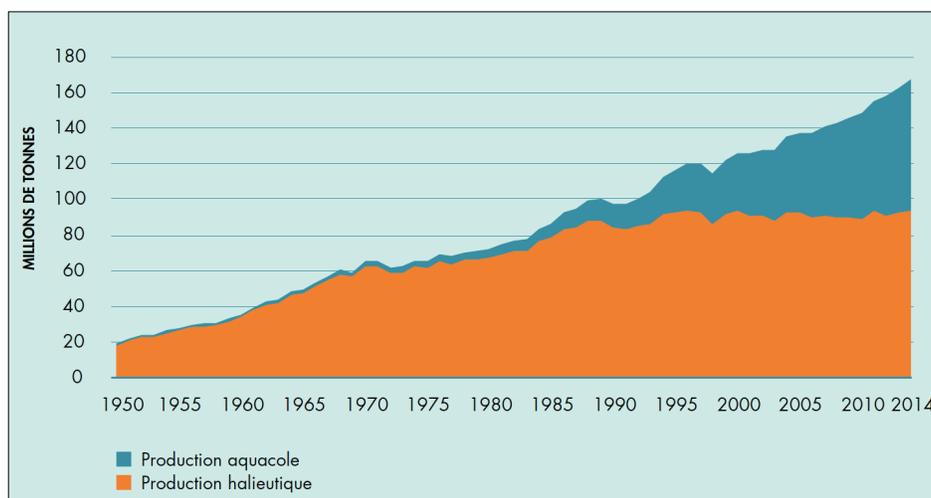


Figure 4 : Productions halieutique et aquacole mondiales de 1950 à 2014.

La production totale est exprimée en million de tonnes, la production aquacole est représentée en orange alors que la production halieutique est en bleu. Cette figure est tirée de la FAO (2016).

1.2.1. Pisciculture mondiale et salmoniculture au Canada et au Québec

La pisciculture est une sous-catégorie de l'aquaculture qui comprend l'élevage de poissons soit en eaux douces, saumâtres ou salées (aquacultures continentale, côtière et marine). En 2014, la production mondiale de poissons s'élevait à 49,8 millions de tonnes, occupant ainsi une part importante de la production aquacole mondiale (Figure 5) (FAO, 2016). Toujours au cours de la même année, parmi les poissons les plus élevés en pisciculture dans le monde entier, il était possible de compter, en ordre d'importance, les cyprinidés avec plus de 28 millions de tonnes, tous les autres poissons d'eaux douces avec près de 9 millions de tonnes, les cichlidés avec un peu plus de 5 millions de tonnes, les salmonidés avec 3,4 millions de tonnes et enfin, tous les autres poissons côtiers avec 1,1 million de tonnes (Tableau I). L'élevage des salmonidés, ou salmoniculture, se hisse donc au quatrième rang mondial des poissons les plus élevés.

Au Canada, la production de saumon d'élevage en fait le quatrième producteur mondial (DFO-MPO, 2015). Depuis 2005, la production salmonicole annuelle moyenne est de 122 000 tonnes pour une valeur moyenne de 862 000 000 \$/année (Figure 6). En 2015, la Colombie-Britannique était la province qui contribuait le plus à cette production (DFO-MPO, 2015).

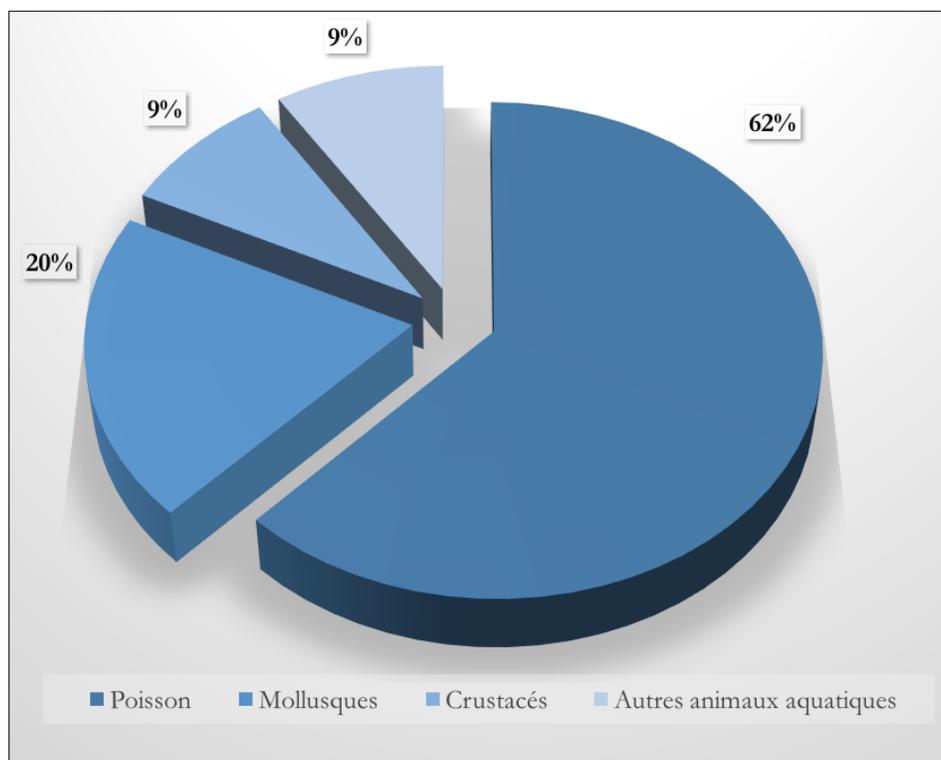


Figure 5 : Production aquacole mondiale en 2014.
L'élevage de poissons représentait plus de la moitié de la production mondiale aquacole. Cette figure est adaptée de la FAO (2016).

Tableau I : Production mondiale des dix groupes de poissons les plus élevés en pisciculture en 2014.

Tableau réalisé à partir de la base de données de la FAO (2017).

Nom des poissons	Production (en tonnes)
Carpes, barbeaux et autres cyprinidés	28 229 332
Autres poissons d'eau douce	8 875 046
Tilapias et autres cichlidés	5 315 558
Saumons, truites, éperlans	3 431 155
Autres poissons côtiers	1 116 848
Autres poissons diadromes	1 113 087
Poissons marins non identifiés	685 319
Autres poissons pélagiques	315 284
Anguilles de rivière	250 122
Soles, flétans	195 036

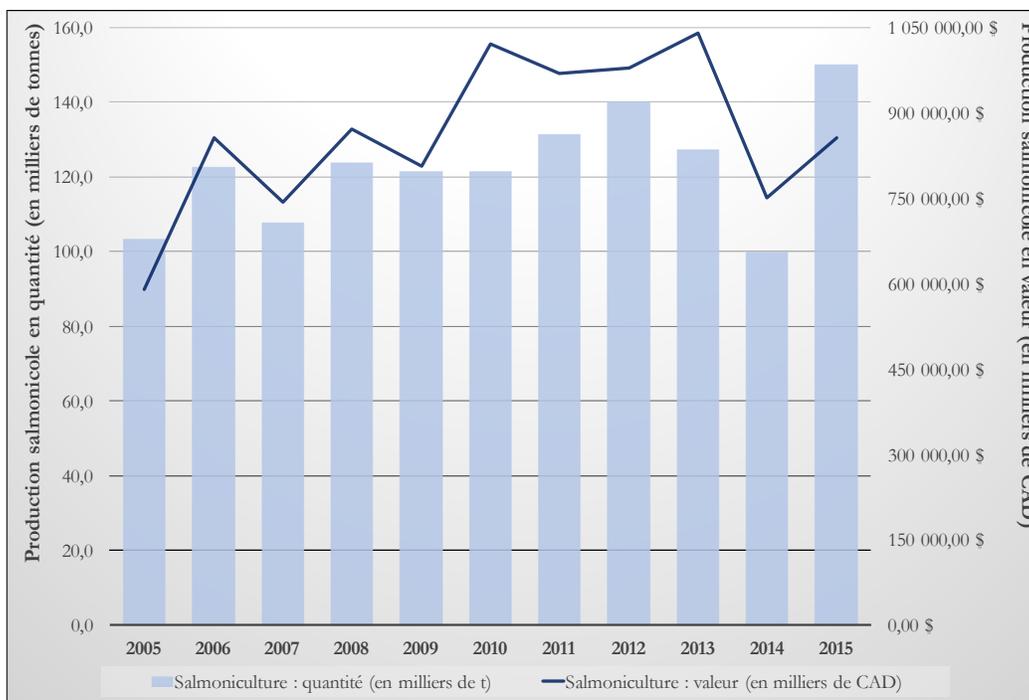


Figure 6 : Production salmonicole au Canada de 2005 à 2015.

La production salmonicole, représentée en bleu pâle, est exprimée en milliers de tonnes (axe principal) alors qu'en bleu foncé, cette même production est exprimée en milliers de dollars canadiens (axe secondaire). Cette figure a été réalisée à partir de la base de données de la FAO (2017).

Au Québec, la salmoniculture destinée à la consommation de table n'a débuté que dans les années 80, avec une production annuelle de 300 tonnes alors que la pêche sportive a été la motivation première de ce type de pisciculture, dès la fin du XIX^e siècle. Ainsi, les salmonidés sont destinés, en ordre d'importance, à trois marchés : celui de l'ensemencement, de la table et celui des étangs de pêche sportive (MAPAQ, 2012). En 2014, le total des ventes réalisées s'est élevé à environ 1 150 tonnes pour une valeur estimée à 9,5 millions de dollars ; la truite arc-en-ciel suivie de l'omble de fontaine (aussi connu sous le nom de truite mouchetée) puis de l'omble chevalier ont été les espèces les plus vendues (MAPAQ, 2016). Les années 2000, apogée pour la pisciculture avec une production dépassant les 2 000 tonnes, ont été cependant marquées par un frein significatif de la production provinciale, notamment dû aux règles environnementales strictes entourant les rejets de phosphore dans l'eau (Morin, 2007). Toutefois, il existe une autre limite à la production de salmonidés : la furunculose.

1.3 LA FURONCULOSE

1.3.1. Description de la maladie et diagnostic au Québec

La furunculose est décrite pour la première fois en Allemagne par Emmerich et Weibel en 1890, chez une truite brune (*Salmo trutta*) infectée (Emmerich and Weibel, 1890). Bien qu'elle affecte les salmonidés d'élevage, cette maladie frappe aussi les poissons dans leur environnement naturel (Bernoth, 1997). Répandue à travers le monde, à l'exception de certains pays, elle est à l'origine de pertes économiques importantes dans le domaine de l'aquaculture (Toranzo *et al.*, 2005). Parmi les signes cliniques possibles de la maladie, les poissons infectés peuvent développer une perte de l'appétit, de la léthargie, de petites hémorragies à la base des nageoires ou encore des furoncles, d'où la maladie tire son nom (Hiney *et al.*, 1997). Ces furoncles, sanguinolents parfois, peuvent être retrouvés sur les parties externes et internes du poisson (Figure 7). Longtemps considérée comme exclusive aux salmonidés, la furunculose touche des poissons d'autres familles également (Bernoth, 1997; Toranzo and Barja, 1992). Causée par la bactérie *Aeromonas salmonicida*, la maladie peut entraîner la mort de l'hôte suivant l'état initial et l'âge du poisson. En pisciculture, le déclenchement ou la propagation de la furunculose dépendent des conditions dans lesquelles les salmonidés sont élevés.



Figure 7 : Exemple de furoncle sur un poisson infecté.
Furoncle non sanguinolent présent à la surface de la peau d'un poisson infecté. Figure adaptée de Dallaire-Dufresne *et al.* (2014b).

Au Québec, depuis 1998, la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal (FMV) offre un service de diagnostic pour les poissons, à Saint-Hyacinthe (Uhland, 2003). Bien que ces services ne fonctionnent que sur la base volontaire des pisciculteurs, il est possible de répertorier les cas de furunculose survenus dans la province et d'avoir un aperçu de l'état de santé des cheptels de poissons. Au cours des dernières années, la furunculose a représenté environ entre 20 à 30 % des maladies diagnostiquées (Figure 8). Selon ces rapports, les salmonidés touchés par la maladie sont : l'omble de fontaine, l'omble chevalier, la truite arc-en-ciel ainsi que le touladi (truite grise) (Lafaille, 2015, 2016, 2017). De plus, il est possible de noter que les poissons affectés sont en bas âge, généralement entre 0 et 2 ans, tel que précédemment décrit dans la littérature (Austin and Austin, 2016). Les isolats d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* obtenus à partir de ces poissons malades constituent une partie de la collection du laboratoire Charette.

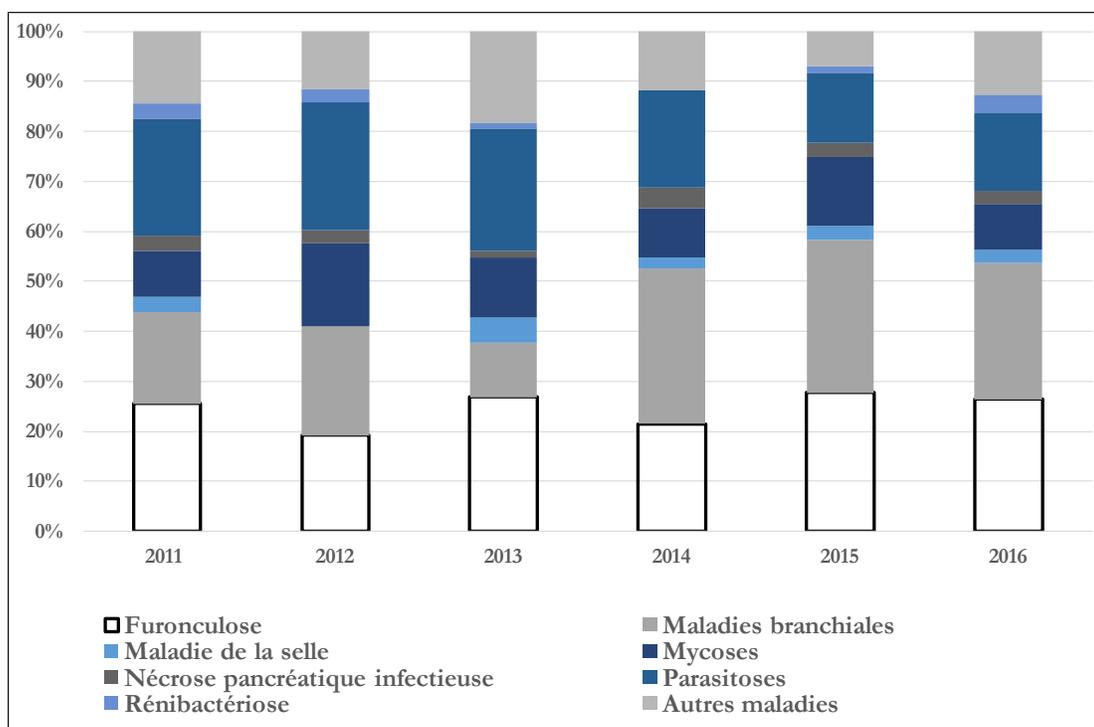


Figure 8 : Maladies diagnostiquées chez les poissons par la FMV entre 2011 et 2016.

La furunculose (en blanc) représente 20 à 30 % des maladies diagnostiquées. Ce graphique a été réalisé à partir des rapports 2015 à 2017 des activités en ichtyopathologie de la FMV de St-Hyacinthe (Lafaille, 2015, 2016, 2017).

1.3.2. Traitements possibles

Afin de prévenir la maladie, plusieurs précautions doivent être mises en place au quotidien dans les piscicultures. Ces recommandations comprennent notamment le fait d'observer des règles d'hygiène strictes, de minimiser les sources de stress pour les poissons, d'assurer une bonne qualité de l'eau ou encore de désinfecter systématiquement les poissons achetés, quelle que soit leur origine (Bernoth, 1997; Uhland, 2004).

Néanmoins, lorsqu'elle se déclare, la furonculose peut être traitée avec plus ou moins de succès par la vaccination ou l'antibiothérapie. Dès les années 1940, la vaccination par voie orale est envisagée et donne des résultats intéressants (Duff, 1942). Cependant, cette expérience n'est pas reproductible et les études pour mettre au point un vaccin efficace se multiplient (Bernoth, 1997; Bullock *et al.*, 1983). Bien que plusieurs modes d'administration soient possibles, la vaccination présente toutefois des désavantages aux niveaux logistique et économique ; ce qui la rend contraignante pour une mise en œuvre à une large échelle sur les petits poissons (Bullock *et al.*, 1983).

Par conséquent, l'antibiothérapie apparaît rapidement comme une alternative intéressante et efficace. À la fin des années 40, « *la furonculose des salmonidés a été la première maladie de poissons traitée avec les médicaments modernes - les sulfonamides et les nitrofuranes* » (Bullock *et al.*, 1983; Gutsell, 1948). De nos jours, au Québec, l'emploi et la prescription des antibiotiques sont strictement encadrés et restreints, puisque seuls quatre antibiotiques sont autorisés actuellement (Tableau II) (Morin *et al.*, 2004). Cependant, l'efficacité des antibiotiques est de plus en plus limitée. La façon dont les antibiotiques ont été employés a entraîné de l'antibiorésistance. En effet, le système de production choisi favorise la multiplication des épisodes de furonculose et par conséquent, entraîne une utilisation importante des antibiotiques (Morin, 2010).

Tableau II : Liste des antibiotiques employés au Québec.
Tableau adapté de Morin *et al.* (2004) et Morin (2010).

Antibiotiques	Nom commercial	Statut légal	Posologie		Période de retrait (en jours)
			mg/kg	jours	T °C ≥ à 10 °C
Oxytétracycline	TM-Aqua [®]	Homologué	75	10	40
Florfenicol	Aquaflor [®]	Homologué	10	10	12
Sulfadiméthoxine/ ormétoprime	Romet-30 [®]	Homologué	50	10	42
Sulfadiazine/ trimétoprime	Tribrisse- 40 [®]	Homologué	30	7-10	80
Érythromycine		Non homologué			180
Enrofloxacin	Baytril	Non homologué			

1.3.3. *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, agent étiologique de la furonculose

A. salmonicida est une espèce qui appartient aux γ -protéobactéries et qui fait partie du genre *Aeromonas*. Ce genre comprend à la fois des souches mésophiles qui peuvent infecter les humains et des souches psychrophiles qui infectent les poissons (Janda and Abbott, 2010). À ce jour, *A. salmonicida* comprend cinq sous-espèces reconnues : *salmonicida*, *masoucida*, *achromogenes*, *pectinolytica* et *smithia*. De nouvelles sous-espèces mésophiles ont été mises en évidence récemment (Vincent *et al.*, 2016b). Suivant la sous-espèce qui infecte le poisson, la furonculose peut être de deux types : la furonculose « typique » causée par la sous-espèce *salmonicida* et la furonculose « atypique » causée par d'autres sous-espèces, soit *masoucida*, *achromogenes* et *smithia*. *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* est une bactérie à Gram négatif, non motile et psychrophile, dont la température optimale de croissance est de 18 °C. Ce microorganisme est ubiquitaire de l'eau.

1.4 LE PLASMIDOME D'*AEROMONAS SALMONICIDA* SSP. *SALMONICIDA*

L'ère du séquençage a permis de donner un nouveau tournant à l'étude des plasmides chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*. Près de 130 ans après la découverte de la bactérie, la souche A449, isolée en France, est la première souche dont le génome a été entièrement séquencé d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* et devient depuis la souche de référence de l'espèce (Reith *et al.*, 2008). Ainsi, son chromosome est de 4,7 Mb et elle possède cinq

plasmides : trois petits (pAsa1, pAsa2 et pAsa3) ainsi que deux grands (pAsa4 et pAsa5). Toutefois, le plasmidome standard, basé sur les plasmides les plus fréquemment rencontrés est composé des plasmides pAsa1, pAsa2, pAsa3, pAsa11 et pAsa5 (Belland and Trust, 1989; Boyd *et al.*, 2003).

1.4.1. Les grands plasmides

A. salmonicida ssp. *salmonicida* possède plusieurs grands plasmides dont les tailles sont en moyenne de 20 à 200 kb. Tous les grands plasmides présentent des fonctions particulières comme la résistance aux antibiotiques ou la virulence (Tableau III). Ce sont majoritairement des plasmides conjugatifs.

La virulence est principalement portée par le plasmide pAsa5 de 155 kb. En effet, il supporte la plupart des gènes qui codent pour le système de sécrétion de type trois (SSTT) (Reith *et al.*, 2008). Découvert chez *Yersinia enterocolitica*, le SSTT est une structure protéique semblable à une aiguille à travers laquelle des effecteurs, qui sont également des protéines, vont circuler pour être injectés dans les cellules de l'hôte eucaryote (Michiels *et al.*, 1991; Salmond and Reeves, 1993). Sur pAsa5, les gènes du SSTT sont organisés en cinq opérons polycistroniques tandis que le chromosome et un petit plasmide (pAsa11) sont aussi porteurs de gènes codant pour des effecteurs et leurs chaperonnes (Fehr *et al.*, 2006; Reith *et al.*, 2008; Vanden Bergh and Frey, 2014). Par ailleurs, plusieurs IS sont également présentes sur le plasmide pAsa5 et sont impliquées dans des réarrangements qui peuvent causer la perte du SSTT chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* (Daher *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2012, 2016).

Un autre grand plasmide d'intérêt est le plasmide pSN254b (152 kb) (Vincent *et al.*, 2014). En effet, ce plasmide confère, aux souches qui le portent, une multirésistance aux antibiotiques et particulièrement, à tous ceux actuellement homologués. Or, une étude a récemment montré que ce plasmide était présent dans près de 25 % des souches résistantes analysées et isolées au Québec (Trudel *et al.*, 2016), ce qui constitue un obstacle supplémentaire au traitement efficace contre la furonculose.

Tableau III : Grands plasmides d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* classés suivant leur fonction.

Plasmide	Fonction	Taille (en pb)	Gènes ou résistances d'intérêt	Nom de la souche	Référence
pAB5S9b	Résistance aux antibiotiques	25 540	<i>tetH, floR, sul2, strA, strB</i>	2009-144K3	(Vincent <i>et al.</i> , 2014)
pRAS1		44 000	<i>dfrA16, qacEΔ1, sull, tetA</i> et <i>tetR</i>	A718	(Sandaa and Enger, 1994)
pASOT3		39 000	<i>aadA2, tetA</i>	-	(Adams <i>et al.</i> , 1998; L'Abée-Lund and Sørum, 2001)
pASOT		47 000	<i>aadA2</i> ou <i>dfrIIc, tetA</i>	-	
pASOT2		47 000	<i>aadA2, tetA</i>	-	
pAr-32		47 000	Sulfathiazole, chloramphénicol et streptomycine	NCMB833	(Aoki <i>et al.</i> , 1971)
pRAS2		48 000	Streptomycine, sulfonamides et tetracycline	1682/92	(L'Abée-Lund and Sørum, 2000)
pAsa9		76 724	<i>floR, tet(G), sull, blaPSE-1, aadA2, tetA</i>	01-B526	(Tanaka <i>et al.</i> , 2017)
pAsa8		110 577	<i>tetA, tetR, floR, tetG, sull, blaPSE-1, aadA</i>	M16474-11	(Trudel <i>et al.</i> , 2016)
pSN254b		152 216	<i>tetA, floR, sull, sul2, blaCMY, aadA, strA, strB</i>	2004-05MF26	(Vincent <i>et al.</i> , 2014)
pAsa4c		163 022	<i>sull, aadA, cat</i>	JF2267	(Tanaka <i>et al.</i> , 2016)
pAsa4		166 749	<i>tetA(E), sull, aadA, cat</i>	A449	(Reith <i>et al.</i> , 2008)
pAsa4b		181 933	<i>tetA(E), sull</i>	01-B522	(Tanaka <i>et al.</i> , 2016)
pAsa6		Virulence	18 536	<i>AopH</i>	RSP74.1
pAsa5	155 098		SSTT	A449	(Reith <i>et al.</i> , 2008)

1.4.2. Les petits plasmides

Plusieurs petits plasmides d'une taille inférieure à 15 kb ont été découverts chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* (Tableau IV). Ils peuvent être classés suivant les fonctions qu'ils supportent ou non. Ainsi, il est possible de trouver des plasmides qui possèdent des

gènes codant pour des facteurs de virulence, des résistances aux antibiotiques ou encore des plasmides sans fonction connue, dits plasmides cryptiques.

Tableau IV : Petits plasmides d’*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* classés suivant leur fonction.

Plasmide	Fonction	Taille (en pb)	Type de réplicon	Gènes d’intérêt	Nom de la souche	Référence
pAsa1	Cryptique	5 424	ColE2	-	A449	(Boyd <i>et al.</i> , 2003)
pAsa2		5 247	ColE1	-	A449	(Boyd <i>et al.</i> , 2003)
pAsa3		5 616	ColE2	-	A449	(Boyd <i>et al.</i> , 2003)
pAsa7	Résistance aux antibiotiques	5 276	ColE1	<i>cat</i>	JF3791	(Vincent <i>et al.</i> , 2016a)
pRAS3.3		11 845	IncQ	<i>tetA</i>	2004-144K3	(Vincent <i>et al.</i> , 2014)
pRAS3.4		Non déterminée	IncQ	<i>tetA</i>	2010-47K18	(Vincent <i>et al.</i> , 2014)
pRAS3.1		11 851	IncQ	<i>tetA</i>	7067/91	(L’Abee-Lund and Sorum, 2002)
pAsa11	Virulence	6 371	ColE2	<i>aopP</i>	01-B526	(Fehr <i>et al.</i> , 2006)
pAsa11B		8 989	ColE2	<i>aopP</i>	HER1104	(Trudel <i>et al.</i> , 2013)
pAsa11C		8 989	ColE2	<i>aopP</i>	JF2506	(Attéré <i>et al.</i> , 2015)
pAsa11D		9 138	ColE2	<i>aopP</i>	JF2507	(Attéré <i>et al.</i> , 2015)

1.4.2.1 Les plasmides cryptiques

Les plasmides pAsa1, pAsa2 et pAsa3 sont cryptiques car, en dehors des éléments génétiques responsables des fonctions de répllication, de mobilisation et de stabilité qui leur sont propres, ils n’ont aucune autre fonction connue (Figure 9) (Boyd *et al.*, 2003). Leur présence suscite d’ailleurs plusieurs interrogations du fait justement qu’« aucune utilité » connue ne leur a été attribuée jusqu’à présent et qu’ils soient, malgré cela, hautement conservés. Avant l’ère du séquençage à haut débit, les cartes de ces plasmides avaient été

établies grâce aux enzymes de restriction (Belland and Trust, 1989). Aujourd'hui encore, bien qu'elle soit désormais souvent couplée au séquençage à haut débit, l'utilisation de l'enzyme *EcoRI* demeure la façon la plus simple, rapide et efficace pour déterminer les profils des petits plasmides d'un isolat d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* (Attéré *et al.*, 2015; Boyd *et al.*, 2003; Trudel *et al.*, 2013). Ces plasmides ont pour point commun d'être en haut nombre de copies et mobilisables. Toutefois, il existe des spécificités qui permettent de les singulariser.

Très stables, les plasmides pAsa1 et pAsa2 sont présents dans tous les isolats étudiés (Attéré *et al.*, 2015; Boyd *et al.*, 2003; Trudel *et al.*, 2013). Une seule étude répertorie l'absence de pAsa2 dans deux isolats, trouvés dans des turbots du Portugal, poissons qui ne sont généralement pas les hôtes d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* (Najimi *et al.*, 2008). En ce qui concerne pAsa3, il peut être absent et souvent la cible de mutations dont les patrons sont retrouvés dans différentes souches (Attéré *et al.*, 2015).

Le plasmide pAsa2 est un plasmide de type ColE1. Il présente la caractéristique de n'avoir aucun système connu contribuant à sa stabilité dans les cellules hôtes ainsi que de ne pas posséder de gène codant pour la protéine Rop, qui intervient dans la stabilisation du *kissing-complex* (Boyd *et al.*, 2003). D'après la classification en fonction des relaxases décrites plus haut (section 1.1.3), la région *mob* de ce plasmide appartient à la famille des MOB_{HEN}. Cette famille, dont fait partie pColE1, est caractérisée par le fait que seuls trois gènes sont impliqués dans la formation du relaxosome, exprimé de façon constitutive (Francia *et al.*, 2004).

Les plasmides pAsa1 et pAsa3 sont des réplicons de type ColE2. Contrairement à pAsa2, leur maintien dans les cellules serait probablement assuré par le système toxine-antitoxine *relEB* (Boyd *et al.*, 2003); *relE* codant pour la toxine alors que *relB*, pour l'antitoxine (Gotfredsen and Gerdes, 1998), propre à chacun.

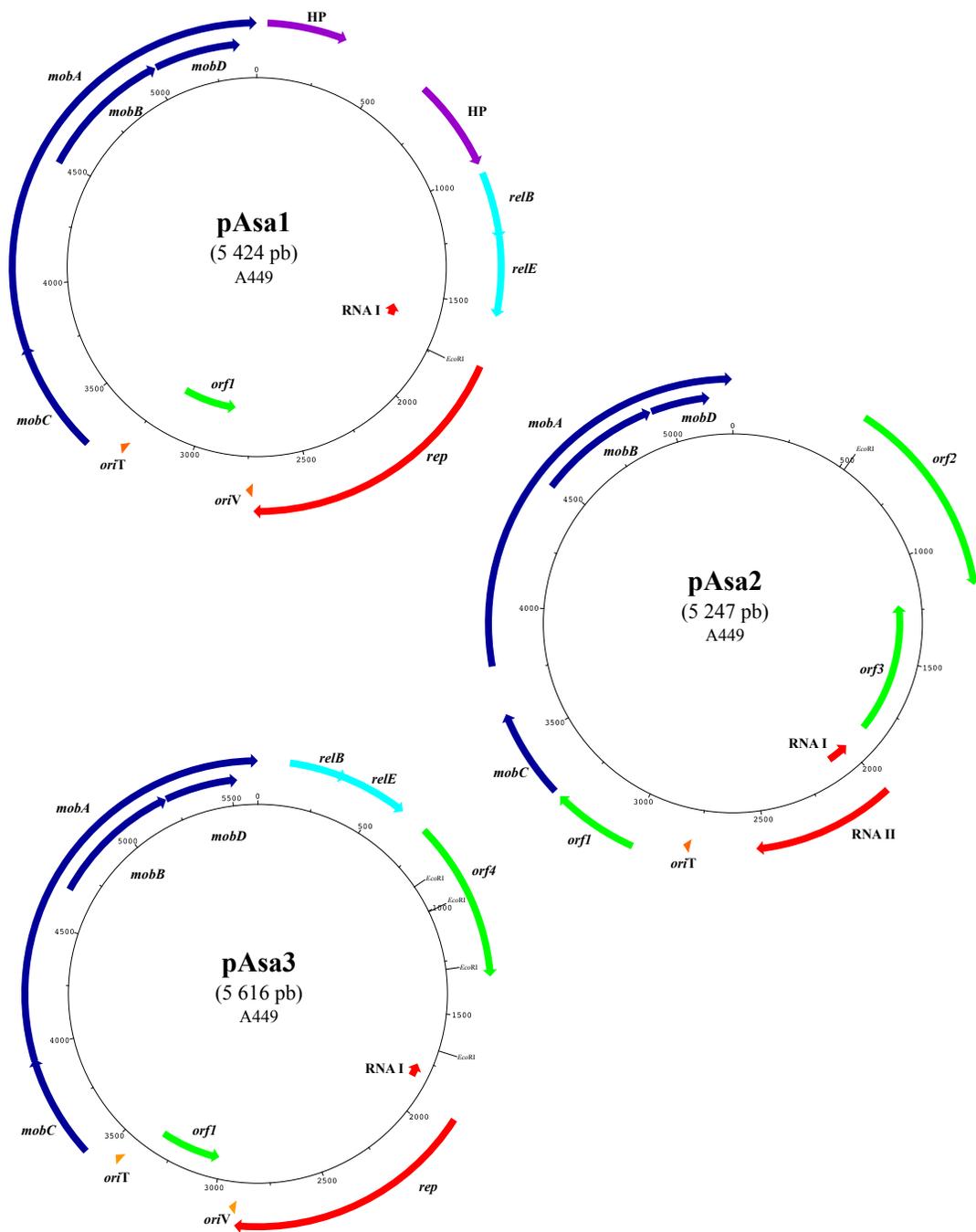


Figure 9 : Les trois plasmides cryptiques d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida*.

Les gènes impliqués dans la mobilisation sont en bleu, les ARN et gènes impliqués dans la réplication sont en rouge. En violet, les gènes codant pour des protéines hypothétiques récemment identifiées, les systèmes TA sont en turquoise et en vert, gènes non caractérisés codant pour des protéines hypothétiques. Les origines de réplication et de transfert sont en orange.

1.4.2.2 Les plasmides portant des facteurs de virulence

Jusqu'à cette étude, le plasmide pAsal1 (6 371 pb) était le seul petit plasmide connu, avec ses variants pAsal1B,C,D, à posséder un facteur de virulence (Attéré *et al.*, 2015; Boyd *et al.*, 2003; Trudel *et al.*, 2013). En effet, le gène *aopP* code pour un effecteur du SSTT, facteur de virulence important chez *A. salmonicida ssp. salmonicida*. (Fehr *et al.*, 2006). En plus de posséder cet élément, une des caractéristiques intéressantes de pAsal1 est qu'il est un dérivé putatif du plasmide cryptique pAsa3 (Boyd *et al.*, 2003). Partageant près de 75 % d'identité nucléotidique avec pAsa3, il présente aussi une séquence d'insertion IS*AS11* en amont du gène *aopP* (Trudel *et al.*, 2013). Par ailleurs, il n'est pas toujours présent, sans aucune corrélation notable avec la présence ou non de pAsa3. Cependant, une étude a montré qu'il existe une dichotomie pour pAsal1 et pAsa3. Ainsi, ces plasmides sont manquants de façon plus fréquente dans les souches d'*A. salmonicida ssp. salmonicida* d'origines européenne que canadienne (Attéré *et al.*, 2015). Ces variants possèdent aussi le gène *aopP*. Toutefois, comparativement à pAsal1, certains gènes ont été altérés sur ces plasmides. Ainsi, dans pAsal1B, c'est le cas du gène *mobA* interrompu par une IS*AS5* complète. De plus, toujours dans ce même plasmide, un fragment de 96 pb d'une autre copie de cette même IS a été retrouvé dans une région non codante entre *repA* et *mobA* (Trudel *et al.*, 2013). Tandis que chez pAsal1C et D, cette même IS s'est insérée au même endroit dans les deux plasmides, soit dans l'IS*AS11*. Cependant, la région qui entoure l'IS*AS5* permet de faire la distinction entre ces deux plasmides. En effet, une duplication d'une partie de l'IS*AS11* est présente sur pAsal1D alors qu'elle est absente de pAsal1C (Attéré *et al.*, 2015) (Figure 10). L'IS*AS5* fait partie de la famille des IS*21* et est présente en 12 copies complètes et 3 partielles dans le génome d'*A. salmonicida ssp. salmonicida* A449 (Reith *et al.*, 2008).

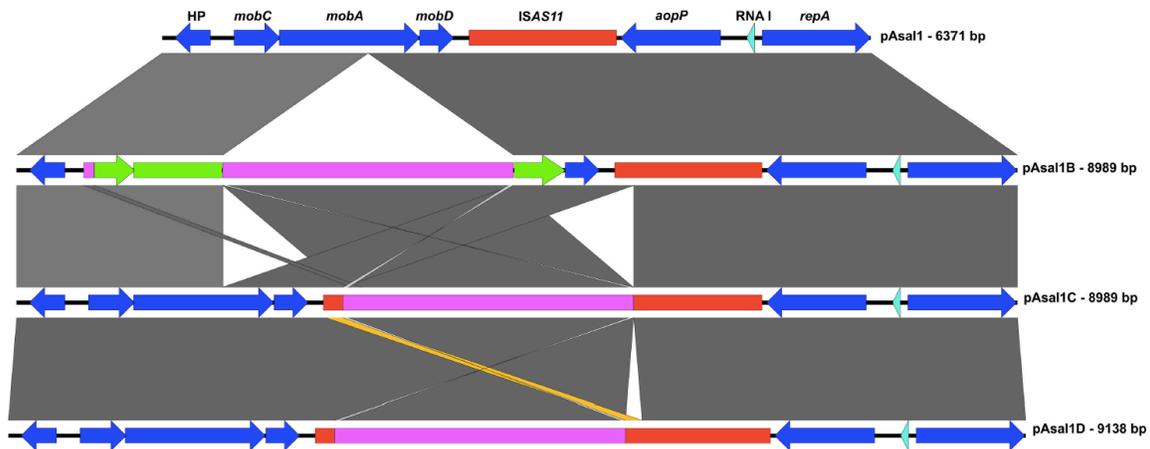


Figure 10 : Comparaison de pAsal1 et de ses variants pAsal1B, pAsal1C et pAsal1D.

En bleu foncé, l'architecture minimale des plasmides, en rouge l'*ISAS5*, en violet l'*ISAS11* et en vert, les pseudogènes. Les séquences ont entre 82 et 100 % d'identité nucléotidique, représentées par le gradient de gris. Figure tirée de Attéré *et al.* (2015).

1.4.2.3 Les plasmides supports de la résistance aux antibiotiques

Les petits plasmides connus dans cette catégorie pour *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* sont au nombre de quatre jusqu'à maintenant : le plasmide pAsa7 et les plasmides pRAS3.1, pRAS3.3 et pRAS3.4. Les plasmides pRAS3 sont des plasmides mobilisables d'environ 11,8 kb et porteurs du gène de résistance à la tétracycline, *tetA(C)*. Le plasmide pRAS3.2 a été mis en évidence dans une espèce atypique d'*Aeromonas salmonicida* (L'Abee-Lund and Sorum, 2002). Les concentrations minimales inhibitrices à cet antibiotique diffèrent cependant suivant les plasmides considérés : elle est ainsi de 64 µg/ml pour la souche porteuse de pRAS3.1, de 32 µg/ml pour celle qui possède pRAS3.3 et de 128 µg/ml pour pRAS3.4 (L'Abee-Lund and Sorum, 2002; Vincent *et al.*, 2014). Par ailleurs, ces trois plasmides présentent des différences dans deux régions comprenant des séquences répétées de 6 et 22 pb, et se trouvant de part et d'autre de la région *mob* (Vincent *et al.*, 2014). Ainsi, pour la région proche de l'*oriT*, les plasmides pRAS3.3 et pRAS3.4 sont identiques tandis que pRAS3.1 possède une répétition supplémentaire de la séquence répétée. Pour la région proche de l'*oriV*, pRAS3.3 et pRAS3.1 sont identiques alors que pRAS3.4 possède une répétition supplémentaire. Ces séquences répétées, proches de régions régulatrices de la mobilisation et de la réplication, sont impliquées dans la régulation du nombre de copies

des plasmides, expliquant probablement la différence de niveau de résistance conféré aux souches (Loftie-Eaton and Rawlings, 2010).

Pour le plasmide pAsa7, la bactérie qui le possède a une concentration minimale inhibitrice de chloramphénicol de 192 µg/ml puisqu'il possède un gène *cat* qui code pour une chloramphénicol-acétyl transférase. C'est également un dérivé de pAsa2 dans lequel l'*orf2* et l'*orf3* ont été perdus et remplacés par le gène *cat* (Figure 11). Il s'agit d'un plasmide de type ColE1, retrouvé en haut nombre de copies dans la bactérie (Vincent *et al.*, 2016a). Du fait de la présence de ce gène de résistance, pAsa7 pourrait constituer un outil de biologie moléculaire intéressant afin d'étudier *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* (Vincent *et al.*, 2016a), dans la mesure où les moyens de faire entrer et conserver de l'ADN étranger dans cette bactérie sont limités et relativement peu efficaces (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014a).

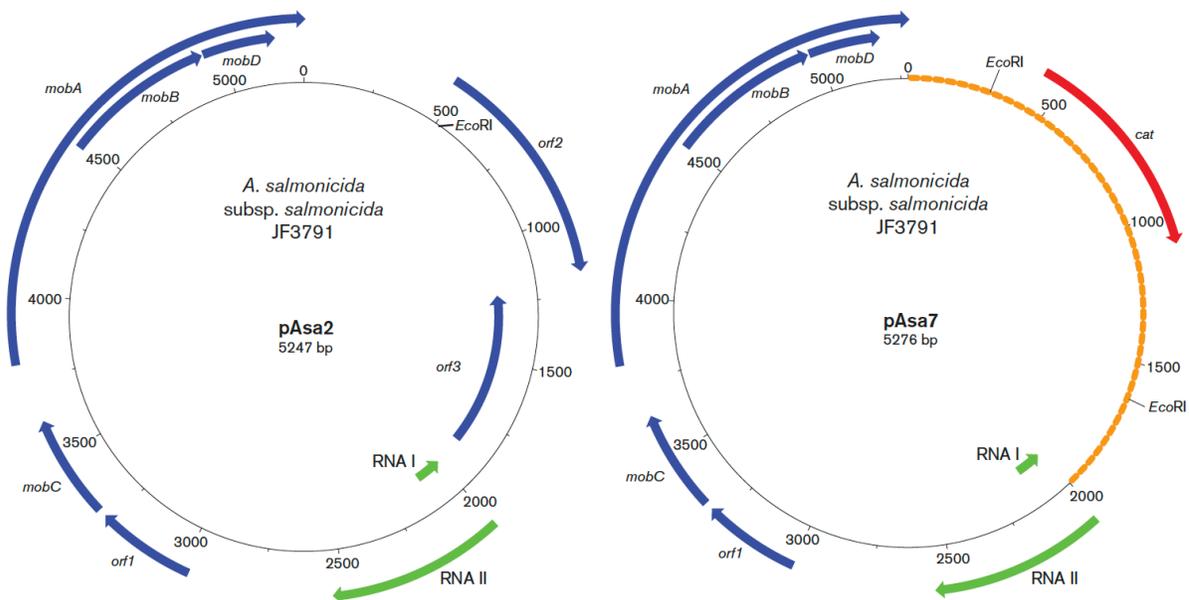


Figure 11 : Cartes de pAsa2 et de pAsa7.

Les gènes codant pour les ARN sont en vert, les autres en bleu et en rouge le gène de résistance au chloramphénicol, *cat*. En orange, la région du plasmide pAsa2 manquante et trouvée chez pAsa7. La figure est tirée de Vincent *et al.* (2016a).

1.5 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

La furonculose pose un problème important au niveau de l'aquaculture mondiale. Les traitements utilisés actuellement s'avèrent peu efficaces pour traiter la maladie ou à défaut, la ralentir significativement. L'antibiothérapie, particulièrement, semble de moins en moins adaptée puisqu'année après année, des résistances aux antibiotiques employés sont découvertes. Il est question dans ce mémoire de la propagation des résistances aux antibiotiques par l'entremise des petits plasmides, mais, comme décrit dans la section 1.4.1, les grands plasmides jouent également un rôle prépondérant. En effet, ce ne sont pas moins de cinq grands plasmides (Tableau IV) qui ont été étudiés au cours de ces cinq dernières années avec comme caractéristique commune de présenter plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques (Tanaka *et al.*, 2016; Trudel *et al.*, 2016; Vincent *et al.*, 2014). En outre, il est intéressant de noter que les autres éléments d'ADN mobiles, comme les transposons, jouent un rôle non négligeable dans la propagation de ces résistances chez d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* (Trudel *et al.*, 2016).

En ce qui concerne les fonctions assurées par les petits plasmides d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, elles sont au nombre de deux (Tableau IV). En effet, en dehors des plasmides cryptiques, l'apport des autres plasmides permet à la bactérie de pouvoir survivre et se reproduire dans des environnements qui lui sont défavorables. Cependant, en ce qui concerne la présence des plasmides cryptiques, bien des questions demeurent encore sans réponse. En effet, le bénéfice qu'ils procurent est bien plus difficile à établir compte tenu des connaissances actuelles limitées. Ce sont des plasmides à haut nombre de copies, très conservés puisque presque toujours trouvés dans les isolats étudiés jusqu'à présent et ceci, quelle que soit l'origine géographique de la souche dont ils sont extraits. Excepté pour l'absence de pAsa3 ou pAsa1 décrite plus haut (Attéré *et al.*, 2015), impossible de les rattacher à une région géographique particulière. Certes, le système toxine-antitoxine *relEB* pourrait en partie répondre à cette question pour les plasmides pAsa1 et pAsa3, mais en aucune façon pour pAsa2.

Par conséquent, en dehors de ce système TA, il était intéressant de comprendre pourquoi des plasmides dont les seuls buts semblent, *a priori*, de se répliquer et se maintenir dans la cellule bactérienne, peuvent ainsi être transmis de cellule en cellule. En outre, étudier

particulièrement la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques contribue à mieux comprendre comment elles se répandent à travers les souches étudiées. Depuis maintenant plusieurs années, la collection de souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* du laboratoire Charette n'a cessé de grandir pour atteindre désormais plus de 200 isolats en provenance de plusieurs régions de l'Amérique du Nord, mais également de l'Europe. Au cours de ce projet, les objectifs spécifiques ont été de :

- 1. Poursuivre la caractérisation des nouvelles souches avec un intérêt particulier pour les petits plasmides.** Mis en corrélation avec des phénotypes de résistance aux antibiotiques notamment, ces nouveaux isolats avaient le potentiel de renfermer de nouveaux petits plasmides.
- 2. Assembler, annoter et analyser les nouveaux plasmides découverts, mais également les plasmides de la collection encore non caractérisés, par comparaison avec des bases de données connues, mais également manuellement.** Une fois caractérisés, ces plasmides pouvaient être étudiés afin de 1) les mettre en corrélation ou non avec des plasmides existants, 2) découvrir les potentielles fonctions qu'ils apportent.
- 3. Analyser la diversité et la plasticité des petits plasmides chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*.** Ou comment ces nouvelles fonctions ont été acquises et comment elles démontrent la capacité d'adaptation de ce microorganisme.

Le chapitre 2 présente un ensemble de découvertes faites au cours de cette maîtrise sur les petits plasmides d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida*.

CHAPITRE 2

LE RÔLE DES PETITS PLASMIDES CRYPTIQUES EN TANT QUE VECTEURS MODELABLES POUR L'INNOVATION GÉNÉTIQUE CHEZ *AEROMONAS SALMONICIDA* SSP. *SALMONICIDA*

2.1. RÉSUMÉ

Quatre petits plasmides sont fréquemment détectés chez *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, bactérie causant la furunculose chez les poissons : pAsa11, avec le gène *aopP* codant pour un effecteur du SSTT et les plasmides cryptiques pAsa1, pAsa2 et pAsa3 qui, bien que présents dans la plupart des souches étudiées, ne présentent aucune fonction encore identifiée. Dans cette étude, trois nouveaux plasmides ont été mis en évidence. pAsa10, vecteur d'une résistance à la tétracycline *via* un Tn1721 partiel, possède une architecture minimale sans aucune relation avec d'autres plasmides connus pour cette bactérie. Contrairement à pAsa10, pAsaXI et pAsaXII sont des dérivés respectifs des plasmides pAsa3 et pAsa2, dans lesquels des transposons supportant des fonctions différentes se sont insérés. Leur découverte permet d'agrandir le groupe des petits plasmides dérivés des plasmides cryptiques ayant une fonction et de montrer que les plasmides cryptiques pourraient servir de modèles et ainsi être des vecteurs de l'innovation chez ce microorganisme.

THE ROLE FOR THE SMALL CRYPTIC PLASMIDS AS MOLDABLE VECTORS FOR GENETIC INNOVATION IN *AEROMONAS SALMONICIDA* SUBSP. *SALMONICIDA*

Sabrina A. Attéré^{1,2,3}, Antony T. Vincent^{1,2,3}, Mégane Paccaud^{2,3}, Michel Frenette^{3,4}
and Steve J. Charette^{1,2,3*}

¹Département de Biochimie, de Microbiologie et de Bio-informatique, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Quebec City, QC, Canada

²Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes, Université Laval, Quebec City, QC, Canada,

³Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Quebec City, QC, Canada

⁴Groupe de Recherche en Écologie Buccale (GREB), Faculté de médecine dentaire, Université Laval, Quebec City, QC, Canada

* Correspondence:

Corresponding Author

Steve.charette@bcm.ulaval.ca

Keywords: *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, cryptic plasmid, Tn1721, pAsa10, pAsaXI, pAsaXII, antibiotic resistance

2.2. ABSTRACT

In *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, a bacterium that causes fish disease, there are two types of small plasmids (<15 kbp): plasmids without known function, called cryptic plasmids, and plasmids that bear beneficial genes for the bacterium. Four among them are frequently detected in strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*: pAsa1, pAsa2, pAsa3 and pAsa11. The latter harbors a gene which codes for an effector of the type three secretion system, while the three others are cryptic. It is currently unclear why these cryptic plasmids are so highly conserved throughout strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. In this study, three small plasmids, named pAsa10, pAsaXI and pAsaXII, are described. Linked to tetracycline resistance, a partial Tn1721 occupies half of pAsa10. A whole Tn1721 is also present in pAsa8, another plasmid previously described in *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. The backbone of pAsa10 has no relation with other plasmids described in this bacterium. However, the pAsaXI and pAsaXII plasmids are derivatives of cryptic plasmids pAsa3 and pAsa2, respectively. pAsaXI is identical to pAsa3, but bears a transposon with a gene that encodes for a putative virulence factor. pAsaXII, also found in *Aeromonas bivalvium*, has a 95% nucleotide identity with the backbone of pAsa2. Like pAsa7, another pAsa2-like plasmid recently described, *orf2* and *orf3* are missing and are replaced in pAsaXII by genes that encode a formaldehyde detoxification system. These new observations suggest that transposons and particularly Tn1721 are frequent and diversified in *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Moreover, the discovery of pAsaXI and pAsaXII expands the group of small plasmids that are derived from cryptic plasmids and have a function. Although their precise roles remain to be determined, the present study shows that cryptic plasmids could serve as moldable vectors to acquire mobile elements such as transposons. Consequently, they could act as key agents of the diversification of virulence and adaptive traits of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*.

2.3. INTRODUCTION

The *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* bacterium is a fish pathogen which causes furunculosis to salmonids, particularly in fish farms. In this microorganism, plasmids are present in a high abundance and diversity (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014b; Piotrowska and

Popowska, 2015). Plasmids are self-replicative, generally circular, and extra-chromosomal DNA molecules (Lederberg, 1952). They usually bear genes that are non-essential for their hosts, but can also bring non-negligible advantages such as antibiotic resistance or virulence factors.

The classical set of plasmids found in *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* includes the small plasmids pAsa1, pAsa2, pAsa3 and pAsa11 (5-6 kb) in addition to the large plasmid pAsa5 (155 kb) (Belland and Trust, 1989; Boyd *et al.*, 2003; Reith *et al.*, 2008). The plasmids pAsa1, pAsa2 and pAsa3 possess only the genes required for their replication and mobilization. Given that no function has been assigned to them yet, these plasmids are called “cryptic.” pAsa1 and pAsa3 also have genes involved in their stability since they harbor a toxin-antitoxin (TA) system (Boyd *et al.*, 2003). TA systems are involved in plasmid stability in their host. They are composed of two molecules: a toxin and an antitoxin. The toxin is a generally stable protein, while the antitoxin that controls the activity of the toxin can be either a protein or a non-coding RNA, and is labile (Schuster and Bertram, 2013). This “addiction” system ensures that bacterial cells that did not integrate the plasmid with the TA system are killed by the remaining toxin. For the others, the antitoxin neutralizes the action of the toxin, guaranteeing the presence of the plasmid to the following generations. In pAsa1 and pAsa3, the RelEB system is the one present in those plasmids (Boyd *et al.*, 2003); *relE* and *relB* encodes for the toxin and the antitoxin, respectively (Gotfredsen and Gerdes, 1998). The fourth small plasmid, pAsa11, bears the gene *aopP*, which encodes an effector of the type three secretion system (TTSS), an important virulence factor for the bacterium (Boyd *et al.*, 2003; Dacanay *et al.*, 2006; Fehr *et al.*, 2006). The large plasmid pAsa5 completes the classical set of plasmids. It supports most of the genes required to encode a functional TTSS, except for some genes located on the chromosome and pAsa11 that encode effectors (Reith *et al.*, 2008; Stuber *et al.*, 2003; Vanden Bergh and Frey, 2014).

Outside these plasmids, many *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* isolates were shown to possess additional plasmids (Attéré *et al.*, 2015; Tanaka *et al.*, 2016; Trudel *et al.*, 2016; Vincent *et al.*, 2014, 2016a) while others lack some of the typical ones (Attéré *et al.*, 2015; Boyd *et al.*, 2003; Najimi *et al.*, 2008). For example, pAsa3 and pAsa11 are often absent in

A. salmonicida subsp. *salmonicida* isolates, with a greater propensity to be missing in European isolates compared to the Canadian ones (Attéré *et al.*, 2015). Interestingly, the pAsa11 plasmid shares about 70% of nucleotide identity with pAsa3, which raises the possibility that one derives from the other (Boyd *et al.*, 2003). Another small plasmid, pAsa7, was listed in a *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strain from Switzerland. This plasmid is putatively a modified-pAsa2 where the orf2 and orf3, which encode hypothetical proteins, were replaced by a functional gene *cat*, encoding a chloramphenicol acetyltransferase (Vincent *et al.*, 2016a).

Based on the examples of pAsa11 and pAsa7, which may be derived from pAsa3 and pAsa2 respectively, it is tempting to propose that cryptic plasmids may act as genetic innovation vectors. To further explore this proposition, we analyzed a set of 22 *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* isolates and identified one new non-typical small plasmid. This new small replicon, and two others previously found but not described (Attéré *et al.*, 2015; Trudel *et al.*, 2013), were sequenced and characterized. In addition to serve as gene shuttles for bacteria that share the same environment, two of them add evidence that small cryptic plasmids might have a major evolutionary role: acting as moldable vectors to spread new genes through lateral gene transfers.

2.4. MATERIAL AND METHODS

2.4.1. Growth of bacterial strains

When required, the 22 strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* listed in Table S1 were streaked on furunculosis agar medium (10 g of bacto tryptone, 5 g of yeast extract, 2.5 g of sodium chloride, 1 g of L-tyrosine, 15 g of agar per liter of water), and then incubated at 18°C for 48 h. Colonies were then used either for plasmid extraction or lysate production for PCR genotyping. Strains 01-B526, JF3791 and HER1084 were also streaked in the same conditions before the determination of the minimum inhibitory concentration for formaldehyde. Strains 2004-208 and HER1084 were already partially analyzed in previous studies (Attéré *et al.*, 2015; Trudel *et al.*, 2013) and were investigated further in the present one.

2.4.2. Plasmid profile

Plasmid extraction of every strain was made with the QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Then the restriction enzyme *EcoRI* was used to digest all plasmids (Boyd *et al.*, 2003) with the following conditions: 25 μ L of the preparation digested with the *EcoRI*-HF® of New England BioLabs (NEB) for 2 hours at 37°C. DNA digestions were migrated on a 0.7%-agarose gel for 75 min at 90 V and the plasmid profiles were visualized with ethidium bromide under UV.

2.4.3. PCR for small plasmids and antibiotic resistance

PCR genotyping was also used for the detection of the standard small plasmids (pAsa1, pAsa2, pAsa3 and pAsa11). DNA lysates were obtained as follows: after resuspension of bacterial colonies in water, they were centrifuged for 5 min, at 3 385 x g. Then the supernatant was replaced by lysis buffer SWL (0.186 g of potassium chloride, 0.061 g of Tris-Base, 0.254 g of magnesium chloride, 225 μ L of Tween 20 and NP40, per 50 mL of water). The whole was then incubated at 95°C for 15 min. Lysates were then diluted to a DNA concentration of 100 ng/ μ L. The conditions and the primers of the PCR used to highlight all the standard small plasmids of these strains from the DNA lysates were previously described (Attéré *et al.*, 2015). Genes for chloramphenicol, florfenicol, sulfonamides and tetracycline resistance were detected with a previously described multiplex PCR approach (Trudel *et al.*, 2016).

2.4.4. Determination of the minimum inhibitory concentration for formaldehyde

Resistance to formaldehyde was evaluated for HER1084 (pAsaXII), 01-B526 (standard plasmidome) and JF3791 (pAsa7, derived from pAsa2). Strains 01-B526 and JF3791 have been used as negative controls since they do not possess any known formaldehyde detoxification system. The three strains were cultured in liquid LB medium overnight and the optical density (OD₅₉₅) adjusted to 0.2. For each strain, volumes of 100 μ L were distributed in a 96-well microplate containing formaldehyde that reached final concentrations ranging from 0.0031% to 1% (serially diluted) to determine firstly the rank of the resistance, then from 0.00031% to 0.01% (serially diluted) for a total volume of 200 μ L by well. The OD₅₉₅ was then taken every 15 minutes for 48h at 18°C in a TECAN

Infinite Pro (Tecan, Morrisville, NC, USA). The second experiment has been done in triplicate.

2.4.5. Plasmid sequencing and bioinformatics analyses

High-throughput sequencing of the small plasmid DNA by Illumina MiSeq technology (2x300 bp) was performed on the mini-preparation DNA extraction of strains SHY15-2743, 2004-208 and HER1084. The reads generated were then randomly subsampled using seqtk (<https://github.com/lh3/seqtk>) and *de novo* assembled with A5-miseq version 20160825 (Coil *et al.*, 2015). Assembly information is provided (Table S2). The plasmid sequences were circularized using various tools included in the package EMBOSS version 6.6.0.0 (Rice *et al.*, 2000). The annotations of the plasmids were done automatically with RAST (Aziz *et al.*, 2008), and further manually curated. TAFinder 2.0 was used to predict toxin and antitoxin genes (Shao *et al.*, 2011). All the sequences were visualized and annotated with Artemis software 16.0.0 (Rutherford *et al.*, 2000). The sequences of pAsa10, pAsaXI and pAsaXII were deposited in the DDBJ/ENA/GenBank databases under the accession numbers MF621616, MF621617 and MF621618, respectively. Easyfig 2.1 was used to visualize the comparisons between sequences (Sullivan *et al.*, 2011).

2.5. RESULTS AND DISCUSSION

2.5.1. Plasmid Repertoire

Plasmid profiling of 22 strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* revealed that all of them possessed the small cryptic plasmids pAsa1, pAsa2 and pAsa3 (Table S1). Among these strains, 6 did not have plasmid pAsa11. This observation is in accordance with another study, which reported that plasmid pAsa11 is unstable, likely due to the lack of a “cell addiction” system, such as a toxin/antitoxin system (Attéré *et al.*, 2015). Only strain SHY15-2743 harbored an atypical plasmid profile, which suggested the presence of a new plasmid (Figure 12). This strain was also shown by PCR assay to possess a *tetA* gene, involved in tetracycline resistance (Table S1).

Previously, two studies allowed us to discover that strains 2004-208 and HER1084 possessed atypical plasmidic profiles (Attéré *et al.*, 2015; Trudel *et al.*, 2013). The small plasmid profiles obtained after *EcoRI* digestion of these two strains (2004-208 and HER1084) (Figure 12) showed that strain HER1084 did not have the pAsa11 plasmid, but presented an 8-kb band. With the exception of pAsa3, all small usual plasmids were found in strain 2004-208. Its atypical profile also includes two supplementary bands at about 4 kb and 8 kb. For SHY15-2743, there were two additional bands compared to the standard plasmid profile: one at 3.5 kb and another at 1 kb.

To shed light on the molecular and evolutionary history of these new plasmids, their DNA was sequenced using a high-throughput technology. Strains SHY15-2743, 2004-208 and HER1084 were shown to possess one new plasmid each: pAsa10, pAsaXI and pAsaXII, respectively. Here, we propose a new nomenclature for *A. salmonicida* plasmids. All plasmids after pAsa10 should be named in Roman numerals to avoid any confusion due to fonts, for example pAsa11 and pAsa11 (pAsaXI).

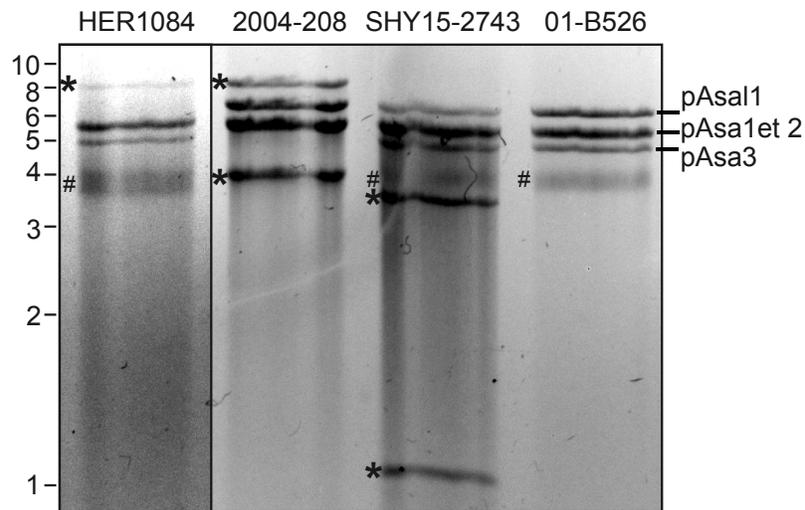


Figure 12 : Atypical small plasmid profiles of strains HER1084, 2004-208 and SHY15-2743.

A small plasmid extraction of each strain was digested with *EcoRI* prior to agarose gel electrophoresis. Each strain bears one or two additional bands (marked with *). Strain 01-B526 harbors a typical plasmid profile composed of the non-cryptic pAsa1 plasmid, and pAsa1, pAsa2, and pAsa3 plasmids with unknown functions. Incompletely digested plasmidic DNA was also present (#).

2.5.2. pAsa10

In strain SHY15-2743, the presence of a new 10-kb plasmid named pAsa10 made the link between the detected tetracycline resistance gene *tetA* and the atypical plasmid profile (Table S1). This plasmid increases the number of those allowing resistance to this antibiotic in *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (L'Abée-Lund and Sorum, 2002; Tanaka *et al.*, 2016; Trudel *et al.*, 2016; Vincent *et al.*, 2014). Effectively, bioinformatics analyses and multiplex PCR revealed that the genes *tetA* and *tetR* involved in tetracycline resistance are present on pAsa10, and caused by a partial transposon *I721* (Tn*I721*) (Figure 13).

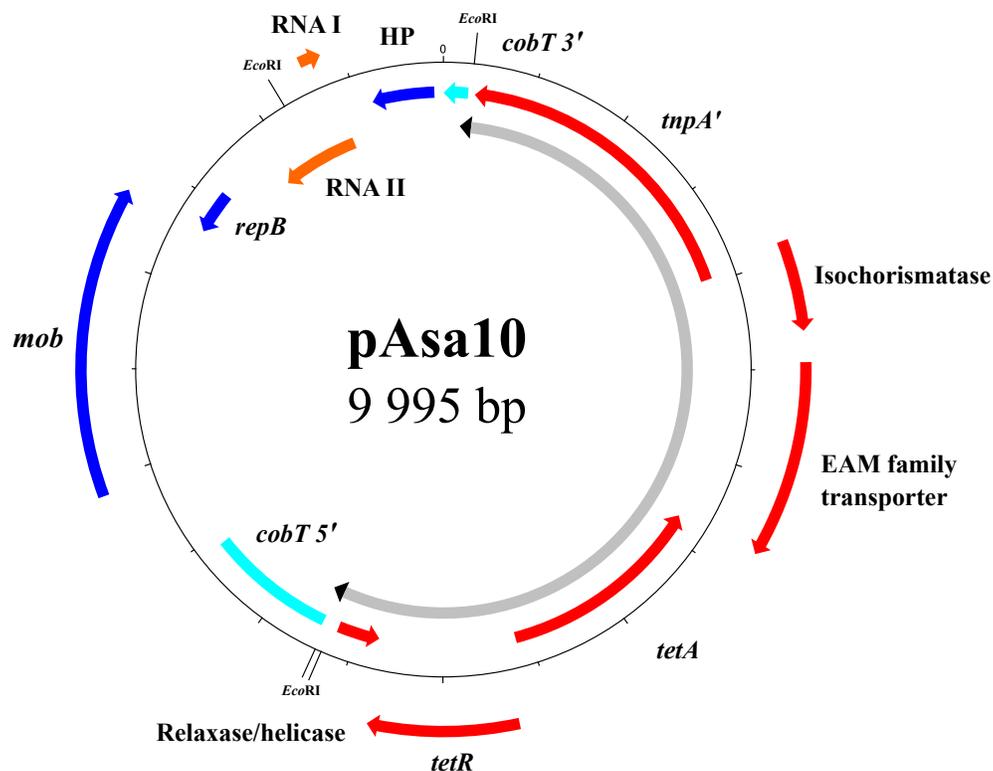


Figure 13 : Map of the pAsa10 plasmid found in strain SHY15-2743. The tetracycline resistance is borne by the *tet* region of transposon Tn*I721*. Tn*I721* interrupts gene *cobT* involved in the biosynthesis of cobalamin. The genes of the mobile genetic element are shown in red, the pseudogene in turquoise, the genes of the backbone in blue, and the RNAs in orange. The portion of the plasmid comprising the transposon is shown in gray with the inverted repeats in black.

Tn1721 is a mobile genetic element discovered for the first time in the plasmid pRSD1 of *Escherichia coli* D1021 (Burkardt *et al.*, 1978; Schmitt *et al.*, 1979). This transposon is composed of two parts (Allmeier *et al.*, 1992). Its precise mechanism of formation is still unknown but it is accepted that two transposons Tn1722 were initially involved in this process. More precisely, these transposons were inserted on both sides of a *tet* region and a part of one of them was deleted to give the actual Tn1721. So, Tn1721 consists of a whole Tn1722 named “minor transposon” and a *tet* region comprising the genes *tetA*, *tetR* with the truncated transposase of the other Tn1722 (Schmitt *et al.*, 1981). Transposon Tn1721 is also characterized by the presence of three 38-pb inverted repeats (IRs) and two 5-bp direct repeats (DRs) due to the insertion of the transposon (Schoffl *et al.*, 1981). Two identical IRs, IRR1 and IRR2, surround the *tet* region in the same orientation while the third one, IRR3, is in an opposed orientation compared to the others, and near to the “minor transposon” (Figure 14) (Schmitt *et al.*, 1979). This IR has mutations that differentiate it from the previous two. Consequently, Tn1721 could transpose in two ways; either all the mobile genetic element can spread from one site to another or only the “minor transposon Tn1722” is transferred (Schoffl *et al.*, 1981).

The *tet* region of Tn1721 is present in the pAsa10 plasmid (Figure 13). This section of the transposon interrupts *cobT*, a gene involved in the biosynthesis of cobalamin (Cameron *et al.*, 1991; Trzebiatowski *et al.*, 1994), and for which the coding DNA sequence was reconstituted *in silico* to assess its completeness. This is the first time that a gene implicated in the biosynthesis of this product is discovered on a plasmid in *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. The insertion of the partial Tn1721 resulted, from either side, in the appearance of the two 5-bp DRs, with the palindromic sequence 5'-GTCTG-3'. However, the IRR1 is in a reverse orientation comparatively to the one found in the reference Tn1721 (Figure 14). The mechanism to explain this inversion remains to be determined, but it is likely that this could be linked with the fact that the transposon is only partial in pAsa10. In any case and to the best of our knowledge, this is the first time that IRR1 and IRR2 are reported in an opposite direction in a partial Tn1721.

Interest for Tn1721 is also increasing because of its spread in the plasmidome of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Figure 15 shows a comparison of the known and

sequenced Tn1721 in this bacterium. A previous study revealed its presence in the pAsa8 plasmid (Trudel *et al.*, 2016). In this case, the interrupted gene and the DR sequences were different from those of pAsa10. Moreover, Tn1721 was complete, but its sequence was cut by two other mobile genetic elements: one insertion sequence (IS5) found in the gene encoding a chemotaxis protein, and an integron (In104) bearing two cassettes with several genes of antibiotic resistance. Acquisition of this transposon, and its potential ability to integrate other mobile elements, could represent a new way for *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* to recombine, disrupt genes, and integrate other mobile elements, could not only represent a new way for *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* to circumvent the antibiotic treatments pressure, but also to adapt to a new environment conditions.

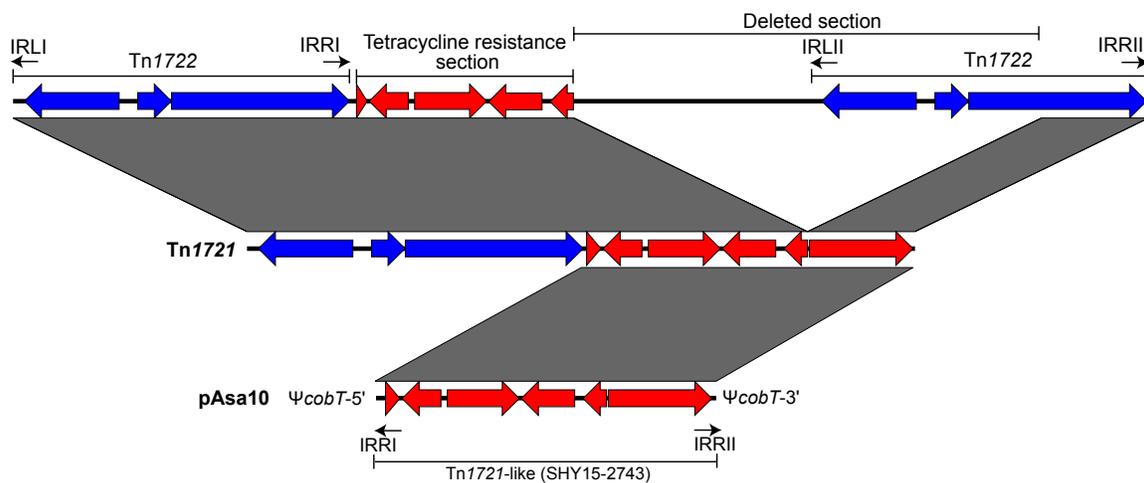


Figure 14 : Formation of transposon Tn1721 and atypical orientation of its IRs in the pAsa10 plasmid.

The formation of Tn1721 is the result of a partial deletion of transposon Tn1722, localized near another Tn1722, itself next to genes responsible for tetracycline resistance (Schmitt *et al.*, 1981). The *tet* region is in red and the complete transposon Tn1722 in blue.

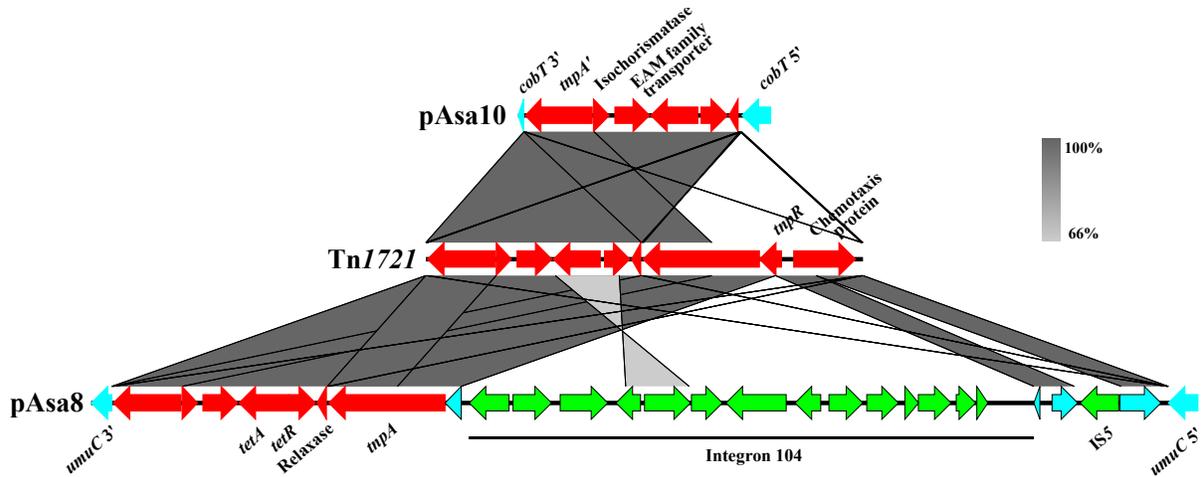


Figure 15 : Comparison of the known and sequenced Tn1721 in plasmids of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.

The gray zones represent similarities between pAsa10, Tn1721 and pAsa8 (accession numbers MF621616, X61367 and KX364409, respectively). The genes of Tn1721 are shown in red, the pseudogene in turquoise, and the other mobile genetic elements in green.

2.5.3. pAsaXI

Another new plasmid characterized here is pAsaXI. Firstly, this plasmid brings a potential virulence factor to the carrier strain 2004-208 (Figure 16). Indeed, pAsaXI possesses a 6.9-kb transposon composed of 3 genes: one that encodes a DDE transposase that belongs to the Tn3-family according to a BLASTp analysis, the *tnpR* gene, and a gene that encodes a protein having a peptidase M66 domain (positions 236-537, e-value of $1.57e^{-89}$) preceded by a signal peptide. A BLASTp analysis revealed that the sequence of the latter gene is likely an homolog of *stcE* found in *E. coli* (71% of identity over 99% of the query length) known to be a sequelog of *tagA* found in *Vibrio cholerae* and *Aeromonas hydrophila*, which are involved in the virulence of these strains (Lathem *et al.*, 2002; Pillai *et al.*, 2006; Szabady *et al.*, 2011; Varshavsky, 2004). Secondly, like other transposons, this one is surrounded by two IRs, and generated 5-pb DRs with the palindromic sequence 5'-ATATA-3'. Except for the presence of the transposase, the length and the sequences of the IRs differ from those found in transposons of Tn3 family (Siguier *et al.*, 2015). Indeed, IRs are shorter (32 pb), and, even if they begin with the conserved “GGGG” motif, the end of

their sequences does not comprise the final TAAG (Siguier *et al.*, 2015). Consequently, we can infer that this transposon belongs likely to a Tn3-family like, but to date, this transposon is mentioned nowhere in the literature. However, a BLAST analysis revealed that the whole transposon is also present in three uncharacterized plasmids of the bacterium *Shewanella baltica* (GenBank # CP002384.1, CP001255.1 and CP001253.1). The latter, previously named *Shewanella putrefaciens*, colonizes fresh and marine water, and was isolated from the Baltic Sea (Ziemke *et al.*, 1998). Consequently, finding this transposon in a strain of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* suggests that at least one direct or indirect event of horizontal transfer involving these bacteria occurred, and demonstrates one more time the high capacity of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* to exchange DNA with other species.

Thirdly, the pAsaXI plasmid is a variant of pAsa3, since its backbone sequence is the same as the one of the reference strain A449 (GenBank: NC_004924). Interestingly, it is likely that pAsa3 is absent in 2004-208, or present in a small subpopulation of cells, for at least two reasons: firstly, it was not viewable by the gel electrophoresis (Figure 12), and secondly, investigation of the sequencing reads that overlap the region in *relE* where the transposon has been inserted revealed that more than 99% of these reads correspond to the transposon. This observation suggests that plasmid pAsaXI has taken advantage over plasmid pAsa3 in strain 2004-208. The discovery of pAsaXI is a new proof that might lead us to consider pAsa1 as a real derivative of pAsa3, and no longer as a putative variant of pAsa3 (See Section 2.6).

In bacteria, the TA systems are involved in plasmid stability. Generally, the toxin, more stable than the antitoxin, ensures plasmid maintenance by killing cells in which the plasmid is lost (Jensen and Gerdes, 1995). The genes are frequently organized such that the gene of the antitoxin is upstream from the gene of the toxin. In pAsaXI, the transposon interrupts *relE*, which encodes the toxin of the TA *relBE* system (Gotfredsen and Gerdes, 1998). This system is likely involved in the stability of pAsa1 and pAsa3 plasmids in *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (Boyd *et al.*, 2003). Therefore, we can infer that the *relBE* system had to fulfill the same function in pAsaXI. However, the insertion in *relE* leads us to consider that this precise place could be a way to the bacterium 1) to protect itself against this toxic

system, and 2) in the same time, to gain beneficial functions; and for the plasmid which is compact, it is likely a place where newly acquired genes could be maintained without affecting the replication and the mobilization the plasmid.

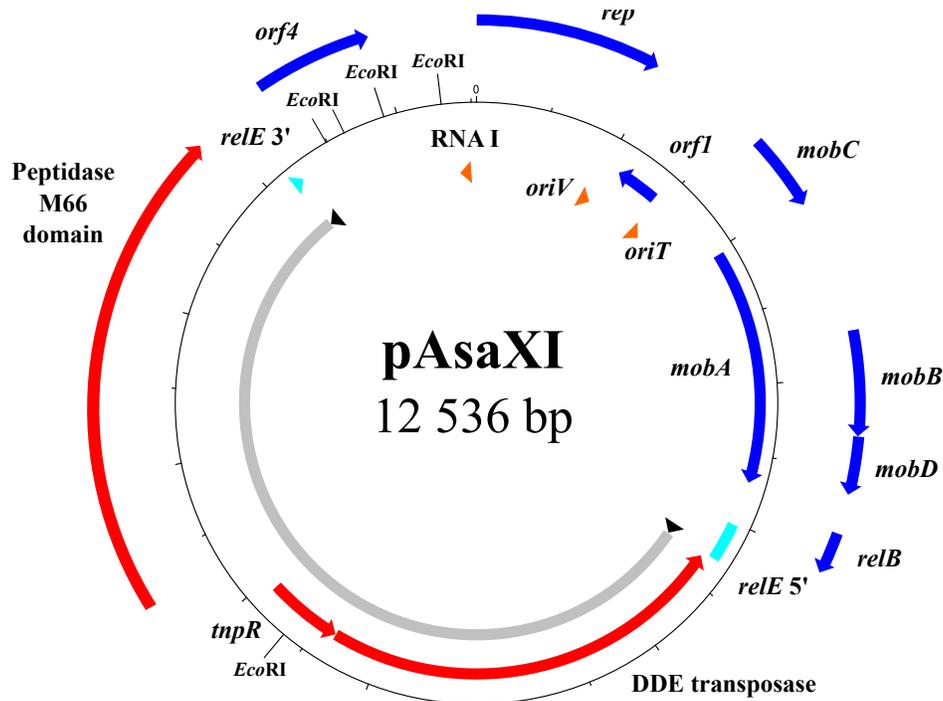


Figure 16 : Map of the pAsaXI plasmid.

The genes of the mobile genetic element are shown in red, the pseudogene in turquoise, the genes of the backbone in blue, and the RNA with the *oriT* and *oriV* in orange. The portion of the plasmid comprising the transposon is shown in gray with the inverted repeats in black.

This strategy of getting rid of the toxin, while keeping the antitoxin, could prevent cell death. Effectively, in the case that the cells become confronted again to the toxin of pAsa3, for example by reacquiring it by a horizontal transfer event, the antitoxin of pAsaXI would likely be able to play its protective role. Moreover, the putative virulence factor that the transposon carries lends another advantage to the bacterium, and could be pressure for the plasmid to be maintained in cells. The localization of the transposon suggests that this TA system could be lost without affecting the plasmid maintenance, and that another mechanism is likely involved to ensure the stability of pAsaXI. We could not exclude the

possibility that this plasmid is in high copy number in the cells, since it is a derivative of the ColE2-type replicon pAsa3, and that would be enough to ensure the transmission to daughter cells.

2.5.4. pAsaXII

The last discovered plasmid in this study is pAsaXII, found in strain HER1084, isolated from a fish captured in France (Figure 17). As with pAsaXI, this third plasmid is a derivative of a cryptic plasmid (pAsa2 in this case) and contains a putative mobile insertion cassette (MIC) that interrupts, here again, a TA system. More precisely, the MIC is inserted in the *parE* gene, which encodes for the toxin of the *parED* TA system (Roberts *et al.*, 1994). Like pAsa7 (Vincent *et al.*, 2016a), pAsaXII highlights that cryptic plasmid pAsa2 could be modified, and form new variants (See Section 2.6). Interestingly, pAsa2 was detected by gel electrophoresis and bioinformatics analyses. Moreover, the regulator RNAs between pAsa2 and pAsaXII exhibit several differences that likely allow both plasmids to coexist in the same cells, as required for ColE1-type replicon plasmids (Camps, 2010; Vincent *et al.*, 2016a).

The presence of pAsaXII in *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* illustrates again the strong ability of this bacterium to acquire or transfer foreign DNA. Effectively, although unlisted in the scientific literature, a BLASTn analysis allowed us to find the same plasmid in *Aeromonas bivalvium* (Genbank accession number CDBT01000031). The fact that *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* is known to be psychrophilic while *A. bivalvium* is mesophilic (Minana-Galbis *et al.*, 2007) introduces the possibility of genetic transfers between aeromonads of different lifestyles.

This transfer demonstrates that functions other than antibiotic resistance can be acquired in *A. salmonicida*, enlarging its pan-genome and potentially increases its adaptation to different environments. Indeed, pAsaXII also bears four genes involved in a detoxification system for formaldehyde. Bacteria can possess resistance to this molecule, and several pathways for formaldehyde detoxification have been discovered (Chen *et al.*, 2016). In *E. coli*, one of these pathways (the GSH-dependent pathway) involves genes of the operon

fmrAB (Chen *et al.*, 2016; Herring and Blattner, 2004), and these are present on plasmid pAsaXII. However, the organization of this operon is slightly different in pAsaXII since a gene that encodes a glyoxalase separates genes *fmrA* and *fmrB*.

This detoxification system, reported for the first time in *A. salmonicida* subsp *salmonicida*, has been inserted in a putative MIC (Siguier *et al.*, 2015). Indeed, the operon *fmrAB* is flanked by two IRs that are quasi-identical (96% identity), and direct repeats could be detected (5'-TAAA-3'). However, the DR sequences are not directly after the IRs, as usually found in transposons; one different nucleotide (G and C) separates them, from either side of the putative MIC. The reason for this unusual feature is still unknown and may simply be caused by an erosion of the sequence due to the lack of conservative pressure. Finally, there is no gene that encodes a transposase, which suggests that the gene was lost or provided in *trans*. Concerning the functionality of the operon, we determined that the strain HER1084 has a minimum inhibitory concentration for formaldehyde of 0,01% comparatively to 0,0025% for the strains 01-B526 and JF3791. This result suggests that the detoxification system encoded by the operon *fmrAB* on pAsaXII is functional. Since strains 01-B526 (standard repertoire of plasmids) and JF3791 (which possesses pAsa7, a derivative of pAsa2) are more sensitive than strain HER1084 (which bears pAsaXII), it is possible to consider that standard plasmids (pAsa1, pAsa2, pAsa3, pAsa1 and pAsa5) or pAsa7 do not confer resistance to formaldehyde even if it is impossible to rule out other strain-specific characteristics.

Use of formaldehyde as a disinfectant for surfaces goes back at least at the end of the 19th century (Harrington, 1897). In aquaculture, it has been employed to treat or prevent fungal infections, and external parasites of fish or their eggs (Bills *et al.*, 1977). It has also been widely used to treat fish before their introduction into a new farm. As for antibiotics, resistance genes against this molecule exist, and as described in this study can be transferred with plasmids and/or other mobile genetic elements. Consequently, even if, to our knowledge, formaldehyde has not been used to cure furunculosis, the bacterium already possesses a mechanism to resist, likely caused by the years of formaldehyde's employment in prophylactic treatments.

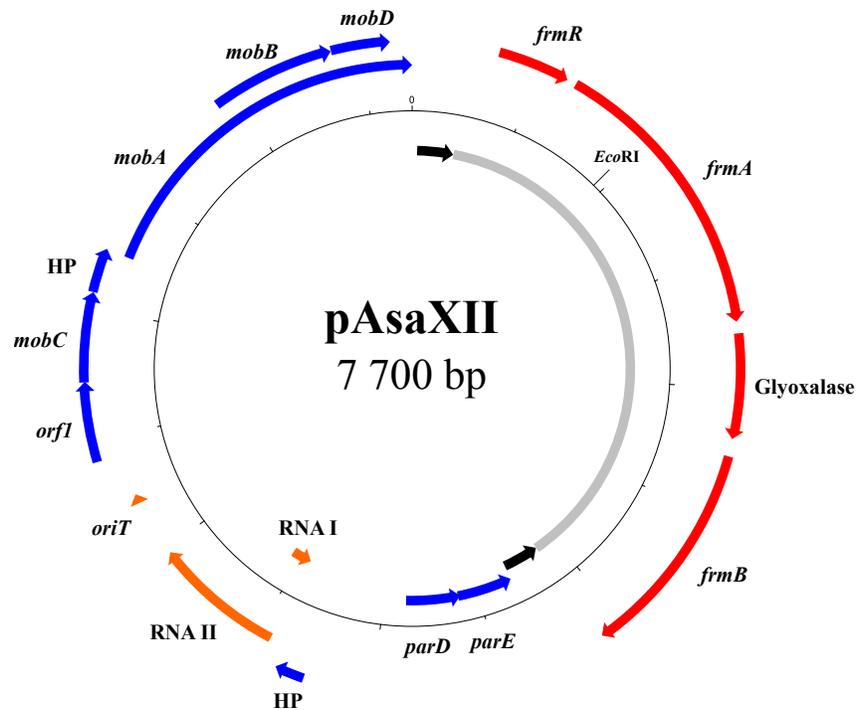


Figure 17 : Map of pAsaXII plasmid.

Almost half of plasmid pAsaXII is occupied by a formaldehyde detoxification system (grey zone) flanked by two IRs (black arrows). Like pAsaXI, a MIC-like element interrupts the STOP codon of the gene *parE* encoding a toxin. The genes of the mobile genetic element are shown in red, the pseudogene in turquoise, the genes of the backbone in blue, and the RNAs and *oriT* in orange.

2.6. CRYPTIC PLASMIDS: A WAY FOR GENETIC INNOVATION IN *A. SALMONICIDA* SUBSP. *SALMONICIDA*?

As previously described (Attéré *et al.*, 2015), the presence of the cryptic plasmids and their potential modifications (SNPs and InDels) were investigated in the strains bearing the new plasmids (Table S3). Interestingly, identical mutations to those found before have been identified (Attéré *et al.*, 2015). pAsa2 in strain HER1084 (pAsaXII carrier) has been modified, as the one in strain RS1752, and presents a duplication of 43 bp in an intergenic region. Moreover, analyses suggest that this region could form stem loop structures, which are characteristic of regulatory regions (Figure S1). Since this strain bears pAsaXII, variant of pAsa2, it would be possible that it is a way for the plasmid to be maintained in the

bacterium. Concerning pAsa3, this plasmid remains the one in which there are the most mutations.

Since their discovery, cryptic plasmids are known as plasmids without assigned functions (Boyd *et al.*, 2003). pAsa1, pAsa2 and pAsa3 only bear the genes necessary for their mobilization, replication, and stability. Some ORFs are still not characterized, but since the number of sequenced and available genomes is increasing in many databases, indications can be found about possible domains that are present on the proteins encoded by *orf2* and *orf3* of plasmid pAsa2. Indeed, the protein obtained from *orf2* would have a RES domain hence the name come from three residues (arginine, glutamate and serine) that would be involved in the formation of an active site (pfam: 08808). A helix-turn-helix domain would be found on the protein encoded by the gene *orf3*. This domain suggests the ability of this protein to bind DNA (pfam: 127280). For *orf1* and *orf4*, to date, no information of this type can be found. But the presence of *orf1* on plasmids of many bacterial species (based on BLAST analyses) may lead us to think that this is a conserved gene, which probably has an important role for the plasmids. In any case, the lack of information about these ORFs may contribute to our partial comprehension of the real roles of cryptic plasmids, and subsequent investigations should be conducted to determine the precise functions of each of these ORFs.

Nevertheless, the pAsaXI and pAsaXII plasmids described in this study present new clues about the potential functions of cryptic plasmids, and for pAsa2, about *orf2* and *orf3*. Since these new plasmids share backbones with pAsa3 and pAsa2 respectively, we compared them with the “original” cryptic plasmids and their variants (Figure 18). For the ColE1-type replicon plasmids (pAsa2 and its variants pAsa7 and pAsaXII) the region including *orf2* and *orf3* is lost in the derivatives of pAsa2. Indeed, this lost part has been replaced by a DNA segment including the gene *cat* for pAsa7 (Vincent *et al.*, 2016a), and by the putative MIC bearing the detoxification system for formaldehyde in pAsaXII. This observation suggests that *orf2* and *orf3* are non-essential for pAsa7 and pAsaXII plasmids, and/or that the proteins produced by these ORFs are brought in *trans* by plasmid pAsa2, since it is present in the strains that bear pAsa7 and pAsaXII.

For ColE2-plasmids (pAsa1, pAsa3, pAsa11 and pAsaXI), the comparison permitted the same conclusion as for ColE1-plasmids: a specific region tends to be lost or modified easily. Effectively, the *relEB* TA system and *orf4* are replaced in pAsa11 by the *ISAS11* and gene *aopP* while in pAsaXI, gene *relE* is interrupted by a transposon that bears a virulence factor (Figure 18).

The replicon of pAsa3 had already been used to create a vector, pSDD1, to perform molecular biology assays in *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014a). This ColE1-type vector was shown to be unstable and is lost when bacterial strains that carry it are cultured for 24 h without selection (without ampicillin). Knowing that pAsaXI and pAsaXII are derivatives of small cryptic plasmids, like pSDD1, it was relevant to verify their stability. Opposite to pSDD1, both pAsaXI and pAsaXII are stable in their natural hosts, even after 7 days of culture without selection. This result was expected since these plasmids were naturally found in *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, while pSDD1 is a laboratory-made chimeric plasmid.

Confronted with different environments, the bacterium *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* seems to have found a way to adapt itself: using the cryptic plasmids present in its genome to acquire new beneficial genes. Considering several points, this could be a “winning” strategy for the bacterium: 1) a gain facing environmental conditions which can be lethal for the bacterium (antibiotics, disinfectant, etc.), 2) a zero or minimal requirement for any metabolism adaptation because cryptic plasmids used as moldable vectors are already borne by the microorganism, 3) stability of the plasmids in the bacterial cells provides consequently, in a certain way, a large retention of the acquired advantage, and 4) these plasmids are in high copy number and consequently so are the genes they bear (Vincent *et al.*, 2016a).

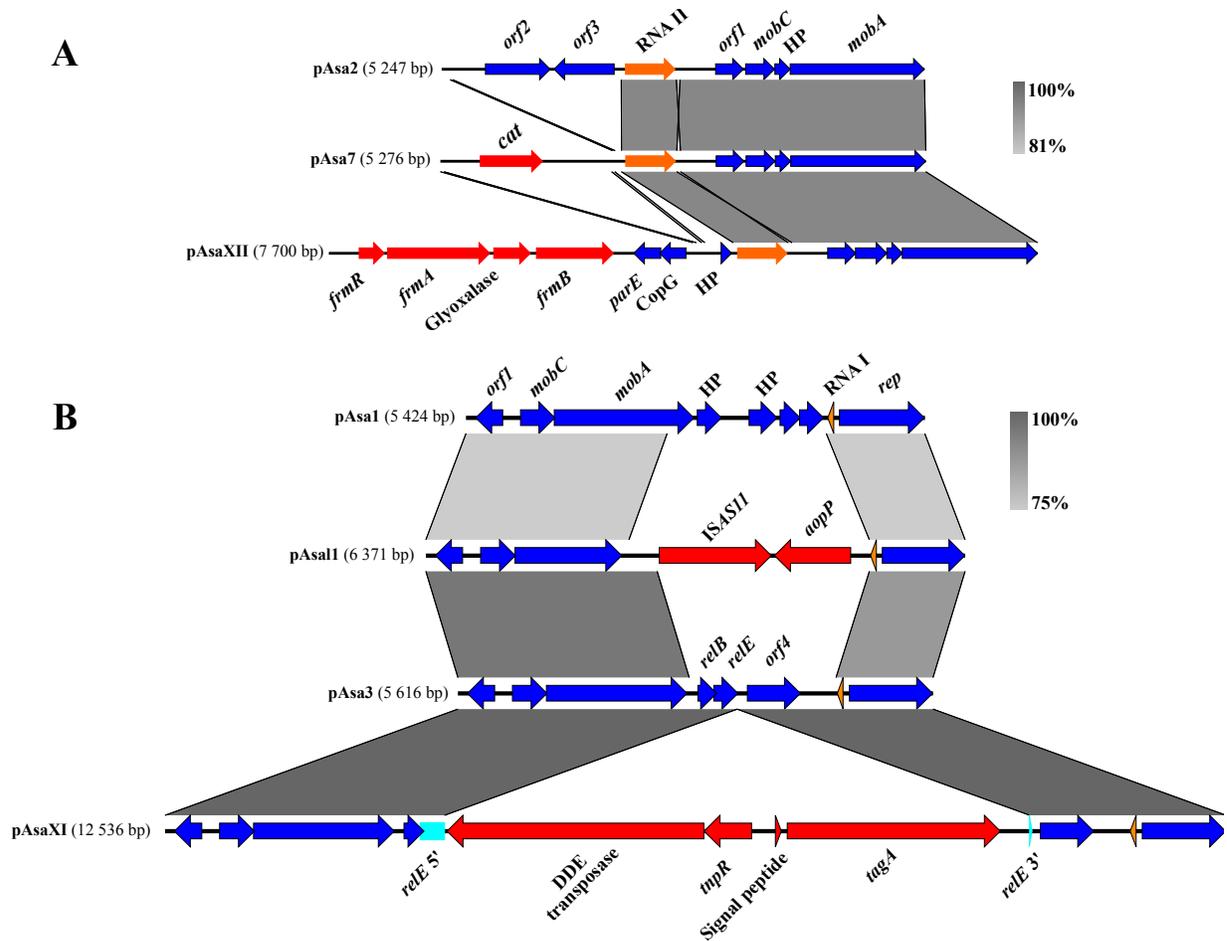


Figure 18 : Sequence comparisons of some ColE1- and ColE2-plasmids of *A. salmonicida*.

A. In the case of pAsa2 and its derivatives pAsa7 and pAsaXII (ColE1 plasmids), the region of *orf2* and *orf3* are substituted by a chloramphenicol resistance gene or a formaldehyde detoxification system, respectively. **B.** For pAsa3 (ColE2), genes *relE*, *relB* and *orf4* are included in the region that can likely be modified or replaced. The genes of the mobile genetic element are shown in red, the pseudogene in turquoise, the genes of the backbone in blue, and the RNAs in orange.

2.7. CONCLUSION

The highlighting of the three new plasmids pAsa10, pAsaXI and pAsaXII of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* demonstrated once again the genome plasticity of this fish pathogen. The spread of the Tn1721 in this bacterium, shown with pAsa10, constitutes a new way to resist tetracycline. The presence of pAsaXI and pAsaXII, variants of the small cryptic plasmids pAsa3 and pAsa2 respectively, demonstrated the high capacity of *A.*

salmonicida to exchange plasmids with other species. Moreover, they showed the potential role of these cryptic plasmids as moldable vectors for acquisition of new beneficial genes, facilitating the adaptation of the carrier strains to different environments.

2.8. AUTHOR CONTRIBUTIONS

SA, AV and SC designed the research protocol. SA and MP performed the experiments. SA and AV analyzed the data. SA, AV, MF and SC wrote the paper.

2.9. FUNDING

AV and SA received a scholarship from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). This project was supported by grants from NSERC, Ressources Aquatiques Québec, and the Innovamer Program of the Québec Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation. SC is a research scholar of the Fonds de Recherche du Québec - Santé.

2.10. ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Laboratoire de bactériologie clinique, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal (Montreal, QC, Canada), the Félix d'Hérelle Reference Center (Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique, Université Laval, Quebec City, QC, Canada), and the Aquatic Animal Health Department, Fisheries and Oceans Canada (Moncton, NB, Canada) for the *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* isolates.

2.11. SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1: Characterization of 22 Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* for their small plasmids and antibiotic resistance genes.

Name of the strain	Fish	Organ	Plasmids					Antibiotic resistance genes								
			pAsa				Atypical profile	<i>sul</i>		<i>floR</i>	<i>cat</i>	<i>tet</i>				
			1	2	3	11		1	2			<i>A(E)</i>	<i>A</i>	<i>A(C)</i>	<i>H</i>	<i>G</i>
SHY15-1459	Rainbow trout	Kidney	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-1543	Brook trout	Kidney	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-1846	Brook trout	Kidney	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-1847	Arctic char	Kidney	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-2589	Arctic char	Kidney	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-2743	Rainbow trout	Kidney	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SHY15-1998	Brook trout	Kidney	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-2405	Brook trout	Kidney	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-2407	Brook trout	Kidney	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-2461	N/A	N/A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-2816	Brook trout	Kidney	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-2951	Brook trout	Kidney	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY16-4166	N/A	N/A	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY16-4688	N/A	N/A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-5108	Brook trout	Kidney	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-3738	Brook trout	Kidney	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-4029	Brook trout	Furuncle	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-3379	Brook trout	Kidney	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-3412	Brook trout	Furuncle	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-3138	Brook trout	Kidney	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-3292	Brook trout	Kidney	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHY15-2950	Brook trout	Kidney	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table S2: Assembly information about the three plasmids.

Plasmid	Strain	Length (bp)	GC (%)	Number of reads	Coverage (x)
pAsa10	SHY15 2743	9995	61	7961	148.65
pAsaXI	2004-208	12536	55	11481	171.94
pAsaXII	HER1084	7700	55	4056	108.04

Table S3: Sequence differences (SNPs and InDels) found in the small plasmids of the three strains further analyzed in this study.

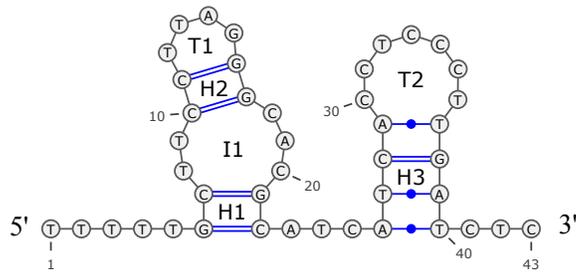
Isolate (new plasmid)	pAsa1	pAsa2	pAsa3	pAsa11
2004-208 (pAsaXI variant of pAsa3)				
SHY15 2743 (pAsa10)			Insertion G (1458) C>G (2838) in <i>rep</i> and causes a (P->A) C>G (2859) in <i>rep</i> and causes a (P->A) G>T (3056) in HP and causes a (R->S) Synonymous in <i>mobA</i> , A->C (5136) in <i>mobB</i> and causes a (E->A)	G->C (1448) in <i>mobA</i> and causes a (E->Q) A->G (1450) in <i>mobA</i> and causes a (E->Q)
HER1084 (pAsaXII variant of pAsa2)		Extension of 43 pb	C>G (2838) in <i>rep</i> and causes a (P->A) C>G (2859) in <i>rep</i> and causes a (P->A) Synonymous in <i>mobA</i> , A->C (5136) in <i>mobB</i> and causes a (E->A)	

Legend:

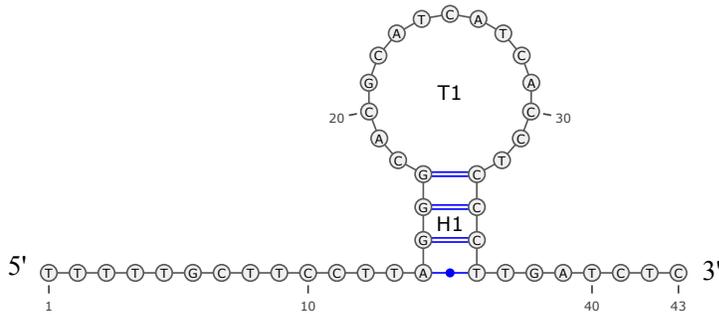
Present and OK

Absent

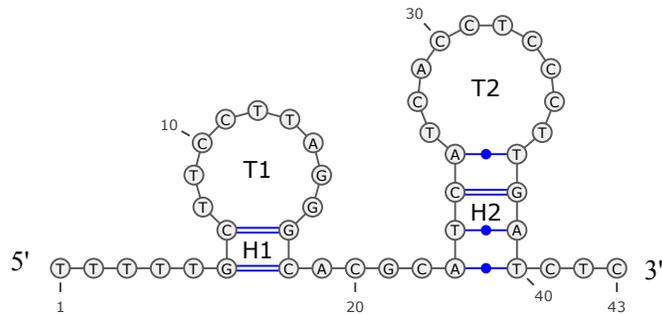




Structure 1
 $\Delta G = -3.79$ kcal/mol



Structure 2
 $\Delta G = -3.57$ kcal/mol



Structure 3
 $\Delta G = -3.40$ kcal/mol

Figure S1: Predicted structures of the duplication of 43 bp in the modified-pAsa2 of strain HER1084.

For this sequence located in the intergenic region of the plasmid pAsa2, three predicted structures are proposed with mfold software at 18°C (Zuker, 2003). The nomenclature used is the one of Leontis & Westhof (Leontis and Westhof, 2001). The ‘H’, ‘I’ and ‘T’ mean, respectively, ‘Helix’, ‘Internal loop’ and ‘Terminal loop’. The change in free energy (ΔG) required for the DNA sequence to hybridize in kilocalories per mole ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, where 1 kcal=4184 J) is given for each structure.

CHAPITRE 3

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les plasmides jouent des rôles importants dans la capacité d'adaptation des bactéries, notamment lorsqu'elles se trouvent dans des conditions qui leur sont défavorables. La diversité de ceux présents dans la bactérie *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* lui permet de faire face aux différents environnements auxquels elle peut être confrontée. Ainsi, parmi les plus répandus, il est possible de compter les plasmides vecteurs de résistance aux antibiotiques qui peuvent être de grande (Tableau III) ou de petite taille (Tableau IV). Ils favorisent l'antibiorésistance et constituent un obstacle au traitement durable de la furonculose utilisant ce type d'approche. Par ailleurs, les plasmides porteurs de facteurs de virulence contribuent également à la pérennité de ce microorganisme puisque les plasmides pAsa5 et pAsa1, porteurs de gènes codant pour le SSTT et pour un effecteur de ce même système respectivement, sont présents chez la plupart des souches étudiées jusqu'à maintenant (Attéré *et al.*, 2015; Boyd *et al.*, 2003; Daher *et al.*, 2011; Najimi *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2017; Trudel *et al.*, 2013).

La dernière catégorie de plasmides à être connue, et à laquelle aucune fonction n'a encore été rattachée, est celle des plasmides cryptiques (Belland and Trust, 1989; Boyd *et al.*, 2003). Ces plasmides (pAsa1, pAsa2 et pAsa3) sont hautement conservés, non seulement à travers le temps, mais également à travers l'espace puisqu'ils sont retrouvés dans la plupart des souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* étudiées à travers le monde (Attéré *et al.*, 2015; Belland and Trust, 1989; Najimi *et al.*, 2008; Trudel *et al.*, 2013). L'universalité de ces plasmides et l'absence d'utilité apparente font en sorte que la raison de leur présence se pose. Ce projet avait donc pour but d'aller plus loin dans la réflexion sur le rôle de ces plasmides, à partir de l'analyse des petits plasmides des souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* de la collection du laboratoire Charette, agrandie par l'arrivée d'une vingtaine de nouvelles souches provenant de la FMV, au moment de l'avancement de ce projet.

3.1. LES PLASMIDES CRYPTIQUES, VECTEURS MODELABLES POUR L'INNOVATION GÉNÉTIQUE CHEZ *A. SALMONICIDA* SSP. *SALMONICIDA* ?

3.1.1. De nouveaux dérivés des plasmides cryptiques

Depuis sa mise en évidence (Fehr *et al.*, 2006), le plasmide pAsa11 était le seul plasmide connu comme étant putativement dérivé du plasmide cryptique pAsa3 (Boyd *et al.*, 2003). Avec une identité nucléotidique d'environ 70 %, ces deux plasmides diffèrent du fait de la présence dans pAsa11 du gène *aopP*, codant pour un effecteur du SSTT, et de l'*ISAS11* (Boyd *et al.*, 2003; Fehr *et al.*, 2006). S'il est fait abstraction de ces deux éléments, les deux plasmides ont une identité nucléotidique nettement supérieure (Figure 18). Près d'une quinzaine d'années s'écoule avant que ne soit trouvé pAsa7, un nouveau petit plasmide qui intéresse d'abord à cause du phénotype de résistance au chloramphénicol *via* sa présence (Vincent *et al.*, 2016a). Or, il apparaît également, après analyses bio-informatiques, qu'il s'agit d'un dérivé du plasmide cryptique pAsa2 (Vincent *et al.*, 2016a). Le plasmide pAsa7 est alors le deuxième dérivé de plasmide cryptique à être mis en lumière après pAsa11. L'hypothèse est alors émise que les plasmides cryptiques puissent servir de vecteurs modelables pour l'élaboration de nouveaux plasmides.

Avec ce projet, la mise en évidence des plasmides pAsaXI et pAsaXII, dérivés respectifs de pAsa3 et pAsa2, semble confirmer cette hypothèse. Il est certain que le faible nombre de plasmides différents mis en évidence fait en sorte que cette piste est encore embryonnaire. Malgré ce fait, les évidences que les plasmides cryptiques puissent être des modèles pour donner de nouveaux plasmides s'accumulent. Ainsi, deux dérivés de pAsa2 et pAsa3 existent, tandis qu'il n'y en avait qu'un seul de connu jusqu'à tout récemment. Le terme de *plasmide(s) modelable(s)* sera d'ailleurs désormais employé tout au long de cette discussion pour faire référence aux plasmides cryptiques ayant servi de modèles (en l'occurrence les plasmides pAsa2 et/ou pAsa3).

Concernant les fonctions acquises par les dérivés pAsa7, pAsaXI et pAsaXII, il est intéressant de constater qu'elles semblent apporter des avantages à la bactérie, probablement confrontée à des environnements particuliers. En effet, chacun de ces plasmides supportent respectivement des gènes de résistance à un antibiotique, des gènes

codant pour un facteur de virulence putatif et un système de détoxification du formaldéhyde permettant ainsi à la bactérie de faire probablement face à une pression de sélection dans un environnement donné ou contenant la molécule toxique. Chez pAsa11, le gène (*aopP*) qui code pour un effecteur du SSTT est un facteur de virulence dirigé contre l'hôte de la bactérie, c'est-à-dire le poisson. Ainsi, les fonctions portées par les dérivés pAsa7, pAsaXI et pAsaXII, pourraient-elles être davantage des capacités afin de faire face à un environnement donné ou bien plutôt des fonctions acquises pour persister dans la bactérie et être transmises même une fois cet environnement quitté ? Leur seule présence, alors qu'ils ont été extraits de souches cultivées sur des milieux sans sélection appropriée, indiquerait que la seconde proposition pourrait être valable. De plus, l'évolution de pAsa11 pourrait éventuellement donner une indication quant à l'avenir de ces dérivés. Effectivement, ce plasmide est présent dans la plupart des isolats étudiés, cohabitant habituellement avec son plasmide modelable (Attéré *et al.*, 2015; Belland and Trust, 1989; Najimi *et al.*, 2008; Trudel *et al.*, 2013). Plusieurs éléments pourraient constituer des pistes expliquant cela. Premièrement, la fonction assurée par pAsa11 (la virulence) présente peut-être un avantage plus important que d'autres fonctionnalités qui fait en sorte que la bactérie tire un bénéfice à le conserver. Ensuite, si l'implantation de ce plasmide s'est produite il y a longtemps, est-ce que les mutations accumulées depuis ce moment par rapport au plasmide modelable augmente sa stabilité. Et enfin, si l'hypothèse que les plasmides modelables sont effectivement à l'origine de l'innovation, ce qui est nouveau et bénéfique (pAsa11) ne prendrait-il pas l'avantage au détriment de l'ancien (pAsa3), faisant en sorte qu'il nous est possible d'observer présentement cette transition ?

La localisation de l'innovation génétique dans les dérivés est également indicatrice des gènes potentiellement accessoires pour les plasmides cryptiques. Ainsi, dans pAsa7 et pAsaXII, dérivés de pAsa2, les *orfs2* et *orfs3* sont manquants tandis que dans le cas de pAsaXI et pAsa11, il semblerait que le gène de la toxine, *relE*, ainsi que la région proche, soient davantage susceptibles d'être perdus ou modifiés (Figure 18). En ce qui concerne particulièrement ce dernier cas, soit l'insertion de transposons dans *relE* ou *parE* (Figure 16 et Figure 17) codant pour les toxines des systèmes TA respectifs relEB et parDE, il est intéressant de se pencher sur l'influence de ces derniers dans le maintien des plasmides dans les cellules hôtes. En effet, rendus probablement inefficaces, ils ne peuvent donc plus

assurer cette fonction de dépendance sur la bactérie afin qu'elle conserve le plasmide. Par conséquent, un ou plusieurs autres mécanismes pourraient alors prendre le relais du système TA. Ainsi, son rôle chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* serait, éventuellement, d'être un mécanisme de soutien plutôt que d'être prépondérant dans le maintien de la stabilité plasmidique. D'ailleurs, il a été démontré récemment que le mécanisme intervenant dans la répartition et la transmission des plasmides à haut nombre de copies aux cellules-filles faisait intervenir le nucléoïde de la bactérie (Reyes-Lamothe *et al.*, 2014). En effet, au cours de la division cellulaire, les plasmides migreraient aux pôles de la cellule, là où le nucléoïde ne se serait pas déployé, assurant ainsi leurs maintien et transmission à la génération suivante.

3.1.2. Perspectives

Le nombre de dérivés différents trouvés, bien qu'en augmentation, demeure cependant faible afin de pouvoir établir avec certitude le rôle d'innovation des plasmides cryptiques. Conséquemment, la détermination des profils plasmidiques de nouvelles souches, au cours des prochaines années, permettra probablement d'étoffer les preuves actuellement existantes. De plus, pAsa1 est le seul plasmide cryptique pour lequel aucun dérivé n'a encore été découvert. De ce fait, en trouver un ou plusieurs viendrait conforter un peu plus solidement cette nouvelle piste.

Bien que la virulence de la souche porteuse du plasmide pAsaXI a pu être démontrée avec l'amibe *Dictyostelium discoideum* (résultat non montré), la part de cette virulence attribuable au plasmide n'a cependant pas pu être établie. Conséquemment, réaliser des tests de virulence permettant de connaître plus précisément le pouvoir virulent relatif à ce plasmide seraient l'étape suivante au présent projet. En ce qui concerne pAsaXII, il serait intéressant de l'introduire dans une souche sensible au formaldéhyde et voir comment évolue la résistance au formaldéhyde de cette dernière.

Poursuivre la caractérisation des *orfs* dont les protéines et fonctions sont inconnues permettrait également d'en savoir davantage sur leurs rôles chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* mais également pour d'autres bactéries. Modifier les plasmides en mutant les

régions d'intérêt ou en obtenant des plasmides par délétion des régions d'intérêts par PCR seraient des stratégies envisageables pour ce but (Imai *et al.*, 1991).

3.2. MUTATIONS DANS LES PETITS PLASMIDES STANDARDS

3.2.1. Polymorphismes récurrents

Lors de la dernière étude menée sur la diversité des petits plasmides d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, plusieurs polymorphismes (*SNPs* et *InDels*) ont été mis en évidence chez les plasmides cryptiques et pAsa11 (Attéré *et al.*, 2015). Il était intéressant de constater que ces modifications se retrouvaient dans des souches différentes et que le plasmide pAsa3 était celui qui en présentait le plus. La même analyse a donc été menée sur les petits plasmides des trois souches (SHY15 2743, 2004-208, et HER1084) ayant permis de mettre en évidence les plasmides pAsa10, pAsaXI et pAsaXII. Tout d'abord, il est possible d'arriver aux mêmes observations que précédemment : le plasmide pAsa3 est le plus sujet aux mutations et les patrons trouvés dans la première étude sont retrouvés également dans la seconde. Ensuite, en ce qui concerne pAsa3 particulièrement, un élément, passé inaperçu jusqu'alors, semble se démarquer. Dans la première analyse (Attéré *et al.*, 2015), les polymorphismes diffèrent entre les plasmides présents dans les souches d'origine québécoise et européenne : une mutation non-synonyme (arginine (R) à sérine (S)), à la position 3 056 dans l'*orf1* - encore non caractérisé à ce jour - est retrouvée exclusivement dans les pAsa3 des souches québécoises tandis que les polymorphismes des pAsa3 européens sont beaucoup plus différents.

Or, en examinant les patrons des pAsa3 des souches SHY15 2743 et HER1084 (Tableau V), cette hypothèse semble bien se confirmer pour cette dernière (souche isolée en France d'une truite), mais pas pour la souche SHY15 1743 (québécoise). Effectivement, le pAsa3 de la souche HER1084, présente les mêmes mutations que celui de la souche de référence A449 alors que le pAsa3 de la souche SHY15 1743 présente à la fois la mutation « d'origine québécoise » R/S, mais aussi les mutations « européennes », en plus d'une insertion qui lui est propre (Tableau V) ; ce qui suggérerait que le plasmide pAsa3 de cette souche soit le résultat d'un transfert entre souches européennes et québécoises. Si la mutation R/S s'avère être une signature des souches québécoises, il est alors intéressant de s'interroger sur l'origine de ces souches : s'agit-il réellement de souches d'*A. salmonicida*

ssp. *salmonicida* différentes ou bien serait-il possible qu'il puisse s'agir d'une seule souche, propre au Québec et qui se propage à travers les poissons infectés ?

Tableau V : Polymorphismes récurrents dans les petits plasmides standards de différentes souches.

En vert, les plasmides non altérés et en orange, ceux qui sont absents. En gras, les souches du présent projet. Adapté de Attéré *et al.* (2015).

Isolat	pAsa1	pAsa2	pAsa3	pAsa11	Région piscicole*
Souches d'origine québécoise					
RS 1752		Extension de 43 pb			NA
01-B526		G->A (192)			E
M11743-09			G->T (3056) dans HP et cause un (R->S)		A
M16474-11			G->T (3056) dans HP et cause un (R->S)		B
M19878-11			G->T (3056) dans HP et cause un (R->S)		B
M22710-11			G->T (3056) dans HP et cause un (R->S)		A
M13566-12				Délétion de 184 pb dans <i>mobA</i> (1630..1813)	C
SHY13 2222			G->T (3056) dans HP et cause un (R->S)		D
SHY15 2743			Insertion G (1458) C>G (2838) dans <i>rep</i> et cause un (P->A) C>G (2838) dans <i>rep</i> et cause un (P->A) G->T (3056) dans HP et cause un (R->S) Synonyme dans <i>mobA</i> , A->C (5136), dans <i>mobB</i> et cause un (E->A)	G->C (1448) dans <i>mobA</i> et cause un (E->Q) A->G (1450) dans <i>mobA</i> et cause un (E->Q)	E
Souches d'origine européenne					
RS 534			C->A dans <i>mobA</i> et <i>mobB</i> (5136), synonyme dans <i>mobA</i> mais (A->E) dans <i>mobB</i>		NA
JF3791	C->T (3270)				
JF2506			Délétion de 16 pb (4793..4808) dans <i>mobA</i> et <i>mobB</i>	pAsa11C	
A449			G->C (2838 and 2859) dans <i>rep</i> , causant dans les deux (A->P) C->A dans <i>mobA</i> et <i>mobB</i> (5136), synonyme dans <i>mobA</i> mais (A->E) dans <i>mobB</i>		

Isolat	pAsa1	pAsa2	pAsa3	pAsa1	Région piscicole*
JF2267	NA	NA	NA	C->G (1448) et G->A (1450), même codon dans <i>mobA</i> (Q->E)	
JF2507			G->T (3435)	pAsa1D	
JF3517		C->T (2796)			
HER1084		Extension de 43 pb	C>G (2838) dans <i>rep</i> et cause un (P->A) C>G (2859) dans <i>rep</i> et cause un (P->A) Synonymous in <i>mobA</i> , A->C (5136) in <i>mobB</i> and causes a (E->A)		

NA : non applicable.

* Les régions piscicoles ont été identifiées de façon arbitraire afin de conserver la confidentialité des données.

À l'exception de la région piscicole D, la localisation géographique des autres régions d'où proviennent ces souches indique qu'elles sont voisines, suggérant potentiellement le fait qu'il s'agisse d'une même souche. Les polymorphismes du plasmide pAsa3 pourraient éventuellement servir à retracer à l'avenir l'origine géographique des souches isolées. Par ailleurs, si cette hypothèse de *SNPs* et *InDels* caractéristiques de l'origine géographique de la souche est appliquée également au plasmide pAsa1, les mutations de ce plasmide dans la souche SHY15 1743 (Tableau V) apporteraient une preuve supplémentaire d'un éventuel transfert, puisqu'il présente le même patron de mutations que le pAsa1 de la souche européenne JF2267 (Tableau V) (Attéré *et al.*, 2015).

Cependant, à cette hypothèse de polymorphismes dépendants de l'origine de la souche, il est aussi possible d'opposer celle consistant à établir qu'ils en sont indépendants. Par conséquent, ces patrons pourraient relever plutôt de l'évolution convergente et donc être des traits homoplasiques. Ainsi, ces patrons existent et sont caractéristiques de la façon dont évolue certaines régions du plasmide pAsa3, en l'occurrence *mobA*, *mobB*, *rep*, et *l'orf1*, et ceci quel que soit le lieu d'où provient la souche isolée.

Les deux études confondues, les plasmides pAsa1 et pAsa2 sont beaucoup moins mutés que le plasmide pAsa3. Ainsi, un seul patron est répertorié pour le plasmide pAsa1 (Attéré *et al.*, 2015) alors que trois différents ont été observés pour le plasmide pAsa2. D'ailleurs, un

de ces patrons est retrouvé dans la souche HER1084, dans laquelle pAsaXII, dérivé de pAsa2 a été isolée (Tableau V). Il s'agit d'une séquence de 43 pb dupliquée dans une région, *a priori*, intergénique et comprise entre l'ARN II et l'*oriT*. Or, puisqu'il a été démontré que les réplicons de type ColE1 peuvent coexister lorsque des mutations sont faites dans la région des ARN régulateurs (Camps, 2010), la présence de ce polymorphisme pourrait être une façon trouvée par le plasmide pour être conservé, malgré la présence de son dérivé. Si une telle hypothèse s'avérait exacte, ceci voudrait dire que la souche RS 1752 aurait pu avoir dans son plasmidome, un autre plasmide de type ColE1 qui aurait été perdu.

3.2.2. Perspectives

Afin de pouvoir confirmer l'hypothèse de l'origine géographique reliée à un certain patron de mutations dans pAsa3, l'idéal serait de pouvoir séquencer tous les pAsa3 de la collection qui comprend désormais plus de 200 souches. Cependant, afin de contourner l'obstacle que pourrait représenter le coût d'une telle démarche, une approche consisterait à amplifier par PCR de courtes régions d'intérêt, soit aux alentours des bases préférentiellement mutées, puis de séquencer par la méthode de Sanger les courts amplicons obtenus. Cette stratégie pourrait ensuite être appliquée, notamment au plasmide pAsa11. Ainsi, la confirmation de cette théorie pourrait être employée à suivre l'évolution des ou de la souche(s) québécoise(s) à l'origine de la furonculose dans la province de Québec.

3.3. LA PROPAGATION DE Tn1721 AU QUÉBEC À SURVEILLER ?

3.3.1. Tn1721, un transposon en expansion ?

Le transposon Tn1721, support de la résistance à la tétracycline, a été retrouvé pour la deuxième fois chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, dans le cadre de cette étude sur le plasmide pAsa10. Contrairement à pAsa8 où il est présent dans son intégralité et interrompu par d'autres éléments d'ADN mobiles (Trudel *et al.*, 2016), le Tn1721 de pAsa10 ne comporte que la partie assurant la résistance à la tétracycline ainsi que sa régulation. Le mécanisme précis de formation de ce transposon n'est toujours pas élucidé à ce jour et celui qui a permis la formation du Tn1721 partiel de pAsa10 l'est encore moins. Toutefois, complet ou partiel, la fonctionnalité de résistance à la tétracycline est assurée et risque de poser un problème conséquent, en cas notamment d'une propagation plus

importante de ce transposon dans les souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* dans la province de Québec.

En effet, les métadonnées relatives aux souches porteuses de ces deux plasmides indiquent, notamment, que les régions piscicoles du Québec où elles ont été isolées sont voisines. Par ailleurs, ce transposon a été mis en évidence récemment, dans un nouveau plasmide dont la caractérisation reste à faire (Anna Schneider, communication personnelle). Et, comme pour les plasmides pAsa8 et pAsa10, il a été isolé d'une souche trouvée à l'été 2016 dans une truite mouchetée d'une région piscicole voisine aux deux autres. Ceci pourrait éventuellement traduire une propagation de ce transposon dans cette partie de la province, probablement dû au fait que les pisciculteurs s'échangent les poissons entre eux (Morin, 2010). Or, si l'expansion de ce transposon, par le biais des petits plasmides, devait se généraliser, l'antibiothérapie par l'oxytétracycline risque de ne plus être du tout efficace ; les antibiotiques autorisés par le Québec étant peu nombreux (Tableau II).

3.3.2. Perspectives

D'un point de vue épidémiologique, il serait intéressant de confirmer ou non la potentielle corrélation existante entre la région piscicole et les souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* porteuses de Tn1721. Dans la mesure où cette hypothèse a été formulée à partir d'un petit nombre d'échantillons, les prochaines campagnes d'échantillonnage et/ou la mise en place d'une campagne systématique pourraient s'avérer être des outils précieux afin de pouvoir étudier ce phénomène plus précisément. De plus, la détection par PCR du Tn1721 serait un moyen de pouvoir trouver le point de départ de cette propagation et constituerait une étape importante afin d'éviter une plus grande dispersion de l'antibiorésistance favorisée par ce transposon. Enfin, mettre en place une traçabilité en ce qui concerne les échanges de poissons pourrait permettre de mieux retrouver les régions où ce transposon serait présent. Autrement, connaître aussi le mécanisme précis par lequel le Tn1721 peut devenir partiel, en laissant « préférentiellement » la région *tet* permettrait probablement de mieux comprendre pourquoi certaines souches seraient peut-être plus susceptibles d'intégrer cette partie du transposon.

3.4. CAPACITÉ DE TRANSFERT D'*A. SALMONICIDA* SSP. *SALMONICIDA*

Bien que pAsaXI et pAsaXII soient des dérivés des plasmides cryptiques, ils sont également identiques à des plasmides trouvés respectivement dans les bactéries *Shewanella baltica* et *Aeromonas bivalvium*. Ceci indique qu'il y a eu, au cours de l'évolution, transfert de ces plasmides d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* à ces microorganismes ou inversement. Il est aussi possible de noter que d'autres plasmides sont aussi le résultat d'un échange entre *A. salmonicida* et d'autres espèces ; par exemple, pAB5S9b proviendrait d'un transfert horizontal avec *Aeromonas bestiarum* ou encore pAr-32 de celui avec *Aeromonas hydrophila* (Aoki *et al.*, 1986; Vincent *et al.*, 2014). Ainsi, *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* semble avoir une haute capacité à échanger son matériel génétique. Certes, il ne s'agit pas d'une caractéristique exclusive à ce microorganisme néanmoins, il demeure intéressant de comprendre les raisons d'une telle capacité. Tout d'abord, il s'agit d'une bactérie aquatique. Par conséquent, elle est probablement confrontée à une diversité importante d'autres espèces bactériennes. Ensuite, il s'agit d'une bactérie dont le pan-génome, c'est-à-dire l'ensemble des gènes de cœur (*core-genome*), accessoires et spécifiques à l'espèce, est ouvert (Vincent and Charette, 2017). Ceci suggère donc qu'elle est davantage permissive en ce qui concerne les transferts de plasmides, compte tenu, entre autres, de son environnement. Enfin, l'ADN de ces plasmides n'est pas la cible d'un système tel que les systèmes CRISPR-Cas (Garneau *et al.*, 2010) ou de restriction/modification, capables de cliver notamment l'ADN plasmidique, puisque ceux-ci ne sont pas présents ou n'ont pas encore été découverts chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*.

Investiguer avec davantage de précision, les mécanismes et conditions avec lesquels les transferts horizontaux fonctionnent chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* pourrait éventuellement paver la voie à une nouvelle alternative pour contrer la furonculose. En effet, si s'en débarrasser s'avère difficile, trouver un moyen efficace de limiter sa capacité à échanger pourrait être une nouvelle possibilité pour ralentir son évolution.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, C. A., Austin, B., Meaden, P. G., and McIntosh, D. (1998). Molecular characterization of plasmid-mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonas salmonicida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4194–4201.
- Allmeier, H., Cresnar, B., Greck, M., and Schmitt, R. (1992). Complete nucleotide-sequence of Tn1721 - gene organization and a novel gene-product with features of a chemotaxis protein. *Gene* 111, 11–20. doi:10.1016/0378-1119(92)90597-i.
- Aoki, T., Egusa, S., Kimura, T., and Watanabe, T. (1971). Detection of R Factors in naturally occurring *Aeromonas salmonicida* strains. *Appl. Microbiol.* 22, 716–717.
- Aoki, T., Mitoma, Y., and Crosa, J. H. (1986). The characterization of a conjugative R-plasmid isolated from *Aeromonas salmonicida*. *Plasmid* 16, 213–218. doi:10.1016/0147-619X(86)90059-4.
- Attéré, S. A., Vincent, A. T., Trudel, M. V, Chanut, R., and Charette, S. J. (2015). Diversity and homogeneity among small plasmids of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* linked with geographical origin. *Front. Microbiol.* 6, 1274. doi:10.3389/fmicb.2015.01274.
- Austin, B., and Austin, D. A. (2016). “Aeromonadaceae Representative (*Aeromonas salmonicida*),” in *Bacterial Fish Pathogens* (Springer International Publishing), 215–321. doi:10.1007/978-3-319-32674-0.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., *et al.* (2008). The RAST server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9, 75. doi:10.1186/1471-2164-9-75.
- Belland, R. J., and Trust, T. J. (1989). *Aeromonas salmonicida* plasmids - Plasmid-directed synthesis of proteins in vitro and in *Escherichia coli* minicells. *J. Gen. Microbiol.* 135, 513–524. doi:10.1099/00221287-135-3-513.

- Bernoth, E.-M. (1997). "Furunculosis: the history of the disease and of disease research," in *Furunculosis: Multidisciplinary Fish Disease Research*, 1–20. doi:10.1016/B978-012093040-1/50003-8.
- Bills, T. D., Marking, L. L., and Chandler Jack H., J. (1977). Formalin: its toxicity to nontarget aquatic organisms, persistence, and counteraction.
- Boyd, J., Williams, J., Curtis, B., Kozera, C., Singh, R., and Reith, M. (2003). Three small, cryptic plasmids from *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* A449. *Plasmid* 50, 131–144. doi:10.1016/s0147-619x(03)00058-1.
- Bullock, G. L., Cipriano, R. C., and Snieszko, S. F. (1983). Furunculosis and other diseases caused by *Aeromonas salmonicida*.
- Burkardt, H. J., Mattes, R., Schmid, K., and Schmitt, R. (1978). Properties of 2 conjugative plasmids mediating tetracycline resistance, raffinose catabolism and hydrogen-sulfide production in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 166, 75–84. doi:10.1007/bf00379731.
- Cameron, B., Guilhot, C., Blanche, F., Cauchois, L., Rouyez, M. C., Rigault, S., *et al.* (1991). Genetic and sequence analyses of *Pseudomonas denitrificans* DNA fragment containing 2 *cob* genes. *J. Bacteriol.* 173, 6058–6065. doi:10.1128/jb.173.19.6058-6065.1991.
- Camps, M. (2010). Modulation of ColE1-like plasmid replication for recombinant gene expression. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 4, 58–73. doi:10.2174/187221510790410822.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2227–2238. doi:10.1128/AAC.01707-08.
- Chen, N. H., Djoko, K. Y., Veyrier, F. J., and McEwan, A. G. (2016). Formaldehyde stress responses in bacterial pathogens. *Front Microbiol* 7, 257. doi:10.3389/fmicb.2016.00257.

- Cohen, S. N., and Chang, A. C. (1973). Recircularization and autonomous replication of a sheared R-factor DNA segment in *Escherichia coli* transformants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 1293–1297.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., and Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 3240–3244. doi:10.1073/pnas.70.11.3240.
- Coil, D., Jospin, G., and Darling, A. E. (2015). A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics* 31, 587–589. doi:10.1093/bioinformatics/btu661.
- Dacanay, A., Knickle, L., Solanky, K. S., Boyd, J. M., Walter, J. A., Brown, L. L., *et al.* (2006). Contribution of the type III secretion system (TTSS) to virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Microbiology-Sgm* 152, 1847–1856. doi:10.1099/mic.0.28768-0.
- Daher, R. K., Filion, G., Tan, S. G. E., Dallaire-Dufresne, S., Paquet, V. E., and Charette, S. J. (2011). Alteration of virulence factors and rearrangement of pAsa5 plasmid caused by the growth of *Aeromonas salmonicida* in stressful conditions. *Vet. Microbiol.* 152, 353–360. doi:10.1016/j.vetmic.2011.04.034.
- Dallaire-Dufresne, S., Emond-Rheault, J. G., Attéré, S. A., Tanaka, K. H., Trudel, M. V., Frenette, M., *et al.* (2014a). Optimization of a plasmid electroporation protocol for *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*. *J. Microbiol. Methods* 98, 44–49. doi:10.1016/j.mimet.2013.12.019.
- Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V., Lafaille, A., and Charette, S. J. (2014b). Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet. Microbiol.* 169, 1–7. doi:10.1016/j.vetmic.2013.06.025.

- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., and Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 434–464.
- DFO-MPO (2015). Statistiques sur l'aquaculture. Available at: <http://dfo-mpo.gc.ca/aquaculture/sector-secteur/stats-fra.htm> [Accessed August 5, 2017].
- Duff, D. C. B. (1942). The oral immunization of trout against *Bacterium Salmonicida*. *J. Immunol.* 44, 87–94.
- Emmerich, R., and Weibel, E. (1890). Über eine durch Bakterien verursachte. *Allg. Fischerei-Zeitung*, 13.
- FAO (2016). La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2016. Contribuer à la sécurité alimentaire et à la nutrition de tous.
- FAO (2017). Available at: <http://www.fao.org/fishery/topic/16140/fr> [Accessed August 5, 2017].
- Fehr, D., Casanova, C., Liverman, A., Blazkova, H., Orth, K., Dobbelaere, D., *et al.* (2006). AopP, a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida*, inhibits the NF-kappa B signalling pathway. *Microbiology-Sgm* 152, 2809–2818. doi:10.1099/mic.0.28889-0.
- Fiebig, A., Castro Rojas, C. M., Siegal-Gaskins, D., and Crosson, S. (2010). Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin-antitoxin systems. *Mol. Microbiol.* 77, 236–251. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07207.x.
- Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, M. P., Latorre, A., Drainas, C., and De La Cruz, F. (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 79–100. doi:10.1016/j.femsre.2003.09.001.
- Garneau, J. E., Dupuis, M.-E., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., *et al.* (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468, 67–71. doi:10.1038/nature09523.

- Gotfredsen, M., and Gerdes, K. (1998). The *Escherichia coli relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol. Microbiol.* 29, 1065–1076. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00993.x.
- Gratia, A. (1925). “Sur un remarquable exemple d’antagonisme entre deux souches de colibacille,” in *Comptes rendus hebdomadaires des séances de la Société de biologie et de ses filiales* (Paris), 1040–1041.
- Gubbins, E. J., Newlon, C. S., Kann, M. D., and Donelson, J. E. (1977). Sequence organization and expression of a yeast plasmid DNA. *Gene* 1, 185–207. doi:10.1016/0378-1119(77)90045-2.
- Gutsell, J. S. (1948). The value of certain drugs, especially sulfa drugs, in the treatment of furunculosis in brook trout, *Salvelinus Fontinalis*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 75, 186–199. doi:10.1577/1548-8659(1945)75[186:TVOCDE]2.0.CO;2.
- Hallez, R., Geeraerts, D., Sterckx, Y., Mine, N., Loris, R., and Van Melderen, L. (2010). New toxins homologous to ParE belonging to three-component toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* 76, 719–732. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07129.x.
- Harrington, C. (1897). Formaldehyde as a practical disinfectant. *J Bost. Soc Med Sci* 2, 26–28.
- Hayes, F., and Van Melderen, L. (2011). Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 46, 386–408. doi:10.3109/10409238.2011.600437.
- Herring, C. D., and Blattner, F. R. (2004). Global transcriptional effects of a suppressor tRNA and the inactivation of the regulator frmR. *J Bacteriol* 186, 6714–6720. doi:10.1128/jb.186.20.6714-6720.2004.
- Hiney, M., Smith, P., and Bernoth, E.-M. (1997). “3 - Covert *Aeromonas salmonicida* Infections,” in *Furunculosis*, 54–97. doi:10.1016/B978-012093040-1/50006-3.

- Imai, Y., Matsushima, Y., Sugimura, T., and Terada, M. (1991). A simple and rapid method for generating a deletion by PCR. *Nucleic Acids Res.* 19, 2785. doi:10.1093/nar/19.10.2785.
- Janda, J. M., and Abbott, S. L. (2010). The Genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 35–73. doi:10.1128/cmr.00039-09.
- Jensen, R. B., and Gerdes, K. (1995). Programmed cell-death in bacteria - proteic plasmid stabilization systems. *Mol. Microbiol.* 17, 205–210. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17020205.x.
- L'Abée-Lund, T. M., and Sørum, H. (2002). A global non-conjugative Tet C plasmid, pRAS3, from *Aeromonas salmonicida*. *Plasmid* 47, 172–181. doi:10.1016/s0147-619x(02)00001-x.
- L'Abée-Lund, T. M., and Sørum, H. (2000). Functional Tn5393-Like transposon in the R plasmid pRAS2 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* isolated in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5533–5535. doi:10.1128/AEM.66.12.5533-5535.2000.
- L'Abée-Lund, T. M., and Sørum, H. (2001). Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. *Microb. Drug Resist.* 7, 263–72. doi:10.1089/10766290152652819.
- Lafaille, A. (2015). Rapport des activités en Ichtyopathologie. St-Hyacinthe.
- Lafaille, A. (2016). Rapport des activités en Ichtyopathologie. St-Hyacinthe.
- Lafaille, A. (2017). Rapport des activités en Ichtyopathologie. St-Hyacinthe.
- Lathem, W. W., Grys, T. E., Witowski, S. E., Torres, A. G., Kaper, J. B., Tarr, P. I., *et al.* (2002). StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157 : H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol. Microbiol.* 45, 277–288. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02997.x.

- Lederberg, J. (1952). Cell Genetics and Hereditary Symbiosis. *Physiol. Rev.* 32, 403–430.
- Leontis, N. B., and Westhof, E. (2001). Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *Rna* 7, 499–512. doi:10.1017/S1355838201002515.
- Lilly, J., and Camps, M. (2015). Mechanisms of theta plasmid replication. *Microbiol. Spectr.* 3. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0029-2014.
- Loftie-Eaton, W., and Rawlings, D. E. (2010). Evolutionary competitiveness of two natural variants of the IncQ-like plasmids, pRAS3.1 and pRAS3.2. *J Bacteriol* 192, 6182–6190. doi:10.1128/jb.00176-10.
- Mahillon, J., and Chandler, M. (1998). Insertion Sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 725–774.
- MAPAQ (2012). Available at: <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/peche/aquaculture/Pages/aquaculture.aspx> [Accessed August 5, 2017].
- MAPAQ (2016). Pêches et aquaculture commerciales au Québec - En un coup d’œil.
- Maslow, A. H. (1943). A theory of human motivation. *Psychol. Rev.* 50, 370–396. doi:10.1037/h0054346.
- Michiels, T., Vanooteghem, J. C., Derouvroit, C. L., China, B., Gustin, A., Boudry, P., et al. (1991). Analysis of virC, an Operon Involved in the Secretion of Yop Proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 173, 4994–5009. doi:10.1128/jb.173.16.4994-5009.1991.
- Minana-Galbis, D., Farfan, M., Carme Fuste, M., and Gaspar Loren, J. (2007). *Aeromonas bivalvium* sp nov., isolated from bivalve molluscs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 582–587. doi:10.1099/ij.s.0.64497-0.
- Morin, R. (2007). Production piscicole au Québec.

- Morin, R. (2010). L'utilisation des antibiotiques pour combattre la furonculose chez l'omble de fontaine génère de l'antibiorésistance chez *Aeromonas salmonicida*. *L'Aquicole* 15, 1–5.
- Morin, R., Uhland, C., and Lévesque, G. (2004). L'utilisation des antibiotiques en pisciculture au Québec. *L'Aquicole* 9, 1–15.
- Najimi, M., Balado, M., Lemos, M. L., and Osorio, C. R. (2009). Genetic characterization of pAsa6, a new plasmid from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* that encodes a type III effector protein AopH homolog. *Plasmid* 61, 176–181. doi:10.1016/j.plasmid.2009.01.001.
- Najimi, M., Lemos, M. L., and Osorio, C. R. (2008). Distribution of small plasmids in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* strains isolated from NW Spain and Portugal: evidence of clonality in strains isolated from turbot, *Psetta maxima*(L.). *J Fish Dis* 31, 469–472. doi:10.1111/j.1365-2761.2007.00896.x.
- Oberer, M., Zangger, K., Prytulla, S., and Keller, W. (2002). The anti-toxin ParD of plasmid RK2 consists of two structurally distinct moieties and belongs to the ribbon-helix-helix family of DNA-binding proteins. *Biochem. J.* 361, 41–7. doi:10.1042/0264-6021:3610041.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., and Groisman, E. a (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299–304. doi:10.1038/35012500.
- Pillai, L., Sha, J., Erova, T. E., Fadl, A. A., Khajanchi, B. K., and Chopra, A. K. (2006). Molecular and functional characterization of a ToxR-regulated lipoprotein from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 74, 3742–3755. doi:10.1128/iai.00402-06.
- Piotrowska, M., and Popowska, M. (2015). Insight into the mobilome of *Aeromonas* strains. *Front. Microbiol.* 6, 494. doi:10.3389/fmicb.2015.00494.

- Reith, M. E., Singh, R. K., Curtis, B., Boyd, J. M., Bouevitch, A., Kimball, J., *et al.* (2008). The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics* 9, 427. doi:10.1186/1471-2164-9-427.
- Reyes-Lamothe, R., Tran, T., Meas, D., Lee, L., Li, A. M., Sherratt, D. J., *et al.* (2014). High-copy bacterial plasmids diffuse in the nucleoid-free space, replicate stochastically and are randomly partitioned at cell division. *Nucleic Acids Res.* 42, 1042–1051. doi:10.1093/nar/gkt918.
- Rice, P., Longden, I., and Bleasby, A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 16, 276–277. doi:10.1016/S0168-9525(00)02024-2.
- Roberts, R. C., Strom, A. R., and Helinski, D. R. (1994). The *parDE* operon of the broad-host-range plasmid RK2 specifies growth-inhibition associated with plasmid loss. *J. Mol. Biol.* 237, 35–51. doi:10.1006/jmbi.1994.1207.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A., *et al.* (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16, 944–945. doi:10.1093/bioinformatics/16.10.944.
- Salmond, G. P. C., and Reeves, P. J. (1993). Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 18, 7–12. doi:10.1016/0968-0004(93)90080-7.
- Sandaa, R.-A., and Enger, Ø. (1994). Transfer in marine sediments of the naturally occurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4234–4238.
- Schmitt, R., Altenbuchner, J., Wiebauer, K., Arnold, W., Puhler, A., and Schoffl, F. (1981). Basis of transposition and gene amplification by Tn1721 and related tetracycline-resistance transposons. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 45 Pt 1, 59–65. doi:10.1101/SQB.1981.045.01.011.

- Schmitt, R., Bernhard, E., and Mattes, R. (1979). Characterisation of Tn1721, a new transposon containing tetracycline resistance genes capable of amplification. *Mol. Gen. Genet.* 172, 53–65. doi:10.1007/bf00276215.
- Schoffl, F., Arnold, W., Puhler, A., Altenbuchner, J., and Schmitt, R. (1981). The tetracycline resistance transposons TN1721 and TN1771 have 3 38-base-pair repeats and generate 5-base-pair direct repeats. *Mol. Gen. Genet.* 181, 87–94. doi:10.1007/bf00339010.
- Schuster, C. F., and Bertram, R. (2013). Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiol. Lett.* 340, 73–85. doi:10.1111/1574-6968.12074.
- Shao, Y., Harrison, E. M., Bi, D., Tai, C., He, X., Ou, H. Y., *et al.* (2011). TADB: a web-based resource for Type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res* 39, D606-11. doi:10.1093/nar/gkq908.
- Siguier, P., Gourbeyre, E., and Chandler, M. (2014). Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 865–891. doi:10.1111/1574-6976.12067.
- Siguier, P., Gourbeyre, E., Varani, A., Ton-Hoang, B., and Chandler, M. (2015). Everyman's guide to bacterial insertion sequences. *Microbiol. Spectr.* 3. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0030-2014.
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., and Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, D32–D36. doi:10.1093/nar/gkj014.
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., and de la Cruz, F. (2010). Mobility of Plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 434–452. doi:10.1128/MMBR.00020-10.

- Stuber, K., Burr, S. E., Braun, M., Wahli, T., and Frey, J. (2003). Type III secretion genes in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* are located on a large thermolabile virulence plasmid. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3854–3856. doi:10.1128/jcm.41.8.3854-3856.2003.
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., and Beatson, S. A. (2011). Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* 27, 1009–1010. doi:10.1093/bioinformatics/btr039.
- Szabady, R. L., Yanta, J. H., Halladin, D. K., Schofield, M. J., and Welch, R. A. (2011). TagA is a secreted protease of *Vibrio cholerae* that specifically cleaves mucin glycoproteins. *Microbiology-Sgm* 157, 516–525. doi:10.1099/mic.0.044529-0.
- Takechi, S., Matsui, H., and Itoh, T. (1995). Primer RNA synthesis by plasmid-specified Rep protein for initiation of ColE2 DNA replication. *EMBO J.* 14, 5141–5147. doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb00196.x.
- Takechi, S., Yasueda, H., and Itoh, T. (1994). Control of ColE2 plasmid replication: regulation of rep expression by a plasmid-coded antisense RNA. *Mol. Gen. Genet.* MGG 244, 49–56. doi:10.1007/BF00280186.
- Tanaka, K. H., Dallaire-Dufresne, S., Daher, R. K., Frenette, M., and Charette, S. J. (2012). An Insertion Sequence-Dependent Plasmid Rearrangement in *Aeromonas salmonicida* Causes the Loss of the Type Three Secretion System. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0033725.
- Tanaka, K. H., Vincent, A. T., Emond-Rheault, J. G., Adamczuk, M., Frenette, M., and Charette, S. J. (2017). Plasmid composition in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 unravels unsuspected type three secretion system loss patterns. *BMC Genomics* 18, 528. doi:10.1186/s12864-017-3921-1.
- Tanaka, K. H., Vincent, A. T., Trudel, M. V, Paquet, V. E., Frenette, M., and Charette, S. J. (2016). The mosaic architecture of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* pAsa4 plasmid and its consequences on antibiotic resistance. *PeerJ* 4, e2595. doi:10.7717/peerj.2595.

- Tansirichaiya, S., Mullany, P., and Roberts, A. P. (2016). PCR-based detection of composite transposons and translocatable units from oral metagenomic DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, fnw195. doi:10.1093/femsle/fnw195.
- Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G., and Som, T. (1981). Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 1421–1425.
- Toranzo, A. E., and Barja, J. L. (1992). First report of furunculosis in turbot reared in floating cages in northwest Spain. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 12, 147–149.
- Toranzo, A. E., Magariños, B., and Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246, 37–61. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.01.002.
- Trudel, M. V., Tanaka, K. H., Filion, G., Daher, R. K., Frenette, M., and Charette, S. J. (2013). Insertion sequence *AS5* (ISAS5) is involved in the genomic plasticity of *Aeromonas salmonicida*. *Mob. Genet. Elements* 3, e25640. doi:10.4161/mge.25640.
- Trudel, M. V., Vincent, A. T., Attere, S. A., Labbe, M., Derome, N., Culley, A. I., *et al.* (2016). Diversity of antibiotic-resistance genes in canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: dominance of pSN254b and discovery of pAsa8. *Sci. Rep.* 6, 35617. doi:10.1038/srep35617.
- Trzebiatowski, J. R., O'Toole, G. A., and Escalante-Semerena, J. C. (1994). The *cobT* gene of *Salmonella typhimurium* encodes the NaMN: 5,6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase responsible for the synthesis of N¹-(5-phospho-alpha-D-ribose)-5,6-dimethylbenzimidazole, an intermediate in the synthesis of the nucleotide loop of cobalamin. *J. Bacteriol.* 176, 3568–3575. doi:10.1128/jb.176.12.3568-3575.1994.
- Uhland, C. (2003). La médecine vétérinaire et l'aquaculture au Québec. *L'Aquicole* 8.
- Uhland, C. (2004). Maladies communes dans les piscicultures du Québec et interventions vétérinaires. *Le médecin vétérinaire du Québec* 34, 268–274.

- Vanden Bergh, P., and Frey, J. (2014). *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in the light of its type-three secretion system. *Microb Biotechnol* 7, 381–400. doi:10.1111/1751-7915.12091.
- Varshavsky, A. (2004). “Spalog” and “sequelog”: neutral terms for spatial and sequence similarity. *Curr. Biol.* 14, R181–R183. doi:10.1016/j.cub.2004.02.014.
- Vincent, A. T., and Charette, S. J. (2017). Phylogenetic analysis of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* underlines the dichotomy between European and Canadian strains for the *salmonicida* subspecies. *J. Fish Dis.* 40, 1241–1247. doi:10.1111/jfd.12595.
- Vincent, A. T., Emond-Rheault, J.-G., Barbeau, X., Attéré, S. A., Frenette, M., Lagüe, P., *et al.* (2016a). Antibiotic resistance due to an unusual ColE1-type replicon plasmid in *Aeromonas salmonicida*. *Microbiology* 162, 942–953. doi:10.1099/mic.0.000286.
- Vincent, A. T., Trudel, M. V, Freschi, L., Nagar, V., Gagne-Thivierge, C., Levesque, R. C., *et al.* (2016b). Increasing genomic diversity and evidence of constrained lifestyle evolution due to insertion sequences in *Aeromonas salmonicida*. *BMC Genomics* 17, 44. doi:10.1186/s12864-016-2381-3.
- Vincent, A. T., Trudel, M. V, Paquet, V. E., Boyle, B., Tanaka, K. H., Dallaire-Dufresne, S., *et al.* (2014). Detection of variants of the pRAS3, pAB5S9, and pSN254 plasmids in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: multidrug resistance, interspecies exchanges, and plasmid reshaping. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7367–7374. doi:10.1128/aac.03730-14.
- Ziemke, F., Hofle, M. G., Lalucat, J., and Rossello-Mora, R. (1998). Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen’s genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 179–186. doi:10.1099/00207713-48-1-179.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406–3415. doi:10.1093/nar/gkg595.