



Développement d'outils thérapeutiques à base de probiotiques endogènes contre la furonculose (*Aeromonas salmonicida*) chez l'Omble de fontaine d'aquaculture (Phase I – *in vitro*)

Mémoire

Jeff Gauthier

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

Québec, Canada

© Jeff Gauthier, 2016

Résumé

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* est une bactérie à Gram négatif responsable de la furonculose, une infection opportuniste des salmonidés d'élevage représentant en moyenne de 30 à 60 % des diagnostics annuels posés au Québec chez l'Ombre de fontaine aquicole (*Salvelinus fontinalis*). Les méthodes de traitement actuelles contre la furonculose reposent essentiellement sur l'antibiothérapie et l'immunoprophylaxie. Cependant, l'usage intensif d'antibiotiques en aquaculture contribue à l'émergence de souches pathogènes d'*A. salmonicida* antibiorésistantes (certaines résistant à jusqu'à 8 antibiotiques). De plus, les effets secondaires associés à l'antibiothérapie et la vaccination peuvent causer des altérations maladaptives des interactions hôte-microbiote, en défaveur des bactéries résidentes de l'hôte qui contribuent à la résistance aux infections. C'est pourquoi l'administration de symbiotes bactériens endogènes à des hôtes sensibles en tant que traitement probiotique semble être une solution prometteuse. L'objectif de ce projet de maîtrise était d'initier la recherche et le développement d'un traitement à base de probiotiques endogènes pour prévenir et traiter la furonculose chez l'Ombre de fontaine. Dans le cadre de ce projet, des souches de *Pseudomonas* spp. endogènes de l'Ombre de fontaine ont été découvertes sur la base de leur effet d'antagonisme marqué et inductible vis-à-vis *A. salmonicida*. L'analyse bio-informatique du génome de ces souches a permis de prédire qu'elles appartiennent à l'espèce *P. fluorescens*, qu'elles sont *a priori* non pathogènes et qu'elles ne portent aucun gène horizontalement transférable de résistance à des antibiotiques homologués au Canada pour usage en aquaculture. Ces souches seraient donc des candidats probiotiques prometteurs pour prévenir et traiter la furonculose chez l'Ombre de fontaine.

Abstract

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* is a Gram-negative bacterium causing furunculosis, an opportunistic disease of farmed salmonids that accounts for 30 to 60% of yearly diagnoses emitted for the brook charr (*Salvelinus fontinalis*) in the Quebec province, Canada. Current treatment methods against furunculosis include antibiotherapy and immunoprophylaxis. However, the intensive use of antimicrobials in aquaculture contributes to the emergence of resistant *A. salmonicida* strains (some of which can resist up to 8 antimicrobials). Moreover, the adverse effects of antibiotherapy and vaccination may cause maladaptive changes in host-microbiota interactions, in disfavour of resident bacteria that contribute to enhance disease resistance. Therefore, using bacterial symbionts as a probiotic treatment appears to be a promising solution to treat furunculosis. The purpose of this Master's project was to pioneer research and development of an endogenous probiotic-based treatment strategy for brook charr against furunculosis. In this project, endogenous *Pseudomonas* spp. strains from brook charr were identified on the basis of their strong and inducible *in vitro* antagonistic effect against *A. salmonicida*. Bioinformatic analyses of those strains' genome sequence predicted that: (i) they belong to the *P. fluorescens* species group, (ii) they are non-pathogenic *a priori*, and (iii) they harbor no horizontally-transferable genes that confer resistance to antibiotics approved for use in aquaculture in Canada. These *P. fluorescens* strains therefore are promising probiotic candidates for *in vivo* trials on live brook charr.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xix
Avant-propos	xxi
1 - Introduction	1
1.1 – Mise en contexte	1
1.2 – La furonculose des salmonidés	1
1.3 - Stratégies actuelles contre la furonculose.....	3
Antibiothérapie	3
Vaccination	4
1.4 – Les probiotiques endogènes, une alternative efficace et durable.....	6
Rôle du microbiote dans la résistance aux infections bactériennes	6
Probiotiques : définition et modes d'action.....	7
Pertinence de l'approche probiotique endogène.....	10
2 – Hypothèses.....	13
3 - Objectifs spécifiques	15
4 – Antagonistic effect of autochthonous brook charr bacteria (<i>Pseudomonas</i> spp.) against <i>Aeromonas salmonicida</i> , the etiological agent of salmonid furunculosis	17
Résumé.....	17
Abstract.....	18
4.1 – Introduction.....	19
4.2 – Materials and Methods.....	22
Bacterial strains, sampling and culture conditions	22
Screening for probiotic candidates with agar diffusion assays.....	24
Inducibility assessment with <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> 01-B526 culture supernatants	25
Growth kinetics of selected PCs	26
Bacterial competition assays in liquid medium	26
Presumptive identification of PCs by sequencing of the 16S rRNA gene.....	29

4.3 – Results	30
Autochthonous isolates inhibit growth of <i>A. salmonicida</i> in biofilm-like conditions through diffusible inhibitory compounds	30
In planktonic-like conditions, PCs inhibit <i>A. salmonicida</i> through faster exponential growth.....	32
The diffusible inhibitory effect of PCs is inducible by <i>A. salmonicida</i> extracellular products	38
4.4 – Discussion	41
4.5 – Acknowledgements	47
4.6 – Author Contributions.....	48
4.7 – Conflicts of Interest.....	48
5 – Caractérisation et analyse comparative du pan-génome des candidats probiotiques sélectionnés : prédictions sur leur innocuité et leur mécanisme d'action.....	49
5.1 - Introduction.....	49
5.2 - Matériel et Méthodes	50
Souches, conditions de culture et extractions d'ADN	50
Séquençage de seconde génération	51
Assemblage <i>de novo</i>	52
Identification des CP sélectionnés.....	53
Arrangement et contenu des génomes.....	54
Bases fonctionnelles de l'effet d'antagonisme	55
Évaluation des risques biologiques associés à l'utilisation des CP	56
5.3 – Résultats et discussion.....	58
Les CP sélectionnés appartiennent au groupe-espèce <i>Pseudomonas fluorescens</i>	58
Le génome des CP est <i>a priori</i> dépourvu de plasmides, tout en étant riche en éléments génétiques mobiles	59
Les bases fonctionnelles de l'effet d'antagonisme des CP se situent parmi un grand ensemble de gènes accessoires	65
Les risques biologiques associés à l'utilisation des CP sont faibles.....	70
6- Conclusion	81
7 – Perspectives.....	83
7- Bibliographie.....	85
Annexe A – Script GetContigCoverage.pl.....	95
Les dépendances.....	95
Comment exécuter le script.....	95
Le code du script	95
Annexe B – Pipeline AccessoryGenome.pl v1.0	99

B.1 – Exemple de fichier de sortie (format CSV).....	99
B.2 – Arborescence du script et des modules	99
B.3 – Script principal ./AccessoryGenome.pl.....	100
Les dépendances	100
B.4 – Module ./scripts/1-gbk-extract.pl	103
B.5 – Module ./scripts/2-parse-results.pl	106
Annexe C – Analyse comparative détaillée du contenu en gènes de virulence.....	109
C.1 – Script VFDB_search.sh.....	109
Les dépendances	109
Comment exécuter le script	109
Le code du script.....	109
C.2 – Script insert_vfs_into_comparison.pl	110
Les dépendances	110
Comment exécuter le script	110
Le code du script.....	110
C.3 – Table comparative détaillée	112
Description.....	112
La table détaillée.....	112

Liste des tableaux

Table 1. Antibiotiques autorisés pour traiter la furonculose des salmonidés au Canada.	5
Table 2. Autochthonous bacteria from brook charr exhibiting diffusible inhibitory effect on agar against <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> 01-B526.....	31
Table 3. Susceptibility of ten <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> strains to selected PC in agar diffusion assays.....	33
Table 4. Identity matrix between partial 16S rRNA gene sequence pairs of selected PCs..	34
Table 5. Antagonistic index (AI%) of selected PCs against A449-GFP in liquid broth competition assays.	37
Table 6. Matrice d'identité nucléotidique moyenne (ANI, %) entre les génomes des CP <i>Pseudomonas fluorescens</i> Iso11A, Iso11B et Iso13, la souche témoin neutre <i>P. fluorescens</i> CPM15 et plusieurs génomes de référence appartenant au genre <i>Pseudomonas</i>	60
Table 7. Principales statistiques d'assemblage <i>de novo</i> du génome des souches bactériennes de cette étude.	61
Table 8. Principales caractéristiques des <i>scaffolds</i> présents en plus d'une copie dans le génome des CP et du témoin antagoniste neutre.	63
Table 9. Prophages intacts présents dans le génome des souches bactériennes analysées dans cette étude.....	64
Table 10. Topologie et contenu en gènes des génomes des CP <i>Pseudomonas fluorescens</i> Iso11A, Iso11B, Iso13, et la souche témoin antagoniste neutre <i>P. fluorescens</i> CPM15, comparés à des souches probiotiques ou de biocontrôle d'intérêt.	66
Table 11 (partie 1/2). Tableau comparatif du contenu en gènes de virulence de plusieurs génomes de <i>Pseudomonas</i> , incluant les souches de cette étude (encadré noir).....	72
Table 12. Fréquence des annotations CARD de gènes d'antibiorésistance chez les candidats probiotiques de cette étude et des agents de biocontrôle ou probiotiques commerciaux.	76
Table 13. Validation expérimentale des résistances aux antibiotiques autres que les mécanismes d'efflux chez les CP et la souche témoin antagoniste neutre de cette étude.....	77
Table 14. Gènes de virulence ou d'antibiorésistance des candidats probiotiques de cette étude qui sont situés dans des îlots génomiques (GEI) ou des prophages.	79

Liste des figures

Fig. 1. Modes d'action des probiotiques chez l'humain.....	9
Fig. 2. Relative abundance of <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449-GFP while co-cultured in liquid broth with pure probiotic candidate cultures in different mix ratios.....	36
Fig. 3. Relative abundance of <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449-GFP while co-cultured [1:1] in liquid broth with probiotic candidate mixtures.....	39
Fig. 4. Growth curves of positively-screened probiotic candidates <i>Pseudomonas</i> spp. Iso11A, Iso11B and Iso13, and neutral control strain <i>Pseudomonas</i> sp. CPM15.....	40
Fig. 5. Effect of prior exposure to <i>A. salmonicida</i> 01-B526 ECPs on the diffusible inhibitory effect of PCs <i>Pseudomonas</i> spp. Iso11A, Iso11B and Iso13 in biofilm-like conditions.....	42
Fig. 6. Diagramme de Venn du pan-génomique des candidats probiotiques <i>Pseudomonas fluorescens</i> Iso11A, Iso11B, Iso13 et le témoin antagoniste neutre <i>P. fluorescens</i> CPM15.....	67
Fig. 7. Distribution des gènes encodant des protéines présents chez les CP <i>P. fluorescens</i> Iso11A, Iso11B et Iso13, mais absents chez <i>Pseudomonas</i> sp., selon le niveau de détail des annotations sur leur fonction moléculaire et les catégories fonctionnelles dont ils font partie.....	68
Fig. 8. Représentation circulaire du chromosome des CP sélectionnés <i>Pseudomonas fluorescens</i> Iso11A, Iso11B, Iso13 et du témoin antagoniste neutre <i>P. fluorescens</i> CPM15.....	78

Liste des abréviations

ACIA	Agence canadienne d'inspection des aliments
ADNdb	ADN double brin
ADNr	gène d'ARN ribosomique
AI%	<i>antagonistic index</i> (%) (Indice d'antagonisme)
ANI	<i>average nucleotide identity</i> (Identité nucléotidique moyenne)
AQC2	<i>aquacultural containment level 2</i> (Niveau de confinement aquacole 2)
ARNr	ARN ribosomique
CARD	<i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i> (Base de données compréhensive de la résistance aux antibiotiques)
CP	candidat probiotique
ECP	<i>extracellular product</i> (produit extra-cellulaire)
FAO	<i>Food and Agriculture Organisation</i> (Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture)
FCI	Fondation canadienne pour l'innovation
GEI	<i>genomic island</i> (îlot génomique)
I/P	intra-péritonéal
kb	kilobases (1 000 pb)
MAPAQ	Ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation du Québec
MDR	<i>multidrug resistance</i> (résistance multi-drogues)
Mb	mégabases (1 000 000 pb)
NJDEP	<i>New Jersey Department of Environmental Protection</i> (Ministère de la protection de l'environnement du New Jersey)
nt	nucléotide
ORF	<i>open reading frame</i> (Phase ouverte de lecture)
pb	paire de bases
PC	<i>probiotic candidate</i> (Candidat probiotique)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Réaction de polymérase en chaîne)
SDS	sodium dodécyl sulfate
SORDAC	Société de recherche et de développement en aquaculture continentale Inc.
VFDB	<i>Virulence Factor Database</i> (Base de données des facteurs de virulence)
WGS	<i>whole-genome shotgun</i> (Séquence génomique à fragmentation initiale aléatoire)
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Organisation mondiale de la santé)

À mes deux muses :

Karine...

...et la Science (avec un grand S).

*« Il n'existe pas de sciences appliquées, mais bien
des applications de la science. »*

- Louis Pasteur

L'approche probiotique endogène en une citation :

« Pourquoi chercher ailleurs ce que l'on a déjà chez soi ? »

-Boursault

Remerciements

J'offre mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche Nicolas Derome et à mon codirecteur Steve Charette, pour m'avoir confié non seulement un projet de maîtrise, mais toute une opportunité d'appliquer mes compétences à la résolution d'une problématique majeure en aquaculture, et surtout, de m'avoir donné l'envie de poursuivre une carrière de chercheur en biologie.

Je tiens aussi à remercier Sébastien Boutin et Martin Llewellyn qui m'ont assisté au démarrage du projet; Laurine Brocard, Typhaine Morvant et Tom Van Acker pour leur assistance dans la réalisation des expériences et la prise de résultats; Michel Frenette, Nadia Aubin-Horth et Roger Lévesque pour les conseils et les avis reçus en lien avec ce projet.

Un grand merci à Antony Vincent qui m'a recommandé à mes directeurs de recherche alors qu'ils cherchaient à qui confier ce projet de maîtrise, en plus de m'avoir substantiellement avisé sur les aspects bio-informatiques du projet.

Finalement, je souligne la contribution financière de la Société de recherche et développement en aquaculture continentale inc. (SORDAC), de Ressources Aquatiques Québec (RAQ) et du Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), laquelle fut essentielle à la réalisation de ce projet de recherche et de développement.

Avant-propos

Le 4^e chapitre de ce mémoire a été soumis le 31 mars 2016 à la revue *Microbiology* : Gauthier J, Brocard L, Charette SJ, Derome N (2016). *Antagonistic effect of autochthonous brook charr bacteria (Pseudomonas spp.) against Aeromonas salmonicida, the etiological agent of salmonid furunculosis*. Je suis le principal concepteur et réalisateur des expériences décrites dans ce chapitre, j'ai rédigé le manuscrit, et je suis l'auteur correspondant de cet article. La coauteure Laurine Brocard (École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique (ONIRIS), 44307 Nantes cedex 3, France) a participé à la conception et à la réalisation des expériences. Les coauteurs Steve J. Charette et Nicolas Derome sont respectivement mes directeur et codirecteur de recherche, et ont contribué de manière substantielle à la conception des expériences et à l'amélioration du manuscrit. L'article était, au moment du dépôt de ce mémoire, en révision par les pairs.

1 - Introduction

1.1 – Mise en contexte

Depuis 2010, les produits de l'aquaculture représentent plus du tiers des poissons consommés par année, une proportion qui ne cesse d'augmenter depuis les dix dernières années (FAO/OMS, 2012). Cette hausse de la production piscicole est attribuable à la croissance démographique et à la consommation de poisson *per capita*, laquelle était aussi en croissance. En 2012, la famille des Salmonidés représentait en masse 85,5 % de la production aquacole de poisson au Québec, pour une valeur totale de 1 951 000 \$. L'Ombre de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) représentait 95 % de la masse produite, dont la majeure partie était destinée au marché de l'ensemencement (Pêches et océans Canada, 2013). Cependant, de nombreuses pertes économiques sont encore attribuables aux maladies infectieuses qui sévissent en milieu aquacole. Parmi ces maladies infectieuses, la furonculose des Salmonidés figure parmi les plus ravageuses, en représentant en moyenne de 30 à 60 % des diagnostics annuels posés chez l'Ombre de fontaine aquicole au Québec par le Service vétérinaire de l'Université de Montréal (Morin, 2010).

1.2 – La furonculose des salmonidés

L'agent étiologique de la furonculose, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, est une Gammaprotéobactérie psychrophile qui infecte principalement les Salmonidés (Austin & Austin, 2012). Ce bacille est doté d'une myriade de facteurs de virulence et de multiples résistances aux antibiotiques transmissibles horizontalement (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014; Vincent *et al.*, 2014). De plus, l'importante plasticité génomique d'*A. salmonicida* sous-tend de grandes variations inter-souches en terme de virulence et d'antibiorésistance

(Nash *et al.*, 2006; Vincent *et al.*, 2014).

Aeromonas salmonicida cause une bactériémie systémique dans les cas aigus (c.-à-d. bactéries présentes dans le sang) ; les formes chroniques sont caractérisées par des ulcères dermiques et des nécroses importantes dans les tissus musculaires (Bullock *et al.*, 1983). La mortalité associée à la furunculose est très importante et le temps pour intervenir est restreint. Un seul poisson infecté par injection intrapéritonéale peut suffire à décimer jusqu'à 90% d'un bassin de truites de mer en santé (*Salmo trutta* morpha *trutta*) en moins de sept jours (Scott, 1968). En 2014, une épizootie de furunculose à la *Pequest Trout Hatchery*, New Jersey, É.-U. a forcé les autorités environnementales de l'état à euthanasier 114 000 ombles de fontaine (*Salvelinus fontinalis*), ce qui représentait 19 % des stocks de cette pisciculture (NJDEP, 2014).

Bien que *A. salmonicida* soit naturellement présent dans la flore commensale des poissons sauvages en santé (Cahill, 1990), l'Ombre de fontaine d'aquaculture est exposé à des conditions stressantes qui diffèrent considérablement de celles de son habitat naturel. Les principaux facteurs de stress incluent une température supérieure à 17°C (McCormick *et al.*, 1972), une valeur de pH inférieure à 7,1 (Menendez, 1976) et une densité excessive des stocks (Vijayan *et al.*, 1990; Vijayan & Leatherland, 1988, 1990). Chez l'Ombre de fontaine, en particulier, il a été démontré que ces facteurs de stress perturbent la composition taxonomique de sa flore microbienne au détriment des populations probiotiques et commensales (Boutin *et al.*, 2013a). Conséquemment, l'invasion par les bactéries pathogènes est facilitée (Kamada *et al.*, 2013; Stecher *et al.*, 2013). Il paraît donc logique que l'absence de certains symbiontes-clés puisse être un déterminant majeur de la vulnérabilité de l'Ombre de fontaine d'aquaculture à *A. salmonicida*.

1.3 - Stratégies actuelles contre la furonculose

Antibiothérapie

Les antimicrobiens de synthèse sont très répandus en aquaculture commerciale lorsque les solutions prophylactiques habituelles (telles que les vaccins) s'avèrent inexistantes ou inefficaces (Alderman & Hastings, 1998). La popularité des antibiotiques s'explique par leur accessibilité et leur efficacité à court terme. Cependant, l'usage intensif d'antibiotiques en prophylaxie ou comme facteurs de croissance a donné de l'ampleur à une problématique émergente au niveau mondial : la résistance aux antibiotiques. L'Organisation Mondiale de la Santé a prédit qu'une ère « post-antibiotique » pourrait devenir une réalité au cours du présent siècle (OMS, 2014). La problématique est que certaines bactéries peuvent non seulement acquérir la résistance aux antibiotiques, mais aussi la retransmettre. Ce phénomène est favorisé par le mode d'action de ces substances, qui induit une forte pression de sélection positive pour l'antibiorésistance (Kolář *et al.*, 2001; Tello *et al.*, 2012).

Chez le genre *Aeromonas*, la résistance aux antibiotiques est principalement médiée par des plasmides conjugatifs (Inglis *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 2001). Chez *A. salmonicida* plus spécifiquement, la résistance à l'oxytétracycline est véhiculée par un plasmide nommé pSN254b (Vincent *et al.*, 2014). Ce dernier est fortement homologue à un plasmide de résistance aux antibiotiques et au mercure (*mercury and drug resistance – MDR*) décrit initialement chez *Salmonella enterica* serovar Newport SN254 (Welch *et al.*, 2007). Des formes homologues de ce plasmide sont retrouvées chez d'autres espèces d'entérobactéries pathogènes telles que *Yersinia pestis* et *Y. ruckeri* (*Ibid.*). Ceci laisse présager

qu'*A. salmonicida* aurait le potentiel de propager l'antibiorésistance à d'autres espèces de bactéries, ou encore, de l'acquérir. De plus, *A. salmonicida* possède également la faculté d'intégrer des cassettes de gènes à son chromosome en faisant intervenir des intégrons de classe I (L'Abée-Lund & Sørum, 2001). On peut anticiper que la résistance aux antibiotiques finira par épuiser à court terme les recours actuellement utilisés contre la furonculose (**Table 1**). Même si le risque de zoonoses par *A. salmonicida* est considéré comme inexistant (Fosse, 1993), l'acquisition et l'intégration de gènes de résistance pourrait aggraver l'émergence de souches pathogènes d'*A. salmonicida* résistantes, en plus de potentiellement transférer l'antibiorésistance à des agents pathogènes humains (Vincent *et al.*, 2014).

Vaccination

Les principales méthodes de vaccination des salmonidés contre *A. salmonicida* impliquent i) l'utilisation d'antigènes de surface tels que la protéine « A-layer » ou ii) de bactérines (cultures bactériennes mortes, avirulentes ou atténuées) (Mutoloki *et al.*, 2006; Udey & Fryer, 1978; Vaughan *et al.*, 1993). C'est d'ailleurs des bactérines qui sont utilisées dans la plupart des vaccins homologués au Canada pour la vaccination des salmonidés contre la furonculose (Gouvernement du Canada, 2013). Parmi ces vaccins, il existe des formules administrables tant par balnéation (p. ex. *Furogen Dip* (Novartis)) que par injection intrapéritonéale (p. ex. Alpha Ject 4 (Pharmaq)). Les vaccins par balnéation n'induisent pas la production d'anticorps aussi efficacement que les vaccins par injection (Chettri *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2005). Cependant, ces derniers causent des effets secondaires importants chez les Salmonidés. Chez le Saumon atlantique (*Salmo salar*) on constate une réaction

Table 1. Antibiotiques autorisés pour traiter la furunculose des salmonidés au Canada.

Formulation	Classe d'antibiotiques	Statut légal	Taux d'utilisation
TM-Aqua®	Tétracycline	Homologué (1)	Utilisé + +++
Aquaflor®	Florfénicol	Homologué (1)	(le plus utilisé depuis 1999-2000)
Romet-30®	Sulfomethoxazole et triméthoprim	Homologué (1)	Utilisé ++
Érythromycine	-	Non homologué (2), DMU (3)	Peu utilisé -
Baytril	Acide nalidixique	Non homologué (4), UMMDE (5)	N/D

Données et descriptions tirées de Morin, 2010. (1) Le produit est homologué pour utilisation chez les salmonidés d'élevage. (2) L'Érythromycine est un médicament nouveau non approuvé et sans identification numérique. (3) DMU : Autorisation de distribution d'un médicament d'urgence. (4) Le Baytril est non homologué pour utilisation chez les salmonidés d'élevage, par contre il est homologué pour utilisation chez les bovins. (5) L'UMMDE désigne l'utilisation chez un animal, d'une façon non conforme aux directives de l'étiquette d'un médicament homologué par Santé Canada.

inflammatoire dommageable qui peut résulter en une croissance réduite et une qualité de chair moindre (Midtlyng, 1997; Midtlyng & Lillehaug, 1998; Mutoloki *et al.*, 2006).

Tant par balnéation que par injection, les protocoles de vaccination en vigueur présentent des limites importantes : (1) de fortes contraintes de manipulation pour vacciner plusieurs milliers de poissons, (2) une immunité temporaire rendant nécessaires des rappels annuels et (3) une efficacité irrégulière et transitoire (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014; Andrée Lafaille, communication personnelle). Les aspects logistiques liés à la vaccination sont exigeants et nécessitent du personnel qualifié (Komar *et al.*, 2004) en plus d'induire un stress chez les poissons vaccinés pouvant contrebalancer les efforts de vaccination (Mutoloki *et al.*, 2006).

1.4 – Les probiotiques endogènes, une alternative efficace et durable

Rôle du microbiote dans la résistance aux infections bactériennes

Chez les Métazoaires, les cellules de la flore microbienne (*c.-à-d.* le microbiote) seraient, selon les plus récentes estimations, de 1.5 à 2 fois plus nombreuses que les cellules de leur hôte (Sender *et al.*, 2016). La plupart des rôles joués par les symbiotes des Métazoaires sont indispensables à la survie de leur hôte. En effet, des fonctions biologiques aussi diverses et essentielles que la maturation du système immunitaire (Weiss *et al.*, 2011), la digestion de nutriments essentiels à la survie de l'hôte (Brune, 2014), ou encore la détermination sexuelle (Chevalier *et al.*, 2012) dépendent de la présence obligatoire de symbiotes microbiens chez certaines espèces.

Une explication possible de l'indispensabilité de ces rôles est que le métagénome microbien dépasse largement le complément génétique de l'hôte, voire jusqu'à 100 fois (Qin *et al.*,

2010). Ce vaste ensemble de fonctions additionnelles permet au microbiote d'assister, voire d'assumer différentes voies métaboliques à la place de l'hôte (Gerritsen *et al.*, 2011; Holmes *et al.*, 2012), ou encore de contribuer à l'immunité innée et adaptative de ce dernier (Belkaid & Hand, 2014; Maslowski & Mackay, 2010). Cette contribution à l'immunité est non-négligeable, car les symbiontes microbiens agissent des deux côtés de l'interface hôte-pathogène (*c.-à-d.* par interaction soit avec l'hôte ou avec les agents pathogènes) (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Pour toutes ces raisons, l'idée d'administrer des symbiontes bactériens jouant un rôle-clé dans la physiologie de leur hôte (*c.-à-d.* probiotiques endogènes) semble être une solution élégante pour prévenir et traiter les infections opportunistes telles que la furonculose.

Probiotiques : définition et modes d'action

En 2001, l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) définissait les probiotiques comme étant des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, confèrent des effets bénéfiques sur la santé de leur hôte (FAO/OMS, 2001). Souvent, cette appellation désigne une culture soit pure ou mixte de micro-organismes, lesquels sont administrés oralement et peuvent survivre à leur passage dans le tube digestif de l'hôte (*Ibid.*). Les probiotiques peuvent agir aussi bien sur les bactéries pathogènes que sur l'hôte (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). C'est sur cette propriété que réside leur avantage par rapport aux méthodes habituelles de traitement. À l'inverse des substances antimicrobiennes de synthèse, qui ciblent une portion très précise de la machinerie moléculaire de l'agent pathogène (Kahan *et al.*, 1974; Reynolds, 1989; Shinabarger *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1979), les probiotiques peuvent exercer simultanément plusieurs stratégies contre les bactéries pathogènes, de part et d'autre de

l'interface hôte-microbe (**Fig. 1**), par exemple :

- (i) *Création d'un microenvironnement hostile aux agents pathogènes.* Les déchets métaboliques produits par les bactéries du genre *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Bifidobacterium* (tels que l'acide lactique et l'acide acétique) possèdent un fort effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, entre autres, en perméabilisant la membrane externe (Alakomi *et al.*, 2000; Keersmaecker *et al.*, 2006). De manière plus spécifique, certaines souches probiotiques sont connues pour produire des peptides antibactériens (*c.-à-d.* des bactériocines) ainsi que des composés antifongiques tels que le phényl-lactate et l'hydroxyphényl-lactate (Coloretti *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2010).
- (ii) *Renforcement de la barrière épithéliale.* Des probiotiques du genre *Lactobacillus*, ainsi que *Escherichia coli* souche Nissle 1917, ont la capacité d'augmenter les niveaux d'expression de gènes impliqués dans la formation et la maintenance des jonctions serrées (Anderson *et al.*, 2010; Hummel *et al.*, 2012; Zyrek *et al.*, 2007). Des mécanismes de renforcement plus indirects existent aussi, comme chez le probiotique *Lactobacillus rhamnosus* GG qui prévient les dommages induits par des cytokines chez des modèles cellulaires intestinaux humains par l'entremise de facteurs protéiques solubles (Yan & Polk, 2002).

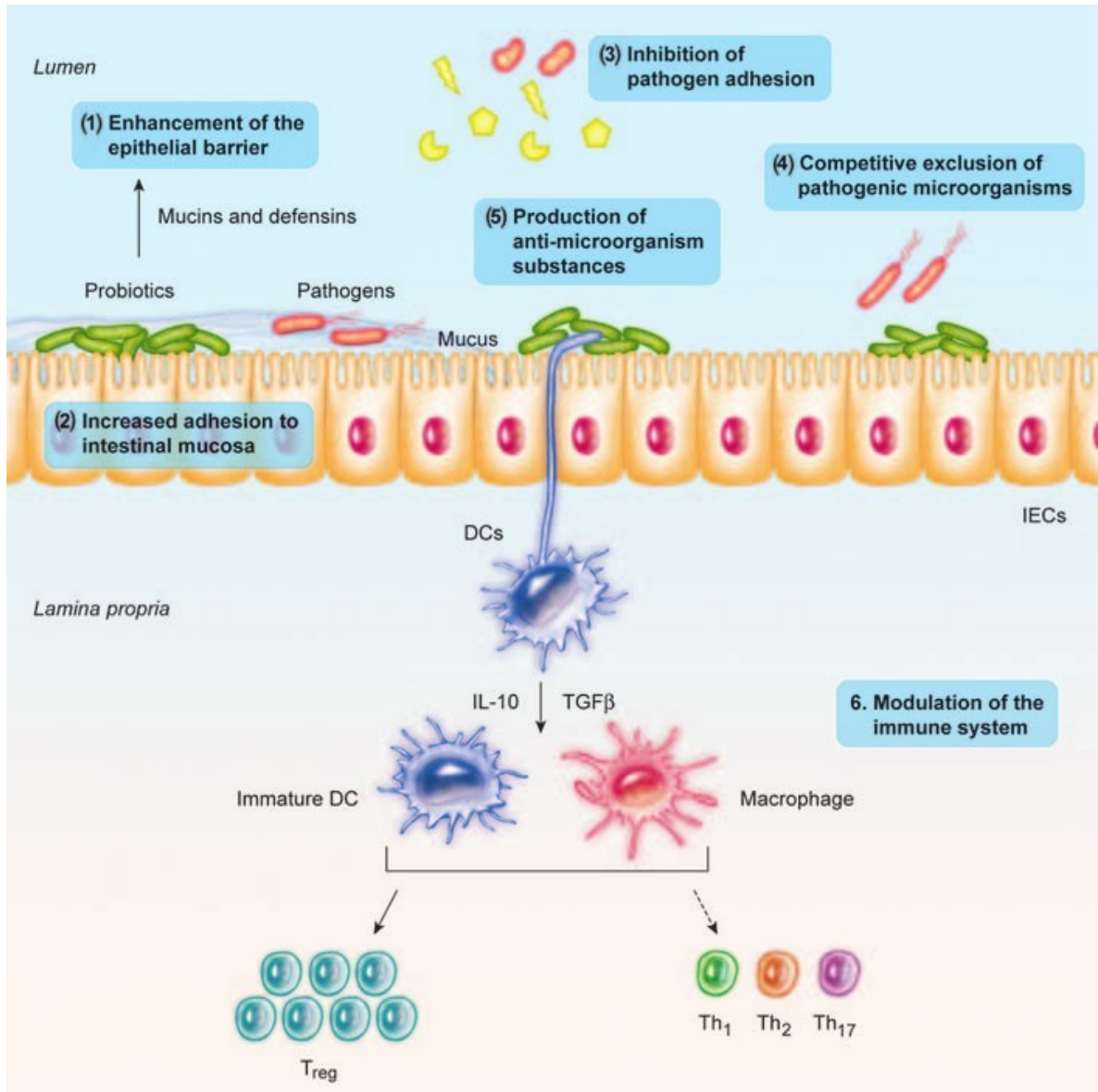


Fig. 1. Modes d'action des probiotiques chez l'humain. Tiré de *Bermudez-Brito et al. (2012)*. DC, cellules dendritiques; IEC, cellules épithéliales de l'intestin; IL-10, interleukine 10; TGFβ, facteur de croissance de transformation bêta. T_{reg}, lymphocyte T régulateur; Th_(1, 2, 17), lymphocytes T "helper" 1, 2 et 17.

- (i) *Modulation de la réponse immunitaire innée de l'hôte.* Certains probiotiques (particulièrement chez le genre *Lactobacillus*) stimulent l'immunotolérance chez leur hôte par l'interaction avec les récepteurs de patrons moléculaires microbiens de leur hôte (Shida *et al.*, 2009; Wells, 2011). Chez l'Humain, il est possible qu'une carence en ce type d'interactions soit l'un des facteurs responsables de maladies inflammatoires intestinales telles que la maladie de Crohn ou le syndrome du colon irritable (Kruis, 2004; Malchow, 1997; Marteau *et al.*, 2001).

Étant donné toutes ces propriétés d'intérêt, l'idée d'administrer des symbiontes bactériens jouant un rôle-clé dans la physiologie de leur hôte semble être une solution élégante pour prévenir les infections opportunistes.

Pertinence de l'approche probiotique endogène

Les probiotiques endogènes (ou autochtones) sont des micro-organismes vivants qui confèrent des effets bénéfiques sur la santé lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante à leur hôte d'origine (Balcázar *et al.*, 2006).

À notre connaissance, il n'existe aucun traitement thérapeutique à base de probiotiques endogènes contre la furonculose des Salmonidés, et ce, malgré le succès de cette approche chez d'autres modèles hôte-pathogène (Boutin *et al.*, 2012, 2013b; Goulden *et al.*, 2012; Schubiger *et al.*, 2015). À titre d'exemple, des candidats probiotiques du microbiote cutané de l'Omble de fontaine ont diminué efficacement la mortalité causée par la maladie bactérienne de l'eau froide par l'entremise d'un antagonisme spécifique vis-à-vis l'agent pathogène, sans qu'il y ait perturbation homéostatique du microbiote du poisson (Boutin *et al.*, 2013b).

À l'inverse, un probiotique exogène (*c.-à-d.* allochtone) n'est pas nécessairement efficace chez n'importe quel hôte, et peut même perdre ses propriétés bénéfiques chez certains hôtes :

- *Pseudomonas fluorescens* AH-2, isolé de la Perche du Nil (*Lates niloticus*), réduit la mortalité causée par la vibriose chez la Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Cependant, cette souche, bien que dotée d'un fort effet d'antagonisme vis-à-vis *Aeromonas salmonicida*, ne confère aucune protection *in vivo* contre la furunculose chez le Saumon atlantique (Gram *et al.*, 2001).
- *Bacillus cereus*, un probiotique homologué pour la consommation humaine, exhibe un effet cytotoxique *in vitro* vis-à-vis des cellules intestinales porcines (Trapecar *et al.*, 2011).
- La souche *Rhodococcus* sp. CPM5, bien que protectrice contre la columnaris et la maladie bactérienne de l'eau froide chez l'Omble de fontaine (Boutin *et al.*, 2012, 2013b), augmente la mortalité chez le Doré jaune (*Sander vitreus*) (Seghouani *al.* en préparation).

C'est pourquoi la sélection de candidats probiotiques à partir de bactéries naturellement présentes chez l'hôte (*c.-à-d.* endogènes) pourrait diminuer les risques de pathogénicité imprévue en plus d'assurer le maintien des interactions bénéfiques avec l'hôte. Ce projet de maîtrise visait donc à initier la recherche et le développement d'une telle approche pour prévenir et traiter la furunculose chez l'Omble de fontaine.

2 – Hypothèses

1. Il existe des symbiotes bactériens présents chez l'Ombre de fontaine qui possèdent des propriétés d'antagonisme vis-à-vis de l'agent étiologique de la furonculose, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*.
2. Certains de ces symbiotes possèdent un risque de virulence et de dissémination de l'antibiorésistance assez faible pour permettre leur utilisation en tant qu'agents probiotiques expérimentaux pour prévenir et traiter la furonculose chez l'Ombre de fontaine d'élevage.

3 - Objectifs spécifiques

Pour vérifier l'hypothèse 1 : (Chapitre 4)

1. Rechercher des symbiontes bactériens endogènes montrant un effet d'antagonisme envers plusieurs souches d'*A. salmonicida* isolées au Québec et ailleurs dans le monde ;
2. Caractériser la dynamique de leur antagonisme vis-à-vis *A. salmonicida* en situation de compétition *in vitro*, seuls et en combinaison.

Pour vérifier l'hypothèse 2 : (Chapitre 5)

3. Identifier les candidats probiotiques sélectionnés à l'aide d'une méthode basée sur l'identité partagée entre des génomes complets;
4. Analyser le pan-génome des candidats probiotiques sélectionnés afin :
 - (a) d'éclaircir les bases mécanistiques de leur effet d'antagonisme vis-à-vis *A. salmonicida* ;
 - (b) d'évaluer *in silico* leur innocuité envers l'humain et l'environnement, et ce, en portant une attention particulière à :
 - (i) la présence de gènes de virulence et d'antibiorésistance ;
 - (ii) la présence de ces gènes sur des éléments génétiques mobiles.

4 – Antagonistic effect of autochthonous brook charr bacteria (*Pseudomonas* spp.) against *Aeromonas salmonicida*, the etiological agent of salmonid furunculosis

Résumé

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* est une bactérie à Gram négatif responsable de la furonculose, une infection opportuniste majeure chez les salmonidés d'élevage. Les méthodes de traitement actuelles contre la furonculose reposent essentiellement sur l'antibiothérapie et l'immunoprophylaxie. Cependant, l'usage intensif d'antimicrobiens de synthèse contribue à l'émergence de résistances aux antibiotiques transférables horizontalement, lesquelles sont déjà retrouvées chez un nombre croissant de souches d'*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. De plus, les effets secondaires de l'antibiothérapie et de la vaccination par injection intrapéritonéale (I/P) peut causer des altérations maladaptives dans les interactions hôte-microbiote, en défaveur des bactéries résidentes de l'hôte qui contribuent à la résistance aux infections. En ce qui concerne la furonculose, aucune étude n'a encore traité de l'utilisation de bactéries endogènes comme traitement probiotique contre la furonculose. Dans le cadre de notre étude, nous avons identifié des souches de *Pseudomonas* spp. endogènes de l'Ombre de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) ayant inhibé la croissance de plusieurs souches d'*A. salmonicida* subsp. *salmonicida* par l'entremise de : (i) composés inhibiteurs diffusibles induits par les composés extracellulaires d'*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*; (ii) l'exclusion compétitive par une croissance exponentielle plus rapide. Ainsi, ces souches seraient des candidats probiotiques prometteurs pour prévenir et traiter la furonculose chez l'Ombre de fontaine lors d'essais *in vivo*.

Abstract

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* is a ubiquitous Gram-negative bacterium causing furunculosis, a severe opportunistic infection of farmed salmonid fish. Current treatment methods against salmonid furunculosis rely heavily on antibiotherapy and immunoprophylaxis. However, the intensive use of antibiotherapy intensifies the ongoing health concern of horizontally-acquired multidrug resistance, already found in a growing number of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains around the world. Moreover, the adverse effects of broad-spectrum antibiotics and I/P vaccination may cause maladaptive changes in host-microbiota interactions, in disfavour of resident bacteria that contribute to enhance disease resistance. Dispensing bacterial symbionts as a probiotic to susceptible hosts therefore appears to be a promising solution. In the case of furunculosis, there is no study so far addressing the use of autochthonous bacterial strains as a probiotic treatment. Here, we identified autochthonous *Pseudomonas* spp. strains from brook charr (*Salvelinus fontinalis*) that reproducibly inhibited growth of various *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains *in vitro* through (i) diffusible inhibitory compounds inducible by *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* extracellular products and (ii) competitive exclusion by faster exponential growth. The strong and inducible antagonistic effect of these autochthonous *Pseudomonas* spp. isolates against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* is best observed in a biofilm-like context, suggesting that they would be most effective after colonizing host surfaces, and therefore, are promising probiotic candidates for *in vivo* trials on live brook charr.

4.1 – Introduction

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* is a ubiquitous Gram-negative bacterium causing furunculosis, an opportunistic infection of farmed salmonid fish (Austin & Austin, 2012; Bullock *et al.*, 1983). Furunculosis is an acute to chronic condition, with severe episodes often resulting in fatal septicaemia with few apparent physical signs (Pickering, 1997). Mortality rates are high and response time is short; a single infected fish can decimate 90% of an experimental group of trout in less than seven days (Scott, 1968).

Current treatment methods against salmonid furunculosis rely on antibiotherapy and immunoprophylaxis. On one hand, antimicrobials such as florfenicol (Samuelsen *et al.*, 1998) or sulfadimethoxine-ometoprim (Amend, 1965) have been proven efficient against furunculosis, and thus have become popular curative treatments against this disease (Austin & Austin, 2012; Morin, 2010). However, the intensive use of antibiotherapy may intensify the ongoing health concern of antibiotic resistance (WHO, 2014). Horizontally acquired multidrug resistance is also common among *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains (Inglis *et al.*, 1993). The first genome sequence available for *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* revealed more than 25 genes encoding multidrug resistance and efflux pumps (Reith *et al.*, 2008). Antibiotic resistance plasmids have been found since then in a growing number of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains around the world, some of which are resistant to up to eight different antimicrobials (McIntosh *et al.*, 2008; Vincent *et al.*, 2014, 2016).

On the other hand, immunoprophylaxis protocols have been developed to immunize fish against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Furunculosis vaccines usually consist of either bacterin (Udey & Fryer, 1978), live-attenuated cells (Vaughan *et al.*, 1993) or purified

antigens (Lutwyche *et al.*, 1995), administered to healthy fish either *via* intraperitoneal (I/P) injection, immersion or feed. In a survey conducted by Håstein *et al.* (2005), the efficacy of fish vaccines against furunculosis ranged from « acceptable » to « very good » according to participants, but with significant occurrences of side effects in I/P adjuvanted vaccines. Other trials on salmonid fish corroborate that adjuvanted I/P vaccines have been shown to trigger maladaptive inflammatory responses with adverse effects on growth and flesh quality (Midtlyng & Lillehaug, 1998; Mutoloki *et al.*, 2006).

Some crucial aspects of fish rearing (*e.g.* pH, high temperature, hypoxia and handling) increase predisposition to furunculosis by causing maladaptive changes in host behavior and physiology of farmed fish (Pickering, 1997), which in turn disturb host functions such as the immune response (Barton & Iwama, 1991) and symbiotic interactions with the host microbiota (*i.e.* dysbiosis) (Boutin *et al.*, 2013a). The combination of dysbiosis and a weaker immune system allows opportunistic pathogens to undergo a shift in virulence as a response to the disruption of host homeostasis (Stecher *et al.*, 2013). Dysbiosis induced by antimicrobial therapy could in turn facilitate the proliferation of other antibiotic-resistant pathogens, leading to secondary infections (*Ibid.*). Moreover, broad-spectrum antibiotics and the adverse effects of I/P vaccination may trigger or further aggravate dysbiosis by targeting not only *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, but also beneficial bacteria from the host microbiota.

Dispensing bacterial symbionts as a probiotic to susceptible hosts therefore appears to be a promising solution as it has been proven in many other host-pathogen combinations (Boutin *et al.*, 2012, 2013b; Goulden *et al.*, 2012; Schubiger *et al.*, 2015). Indeed, bacterial symbionts may contribute to disease resistance of their host *via*: (1) mechanisms targeting

pathogens such as nutritional competition, diffusion of antimicrobial compounds or competitive exclusion from epithelial surfaces (Bermudez-Brito *et al.*, 2012; Kamada *et al.*, 2013); (2) mechanisms targeting the host itself, such as the modulation of host immune signaling pathways (Kamada *et al.*, 2013). Selecting autochthonous bacterial strains (*i.e.* directly from the host species) also increases the probability of probiotic efficacy while reducing the risks of unforeseen pathogenicity (Courvalin, 2006; Trapecar *et al.*, 2011). In the case of furunculosis, there is no study so far addressing the use of autochthonous bacterial strains as a probiotic treatment. Before this becomes reality, it is necessary to establish which autochthonous bacterial strains have an inhibitory potential against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.

Here, we present the identification of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) autochthonous bacterial strains as probiotic candidates for the treatment of salmonid furunculosis. The antagonistic potential of these autochthonous bacterial strains against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* was assessed through agar diffusion assays and liquid broth competition assays. Those assays were respectively designed as *in vitro* analogues of conditions encountered in a real-life aquacultural production system: (i) biofilm-like conditions, obtained through growing PCs and *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* on solid media (McBain, 2009) and preventing direct contact between the two; and (ii) planktonic-like conditions, in which antagonistic bacteria are directly exposed to each other in liquid media. This study allowed the identification of three *Pseudomonas* strains that reproducibly inhibited growth of various *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains in biofilm-like conditions by means of diffusible inhibitory compounds inducible by exposure to *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* extracellular products (ECPs). In planktonic-like

conditions, those three *Pseudomonas* strains inhibited *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* mainly by competitive exclusion through faster exponential growth.

4.2 – Materials and Methods

Bacterial strains, sampling and culture conditions

Source material. Autochthonous brook charr bacteria were recovered from skin, gill and intestine mucus samples from ten healthy adult brook charr (*Salvelinus fontinalis*) with an average mass of 710 ± 26 g per fish. Fish were handed from a local Quebec trout hatchery (Pisciculture de la Jacques-Cartier inc., Cap-Santé, Québec, Canada). The brook charr was chosen as a host model because of its susceptibility to furunculosis (Cipriano & Heartwell, 1986) and the evidence of the impact caused by stressful aquacultural conditions on its microbiota structure (Boutin *et al.*, 2013a). Fish were euthanized prior to bacterial sampling by exposure to >250 mg.ml⁻¹ tricaine methanesulfonate (MS-222), in compliance with Standard Operating Procedure EU-5 of the “Comité de Protection des Animaux de l'Université Laval” (CPAUL, <http://www.cpa.ulaval.ca/>). Skin and gill mucus were sampled with a sterile razor blade and diluted in nine volumes of sterile phosphate-buffered saline (PBS) 1X, pH 7.4. Intestine mucus was recovered after dissecting the lower intestine. Briefly, fish were deprived from fecal matter by applying gentle pressure on both sides of the abdomen, from the pelvic fin to the anal fin. After clearing feces, a small incision was made above the anal fin with a sterile razor blade. Then, a longitudinal cut was made with iris scissors up to the pelvic fin. Internal organs were removed out and a section of the intestine was cut with iris scissors between the anterior intestine and the rectum. This

section of the gut was cut longitudinally with a sterile razor blade and spread (lumen facing up). Intestines were rinsed with sterile PBS 1X, pH 7.4 for removal of trace fecal matter. Intestine mucus was then sampled with a sterile razor blade throughout the interior surface of the spread intestine section. Those samples were also diluted in nine volumes of sterile PBS 1X, pH 7.4.

Bacterial isolation. Serial dilutions (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) were prepared for each pooled mucus homogenate (skin, gill and intestine), and 0.1 mL of each dilution was spread on Tryptic Soy Agar (BD Diagnostics) plates and incubated at 18°C until sufficient growth. Colonies were isolated in pure culture by three-step streaking on fresh agar medium and incubated at 18°C until sufficient growth. Colonies from each plate were re-isolated in pure culture by three-step streaking on fresh agar as described above. Glycerol stock cultures were prepared for each bacterial isolate by suspending pure bacteria in 1 mL of liquid broth + 15% (V/V) glycerol. Stocks were kept at -80°C immediately after preparation.

Screening for probiotic candidates with agar diffusion assays

The purpose of agar diffusion assays was to screen autochthonous brook charr isolates for antagonistic properties against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* in biofilm-like conditions (*i.e.* high cell density and no direct contact between those probiotic candidates (PC) and *A. salmonicida*). Bacterial lawns of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 (Charette *et al.*, 2012) were prepared by streaking a sterile swab dipped in liquid 01-B526 culture (OD₆₀₀ of about 0.7) on the whole surface of a Tryptic Soy Agar plate (TSA, BD Diagnostics). This streaking step was repeated twice, with the Petri dish rotated 120° after the first and second streakings. Wells were punched in the agar using sterile pipette tips with a diameter of 3.5 mm (ART P-20). For each brook charr-derived isolate, 10 µL of liquid culture (OD₆₀₀ ~ 0.7) were dispensed in an assigned well. Plates were incubated right side up for 30 min in order to let liquid cultures adsorb in the wells. Afterwards, plates were incubated upside down at 18°C for 96 h. The diffusible inhibitory effect of pure PC culture supernatants has also been assessed by a similar approach. Liquid PC cultures grown overnight in Tryptic Soy Broth (BD Diagnostics) were adjusted to OD₆₀₀ ~ 0.7 with fresh TSB, and were centrifuged at 10,000 x g for 20 minutes at 4°C. Culture supernatants were sterilized by filtration on a 0.2 µm disc syringe membrane. 10 µL of each sterile PC culture supernatant were arrayed in culture wells carved in *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 agar plates as previously described. Finally, the diffusible antagonistic effect of all positively-screened PCs has been validated across a panel of ten *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains: Reference strain A449 (Michel, 1979) and nine environmental isolates from Canada (Quebec and New Brunswick), Switzerland and Norway. All agar diffusion assays have been conducted in triplicates. Inhibition surfaces around the wells were

measured on 23.6 pixel/mm scans with software ImageJ (version 1.48k; <http://imagej.nih.gov/ij/>), with the well area subtracted from the whole inhibition area. The average inhibition diameter was derived from the area of a hypothetical disk whose area is the inhibition plaque around the culture wells, as follows:

$$d = 2 \cdot \sqrt{\frac{A_{total} - A_{well}}{\pi}} \quad (1)$$

where d is the average inhibition diameter (mm), A_{total} the area of the whole inhibition plaque (mm²), and A_{well} the area of the culture well carved in the agar (mm²).

Inducibility assessment with *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 culture supernatants

The inducing effect of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* extracellular products (ECPs) on the diffusible inhibitory effect of PCs was assessed. An *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 liquid culture (48 h, OD₆₀₀ adjusted to ~ 1.0) was centrifuged at 10,000 x g for 20 minutes at 4°C. Culture supernatant was filtered on a 0.2 µm disc membrane and then kept in single-use aliquots at -20°C until further use. Serial dilutions of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 culture supernatants were prepared with TSB: undiluted, 1:1, 1:3, 1:7, 1:15, and TSB only as a negative control. ECP concentrations in culture supernatant dilutions were expressed in arbitrary units per ml (AU.ml⁻¹), where [ECP] in undiluted culture supernatant was defined as having 2 AU.ml⁻¹. Liquid PC cultures were prepared and adjusted to OD₆₀₀ ~ 1.0, after which 1 mL of each culture was mixed with an equal volume of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 culture supernatant dilution. Mixtures were incubated at 18°C for 30 minutes and 10 µL of each were arrayed in culture

wells on *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 bacterial lawns, prepared as previously described in agar diffusion assays. Bacterial lawns were incubated for 72 h and measurements were performed as in the agar diffusion assays described above. Statistical significance of results over controls was determined with one-tailed, two-sample Student's *t* tests assuming unequal variance.

Growth kinetics of selected PCs

Positively-screened PCs were also screened for growth characteristics indicating their potential for competitive exclusion of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* in planktonic-like conditions (*i.e.* free-living in liquid medium). 400 μ L of overnight culture in Tryptic Soy Broth (BD Diagnostics) adjusted at OD₆₀₀ \sim 0.05 were arrayed on a sterile 48-well transparent covered plate (CORNING). The plate was incubated at 20°C with orbital shaking (200 RPM) for 48 h; OD₅₉₅ was measured at each incubating cycle of 15 min in a Infinite 200 PRO microplate incubator/reader equipped with a 595 nm absorbance filter (TECAN GmbH).

Bacterial competition assays in liquid medium

Liquid broth competition assays were designed to assess if positively-screened PCs also had anti-*A. salmonicida* properties in planktonic-like conditions as well as in the biofilm-like conditions of agar diffusion assays. The effect of PCs on the relative abundance of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* in liquid medium was assessed by co-culturing them mixed with a GFP⁺ reporter strain of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 (hereby called A449-GFP, unpublished, courtesy of Dr Michael Reith, Fisheries and Oceans Canada, Halifax). A449-GFP contains broad-host-range expression vector pMMB67EH (Fürste *et*

al., 1986) with insert *gfpmut3* (Cormack *et al.*, 1996) for expression of intracellular GFP. The following experiments were performed in triplicates.

Pure probiotic culture assays. Liquid starter cultures of PCs and A449-GFP were prepared in TSB (BD Diagnostics), incubated overnight at 18°C and adjusted to $OD_{600} = 0.09 \pm 0.01$. For each PC, three competition broths were assembled in sterile SnapCap 15 ml culture tubes, each with different [PC] / [A449-GFP] mix ratios: (i) 2.5 mL A449-GFP culture and 2.5 mL PC culture ([PC]/[A449-GFP] ratio = [1:1]); (ii) 2.5 mL A449-GFP culture, 1.67 mL TSB and 0.83 mL PC culture ([PC] / [A449-GFP] ratio = [0.33:1]); (iii) 2.5 mL A449-GFP culture, 2.25 mL TSB and 0.25 mL PC culture ([PC] / [A449-GFP] ratio = [0.1:1]). Competition broths were then incubated at 18°C with 200 RPM orbital shaking for 72 h.

Mixed probiotic assays. Liquid broth competition assays were also used to assess the inhibiting potential of PCs when in combination. The same procedure as described above was applied, but with proportional quantities of the different PC cultures (1:1 and 1:1:1). Competition broth assemblies (2.5 mL PC mixture and 2.5 mL A449-GFP) and the rest of the procedure were conducted as described above.

For either pure or mixed culture competition assays, wild-type *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strain A449 (A449-WT) was used as a negative control strain that would only limit growth of A449-GFP by an approximately equal rate of nutrient consumption and secondary metabolite production (*i.e.* no antagonistic interactions). At $t = 24$ h, 48 h and 72 h, 500 μ L of each competition culture were paraformaldehyde-fixed prior to measuring fluorescence intensity. Briefly, cells were centrifuged at 4000 x g for 15 min at 4°C. Pellets were resuspended in PBS 1X, pH 7.4 containing 1% paraformaldehyde and were let on ice for 30 min. Cells were centrifuged again (4000 x g, 15 min, 4°C) and suspended in 500 μ L

PBS 1X, pH 7.4. 100 μ L of fixed culture aliquots were arrayed on a black-walled 96-well transparent microplate, and fluorescence intensity was measured with a BioTek Synergy 2 microplate reader ($\lambda_{EX} = 490$ nm; $\lambda_{EM} = 535$ nm). All measures were normalized over those of a pure culture of A449-GFP (5 mL, initial $OD_{600} = 0.09 \pm 0.01$). Therefore, the relative concentration of A449-GFP was calculated as follows:

$$[A449-GFP] = \frac{I_{PC,t} - I_{B,t}}{I_{NORM,t} - I_{B,t}} \quad (2)$$

where $[A449-GFP]$ is the relative concentration of A449-GFP in a particular competition broth; $I_{PC,t}$ is the fluorescence intensity in 100 μ L of A449-GFP co-cultured with a PC at time t ; $I_{NORM,t}$ is the fluorescence intensity in 100 μ L of A449-GFP cultured alone at time t and $I_{B,t}$ is the fluorescence intensity in 100 μ L of PBS 1X, pH 7.4 at time t (blank). For each PC, an antagonistic index (AI%) was calculated from relative A449-GFP abundances throughout the assay, as follows:

$$AI\% = \left(\frac{\frac{[GFP]_{PC,24h}}{[GFP]_{WT,24h}} + \frac{[GFP]_{PC,48h}}{[GFP]_{WT,48h}} + \frac{[GFP]_{PC,72h}}{[GFP]_{WT,72h}}}{3} \right) \times 100 \quad (3)$$

where $[GFP]_{PC}$ is the relative abundance of A449-GFP when exposed to a given PC, and $[GFP]_{WT}$ is the relative abundance of A449-GFP when exposed to the negative control strain (A449-WT). The AI% of A449-WT is null by definition. Statistical significance of results over controls was determined with one-tailed, two-sample Student's t tests assuming unequal variance.

Presumptive identification of PCs by sequencing of the 16S rRNA gene

Genomic DNA was recovered with a modified protocol for the DNeasy Blood & Tissue spin-column method (Qiagen). For each isolate, 1 mL of culture was centrifuged at 16,000 x g for 1 min. The resulting bacterial pellet was then resuspended in 200 µL PBS 1X, pH 7.4. From this step, the standard Qiagen DNeasy Blood and Tissue protocol for bacterial cells was followed, with an additional incubation step at 37°C for 1 h after adding 5 units of RNase A (Ambion) following detergent lysis. The final elution step was achieved with 200 µL 1M Tris-Cl buffer pH 8 instead of buffer AE. After spin-column purification, DNA samples were pelleted and washed with cold 70% ethanol. Washed pellets were fully air-dried and resuspended in 1M Tris-HCl buffer pH 8. DNA extracts were stored at -20°C.

For selected probiotic candidates (PCs), a partial 16S rDNA fragment of ~1.4 kb was obtained by PCR amplification with universal primers f-tot (5'-GCAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') (Castillo *et al.*, 2006) and 1389R (5'-AGGCCCGGGAACGTATTCAC-3') (James, 2010) targeting the 16S rRNA gene. PCR reactions contained 25 µL TaKaRa Premix Taq v2.0 [2X] (Clontech), 250 ng template DNA, 0.5 µM forward and reverse primers and ddH₂O up to a total reaction volume of 50 µL. PCR amplifications were performed with an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min 30 s and a final extension step at 72°C for 5 min. PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis (0.8% (w/v), 5.5 V/cm).

Purified PCR products were sequenced by the Sanger method at the Plateforme d'Analyses Génomiques of the Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (Université Laval,

Québec, Canada). Amplicons were sequenced from both ends by using f-tot and 1389R as sequencing primers. Forward and reverse sequence reads were verified, trimmed and assembled with software SeqTrace (version 0.9.0; <http://seqtrace.googlecode.com/>). Bacterial isolates were presumptively identified by BLASTn alignment (Altschul *et al.*, 1990) of the resulting amplicon sequences against the NCBI database “Reference RNA sequences (Bacteria and Archaea)” using the “megablast” algorithm (Zhang *et al.*, 2000) (word size of 28). The genus of the closest match served as a presumptive identification until further characterization. A multiple alignment of those sequences, including sequences of the closest BLAST hits (see Results), was computed using software MUSCLE (version 3.8.31; <http://www.drive5.com/muscle/>) and pairwise sequence identity percentages were obtained with software Jalview (version 2.8.0b; <http://www.jalview.org/>) from a ~1.2 kb region common to all sequences in the multiple alignment mentioned above.

4.3 – Results

Autochthonous isolates inhibit growth of *A. salmonicida* in biofilm-like conditions through diffusible inhibitory compounds

A collection of 47 autochthonous bacteria isolated from brook charr tissues (skin mucus, gills and intestine) was screened by agar diffusion assays on the basis of antagonism against the virulent *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strain 01-B526 (Charette *et al.*, 2012). From this set, inhibition zones were observed around culture wells inoculated with three different autochthonous bacterial isolates (**Table 2**). The diffusible antagonistic effect of those positively-screened isolates (Iso11A, Iso11B and Iso13) has been validated across a panel

Table 2. Autochthonous bacteria from brook charr exhibiting diffusible inhibitory effect on agar against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526.

Code	Presumptive ID (Genus)	Family	Class (Proteobacteria)	Sampling site	Inhibitory effect ^A
Iso11A	<i>Pseudomonas</i> sp.	Pseudomonadaceae	Gamma	Skin mucus	+++
Iso11B	<i>Pseudomonas</i> sp.	Pseudomonadaceae	Gamma	Skin mucus	++
Iso13	<i>Pseudomonas</i> sp.	Pseudomonadaceae	Gamma	Skin mucus	+++
CPM15 ^B	<i>Pseudomonas</i> sp.	Pseudomonadaceae	Gamma	Skin mucus	-

A: Inhibition diameter around culture wells carved in bacterial lawns of *A. salmonicida* 01-B526 at $t = 96$ h; ++, 10 to 14 mm wide; +++, more than 14 mm wide. B: This isolate is an autochthonous bacterium from brook charr having no inhibitory effect on agar, but was used as a neutral control in subsequent experiments.

of ten *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains: Reference strain (Michel, 1979) and nine environmental isolates from Canada (Quebec and New Brunswick), Switzerland and Norway. This effect was observed on every tested *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strain with variable intensity (**Table 3**). Except for reference strain A449, there is no significant difference in effect among other *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains (One-way ANOVA, $P = 0.76$). The effect of Iso11B was significantly weaker than the effect of Iso11A and Iso13 (One-way ANOVA, $P = 0.02$ and 0.01 , respectively).

The three inhibitory isolates Iso11A, Iso11B and Iso13 have presumptively been identified by the sequence alignment of their 16S rRNA gene. Iso11A, Iso11B and Iso13 were identified as *Pseudomonas* spp. belonging to the *P. fluorescens* group, as suggested by their high 16S rDNA sequence identity (>99%) with *P. azotoformans*, a nitrogen-fixing bacterium in the *P. fluorescens* species complex (Anzai *et al.*, 2000) (**Table 4**). There is strong sequence identity between 16S rDNA sequences of *Pseudomonas* sp. Iso11A, Iso11B and Iso13, suggesting that they are all closely related strains. Among strains with no diffusible inhibitory effect, Isolate *Pseudomonas* sp. CPM15 shared >99% 16S rDNA sequence identity with *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B, Iso13 and *P. azotoformans*. Therefore, this isolate was selected as a neutral control strain for the following assays (*i.e.* a closely related strain without antagonistic effect through diffusible compounds on agar).

In planktonic-like conditions, PCs inhibit *A. salmonicida* through faster exponential growth

The antagonistic effect of the selected PCs against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* in

Table 3. Susceptibility of ten *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains to selected PC in agar diffusion assays.

Origin	<i>A. salmonicida</i> strain	Susceptibility *				
		Iso11A	Iso11B	Iso13	PC mean	CPM15 (Ø)
Quebec, Canada	01-B522	++	++	+++	+++	-
	01-B526	++	++	++	++	-
	09-0167	++++	+++	++++	++++	-
	M15879-11	+++	++	+++	++	-
	m23067-09	++++	+++	+++	+++	-
New Brunswick, Canada	2004-05MF26	++++	+++	++++	++++	-
	2009-144K3	+++	++	+++	+++	-
Norway	HER1085	++++	+++	+++	+++	-
Switzerland	JF2267	++++	++	+++	+++	-
France	A449 (Reference)	++	+	+	+	-
-	All strains	+++	++	+++	+++	-

* Inhibition diameter (mm) around culture wells carved in bacterial lawns of *A. salmonicida* at $t = 96$ h. +, less than 10 mm wide; ++, 10 to 14 mm wide; +++, 14 mm to 17 mm wide; +++++, more than 17 mm wide. The average standard error between replicates ($n = 3$) is ± 5 mm. Ø, neutral control strain.

Table 4. Identity matrix between partial 16S rRNA gene sequence pairs of selected PCs.

Sequence identity (%)	Iso11B	Iso13	CPM15	<i>P. azotoformans</i>¹
Iso11A	100.00	99.84	99.67	99.84
Iso11B	-	99.84	99.67	99.84
Iso13	-	-	99.51	99.67
CPM15	-	-	-	99.76

Percentage sequence identity (%) represents the proportion of shared base pairs between homologous gene sequences in a pairwise alignment.¹
Pseudomonas azotoformans NBRC 12693 (GenBank: AB680322).

planktonic-like conditions was assessed by competition assays in broth cultures; the normalized fluorescence intensity of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449-GFP served as a proxy for its relative abundance (see Materials and Methods).

In competition broths where initial [PC] / [A449-GFP] = [1:1], all PCs (*i.e.* *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B and Iso13) had a negative effect on [A449-GFP] in liquid culture conditions over a 72-hour time course (**Fig. 2**). One exception was *Pseudomonas* sp. Iso11B, which had no significant effect at t = 48h. In presence of *Pseudomonas* spp. Iso11A and Iso11B, there was a slight initial increase in [A449-GFP] from t = 24h to t = 48h, followed by a steep decrease at t = 72h. At this time point, all PCs had a strong significant negative effect on [A449-GFP], including neutral control *Pseudomonas* sp. CPM15 (**Fig. 2**; P < 0.05). In competition broths with low initial PC / A449-GFP dosages ([0.33:1] and [0.1:1]), the effect of *Pseudomonas* sp. CPM15 was comparable, in some cases superior, to the effect of other PCs *Pseudomonas* sp. Iso11A, Iso11B and Iso13 (**Fig. 2**). We therefore wanted to assess how significantly the antagonistic effect of *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B and Iso13 in liquid broth was different from the effect of neutral control strain *Pseudomonas* sp. CPM15. To resolve this matter, we tested the statistical significance of selected PCs' antagonistic indices (AI%) over those of *Pseudomonas* sp. CPM15 (neutral model) and *A. salmonicida* A449-WT (negative model) (**Table 5**). Whereas all PCs (including neutral control *Pseudomonas* sp. CPM15) had significantly higher AI% scores than negative control *A. salmonicida* A449-WT (P < 0.05), none of the PCs had significantly higher AI% scores than neutral control strain *Pseudomonas* sp. CPM15 (the only exception being *Pseudomonas* sp. Iso13 in [1:1] competition broths). Overall, all PCs, including neutral control strain *Pseudomonas* sp. CPM15, had a

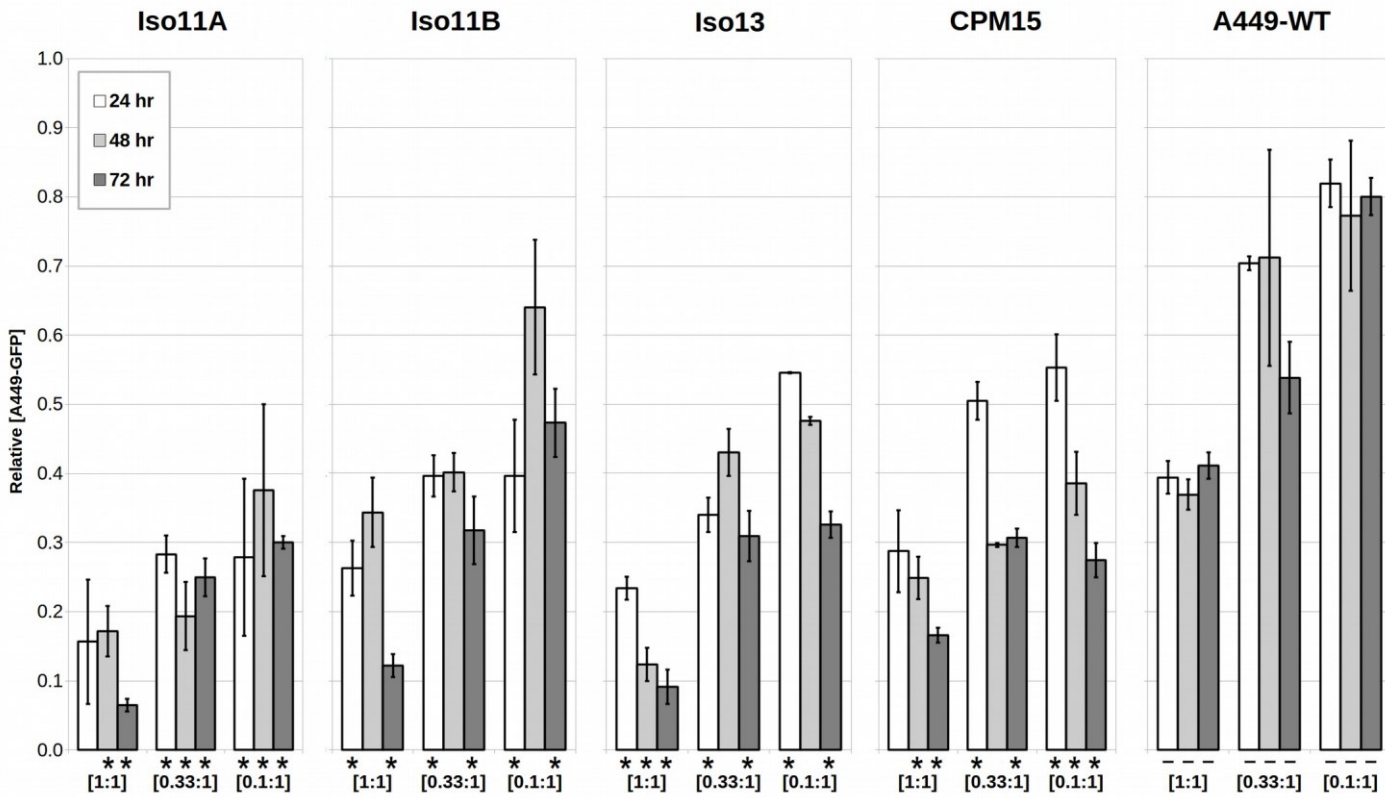


Fig. 2. Relative abundance of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449-GFP while co-cultured in liquid broth with pure probiotic candidate cultures in different mix ratios. Solid bars indicate relative [A449-GFP]. Black lines indicate the standard error of the mean between replicates (n = 3). * P < 0.05 ($H_0 = [A449-WT]$ at corresponding mix ratios and time points).

Table 5. Antagonistic index (AI%) of selected PCs against A449-GFP in liquid broth competition assays.

Antagonists		PC / <i>A. sal.</i> [1:1]			PC / <i>A. sal.</i> [0.33:1]			PC / <i>A. sal.</i> [0.1:1]		
		AI% ± SE	P-value*		AI% ± SE	P-value*		AI% ± SE	P-value*	
			(-)	(∅)		(-)	(∅)		(-)	(∅)
PC cultures	<i>Pseudomonas</i> sp. Iso11A	66 ± 12	0.02	NS	62 ± 10	0.008	NS	59 ± 20	0.05	NS
	<i>Pseudomonas</i> sp. Iso11B	36 ± 5	0.01	NS	42 ± 6	0.01	NS	36 ± 12	NS	NS
	<i>Pseudomonas</i> sp. Iso13	61 ± 7	0.007	0.04	44 ± 5	0.008	NS	43 ± 1	0.009	NS
Neutral model (∅)	<i>Pseudomonas</i> sp. CPM15	39 ± 5	0.009	-	43 ± 2	0.02	-	49 ± 7	0.007	-
Negative model (-)	<i>A. salmonicida</i> A449 (wt)	0 ± 2	-	-	0 ± 7	-	-	0 ± 5	-	-

PC, probiotic candidate; SE, standard error of the mean between replicates (n = 3). *AI% scores were not deemed significant (NS) if: AI% (Treatment) < AI% (Null model) and if P > 0.05.

significantly greater negative effect on [A449-GFP] when in [1:1] competition broths rather than in [0.33:1] and [0.1:1] competition broths (One-way ANOVA, $P = 0.01$ and 0.003 respectively). There was no significant difference between the effect of PCs in [0.33:1] and [0.1:1] mix ratios (One-way ANOVA, $P = 0.15$).

The efficacy of probiotic mixtures (11A+11B, 11A+13, 11B+13 and 11A+11B+13) was highly variable and almost never significant at $t = 24\text{h}$ and 48h (**Fig. 3**). Then, at $t = 72\text{h}$, all probiotic mixtures had a stable negative effect on [A449-GFP] (**Fig. 3**, $P < 0.05$). However, none of the mixtures had significantly higher AI% scores than neutral control *Pseudomonas* sp. CPM15 at any given time ($P > 0.05$, data not shown). Moreover, none of the probiotic mixtures significantly inhibited A449-GFP more than any of the PCs alone.

Growth in pure liquid culture was measured and compared between probiotic candidates (PCs), the neutral control strain (*Pseudomonas* sp. CPM15) and *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* reference strain A449. The purpose of this experiment was to assess growth characteristics of PCs that would indicate their potential for competitive exclusion of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. All candidates showed a steeper growth rate than *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 during the log phase. *Pseudomonas* spp. Iso13 and CPM15 had shorter lag periods than *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 (**Fig. 4**).

The diffusible inhibitory effect of PCs is inducible by *A. salmonicida* extracellular products

Pure culture supernatants from *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B and Iso13 did not inhibit *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 on agar (data not shown). Nevertheless, the

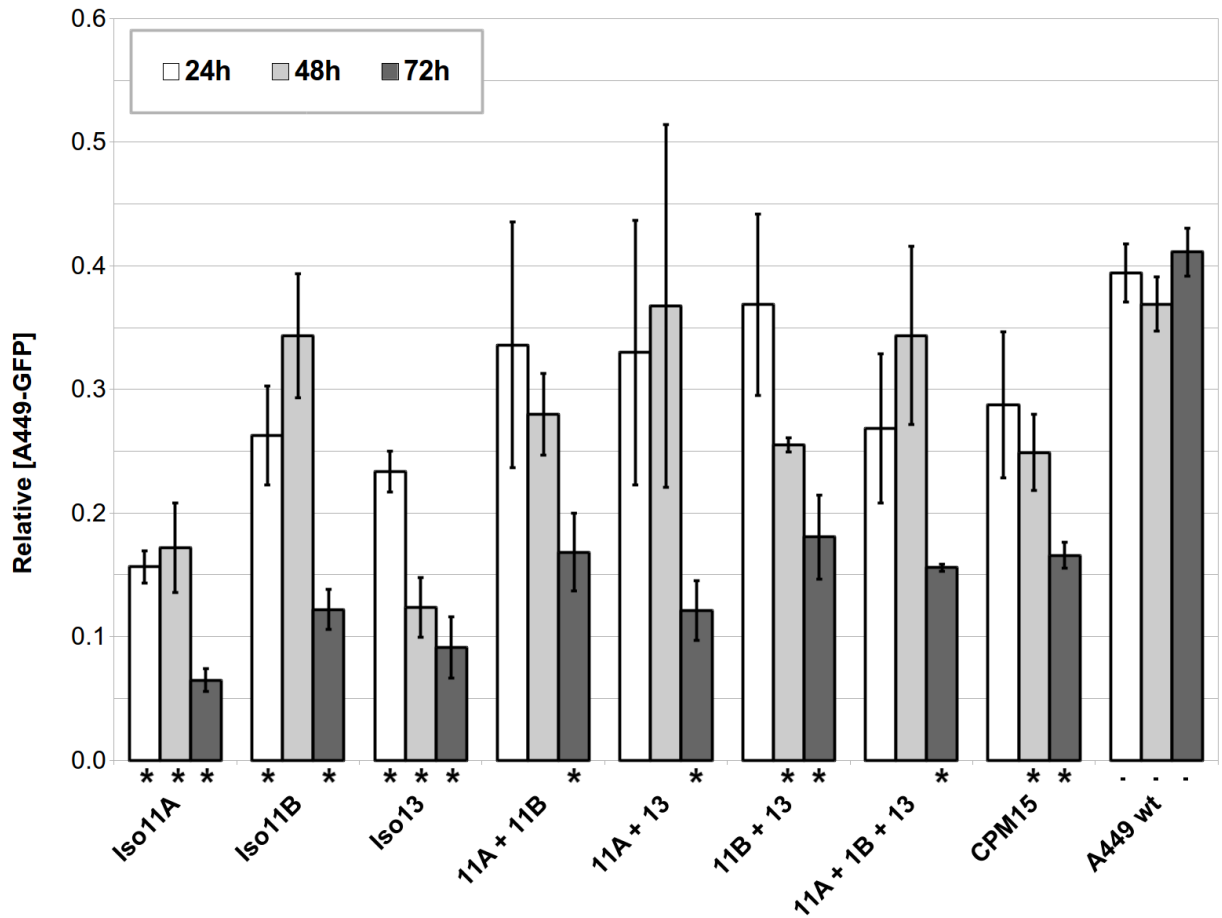


Fig. 3. Relative abundance of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449-GFP while co-cultured [1:1] in liquid broth with probiotic candidate mixtures. Solid bars indicate relative [A449-GFP]. Black lines indicate the standard error of the mean between replicates (n = 3). * P < 0.05 ($H_0 = [A449-WT]$ at corresponding mix ratios and time points).

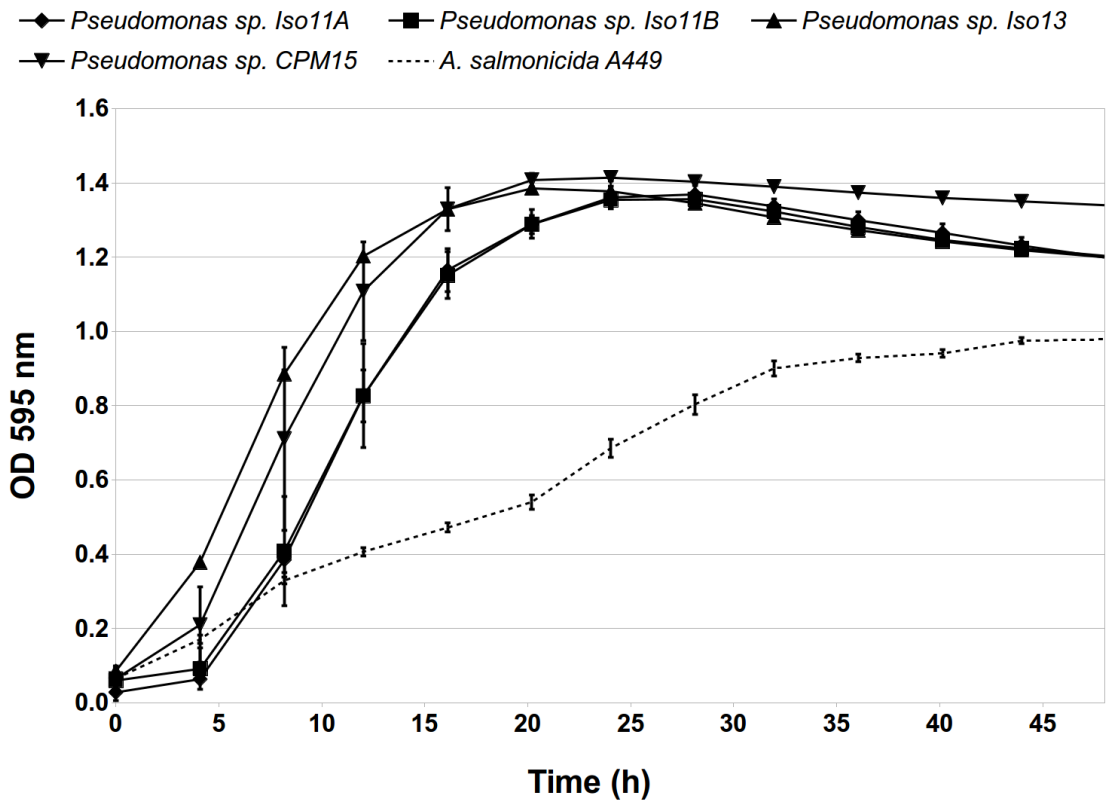


Fig. 4. Growth curves of positively-screened probiotic candidates *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B and Iso13, and neutral control strain *Pseudomonas* sp. CPM15. OD₅₉₅, optical density at 595 nm in pure broth culture of each strain.

diffusible inhibitory effect of PCs was positively modulated by exposure to *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ECPs (**Fig. 5**). More precisely, *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B and Iso13 produced larger inhibition zones when exposed to higher ECP concentrations prior to being dispensed on *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 bacterial lawns. Exposure to more than 0.5 AU ml⁻¹ of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 ECPs did significantly increase around two-fold the diameter of inhibition zones produced by PCs *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B and Iso13 ($P < 0.05$).

4.4 – Discussion

The purpose of this study was to initiate research and development of an endogenous probiotic treatment strategy against salmonid furunculosis in brook charr (*Salvelinus fontinalis*) using autochthonous bacteria as potential PCs. A collection of 47 autochthonous bacterial isolates from brook charr were recovered from skin mucus, gills and intestine, and their antagonistic potential against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* was assessed through *in vitro* antagonism assays designed to emulate different biological contexts in which probiotic bacteria are likely to exhibit their antimicrobial effects.

Agar diffusion assays were used to assess bacterial antagonism in conditions of high cell density and no direct contact between *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* and PCs (*i.e.* biofilm-like conditions). Three bacterial isolates from skin mucus (*Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B and Iso13) produced inhibition zones on *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* bacterial lawns (**Table 2** and **Table 3**). The diffusible inhibitory effect of those PCs was observed on every tested *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strain with globally

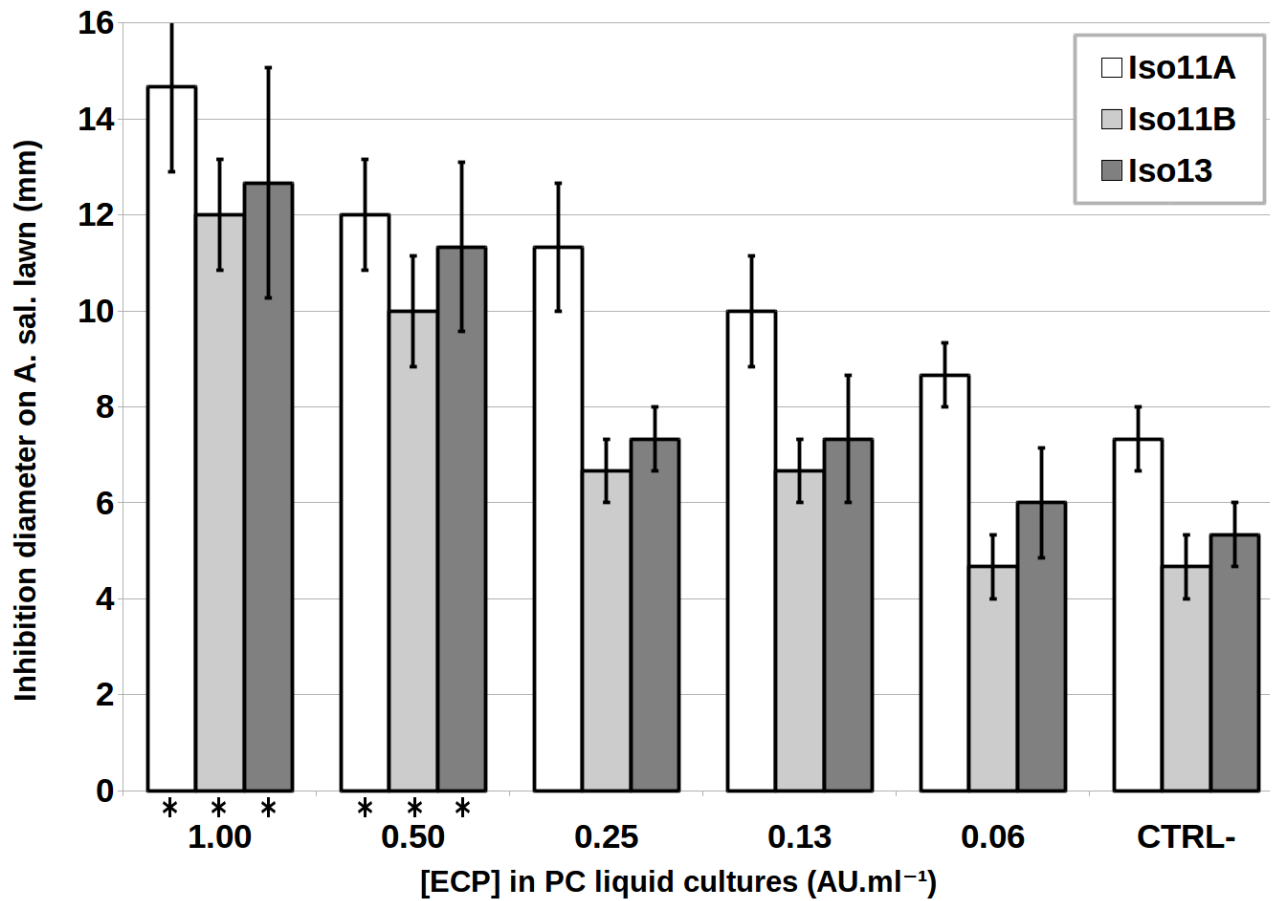


Fig. 5. Effect of prior exposure to *A. salmonicida* 01-B526 ECPs on the diffusible inhibitory effect of PCs *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B and Iso13 in biofilm-like conditions. AU, arbitrary units; *, $P < 0.05$ (H_0 = inhibition diameter caused by PCs unexposed to ECPs).

similar intensity. However, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strain A449 was less sensitive to selected PCs than other *A. salmonicida* strains (One-way ANOVA, $P = 0.03$). Since strain A449 has been isolated 40 years ago (Michel, 1979), and has been lab-reared ever since, the traits targeted by PCs may have evolved in a totally different path than the other tested strains. Aside from *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449, there was no significant difference in effect among other *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains (One-way ANOVA, $P = 0.76$). This result strongly suggests that diffusible compounds produced by selected PCs target common traits that are essential for either growth or survival among *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains. However, the exact nature of the compounds produced by *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B and Iso13, their mechanism of action and their specificity to *A. salmonicida* cannot be derived from these results alone.

The inducing effect of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* extracellular products (ECPs) on the diffusible inhibitory effect of PCs *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B and Iso13 was assessed. PCs produced larger inhibition zones when exposed to higher *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ECP concentrations prior to antagonism trials against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 (**Fig. 5**). Moreover, pure culture supernatants from PCs unexposed to *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* had no inhibitory effect against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 on agar (data not shown). Those two results suggest that the diffusible inhibitory effect of PCs is induced by the presence of signal molecules produced by *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, and that those signal molecules can modulate the PCs' inhibitory intensity in a dose-dependent manner. However, the exact nature of the inducer molecules produced by *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, and their mode of action, require further investigation.

The antagonistic effect of selected PCs *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B and Iso13 against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* in planktonic-like conditions was verified by competition assays in broth cultures. Interestingly, the effect of PCs on [A449-GFP] in liquid broth was hardly distinguishable from the effect of neutral control strain *Pseudomonas* sp. CPM15 (**Table 5**), which did not exhibit any diffusible inhibitory effect on agar. Furthermore, growth curves of pure PCs *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B, Iso13 and neutral control strain *Pseudomonas* sp. CPM15 are highly similar, and all have steeper log-phase growth rates than *A. salmonicida* (**Fig. 4**). This suggests that in planktonic-like conditions (*i.e.* in liquid broth), PCs outcompete A449-GFP *via* faster log-phase growth in a similar manner than *Pseudomonas* sp. CPM15. These results also suggest that their diffusible inhibitory effect observed on agar is not a major contributor to their efficacy in planktonic-like conditions, either because inhibitory compounds from PCs were not produced in sufficient concentrations, or because they were not produced at all in those conditions.

None of the probiotic mixtures (11A+11B, 11A+13, 11B+13 and 11A+11B+13) had a significantly higher antagonistic index (AI%) than *Pseudomonas* sp. CPM15 (data not shown), suggesting that interactions between PCs co-occur with their antagonistic effect against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. This could be attributable to inter-strain competition (Hibbing *et al.*, 2010), which may have limited the overall *in vitro* antagonistic effect of the PC mixtures against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.

The overall effect of *Pseudomonas* sp. Iso11B was significantly lower than the effect of other PCs in both biofilm-like and planktonic-like conditions. *Pseudomonas* sp. Iso11B was recovered from a previous stock culture (*Pseudomonas* sp. Iso11), which was suspected to

be contaminated because of the presence of a second colony-type, with smaller colony sizes but the same overall aspect. Although colony morphology variants are a common occurrence among *Pseudomonas* species (Kirisits *et al.*, 2005; Workentine *et al.*, 2010), we have isolated a colony variant of each type and renamed the resulting pure cultures as *Pseudomonas* spp. Iso11A and Iso11B. Only one colony-type was distinguishable in each resulting pure culture (*i.e.* no noticeable differences in colony size for either *Pseudomonas* spp. Iso11A or Iso11B). It was not possible with 16S rRNA gene sequence identity to distinguish between those two isolates (**Table 4**), thereby supporting the hypothesis that *Pseudomonas* spp. Iso11A and Iso11B are variants of the same strain, in spite of significant and reproducible phenotypic differences regarding their antagonistic effect against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. This finding suggests that the genomic stability of isolates *Pseudomonas* spp. Iso11A and Iso11B is not optimal, and could result in important phenotypic changes when extensively sub-cultured, as suggested by the differential inhibition efficiency regarding *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* quantified both in solid and liquid culture media. Proper culture maintenance will be required in order to preserve phenotypic traits of interest in *Pseudomonas* sp. Iso11A. The assessment of *Pseudomonas* sp. Iso11B in subsequent *in vivo* trials is not recommended because of its significant loss of efficacy *in vitro*.

In spite of their antagonistic effect against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, all PCs of this study require proper identification and safety assessments, in order to exclude PCs that are potentially pathogenic. The sequence identity between 16S rDNA sequences of PCs suggests that they are closely related strains in the *P. fluorescens* group (**Table 4**), which are generally recognized as safe, risk group 1 organisms (Scales *et al.*, 2014). However,

16S rDNA sequence identity rarely allows taxonomical resolution to the species level (Naum *et al.*, 2008). Therefore, more thorough investigations based on genomics (*e.g.* phylogenomics (Philippe *et al.*, 2005) or whole-genome average nucleotide identity (Richter & Rosselló-Móra, 2009)) will be required to determine if PCs are related or not to pathogenic *Pseudomonas* species or subspecies. Whole genome data from selected PCs will also allow pre-*in-vivo* predictions on their safety, *e.g.* by detection of virulence factors, transferable antimicrobial resistance genes, or other traits deemed as non-suitable for a probiotic formula registration. Those assessments are currently underway.

In conclusion, two autochthonous *Pseudomonas* spp. isolates from brook charr (*Salvelinus fontinalis*) had a strong antagonistic effect against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Their effect seems to be mediated through diffusible inhibitory compounds whose efficiency is best observed in a biofilm-like context (*i.e.* high cell density and no direct contact between PCs and *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*). In planktonic-like conditions, those compounds do not seem to be major contributors to their effect. Results from this study therefore suggest that in an *in vivo* context, PCs would be most effective after colonizing host surfaces. Another possibility is colonization of the surrounding environment, as observed in a previous study where an autochthonous *Rhodococcus* sp. strain from brook charr decreased mortality caused by bacterial cold disease without disturbing the fish microbiota, but rather by forming biofilms in the production system (Boutin *et al.*, 2013b). Another interesting feature of PCs *Pseudomonas* spp. Iso11A and Iso13 is that their diffusible inhibitory effect observed on agar was triggered and positively modulated by the presence of ECPs produced by *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. This result provides interesting indications, not only on their mode of action, but also on methods for improving

the intrinsic efficacy of PCs discovered in this study. Indeed, growing PCs in presence of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ECPs prior to administration could potentiate their diffusible inhibitory effect against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. *In vivo* assessments will be required to further validate this claim.

4.5 – Acknowledgements

This work was supported by a Discovery grant from the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (to ND) and a research grant from the Société de Recherche et de Développement en Aquaculture Continentale Inc. (SORDAC) (to ND and SJC).

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 (New Brunswick, Canada) as well as Joachim Frey (University of Bern, Switzerland) for the *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* isolates. The authors also thank Michael Reith for handing *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strain A449-GFP to their research group; Daniel Grenier and his research group for apparatus required for liquid broth competition assays; Laurence Rivard, Typhaine Morvant and Tom Van Acker for performing experiments; Sébastien Boutin, Martin Llewellyn, Nadia Aubin-Horth and Michel Frenette for helpful insights and critical advice; and Antony Vincent for critical reading of the manuscript.

4.6 – Author Contributions

Designed the experiments: JG LB SJC ND. Performed the experiments: JG LB. Wrote the manuscript: JG SJC ND.

4.7 – Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

5 – Caractérisation et analyse comparative du pan-génome des candidats probiotiques sélectionnés : prédictions sur leur innocuité et leur mécanisme d'action

5.1 - Introduction

Trois souches bactériennes (*Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B et Iso13), isolées du mucus cutané d'Omble de fontaine sain d'aquaculture, ont montré un effet d'antagonisme marqué vis-à-vis *Aeromonas salmonicida in vitro* (Chapitre 4). Malgré leur effet d'antagonisme marqué et inductible vis-à-vis *A. salmonicida*, tous les candidats probiotiques (CP) de cette étude doivent être proprement identifiés afin d'exclure ceux étant potentiellement pathogènes. L'identité de séquences entre les séquences du gène de l'ARNr 16S des CP suggère que ces souches sont fortement apparentées au groupe-espèce *Pseudomonas fluorescens* (**Table 4**), généralement réputé sécuritaire et non-pathogène (Scales *et al.*, 2014). Cependant, l'identité de séquences entre paires de gènes d'ARNr 16S offre rarement assez de résolution pour inférer l'appartenance à une espèce (Naum *et al.*, 2008). Voici pourquoi des investigations plus intégratives basées sur la génomique (*p.ex.* la phylogénomique (Philippe *et al.*, 2005) ou l'identité nucléotidique moyenne entre génomes complets (Richter & Rosselló-Móra, 2009) seront requises pour déterminer si les CP de cette étude appartiennent ou non à des espèces ou des sous-espèces pathogènes de *Pseudomonas*. La séquence complète du génome des CP permettra également de détecter la présence éventuelle de caractères indésirables chez un candidat probiotique, comme les groupes fonctionnels de gènes de virulence ou de gènes de résistances aux antibiotiques, ou encore, d'éléments génétiques mobiles susceptibles de disséminer de tels gènes à d'autres

souches bactériennes.

Outre l'évaluation du risque biologique, la séquence génomique des CP pourrait renseigner sur la base moléculaire de leur effet d'antagonisme vis-à-vis *A. salmonicida*. Chez les bactéries du genre *Pseudomonas*, des mécanismes courants impliquant des composés inhibiteurs diffusibles incluent la séquestration pyoverdine-dépendante du fer (Ambrosi *et al.*, 2005; Schalk & Guillon, 2013), les biosurfactants (Gunther *et al.*, 2005; Ochsner & Reiser, 1995) et les protéases extracellulaires (Caballero *et al.*, 2001; Chessa *et al.*, 2000).

L'innocuité et le mécanisme d'action des CP *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B et Iso13 ont été investigués à l'aide d'analyses de génomique comparative sur les séquences *whole-genome shotgun* (WGS) des CP de cette étude, lesquelles ont été obtenues par séquençage de seconde génération. Ces analyses ont d'abord confirmé que les CP de cette étude appartiennent à l'espèce *Pseudomonas fluorescens* ; ensuite elles ont révélé que le risque biologique associé à leur utilisation est faible ; et enfin, ces analyses ont permis d'identifier un vaste ensemble de gènes candidats qui pourrait expliquer leur effet d'antagonisme vis-à-vis *A. salmonicida*.

5.2 - Matériel et Méthodes

Souches, conditions de culture et extractions d'ADN

Les trois CP *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B, Iso13 et la souche témoin neutre *P. fluorescens* CPM15 ont été cultivés en bouillon Trypticase Soja (BD Diagnostics) à 18°C avec agitation pendant 24 heures où jusqu'à saturation. Pour chaque isolat, un aliquot de 2 mL de culture liquide a été centrifugé à 16000 x g pendant 1 min. Les culots ont été re-

suspendus dans 1 mL d'eau MilliQ stérile. La lyse cellulaire a été amorcée par ajout de sodium dodécyl sulfate (SDS) à une concentration finale de 0.75%, suivi d'un traitement à la ribonucléase A à 37°C pendant une heure. Le lysat a été ensuite traité à la protéinase K (20 mM EDTA, 100 µg/mL d'enzyme) pendant deux heures à 50°C. Une première étape de purification a été réalisée en ajoutant 125 µL d'acétate de potassium (KOAc) 8M afin de faire précipiter le SDS. Après 30 minutes sur glace, le lysat a été centrifugé à 16000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été recueilli puis mis en contact pendant 30 minutes avec un volume de phénol équilibré, puis un volume de phénol : chloroforme : alcool isoamyl [25:24:1] puis un volume de chloroforme : alcool isoamyl [24:1]. Les phases aqueuses et organiques ont été mélangées par culbutage pendant 30 minutes. La phase aqueuse a été séparée de la phase organique par centrifugation à 16000 x g pendant 10 minutes, puis transférée dans un autre microtube. La phase aqueuse recueillie a été mélangée à un volume égal d'isopropanol pendant 30 minutes à TP afin de faire précipiter l'ADN. Après centrifugation à 16000 x g pendant 10 minutes, le culot d'ADN a été lavé à l'éthanol froid de deux à trois fois. Les culots séchés ont ensuite été dissous dans 20-30 µL d'eau stérile puis conservés à -20°C jusqu'à usage ultérieur.

Séquençage de seconde génération

L'ADN génomique bactérien a été séquencé à la Plateforme d'Analyses Génomiques de l'Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes de l'Université Laval. Pour chaque souche à l'étude, une banque d'ADN a été construite à partir de 500 ng d'ADN génomique bactérien en utilisant la méthode KAPA Hyper Prep (KAPA Biosystems). Les banques d'ADN ont ensuite été séquencées à l'aide d'un appareil miSeq (Illumina), résultant en des centaines de

milliers de lectures couplées (*paired-end*) par génome.

Assemblage *de novo*

Les lectures en format FASTQ ont été assemblées *de novo* à l'aide du *pipeline* a5-miseq-linux version 2014/11/20 (Tritt *et al.*, 2012), une suite intégrée d'assemblage de génomes bactériens à partir de courtes lectures *paired-end* en format FASTQ. Ce *pipeline* comporte cinq étapes: (1) le tri des lectures de mauvaise qualité et le retrait des séquences adaptatrices, (2) l'assemblage des contigs en « échafaudages » (*scaffolds*) à l'aide de l'algorithme IDBA-UD (Peng *et al.*, 2012) basé sur les graphes de Bruijn (la taille de *k*-mer optimale est déterminée lors de l'exécution du *pipeline* A5), (3) l'assemblage des contigs en *scaffolds* avec SSPACE (Boetzer *et al.*, 2011), (4) la scission des *scaffolds* bruts comportant des mésassemblages, puis (5) réassemblage des *scaffolds*. Les métriques d'assemblage tels que la taille du plus grand contig, le N50 et le nombre de lectures ont été compilées par le *pipeline* A5.

La couverture moyenne du génome et celle de chaque contig ont été obtenues à l'aide d'un script Perl personnalisé (GetContigCoverage.pl; voir Annexe A) utilisant comme entrées un fichier d'assemblage (*.ace) généré par le logiciel CONSED v29.0 (Gordon *et al.*, 1998) et un sommaire de la couverture par nucléotide du génome généré par l'outil TABLET (Milne *et al.*, 2010). La couverture moyenne des contigs a été définie de la manière suivante :

$$C = \frac{\sum_{i=1}^k c_i}{k} \quad (4)$$

où *C* est la couverture moyenne d'un seul contig, *c_i* est la couverture du *i*-ème nucléotide du contig et *k* la taille du contig (pb). La couverture du génome *C* (*i.e.* la moyenne pondérée de

la couverture moyenne des contigs) a été déterminée *a posteriori* :

$$\bar{C} = \sum_{j=1}^n \left\{ \frac{L_j}{\sum_{j=1}^n L_j} \times C_j \right\} \quad (5)$$

où L_j est la taille du j -ème contig (pb) et C_j la couverture moyenne de ce contig. Le nombre de copies des contigs a été dérivé en normalisant leur couverture moyenne par la couverture du génome.

Identification des CP sélectionnés

Les CP ont été identifiés au rang d'espèce sur la base de l'identité nucléotidique moyenne (*average nucleotide identity*; ANI) entre leur génome et des génomes de référence. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel JSPECIES (Richter & Rosselló-Móra, 2009) à l'aide de la fonction « ANIm » qui utilise le script MUMmer (Kurtz *et al.*, 2004) comme algorithme d'alignement de séquences. Les fichiers d'entrée sont les séquences WGS (*i.e.* tous les contigs) des souches à l'étude et les séquences complètes de génomes de *Pseudomonas spp.* disponibles sur la base de données *Pseudomonas Genome Database* (<http://www.pseudomonas.org/>). L'outil JSPECIES calcule l'ANI en fractionnant les génomes comparés en segments de 1020 nt, puis en calculant la moyenne des alignements entre segments qui montrent plus de 30% d'identité de séquence sur au moins 70% de leur longueur.

Arrangement et contenu des génomes

Un modèle d'assemblage non fermé (brouillon) du chromosome (*draft assembly*) a été réalisé à l'aide de l'outil CONTIGuator v2.7 (Galardini *et al.*, 2011). Brièvement, cet outil (i) oriente les contigs sur un chromosome de référence (idéalement la séquence avec laquelle la souche à l'étude partage la plus grande valeur d'ANI); (ii) retourne la séquence d'un pseudo-chromosome dérivé de l'alignement généré en (i); (iii) dresse la liste des contigs n'ayant pu être alignés sur la séquence de référence; et (iv) détermine les stratégies d'amplification PCR (amorces et T_m) requises pour combler les brèches entre contigs (*gaps*), ou encore, pour valider les jonctions prédites entre les contigs.

Les gènes ont été annotés à l'aide du serveur web d'annotation de génomes procaryotes et viraux RAST (Aziz *et al.*, 2008). RAST annote les gènes codant pour des ARN de transfert à l'aide du logiciel tRNAscan-SE (Lowe & Eddy, 1997), tandis que les gènes codant les ARN ribosomiques sont détectés à l'aide de l'outil search_for_rnas (Niels Larsen, non-publié, disponible *via* l'auteur). Les phases ouvertes de lecture (ORF, *open reading frame*) se trouvant au coeur de ces gènes, probablement des artefacts d'annotation, ne sont pas considérés pour la recherche subséquente de gènes encodant des protéines (PEG, *protein encoding genes*). RAST effectue ensuite une recherche *ab initio* de ces PEG à l'aide de l'outil GLIMMER3 (Delcher *et al.*, 2007). La recherche de PEG est raffinée de manière itérative en déterminant le contexte phylogénétique du génome à annoter, et ce, avec un sous-ensemble de gènes candidats « universellement » retrouvés chez les Bactéries et Archées (Aziz *et al.*, 2008).

Bases fonctionnelles de l'effet d'antagonisme

Le pan-génomique des CP à l'étude (*Pseudomonas spp.* Iso11A, Iso11B et Iso13) et de la souche « témoin neutre » décrite dans le chapitre 4 (*P. fluorescens* CPM15) a été analysé afin de rechercher des gènes candidats présents chez tous les CP, mais absents chez la souche témoin neutre. C'est dans ce sous-ensemble que pourraient être trouvés des gènes candidats expliquant l'effet antimicrobien diffusible, lui aussi présent chez tous les CP à l'étude, mais pas chez *P. fluorescens* CPM15. Le pipeline AccessoryGenome.pl (Annexe B) a été développé afin de résoudre cette problématique. Ce pipeline codé en Perl automatise la recherche de gènes homologues parmi plusieurs génomes en automatisant l'action de logiciels de la suite EMBOSS (Rice *et al.*, 2000) et de la suite FASTA v36 (Pearson *et al.*, 1997).

Brièvement, ce pipeline prend comme entrée un ensemble de n génomes annotés en format GenBank, puis : (i) extrait les séquences d'ADN codantes (*Coding DNA Sequence* – CDS) de chaque génome, ainsi que leur traduction en acides aminés; (ii) aligne chaque CDS traduite contre la séquence traduite (dans les six cadres de lecture possibles) d'un autre génome à l'aide de TFASTX v36.3.5e (Pearson *et al.*, 1997); (iii) compile le pourcentage d'identité entre chaque gène de chacun des n génomes et son plus proche homologue dans les $n-1$ autres génomes, s'il existe dans ceux-ci. Pour être considérés comme présents dans les deux génomes, deux orthologues doivent s'aligner avec une valeur E inférieure à 10^{-10} (Pearson, 2013) sur au moins 70% de leur séquence. Les hiérarchies fonctionnelles des gènes, assignées par RAST (<ftp://ftp.theseed.org/subsystems/subsys.txt>) ont été jointes manuellement aux fichiers de sortie de AccessoryGenome.pl via un tableur numérique.

Évaluation des risques biologiques associés à l'utilisation des CP

Résistance aux antibiotiques. Les gènes de résistance aux antibiotiques ont été prédits par annotation d'ORF candidats provenant des fichiers de contigs en format FASTA de chaque souche à l'étude, et ce, à l'aide de l'outil Resistance Gene Identifier v2 de la *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) (<http://arpcard.mcmaster.ca/>), en utilisant les paramètres par défaut. Plusieurs résistances prédites ont aussi été validées expérimentalement à l'aide d'antibiogrammes. Brièvement, pour chaque souche à l'étude, un tapis bactérien a été préparé sur gélose Mueller-Hinton (Criterion) par striation simple avec un coton-tige trempé dans une culture liquide de $DO_{600} = 0.9 \pm 0.1$. Des disques d'antibiotiques BBL Sensi-Disc (BD Diagnostics) Te 5, Te 30 (tétracycline 5 et 30 μg), FOS 200 (fosfomycine 200 μg), C 30 (chloramphénicol 30 μg) et FFC 30 (florfénicol 30 μg) ont été déposés à la surface des géloses fraîchement inoculées. Les géloses ont été incubées à 18°C pendant 24 h, après quoi les halos d'inhibition autour des disques ont été mesurés à partir de numérisations 600 pixels/pouce à l'aide du logiciel de mesures d'images ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Pathogénicité. Le risque de pathogénicité associé à l'utilisation des CP a été évalué par analyse comparative de leur contenu en gènes de virulence. D'abord, les gènes de virulence des CP à l'étude ont été annotés à l'aide d'un script Perl personnalisé (VFDB_search.pl; Annexe C.1) qui : (i) extrait les séquences traduites de toutes les phases de lectures ouvertes (*open reading frame – ORF*) de taille supérieure à 60 codons¹ dans chaque génome, et (ii) recherche, à l'aide de BLASTP, le meilleur homologue présent dans la *Virulence Factor Database* (Chen *et al.*, 2005, 2012). Un gène est considéré comme « annoté » s'il partage

¹Le seuil de 60 codons a été choisi afin d'éviter l'inclusion de courts ORF fortuits (c.-à-d. sans signification biologique).

plus de 60 % d'identité avec son plus proche homologue sur au moins 85% de sa séquence. Ensuite, les données de sortie de VFDB_search.pl ont été compilées à l'aide d'un autre script Perl personnalisé (insert_vfs_into_comparison.pl; Annexe C.2), qui intègre les annotations à une table comparative de 17 génomes de *Pseudomonas* colligée par les auteurs de VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/Down/>). Finalement, une synthèse des tables comparatives générées par insert_vfs_into_comparison.pl (Annexe C.3) a été faite manuellement à l'aide d'un tableur numérique.

Pollution génétique par transfert horizontal. Afin de prédire si les CP de cette étude sont susceptibles de disséminer des gènes de virulence ou d'antibiorésistance, les génomes des CP ont été annotés avec l'outil IslandViewer 3 (Dhillon *et al.*, 2013; Langille & Brinkman, 2009). Cet outil permet de prédire la présence d'îlots génomiques (*genomic islands – GEI*) à l'aide de méthodes soit compositionnelles (IslandPath-DIMOB et SIGI-HMM) soit comparatives (IslandPick). IslandViewer vérifie aussi la présence de gènes de virulence ou d'antibiorésistance par annotation des ORF traduits dans les GEI par recherche BLASTP dans les bases de données VFDB et CARD, respectivement. Pour chaque CP à l'étude, les GEI détectés par au moins une méthode, les gènes d'antibiorésistance, et les gènes de virulence présents dans les GEI sont annotés puis incorporés aux fichiers GenBank des génomes des CP. Des cartes génomiques ont été construites à l'aide des fichiers GenBank de sortie en utilisant le logiciel DNAPlotter (Carver *et al.*, 2009).

5.3 – Résultats et discussion

Les CP sélectionnés appartiennent au groupe-espèce *Pseudomonas fluorescens*

Il a été démontré qu'un seuil d'identité nucléotidique moyenne (ANI, *average nucleotide identity*) de 95-96% est équivalent à un seuil d'hybridation ADN:ADN de 70%, ce dernier étant couramment utilisé pour circonscrire l'appartenance d'une souche bactérienne à une espèce (Konstantinidis & Tiedje, 2005). Or, les CP *Pseudomonas spp.* Iso11A, Iso11B et Iso13 forment un groupe-espèce avec *P. fluorescens* A506, *c.-à-d.* plus de 99% d'ANI (**Table 6**).

Le témoin antagoniste neutre *P. fluorescens* CPM15 est à la limite du seuil d'ANI de 95-96 % permettant l'assignation à une espèce. Ce constat témoigne du fait que le calcul de l'ANI tient compte du génome entier des souches testées. Sachant que le génome de *P. fluorescens* CPM15 a été assemblé en de 23 à 25 *contigs* de moins que les génomes de *P. fluorescens* Iso11A, Iso11B et Iso13 (**Table 7**), il est possible qu'il y ait au moins 20 séquences d'insertion ou autres éléments mobiles de moins dans le génome de *P. fluorescens* CPM15 par rapport aux *P. fluorescens* Iso11A, Iso11B et Iso13. Dans ce cas-ci, la présence d'éléments mobiles mutuellement exclusifs pourrait faire diminuer l'ANI entre CPM15 et les autres souches de cette étude, en dépit de séquences chromosomiques fortement identiques.

D'autres génomes de référence de *Pseudomonas* ont donc été inclus à cette analyse (**Table 6**) afin d'évaluer jusqu'à quel point la divergence d'ANI peut être importante entre souches classifiées comme étant de la même espèce. Or, l'une de ces souches de référence (*P. fluorescens* Pf0-1, isolée de la rhizosphère en 1987) n'est pas incluse dans le groupe-espèce

formé par les CP et *P. fluorescens* A506 (**Table 6**). Or, une analyse phylogénomique de 162 souches de *Pseudomonas* a révélé que les souches A506 et Pf0-1 appartiennent à deux sous-groupes de *P. fluorescens* qui présentent plus de 16% de dissimilarité (Silby *et al.*, 2009). Il est donc possible que l'hétérogénéité génomique au sein du groupe *P. fluorescens* soit beaucoup plus importante que pour d'autres espèces bactériennes. À l'inverse, cette forte hétérogénéité intraspécifique dans les valeurs d'ANI pourrait aussi refléter des difficultés rencontrées dans la classification actuelle des espèces de *Pseudomonas*, dont notamment la forte divergence entre les classifications phénotypiques et génotypiques (Bossis *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2007). Pour ces raisons, il a été admis que *P. fluorescens* CPM15, souche de cette étude, fait partie du groupe-espèce *P. fluorescens*, étant donné l'ANI de 95.7 % avec *P. fluorescens* A506.

Le génome des CP est *a priori* dépourvu de plasmides, tout en étant riche en éléments génétiques mobiles

Les CP *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B et Iso13, tout comme le témoin antagoniste neutre *Pseudomonas* sp. CPM15, possèdent des génomes de taille approximativement similaire, avoisinant les 6.5 Mb, avec une teneur en paires G-C d'environ 59-60% (**Table 7**), ce qui est cohérent avec les caractéristiques génomiques typiques du genre *Pseudomonas* (Silby *et al.*, 2011). La forte identité nucléotidique moyenne entre les CP et *P. fluorescens* A506 (**Table 6**) suggère que l'architecture du génome des CP devrait aussi être similaire à celle de *P. fluorescens* A506.

Table 6. Matrice d'identité nucléotidique moyenne (ANI, %) entre les génomes des CP *Pseudomonas fluorescens* Iso11A, Iso11B et Iso13, la souche témoin neutre *P. fluorescens* CPM15 et plusieurs génomes de référence appartenant au genre *Pseudomonas*.

ANI (%)	CPM15	Iso11A	Iso11B	Iso13	<i>P. fluor.</i> ^A	<i>P. fluor.</i> ^B	<i>P. aer.</i> ^C	<i>P. putida</i> ^D
CPM15		95.5	95.5	95.5	95.7	85.7	83.5	84.4
Iso11A	95.5		99.7	99.6	99.2	85.5	83.5	84.5
Iso11B	95.5	99.6		99.6	99.2	85.5	83.5	84.5
Iso13	95.5	99.6	99.6		99.2	85.5	83.5	84.5
<i>P. fluor.</i> ^A	95.6	99.2	99.2	99.2		85.6	83.5	84.3
<i>P. fluor.</i> ^B	85.7	85.5	85.5	85.5	85.6		83.6	84.4
<i>P. aer.</i> ^C	83.5	83.5	83.5	83.5	83.5	83.6		83.9
<i>P. putida</i> ^D	84.4	84.5	84.5	84.5	84.3	84.4	83.9	

a *P. fluorescens* A506; **b** *P. fluorescens* Pf0-1; **c** *P. aeruginosa* PAO1; **d** *P. putida* NBRC 14164.

Table 7. Principales statistiques d'assemblage *de novo* du génome des souches bactériennes de cette étude.

Souche	Nombre de contigs	Taille approximative du génome (pb)	Taille du plus grand contig (pb)	Taille du contig N50 (pb)	Couverture du génome	Teneur en G-C (%)
<i>Pseudomonas sp. Iso11A</i>	75	6 655 593	1 054 141	176 212	22.6x	59.5
<i>Pseudomonas sp. Iso11B</i>	73	6 656 961	559 199	277 038	23.9x	59.5
<i>Pseudomonas sp. Iso13</i>	74	6 653 541	494 852	278 737	38.8x	59.4
<i>P. fluorescens CPM15</i>	50	6 465 734	718 819	335 189	22.6x	59.8

¹ La statistique N50, analogue à une médiane, est un nombre tel que la somme des longueurs des *scaffolds* de taille inférieure ou égale à N50 est égale à la moitié de la somme de la longueur de tous les *scaffolds* de l'assemblage.

Sachant que la souche A506 possède un seul plasmide circulaire (pA506) de ~56.9 kb (Loper *et al.*, 2012), un alignement des contigs des CP sur la séquence de pA506 a été produit à l'aide de CONTIGuator v2.7.4. Cependant, pour les CP *P. fluorescens* Iso11A, Iso11B, Iso13 et le témoin neutre *P. fluorescens* CPM15, aucun des contigs n'a pu s'aligner sur la séquence du plasmide A506 (données non montrées), ce qui suggère l'absence d'un plasmide pA506-like chez ces souches.

Une autre approche de recherche des éléments plasmidiques a été tentée en caractérisant les contigs dont la couverture moyenne était significativement supérieure à 1 (**Table 8**). Si l'on exclut les contigs correspondant aux opérons des ARN ribosomiques, tous les autres correspondent à des séquences d'insertion (excepté chez *P. fluorescens* CPM15). À noter que tous ces contigs présentent une forte homologie avec des séquences de chromosomes de *Pseudomonas*. Ce résultat implique l'absence de plasmides présents en multiples copies chez les souches probiotiques candidates à l'étude et le témoin neutre. La présence de plasmides en simple copie ne peut pas encore être exclue pour le moment, mais pourra être vérifiée ultérieurement par la finition de l'assemblage des génomes.

Des différences marquées existent entre les génomes des CP et la souche témoin neutre *P. fluorescens* CPM15 en ce qui a trait au nombre de prophages (**Table 9**). Cinq prophages (Phi1, Phi3, Phi4, Phi5, Phi6) sont présents chez tous les CP, mais absents de la souche témoin neutre. Si la base génétique de l'effet d'antagonisme des CP vis-à-vis *A. salmonicida* provient de gènes véhiculés par ces cinq prophages, alors la ou les fonctions impliquées font partie d'un sous-ensemble de 353 gènes, dont 44% encodent des protéines hypothétiques.

Table 8. Principales caractéristiques des *scaffolds* présents en plus d'une copie dans le génome des CP et du témoin antagoniste neutre.

<i>Pseudomonas fluorescens</i> CPM15							
Scaffold	Taille (pb)	# Copies	Fonction(s)	Accession *	% Couverture	% identité	Valeur E
scaffold_44	1840	5	ADN polymérase	CP010945.1 (chromosome)	100	99	0

<i>Pseudomonas fluorescens</i> Iso11A							
Scaffold	Taille (pb)	# Copies	Fonction(s)	Accession *	% Couverture	% identité	Valeur E
scaffold_62	2432	6	Putative transposase, famille IS66	CP002585.1 (chromosome)	99	89	0
scaffold_70	1072	7	Transposase, famille IS30	CP006852.1 (chromosome)	100	100	0

<i>Pseudomonas fluorescens</i> Iso11B							
Scaffold	Taille (pb)	# Copies	Fonction(s)	Accession *	% Couverture	% identité	Valeur E
scaffold_60	2413	6	Putative transposase, famille IS66	CP002585.1 (chromosome)	99	89	0
scaffold_70	1066	7	Transposase, famille IS30	CP006852.1 (chromosome)	100	100	0

<i>Pseudomonas fluorescens</i> Iso13							
Scaffold	Taille (pb)	# Copies	Fonction(s)	Accession *	% Couverture	% identité	Valeur E
scaffold_62	2419	6	Putative transposase, famille IS66	CP002585.1 (chromosome)	99	89	0

Ce tableau exclut les *scaffolds* contenant les opérons ARNr (en tout ou en partie) et les *scaffolds* dont la couverture moyenne n'était pas significativement différente de la couverture moyenne du génome ($P > 0.001$, test Z). * Meilleur résultat BLASTn.

Table 9. Prophages intacts présents dans le génome des souches bactériennes analysées dans cette étude.

Code *	Taille (kb)	GC%	CDS **	% hypo ***	Présence / absence				
					<i>P. f.</i> Iso11A	<i>P. f.</i> Iso11B	<i>P. f.</i> Iso13	<i>P. f.</i> CPM15	<i>P. f.</i> A506
Phi1	34.8	63.45	46	61 %	Présence	Présence	Présence	Absence	Absence
Phi2	20.2	59.62	29	28 %	Présence	Présence	Présence	Présence	Présence
Phi3	41.5	57.05	39	33 %	Présence	Présence	Présence	Absence	Absence
Phi4	40.7	57.29	49	57 %	Présence	Présence	Présence	Absence	Présence
Phi5	25.0	58.67	28	36 %	Présence	Présence	Présence	Absence	Absence
Phi6	33.3	57.25	32	47 %	Présence	Présence	Présence	Absence	Absence
Phi7	44.9	57.51	57	53 %	Absence	Absence	Absence	Présence	Absence
Phi8	52.9	57.4	73	33 %	Absence	Absence	Absence	Absence	Présence

* Étant donné que les prophages Phi1 à Phi6 sont présents dans plusieurs génomes, seules les statistiques dérivées de l'analyse du génome de *P. fluorescens* Iso11A ont été rapportées. ** *coding DNA sequence* (séquence encodant des protéines). *** Proportion des CDS encodant des protéines hypothétiques, *c.-à-d.* dont la fonction est inconnue. Bien que l'acquisition de fonctions antimicrobiennes *via* la conversion lysogénique soit une hypothèse très plausible (Brüssow *et al.*, 2004; Canchaya *et al.*, 2004), il est pour l'instant difficile de cerner précisément la ou les fonctions véhiculées par les prophages qui expliqueraient l'effet anti-*A. salmonicida* des CP.

Les génomes des CP et de la souche témoin neutre *P. fluorescens* CPM15 renferment un nombre élevé de gènes d'intégrase (près de quatre fois plus que *P. fluorescens* A506, qui forme un groupe-espèce avec les CP; **Table 10**); le nombre de gènes de transposase est environ deux fois plus élevé chez les CP que chez la souche A506. Ce constat suggère que les CP de cette étude sont susceptibles d'intégrer du matériel génétique exogène à leur chromosome, ou encore de subir des réarrangements fréquents. Néanmoins, de tels éléments sont aussi retrouvés, parfois en quantité aussi importante, dans le génome de probiotiques ou d'agents de biocontrôle homologués (**Table 10**).

Les bases fonctionnelles de l'effet d'antagonisme des CP se situent parmi un grand ensemble de gènes accessoires

L'approche pan-génomique a été utilisée afin de déterminer de manière systématique les gènes différentiellement présents entre les CP *P. fluorescens* Iso11A, Iso11B, Iso13 et la souche témoin antagoniste neutre *P. fluorescens* CPM15. On assume ici que les gènes mutuellement exclusifs chez les CP et la souche témoin neutre pourraient expliquer les différences phénotypiques observées en ce qui a trait à leur effet d'antagonisme vis-à-vis *A. salmonicida*. Cette analyse a révélé un grand sous-ensemble de 1 001 gènes différentiellement présents (**Fig. 6**). Parmi les 600 gènes uniques aux CP, 269 encodent des protéines hypothétiques. La fonction moléculaire des 331 gènes restants a pu être annotée, mais seulement 123 de ces gènes ont pu être assignés à des catégories fonctionnelles hiérarchiques, *c.-à-d.* *SEED subsystems* (Overbeek *et al.*, 2014) (**Fig. 7**).

Table 10. Topologie et contenu en gènes des génomes des CP *Pseudomonas fluorescens* Iso11A, Iso11B, Iso13, et la souche témoin antagoniste neutre *P. fluorescens* CPM15, comparés à des souches probiotiques ou de biocontrôle d'intérêt.

Caractéristiques	Souches bactériennes de cette étude				Agents de biocontrôle (<i>Pseudomonas</i> sp.)		Probiotiques commerciaux (non- <i>Pseudomonas</i>)		
	<i>P. f.</i> CPM15	<i>P. f.</i> Iso11A	<i>P. f.</i> Iso11B	<i>P. f.</i> Iso13	Blightban A506	<i>P. putida</i> B001	BACTO- CELL	MUTA- FLOR	BB-12
Topologie									
Taille du génome (Mb)	6.46	6.65	6.65	6.65	6.02	5.74	1.99	5.44	1.94
# Chromosomes **	1	1	1	1	1	1	n/d	1	1
# Plasmides	n/d	n/d	n/d	n/d	1	n/d	n/d	n/d	0
Contenu en gènes									
# CDS	5 711	6 007	6 006	6 000	5 334	5380	1 898	5329	1622
# gènes d'ARNr	13	14	14	14	19	4 ***	16	53	13
# gènes d'ARNt	62	62	62	62	69	49 ***	56	117	52
Éléments génétiques mobiles									
Ilôts génomiques (GI)	59	33	40	37	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
Prophages intacts **	2	6	6	6	3	n/d	n/d	n/d	n/d
Gènes de transposases	6	8	6	8	3	2	2	11	2
Gènes d'intégrase	20	22	24	23	5	11	3	12	3

* n/d, quantité inconnue. ** Ces quantités ont été déterminées à partir des pseudo-chromosomes générés par CONTIGuator au lieu des séquences génomiques *shotgun*. Le statut de « prophage intact » est défini au sens des auteurs de PHAST. n/d, indéterminé. Blightban A506, *Pseudomonas fluorescens* A506; BACTOCELL, *Pediococcus acidilactici* MA18/5M; MUTAFLOR, *Escherichia coli* Nissle 1917; BB-12, *Bifidobacterium lactis* BB-12. *** Nombre de gènes récupérés malgré la forte fragmentation de la séquence *shotgun* obtenue par assemblage de courtes lectures Illumina GA.

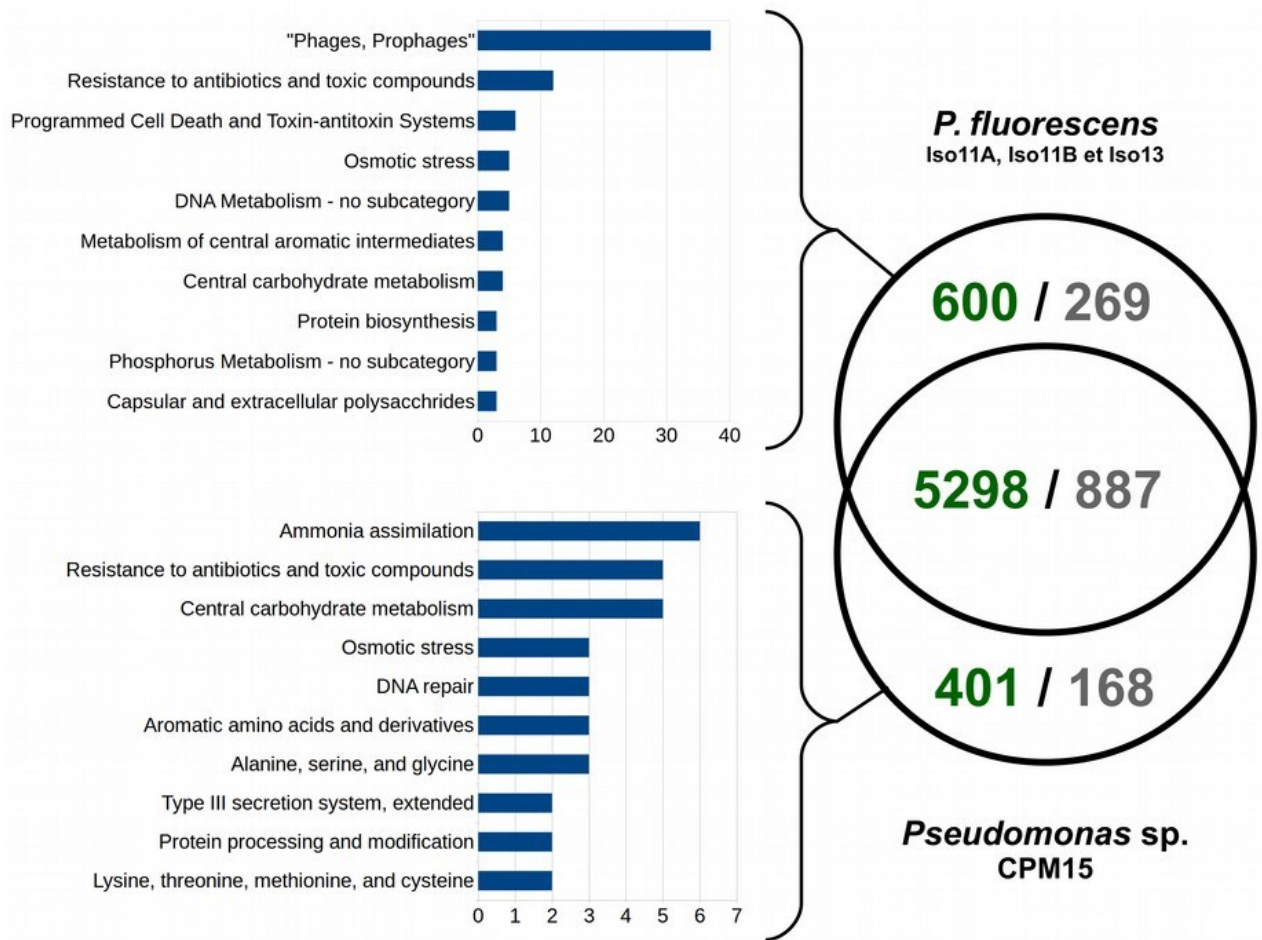


Fig. 6. Diagramme de Venn du pan-génome des candidats probiotiques *Pseudomonas fluorescens* Iso11A, Iso11B, Iso13 et le témoin antagoniste neutre *P. fluorescens* CPM15. En vert, le nombre total de gènes dans chaque sous-ensemble; en gris, le nombre de gènes hypothétiques. Les histogrammes représentent, pour chaque sous-ensemble, la distribution des gènes parmi les dix catégories fonctionnelles (SEED subsystems level 2 (Overbeek et al., 2014)) les plus abondantes.

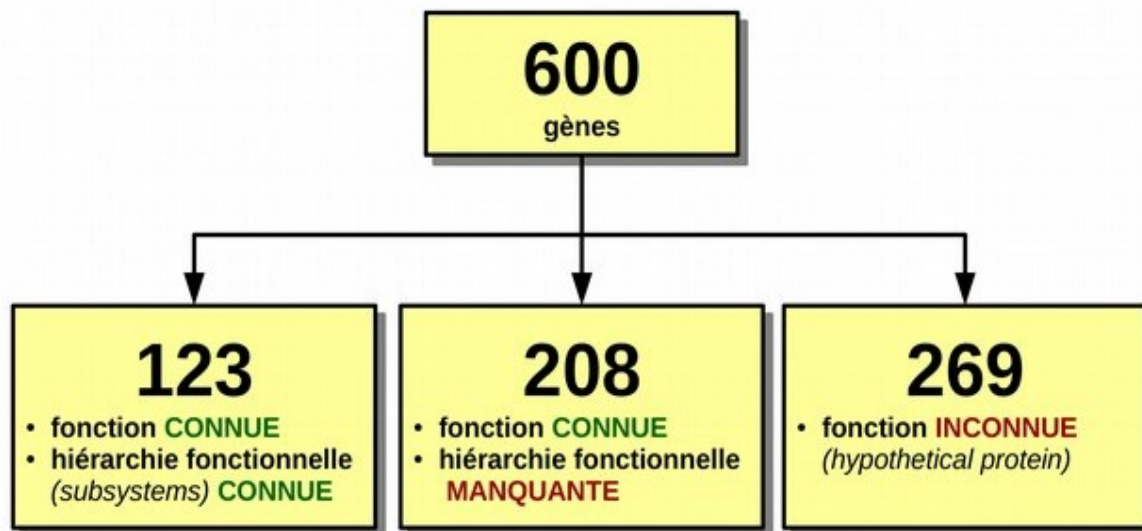


Fig. 7. Distribution des gènes encodant des protéines présents chez les CP *P. fluorescens* Iso11A, Iso11B et Iso13, mais absents chez *Pseudomonas sp.*, selon le niveau de détail des annotations sur leur fonction moléculaire et les catégories fonctionnelles dont ils font partie.

Parmi ces 123 gènes, ceux des prophages occupent la plus grande proportion (**Fig. 6**), ce qui est cohérent avec la présence de cinq prophages exclusifs aux CP par rapport à *P. fluorescens* CPM15. Les autres catégories fonctionnelles les plus abondantes concernent la résistance aux antibiotiques et aux xénobiotiques, et d'autres processus métaboliques qui ne semblent pas explicitement liés à un quelconque mécanisme d'antagonisme vis-à-vis *A. salmonicida*. De plus, il ne serait pas possible d'exclure que ce soient des gènes encodant des protéines hypothétiques qui expliquent l'effet d'antagonisme des CP. Ce scénario serait très probable, sachant que près de la moitié des gènes présents chez les CP, mais absents de la souche témoin neutre, encodent des protéines hypothétiques. Il est donc possible que les bases fonctionnelles de l'effet d'antagonisme chez les CP aient été acquises suite à l'intégration d'un prophage. En effet, les prophages sont connus pour renfermer des éléments génétiques non-réprimés lors du cycle lysogénique (Cumby *et al.*, 2012). Ces éléments génétiques peuvent conférer aux bactéries lysogènes des avantages adaptatifs tels que la production de toxines additionnelles, la résistance à certains antibiotiques, ou encore la production de biofilms (Fortier & Sekulovic, 2013).

Toutefois, l'analyse pan-génomique des souches à l'étude ne permet pas d'établir avec certitude que le répertoire fonctionnel des prophages différentiellement présents renferme les bases fonctionnelles de l'antagonisme, ni quelles sont précisément les fonctions impliquées. Une autre limite de cette approche est l'hypothèse que l'effet d'antagonisme des CP *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B et Iso13 est attribuable à des gènes accessoires présents chez les CP, mais pas chez la souche témoin neutre. Plusieurs scénarios alternatifs pourraient ne pas être reflétés dans les résultats d'une telle analyse. En effet, (i) il est possible que cet effet d'antagonisme soit plutôt attribuable à l'expression différentielle de

gènes mutuellement présents entre les CP et la souche témoin neutre, et (ii) il est aussi possible que, chez la souche témoin neutre, les gènes responsables de l'effet antimicrobien diffusible soient aussi présents, mais qu'ils aient subi des mutations causant des pertes de fonction, ou encore, que les régulateurs de ces gènes ne soient pas fonctionnels. Pour évaluer ces possibilités, il faudrait analyser l'expression différentielle des gènes dans l'ensemble des transcrits bactériens (*c.-à-d.* le transcriptome) des CP en situation de compétition *in vitro* contre *A. salmonicida*. Une caractérisation *in vitro* approfondie du (ou des) composés inhibiteurs permettrait également de mieux prédire quels sont les gènes impliqués dans leur synthèse, et ainsi, d'inférer plus précisément les mécanismes d'action des CP contre *A. salmonicida*.

Les risques biologiques associés à l'utilisation des CP sont faibles

Risque de pathogénicité. Le risque de pathogénicité associé à l'utilisation des CP *P. fluorescens* Iso11A, Iso11B et Iso13 (ainsi que la souche témoin neutre CPM15) a été évalué par analyse comparative à l'aide d'une table du contenu en gènes de virulence de 16 autres génomes de *Pseudomonas* colligée par les auteurs de la *Virulence Factor Database* (VFDB). Cette analyse révèle que la teneur en gènes de virulence des souches de cette étude est, et de loin, inférieure à celle d'espèces pathogènes envers les humains et les plantes. En effet, environ 30-35% des gènes de virulence retrouvés chez *P. aeruginosa* et *P. syringae* sont également présents dans le génome des CP et de la souche témoin neutre (**Table 11**). Cette analyse indique également que près de la moitié (6/13) des groupes fonctionnels de virulence que possèdent les souches de cette étude sont *a priori* incomplets (moins de 60% des gènes faisant partie de ce groupe sont présents). Notamment, les groupes fonctionnels encodant des systèmes de sécrétion de type III (T3SS) sont soit

absents ou quasi absents, *c.-à-d.* moins de 20% des gènes encodant l'appareil de sécrétion sont présents (Annexe C.3). Il est donc fort probable que le T3SS, un déterminant clé de la virulence bactérienne envers les cellules eucaryotes (Tosi *et al.*, 2013), soit inactif chez les CP de cette étude. Outre le T3SS, les CP *P. fluorescens* Iso11A, Iso11B et Iso13, ainsi que CPM15, ne possèdent aucun gène encodant des phospholipases ou des protéases (à l'exception de la protéase alcaline). Les souches de cette étude n'encodent ni d'exotoxine A ni d'enzymes de biosynthèse de cyanure d'hydrogène, lesquelles sont deux déterminants-clés de la virulence de *P. aeruginosa*. De plus, *P. fluorescens* Iso11A, Iso11B, Iso13 et CPM15 n'encodent aucune phytotoxine répertoriée dans la VFDB. En somme, les analyses comparatives suggèrent que le risque de pathogénicité des CP de cette étude est faible, car la plupart des déterminants de la virulence de *Pseudomonas* envers les animaux et les plantes sont soit absents ou *a priori* incomplets. Néanmoins, il est possible qu'elles possèdent des gènes de virulence qui ne soient pas annotés dans la VFDB, ou pas inclus dans le tableau comparatif utilisé pour cette analyse. Pour cette raison, le risque de pathogénicité devra impérativement être vérifié *in vivo* lors d'essais en contexte préventif.

Risque d'antibiorésistance. Les CP *P. fluorescens* Iso11A, Iso11B, Iso13 et la souche témoin antagoniste neutre *P. fluorescens* CPM15 portent plusieurs gènes d'antibiorésistance (**Table 12**), dont la grande majorité (75 % à 79 %) encode des composantes de mécanismes d'efflux, dont des systèmes d'efflux multidrogue. Les autres gènes prédits confèrent la résistance aux β -lactames, la fosfomycine, la polymyxine, et le choramphénicol / florfénicol.

Table 11 (partie 2/2).

	Toxins	Phytotoxin phaseolotoxin	Red								Red				Red					Green	Red	Red					
		Phytotoxin syringomycin	Red								Red				Red					Red	Green	Red					
		Phytotoxin syringopeptin	Red								Red				Red					Red	Green	Red					
		TccC-type insecticidal toxins	Red				Green	Red			Red				Red					Green	Green	Green					
Defensive	Antimicrobial activity	Phenazines biosynthesis	Green				Red	Red			Red				Red					Red	Red	Red					
	Antiphagocytosis	Alginate biosynthesis	Green								Green				Green					Green	Green	Green					
		Alginate regulation	Green				Green	Green	Yellow	Yellow			Green				Green					Green	Green	Green			
Regulation	Quorum sensing systems	Acylhomoserine lactone synthase	Green				Green	Green	Red	Red			Green				Red	Red					Red	Red	Red		
		N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone	Green				Red	Red	Yellow	Red			Red				Red					Red	Red	Red			
		N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone	Red								Red				Red					Green	Green	Green					
		N-(butanoyl)-L-homoserine lactone	Green				Red	Red	Yellow	Yellow			Red				Red					Red	Red	Red			
	Sensor kinase	GacS/GacA two-component system	Green				Green	Green	Red	Red			Green				Red	Green					Green	Green	Green		
Non-specific	Biosurfactant	Rhamnolipid biosynthesis	Green				Red	Red	Yellow	Green	Yellow	Green			Red				Yellow	Red					Red	Red	Red
	Iron uptake	Achromobactin biosynthesis and transport	Red	Yellow	Red		Red			Red				Red					Red	Green	Green	Red					
		Pyochelin	Green				Red			Red				Red					Yellow	Red	Yellow						
		Pyochelin receptor	Green				Red			Red				Red					Red	Red	Red						
		Pyoverdine	Green				Green	Yellow	Green			Green				Yellow	Yellow	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green				
		Pyoverdine receptors	Green								Green				Green					Red	Red	Red	Red				
		Yersiniabactin	Red								Red				Red					Green	Red	Green					
Nombre total de gènes de virulence			230	193	234	231	142	115	129	85	83	85	85	85	106	108	109	108	71	222	196	239					
Proportion du nombre maximal (%)			96.2	80.8	97.9	96.7	59.4	48.1	54.0	35.6	34.7	35.6	35.6	35.6	44.4	45.2	45.6	45.2	29.7	92.9	82.0	100.0					

Les facteurs de virulence sont considérés comme fonctionnels si plus de 60% des gènes l'encodant sont présents (vert). À l'inverse, ils sont considérés comme incomplets (jaune) lorsque plus de 40% des gènes encodant le facteur de virulence sont manquants. En rouge, les facteurs de virulence entièrement absents (aucun gène retrouvé).

Toutes les souches à l'étude portent le gène *cfr* codant une méthyltransferase de l'ARNr 23S (EC 2.1.1.224) conférant la résistance au chloramphénicol et au florfénicol (AQUAFLOTM). Cependant, seuls les CP *P. fluorescens* Iso11A, Iso11B et Iso13 montrent des signes de résistance *in vitro* à ces deux antibiotiques; la souche témoin neutre *P. fluorescens* CPM15 résiste au chloramphénicol, mais pas au florfénicol (**Table 13**), ce qui indique que d'autres fonctions que *cfr* pourraient conférer la résistance à l'AQUAFLO chez les CP de cette étude. Il s'agit fort probablement de mécanismes d'efflux, puisqu'aucun gène d'antibiorésistance spécifique au florfénicol/chloramphénicol autre que *cfr* n'a été retrouvé chez les CP de cette étude (**Table 12**). Le profil d'antibiorésistance des souches bactériennes de cette étude amène des avenues intéressantes sur leur utilisation concrète en tant que traitement probiotique. En effet, si les CP *P. fluorescens* Iso11A, Iso11B et Iso13 résistent fortement à l'AQUAFLO (**Table 13**), alors ils pourraient être utilisés en parallèle, ou encore, administrés aux poissons infectés pendant la période de retrait de l'antibiotique afin de consolider le traitement antimicrobien. Par contre, une telle stratégie risquerait d'augmenter l'incidence de transferts horizontaux des gènes de résistance au florfénicol des CP vers d'autres bactéries, dont potentiellement *A. salmonicida*.

Risque de pollution génétique par transfert horizontal. Afin d'évaluer le risque de transfert horizontal de gènes indésirables, les îlots génomiques (GEI), les prophages, le mobilome et le résistome des candidats probiotiques de cette étude ont été annotés puis cartographiés sur la séquence de leur génome (**Fig. 8**). Les GEI étant des loci susceptibles d'être échangés par transfert horizontal (Boyd *et al.*, 2009; Juhas *et al.*, 2009), les gènes de virulence et d'antibiorésistance auraient de plus fortes chances d'être transférés horizontalement à leur tour s'ils se situaient dans des GEI ou des prophages plutôt qu'ailleurs dans le chromosome.

Or, aucun gène de virulence ne se trouve dans les GEI ou les prophages des souches bactériennes à l'étude, à l'exception de chez *P. fluorescens* CPM15 (**Table 14**). Toutes les souches à l'étude ne possèdent que deux gènes de résistances aux antibiotiques dans des GEI (ceux de CPM15 sont différents de ceux des autres souches). Chez les CP *P. fluorescens* Iso11A, Iso11B et Iso13, aucun de ces deux gènes (*emrB* et *pmrC*) n'encode de résistance à des antibiotiques autorisés pour traiter la furonculose au Canada (**Table 1**). En effet, *emrB* confère la résistance au CCCP, FCCP au 2,4-dinitrophénol et à l'acide nalidixique (Andersen *et al.*, 2015) et *pmrC* confère la résistance à la polymyxine B (Lee *et al.*, 2004). Sachant que les CP de cette étude montrent une sensibilité à l'acide nalidixique (**Table 13**), il est possible que le gène *emrB* soit inactif ou non fonctionnel.

En somme, les résultats de cette analyse suggèrent qu'il y a un faible risque que les CP disséminent par transfert horizontal des gènes de résistance à des antibiotiques d'importance majeure en aquaculture au Canada. Toutefois, la possibilité que les CP renferment des mécanismes de transfert horizontal effectifs, mais non-annotés, ne peut être écartée. Il en est de même pour les gènes de résistance aux antibiotiques. Les risques associés à leur utilisation devront donc nécessairement être vérifiés *in vivo* lors d'essais en contexte préventif.

Table 12. Fréquence des annotations CARD de gènes d'antibiorésistance chez les candidats probiotiques de cette étude et des agents de biocontrôle ou probiotiques commerciaux.

Gènes d'antibiorésistance	Nombre de gènes annotés								
	Souches bactériennes de cette étude				Agents de biocontrôle (<i>Pseudomonas</i> sp.)		Probiotiques commerciaux ^(b) (non- <i>Pseudomonas</i>)		
	<i>P. f.</i> CPM15	<i>P. f.</i> Iso11A	<i>P. f.</i> Iso11B	<i>P. f.</i> Iso13	Blightban A506	<i>P. putida</i> B001	BACTO- CELL	MUTA- FLOR	BB-12
Résistances non spécifiques									
Systèmes d'efflux	31	24	24	24	24	19	4	55	-
Résistances spécifiques									
β-lactames	3	3	3	3	3	3	-	1	-
Polymyxine	3	3	3	3	2	1	-	8	1
Fosfomycine	1	1	1	1	1	-	-	-	-
Chloramphénicol	1	1	1	1	1	1	-	1	1
Fluoroquinolones	-	-	-	-	-	-	2	-	1
Lincosamides	-	-	-	-	-	-	1	1	-
Bacitracine	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Isoniazide	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Tétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	1
TOTAL	39	32	32	32	31	24	7	68	4

Blightban A506, *Pseudomonas fluorescens* A506; BACTOCELL, *Pediococcus acidilactici* MA18/5M; MUTAFLOR, *Escherichia coli* Nissle 1917; BB-12, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12.

Table 13. Validation expérimentale des résistances aux antibiotiques autres que les mécanismes d'efflux chez les CP et la souche témoin antagoniste neutre de cette étude.

CP	Diamètre d'inhibition (mm) autour des disques d'antibiotiques*				
	TET	CHL	NAL	SXT	FFC
<i>P. fluorescens</i> CPM15	+++	+	++	++	+++
<i>P. fluorescens</i> Iso11A	+++	+	+++	++	-
<i>P. fluorescens</i> Iso11B	+++	+	++	++	-
<i>P. fluorescens</i> Iso13	+++	+	++	++	-

* TET, tétracycline (30 µg); CHL, chloramphénicol (30 µg); NAL, acide nalidixique (30 µg); SXT, sulfaméthoxazole / triméthoprim (1.25 µg / 23.75 µg); FFC, florfenicol (30 µg). -, diamètre d'inhibition (d.i.) absent ou difficilement mesurable; +, d.i. inférieur à 10 mm; ++, d.i. entre 10 et 16 mm; +++, d.i. supérieur à 16 mm.

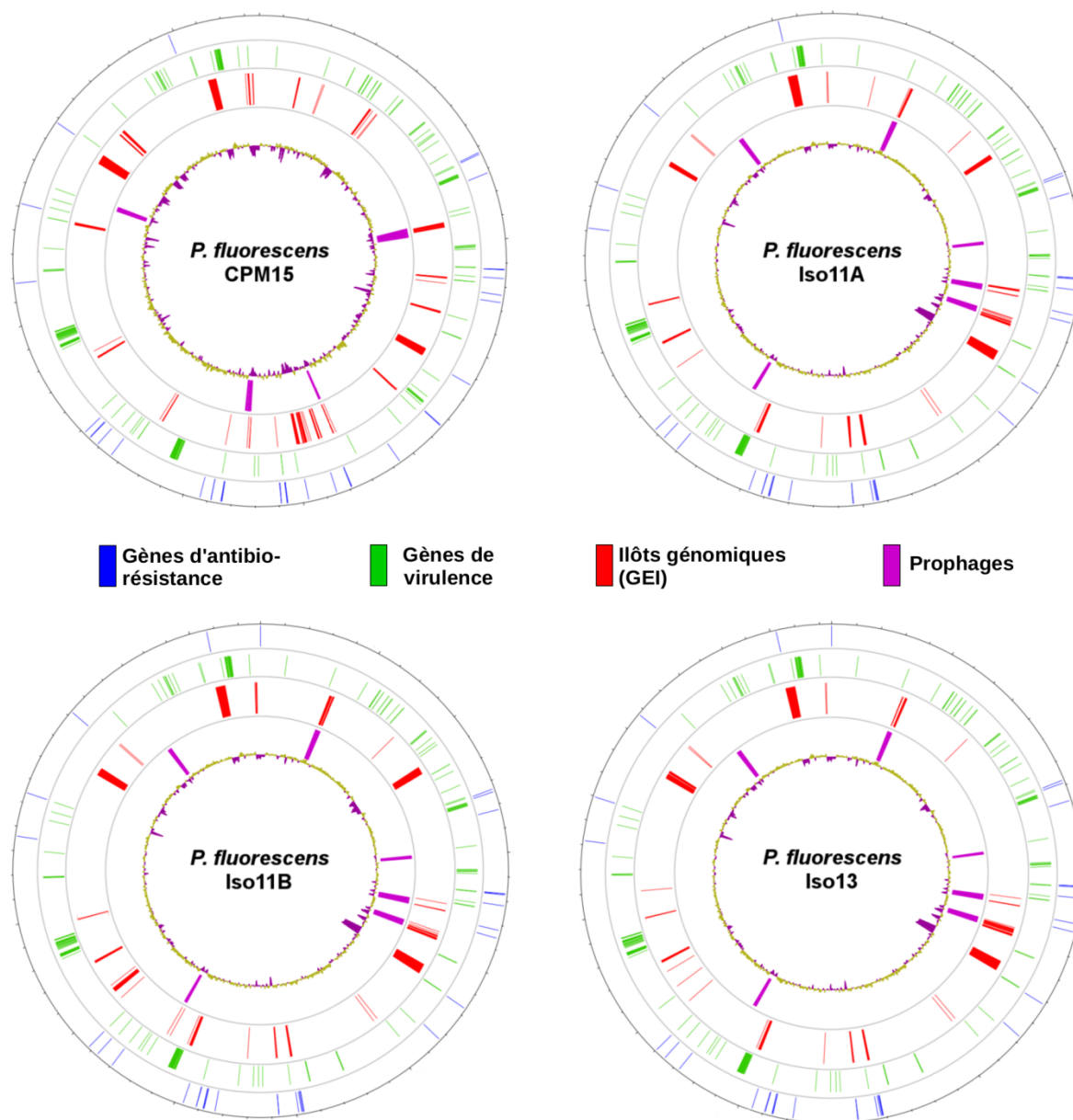


Fig. 8. Représentation circulaire du chromosome des CP sélectionnés *Pseudomonas fluorescens* Iso11A, Iso11B, Iso13 et du témoin antagoniste neutre *P. fluorescens* CPM15. Les rectangles colorés représentent les gènes d'antibiorésistance et de virulence, ainsi que des îlots génomiques et des prophages. Le cercle central correspond à la composition en G-C (mauve, %GC < 50 %; jaune, %GC > 50%).

Table 14. Gènes de virulence ou d'antibiorésistance des candidats probiotiques de cette étude qui sont situés dans des ilots génomiques (GEI) ou des prophages.

(Gène) Produit	Catégorie	Élément mobile	Présence / absence			
			<i>P.f.</i> CPM15	<i>P.f.</i> Iso11A	<i>P.f.</i> Iso11B	<i>P.f.</i> Iso13
(<i>bplL</i>) lipopolysaccharide biosynthesis protein	Virulence	GEI	x			
(<i>gtrA</i>) bactoprenol-linked glucose translocase/flippase	Virulence	GEI	x			
(<i>gtrB</i>) bactoprenol glucosyl transferase	Virulence	GEI	x			
(<i>pilF</i>) type 4 fimbrial biogenesis protein	Virulence	Prophage	x			
(<i>facT</i>) putative transporter	Antibiorésistance	GEI	x			
(<i>mexS</i>) MexT suppressor protein	Antibiorésistance	GEI	x			
(<i>emrB</i>) multidrug resistance protein B *	Antibiorésistance	GEI		x	x	x
(<i>pmrC</i>) predicted metal-dependant hydrolase **	Antibiorésistance	GEI		x	x	x

* *emrB* confère la résistance au CCCP, FCCP au 2,4-dinitrophenol et à l'acide nalidixique. ** *pmrC* confère la résistance à la polymyxine B.

6- Conclusion

Ce projet de maîtrise proposait d'identifier des symbiontes endogènes de l'Omble de fontaine montrant un effet d'antagonisme marqué vis-à-vis d'*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, l'agent étiologique de la furonculose des salmonidés. Trois isolats bactériens provenant du mucus cutané du poisson-hôte ont démontré des propriétés d'antagonisme *in vitro* marquées vis-à-vis de dix souches - dont quatre québécoises - d'*A. salmonicida*, l'agent étiologique de la furonculose. Ces trois souches (*Pseudomonas fluorescens* Iso11A, Iso11B et Iso13) ont été sélectionnées en tant que candidats probiotiques (CP) pour prévenir et traiter la furonculose chez l'Omble de fontaine.

Chez ces trois CP, l'effet d'antagonisme a été mis en évidence lors d'essais *in vitro* émulant différents contextes microbiologiques (*c.-à-d.* en biofilms et en forme planctonique). L'effet des CP semble provenir de composés diffusibles inhibant la croissance d'*A. salmonicida* en conditions proches de celles retrouvées en biofilms (*c.-à-d.* forte densité cellulaire et sans contact direct entre les CP et *A. salmonicida*). En forme planctonique, les CP semblent inhiber *A. salmonicida* par exclusion compétitive, c'est-à-dire en limitant les ressources disponibles à *A. salmonicida*. Cependant, la nature des composés diffusibles sécrétés par les CP reste à préciser.

L'innocuité des CP a été prédite par la caractérisation bio-informatique de leur génome. En somme, les analyses comparatives suggèrent que le risque de pathogénicité des souches de cette étude est faible, car la plupart des déterminants de la virulence de *Pseudomonas* envers les animaux et les plantes sont soit absents ou *a priori* incomplets. De plus, aucun gène de résistance à des antibiotiques homologués pour usage en aquaculture au Canada ne

se trouve sur des éléments génétiques mobiles susceptibles d'être disséminés par transfert horizontal. Conséquemment, nous estimons que les CP de cette étude *P. fluorescens* Iso11A, Iso11B et Iso13 possèdent un faible risque de pathogénicité et de dissémination de l'antibiorésistance, ce qui justifie leur utilisation dans les phases ultérieures du projet (p. ex. validation expérimentale *in vivo*).

En dépit de la perte d'efficacité *in vitro* du variant de culture *Pseudomonas* sp. Iso11B par rapport à Iso11A, cette souche pourrait toujours être incluse dans les essais *in vivo*. En effet, la différence d'efficacité *in vivo* entre *P. fluorescens* Iso11A et Iso11B pourrait être corrélée à des différences entre leur génotype, lesquelles peuvent être justement dérivées des comparaisons entre génomes qui ont été obtenues dans cette étude.

Vu que la plupart des souches probiotiques documentées à ce jour sont des bactéries à acide lactique (*Lactococcus*, *Lactobacillus*), des bifidobactéries ou des entérobactéries (Fontana *et al.*, 2013), l'isolement de *Pseudomonas* spp. endogènes en tant que probiotiques peut sembler atypique. Toutefois, l'usage de souches de *Pseudomonas* en tant que bactéries à effets bénéfiques n'est pas étranger au secteur de l'aquaculture. En contexte aquacole, plusieurs *Pseudomonas* spp. ont démontré des propriétés antimicrobiennes vis-à-vis d'agents pathogènes, et ce, tant *in vitro* qu'*in vivo* (Bly *et al.*, 1997; Gram *et al.*, 1999; Silby *et al.*, 2009). En outre, ce n'est pas la première fois qu'a été rapporté l'isolement d'une souche endogène de *Pseudomonas* inhibitrice vis-à-vis un agent pathogène de salmonidés (Korkea-aho *et al.*, 2011). Conséquemment, les résultats de recherche présentés dans ce mémoire réitèrent que les souches de *Pseudomonas* endogènes constituent un réservoir d'intérêt pour la recherche et le développement d'outils novateurs, particulièrement pour la lutte biologique en aquaculture.

7 – Perspectives

Pour faire suite aux prédictions d'innocuité et d'efficacité des CP *Pseudomonas* spp. Iso11A, Iso11B et Iso13, des essais *in vivo* seront indispensables pour déterminer leur véritable potentiel. En effet, l'efficacité chez des modèles *in vitro* ne résulte pas toujours en une efficacité *in vivo*. Lors de l'essai d'une souche probiotique candidate contre la furonculose chez le Saumon atlantique (*Salmo salar*), Gram et al. (2001) ont découvert que cette souche candidate, *Pseudomonas fluorescens* AH-2, n'avait aucun effet significatif *in vivo* sur la mortalité cumulée causée par la furonculose, et ce, malgré un effet d'antagonisme marqué vis-à-vis *A. salmonicida*. À noter que *P. fluorescens* AH-2 avait été isolée d'un poisson d'eau douce tempérée, la perche du Nil (*Lates niloticus*). Sachant que le Saumon atlantique croît dans de l'eau de mer froide dès la “smoltification” et pendant l'âge adulte (Willoughby, 1999), *P. fluorescens* AH-2 pourrait ne pas arriver à croître dans de telles conditions, menant ainsi à la perte de ses propriétés probiotiques.

Bien que la sélection de CP endogènes minimise le risque d'inefficacité *in vivo* due à l'incompatibilité probiotique-hôte, des essais *in vivo* devraient toujours guider la sélection de probiotiques pour chaque combinaison hôte-pathogène. C'est pourquoi les propriétés d'antagonisme des trois candidats probiotiques *P. fluorescens* Iso11A, Iso11B et Iso13 vont être testées *in vivo* très prochainement en mode préventif et en mode curatif, c'est-à-dire en présence d'une infection expérimentale de furonculose dès que nous aurons accès à un laboratoire aquatique AQC2-*in vivo*.

Lorsque de telles installations seront disponibles, l'innocuité et l'efficacité *in vivo* des trois meilleurs CP seront validées en contexte préventif chez des Ombles juvéniles (0+, ~1 g)

avec des statuts de résistance contrastés (lignées Rupert et Domestique, 100 poissons / lignée / réplique / traitement). L'effet des traitements probiotiques expérimentaux sera comparé aux stratégies de traitement de la furonculose actuellement homologuées au Canada : l'antibiotique AQUAFLO^R et le vaccin FurogenDip α . Plus précisément, nous nous intéresserons à l'effet de ces traitements sur plusieurs marqueurs physiologiques d'intérêt : cortisol plasmique, indice de Fulton, taux de conversion alimentaire, et nous porterons une attention particulière à la stabilité des principales communautés microbiennes en présence (poisson, eau, biofilms et biofiltre), laquelle sera évaluée à l'aide du séquençage d'ADN de nouvelle génération et de la métagénomique. Ce projet fera suite aux activités de recherche entreprises lors de ma maîtrise, et ce, à titre d'objet de mon futur doctorat en biologie.

7- Bibliographie

- L'Abée-Lund, T. M. & Sørum, H. (2001).** Class 1 Integrons Mediate Antibiotic Resistance in the Fish Pathogen *Aeromonas salmonicida* Worldwide. *Microb Drug Resist* **7**, 263–272.
- Alakomi, H.-L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K. & Helander, I. M. (2000).** Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2001–2005.
- Alderman, D. J. & Hastings, T. S. (1998).** Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks*. *Int J Food Sci Technol* **33**, 139–155.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410.
- Ambrosi, C., Tiburzi, F., Imperi, F., Putignani, L. & Visca, P. (2005).** Involvement of AlgQ in Transcriptional Regulation of Pyoverdine Genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **187**, 5097–5107.
- Amend, D. F. (1965, April 26).** Comparison of certain sulfonamide drugs for treatment of bacterial infections of Pacific salmon. Master's Thesis, Oregon State University.
- Andersen, J. L., He, G.-X., Kakarla, P., KC, R., Kumar, S., Lakra, W. S., Mukherjee, M. M., Ranaweera, I., Shrestha, U. & other authors. (2015).** Multidrug Efflux Pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* Bacterial Food Pathogens. *Int J Environ Res Public Health* **12**, 1487–1547.
- Anderson, R. C., Cookson, A. L., McNabb, W. C., Park, Z., McCann, M. J., Kelly, W. J. & Roy, N. C. (2010).** *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol* **10**, 316.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H. & Oyaizu, H. (2000).** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1563–1589.
- Austin, B. & Austin, D. A. (2012).** Aeromonadaceae Representative (*Aeromonas salmonicida*). In *Bact Fish Pathog*, pp. 147–228. Springer Netherlands.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M. & other authors. (2008).** The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**, 75.
- Balcázar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D. & Múzquiz, J. L. (2006).** The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol* **114**, 173–186.
- Barton, B. A. & Iwama, G. K. (1991).** Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu Rev Fish Dis* **1**, 3–26.

- Belkaid, Y. & Hand, T. W. (2014).** Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* **157**, 121–141.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C. & Gil, A. (2012).** Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* **61**, 160–174.
- Bly, J. e., Quiniou, S. m.-A., Lawson, L. a. & Clem, L. w. (1997).** Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *J Fish Dis* **20**, 35–40.
- Boetzer, M., Henkel, C. V., Jansen, H. J., Butler, D. & Pirovano, W. (2011).** Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinforma Oxf Engl* **27**, 578–579.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. & Gardan, L. (2000).** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* **20**, 51–63.
- Boutin, S., Bernatchez, L., Audet, C. & Derôme, N. (2012).** Antagonistic effect of indigenous skin bacteria of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) against *Flavobacterium columnare* and *F. psychrophilum*. *Vet Microbiol* **155**, 355–361.
- Boutin, S., Bernatchez, L., Audet, C. & Derôme, N. (2013a).** Network analysis highlights complex interactions between pathogen, host and commensal microbiota. *PloS One* **8**, e84772.
- Boutin, S., Audet, C. & Derome, N. (2013b).** Probiotic treatment by indigenous bacteria decreases mortality without disturbing the natural microbiota of *Salvelinus fontinalis*. *Can J Microbiol* **59**, 662–670.
- Boyd, E. F., Almagro-Moreno, S. & Parent, M. A. (2009).** Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution. *Trends Microbiol* **17**, 47–53.
- Brune, A. (2014).** Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nat Rev Microbiol* **12**, 168–180.
- Bullock, G., Cipriano, R. & Snieszko, S. (1983).** Furunculosis and other diseases caused by *Aeromonas salmonicida*. *US Fish Wildl Publ*.
- Caballero, A. R., Moreau, J. M., Engel, L. S., Marquart, M. E., Hill, J. M. & O’Callaghan, R. J. (2001).** *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Anal Biochem* **290**, 330–337.
- Cahill, M. M. (1990).** Bacterial flora of fishes: A review. *Microb Ecol* **19**, 21–41.
- Carver, T., Thomson, N., Bleasby, A., Berriman, M. & Parkhill, J. (2009).** DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* **25**, 119–120.
- Castillo, M., Martín-Orúe, S. M., Roca, M., Manzanilla, E. G., Badiola, I., Perez, J. F. & Gasa, J. (2006).** The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. *J Anim Sci* **84**, 2725–2734.
- Charette, S. J., Brochu, F., Boyle, B., Filion, G., Tanaka, K. H. & Derome, N. (2012).** Draft Genome Sequence of the Virulent Strain 01-B526 of the Fish Pathogen *Aeromonas salmonicida*. *J Bacteriol* **194**, 722–723.
- Chessa, J.-P., Petrescu, I., Bentahir, M., Van Beeumen, J. & Gerday, C. (2000).**

- Purification, physico-chemical characterization and sequence of a heat labile alkaline metalloprotease isolated from a psychrophilic *Pseudomonas* species. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol* **1479**, 265–274.
- Chettri, J. K., Deshmukh, S., Holten-Andersen, L., Jafaar, R. M., Dalsgaard, I. & Buchmann, K. (2013).** Comparative evaluation of administration methods for a vaccine protecting rainbow trout against *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2 infections. *Vet Immunol Immunopathol* **154**, 42–47.
- Chevalier, F., Herbinière-Gaboreau, J., Charif, D., Mitta, G., Gavory, F., Wincker, P., Grève, P., Braquart-Varnier, C. & Bouchon, D. (2012).** Feminizing *Wolbachia*: a transcriptomics approach with insights on the immune response genes in *Armadillidium vulgare*. *BMC Microbiol* **12**, S1.
- Coloretti, F., Carri, S., Armaforte, E., Chiavari, C., Grazia, L. & Zambonelli, C. (2007).** Antifungal activity of lactobacilli isolated from salami. *FEMS Microbiol Lett* **271**, 245–250.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. (1996).** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33–38.
- Courvalin, P. (2006).** Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver* **38 Suppl 2**, S261–265.
- Cumby, N., Davidson, A. R. & Maxwell, K. L. (2012).** The moron comes of age. *Bacteriophage* **2**, e23146.
- Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V., Lafaille, A. & Charette, S. J. (2014).** Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet Microbiol* **169**, 1–7.
- Delcher, A. L., Bratke, K. A., Powers, E. C. & Salzberg, S. L. (2007).** Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* **23**, 673–679.
- Dhillon, B. K., Chiu, T. A., Laird, M. R., Langille, M. G. I. & Brinkman, F. S. L. (2013).** IslandViewer update: Improved genomic island discovery and visualization. *Nucleic Acids Res* **41**, W129–132.
- FAO/OMS. (2001).** Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, a joint FAO/WHO expert consultation. Cordoba, Argentina.
- FAO/OMS. (2012).** The State of World Fisheries and Aquaculture. Report, 147 pp.
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S. & Gil, A. (2013).** Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br J Nutr* **109 Suppl 2**, S35–50.
- Fortier, L.-C. & Sekulovic, O. (2013).** Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* **4**, 354–365.
- Fosse, T. (1993).** Les infections humaines à *Aeromonas* sp. : épidémiologie et pathogénicité. *Médecine Mal Infect, 2ème Colloque sur le Contrôle Epidémiologique des Maladies Infectieuses* **23, Supplement 3**, 475–480.

- Fürste, J. P., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M. & Lanka, E. (1986).** Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range tacP expression vector. *Gene* **48**, 119–131.
- Galardini, M., Biondi, E. G., Bazzicalupo, M. & Mengoni, A. (2011).** CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. *Source Code Biol Med* **6**, 11.
- Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G. T. & de Vos, W. M. (2011).** Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr* **6**, 209–240.
- Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. (1998).** Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* **8**, 195–202.
- Goulden, E. F., Hall, M. R., Pereg, L. L. & Høj, L. (2012).** Identification of an Antagonistic Probiotic Combination Protecting Ornate Spiny Lobster (*Panulirus ornatus*) Larvae against *Vibrio owensii* Infection. *PLoS ONE* **7**, e39667.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I. & Nielsen, T. F. (1999).** Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. *Appl Environ Microbiol* **65**, 969–973.
- Gram, L., Løvold, T., Nielsen, J., Melchiorson, J. & Spanggaard, B. (2001).** In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture* **199**, 1–11.
- Gunther, N. W., Nuñez, A., Fett, W. & Solaiman, D. K. Y. (2005).** Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2288–2293.
- Håstein, T., Gudding, R. & Evensen, O. (2005).** Bacterial vaccines for fish--an update of the current situation worldwide. *Dev Biol* **121**, 55–74.
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R. & Peterson, S. B. (2010).** Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* **8**, 15–25.
- Holmes, E., Li, J. V., Marchesi, J. R. & Nicholson, J. K. (2012).** Gut Microbiota Composition and Activity in Relation to Host Metabolic Phenotype and Disease Risk. *Cell Metab* **16**, 559–564.
- Hummel, S., Veltman, K., Cichon, C., Sonnenborn, U. & Schmidt, M. A. (2012).** Differential Targeting of the E-Cadherin/ β -Catenin Complex by Gram-Positive Probiotic Lactobacilli Improves Epithelial Barrier Function. *Appl Environ Microbiol* **78**, 1140–1147.
- Inglis, V., Yimer, E., Bacon, E. J. & Ferguson, S. (1993).** Plasmid-mediated antibiotic resistance in *Aeromonas salmonicida* isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. *J Fish Dis* **16**, 593–599.
- James, G. (2010).** Universal Bacterial Identification by PCR and DNA Sequencing of 16S rRNA Gene. In *PCR Clin Microbiol*, pp. 209–214. Edited by M. Schuller, T. P. Sloots, G. S. James, C. L. Halliday & I. W. J. Carter. Springer Netherlands.

- Juhas, M., van der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W. & Crook, D. W. (2009).** Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *Fems Microbiol Rev* **33**, 376–393.
- Kahan, F. M., Kahan, J. S., Cassidy, P. J. & Kropp, H. (1974).** The Mechanism of Action of Fosfomycin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci* **235**, 364–386.
- Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N. & Núñez, G. (2013).** Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* **14**, 685–690.
- Keersmaecker, S. C. J. D., Verhoeven, T. L. A., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J. & Nagy, I. (2006).** Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol Lett* **259**, 89–96.
- Kirisits, M. J., Prost, L., Starkey, M. & Parsek, M. R. (2005).** Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4809–4821.
- Kolář, M., Urbánek, K. & Látal, T. (2001).** Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int J Antimicrob Agents* **17**, 357–363.
- Komar, C., Enright, W. J., Grisez, L. & Tan, Z. (2004).** Understanding fish vaccination. *AQUA Cult AsiaPacific Mag* 27–29.
- Konstantinidis, K. T. & Tiedje, J. M. (2005).** Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2567–2572.
- Korkea-aho, T. I., Heikkinen, J., Thompson, K. d., von Wright, A. & Austin, B. (2011).** *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J Appl Microbiol* **111**, 266–277.
- Kruis, W. (2004).** Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* **20**, 75–78.
- Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C. & Salzberg, S. L. (2004).** Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* **5**, R12.
- Langille, M. G. I. & Brinkman, F. S. L. (2009).** IslandViewer: an integrated interface for computational identification and visualization of genomic islands. *Bioinformatics* **25**, 664–665.
- Lee, H., Hsu, F.-F., Turk, J. & Groisman, E. A. (2004).** The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **186**, 4124–4133.
- Loper, J. E., Hassan, K. A., Mavrodi, D. V., Davis, E. W., II, Lim, C. K., Shaffer, B. T., Elbourne, L. D. H., Stockwell, V. O., Hartney, S. L. & other authors. (2012).** Comparative Genomics of Plant-Associated *Pseudomonas* spp.: Insights into Diversity and Inheritance of Traits Involved in Multitrophic Interactions. *PLoS Genet* **8**, e1002784.
- Lowe, T. M. & Eddy, S. R. (1997).** tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res* **25**, 955–964.

- Lutwyche, P., Exner, M. M., Hancock, R. E. & Trust, T. J. (1995).** A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout. *Infect Immun* **63**, 3137–3142.
- Malchow, H. A. (1997).** Crohn's Disease and *Escherichia coli*: A New Approach in Therapy to Maintain Remission of Colonic Crohn's Disease? *J Clin Gastroenterol* **25**.
- Marteau, P. R., Vrese, M. de, Cellier, C. J. & Schrezenmeir, J. (2001).** Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* **73**, 430s–436s.
- Maslowski, K. M. & Mackay, C. R. (2010).** Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol* **12**, 5–9.
- McBain, A. J. (2009).** Chapter 4 In Vitro Biofilm Models: An Overview. In *Advances in Applied Microbiology*, pp. 99–132. Edited by B.-A. in A. Microbiology. Academic Press.
- McCormick, J. H., Hokanson, K. E. F. & Jones, B. R. (1972).** Effects of Temperature on Growth and Survival of Young Brook Trout, *Salvelinus fontinalis*. *J Fish Res Board Can* **29**, 1107–1112.
- McIntosh, D., Cunningham, M., Ji, B., Fekete, F. A., Parry, E. M., Clark, S. E., Zalinger, Z. B., Gilg, I. C., Danner, G. R. & other authors. (2008).** Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. *J Antimicrob Chemother* **61**, 1221–1228.
- Menendez, R. (1976).** Chronic Effects of Reduced pH on Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). *J Fish Res Board Can* **33**, 118–123.
- Meyer, J.-M., Gruffaz, C., Tulkki, T. & Izard, D. (2007).** Taxonomic heterogeneity, as shown by siderotyping, of strains primarily identified as *Pseudomonas putida*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2543–2556.
- Michel, C. (1979).** Furunculosis of salmonids: vaccination attempts in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by formalin-killed germs. *Ann Rech Vét Ann Vet Res* **10**, 33–40.
- Midtlyng, P. J. (1997).** Vaccinated fish welfare: protection versus side-effects. *Dev Biol Stand* **90**, 371–379.
- Midtlyng, P. J. & Lillehaug, A. (1998).** Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. *Dis Aquat Organ* **32**, 91–97.
- Milne, I., Bayer, M., Cardle, L., Shaw, P., Stephen, G., Wright, F. & Marshall, D. (2010).** Tablet—next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics* **26**, 401–402.
- Morin, R. (2010).** L'utilisation des antibiotiques pour combattre la furunculose chez l'omble de fontaine génère de l'antibiorésistance chez *Aeromonas salmonicida*. *Bull L'Association Aquaculteurs Qué* **15**, 3–6.
- Mutoloki, S., Brudeseth, B., Reite, O. B. & Evensen, O. (2006).** The contribution of

- Aeromonas salmonicida* extracellular products to the induction of inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following vaccination with oil-based vaccines. *Fish Shellfish Immunol* **20**, 1–11.
- Nash, J. H., Findlay, W. A., Luebbert, C. C., Mykytczuk, O. L., Foote, S. J., Taboada, E. N., Carrillo, C. D., Boyd, J. M., Colquhoun, D. J. & other authors. (2006).** Comparative genomics profiling of clinical isolates of *Aeromonas salmonicida* using DNA microarrays. *BMC Genomics* **7**, 43.
- Naum, M., Brown, E. W. & Mason-Gamer, R. J. (2008).** Is 16S rDNA a Reliable Phylogenetic Marker to Characterize Relationships Below the Family Level in the Enterobacteriaceae? *J Mol Evol* **66**, 630–642.
- Nielsen, D. S., Cho, G.-S., Hanak, A., Huch, M., Franz, C. M. A. P. & Arneborg, N. (2010).** The effect of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strains on the intracellular pH of sessile and planktonic *Listeria monocytogenes* single cells. *Int J Food Microbiol* **141, Supplement**, S53–S59.
- NJDEP. (2014, March 19).** DEP’S Division of Fish and Wildlife Moves to Address Disease Affecting the Pequest Trout Hatchery’s Raceway System. *News Releases - Dep Environ Prot State N J*. Trenton, New Jersey, NJ, USA.
- Ochsner, U. A. & Reiser, J. (1995).** Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6424–6428.
- OMS. (2014).** Antimicrobial resistance: global report on surveillance. ISBN: 978 92 4 156474 8.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B. & other authors. (2014).** The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* **42**, D206–D214.
- Pearson, W. R. (2013).** An Introduction to Sequence Similarity (‘Homology’) Searching. *Curr Protoc Bioinforma* **42**, 3.1.1–3.1.8.
- Pearson, W. R., Wood, T., Zhang, Z. & Miller, W. (1997).** Comparison of DNA Sequences with Protein Sequences. *Genomics* **46**, 24–36.
- Pêches et océans Canada. (2013, November 21).** Production aquacole du Canada en 2012 | Aquaculture | Services statistiques | Pêches et Océans Canada. <http://www.dfo-mpo.gc.ca/stats/aqua/aqua12-fra.htm>, .
- Peng, Y., Leung, H. C. M., Yiu, S. M. & Chin, F. Y. L. (2012).** IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinforma Oxf Engl* **28**, 1420–1428.
- Philippe, H., Delsuc, F., Brinkmann, H. & Lartillot, N. (2005).** Phylogenomics. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **36**, 541–562.
- Pickering, A. D. (1997).** 6 - Husbandry and Stress. In *Furunculosis*, pp. 178–202. Edited by E.-M. Bernoth, A. E. Ellis, P. J. Midtlyng, G. Olivier & P. Smith. San Diego: Academic Press.

- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F. & other authors. (2010).** A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65.
- Reith, M. E., Singh, R. K., Curtis, B., Boyd, J. M., Bouevitch, A., Kimball, J., Munholland, J., Murphy, C., Sarty, D. & other authors. (2008).** The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics* **9**, 427.
- Reynolds, P. E. (1989).** Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **8**, 943–950.
- Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A. (2000).** EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* **16**, 276–277.
- Richter, M. & Rosselló-Móra, R. (2009).** Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci* **106**, 19126–19131.
- Samuelsen, O. B., Hjeltnes, B. & Glette, J. (1998).** Efficacy of Orally Administered Florfenicol in the Treatment of Furunculosis in Atlantic Salmon. *J Aquat Anim Health* **10**, 56–61.
- Santos, Y., García-Marquez, S., Pereira, P. G., Pazos, F., Riaza, A., Silva, R., Morabit, A. El & Ubeira, F. M. (2005).** Efficacy of furunculosis vaccines in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): evaluation of immersion, oral and injection delivery. *J Fish Dis* **28**, 165–172.
- Scales, B. S., Dickson, R. P., LiPuma, J. J. & Huffnagle, G. B. (2014).** Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clin Microbiol Rev* **27**, 927–948.
- Schalk, I. J. & Guillon, L. (2013).** Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. *Environ Microbiol* **15**, 1661–1673.
- Schmidt, A. S., Bruun, M. S., Dalsgaard, I. & Larsen, J. L. (2001).** Incidence, Distribution, and Spread of Tetracycline Resistance Determinants and Integron-Associated Antibiotic Resistance Genes among Motile *Aeromonads* from a Fish Farming Environment. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5675–5682.
- Schubiger, C. B., Orfe, L. H., Sudheesh, P. S., Cain, K. D., Shah, D. H. & Call, D. R. (2015).** Entericidin Is Required for a Probiotic Treatment (*Enterobacter* sp. Strain C6-6) To Protect Trout from Cold-Water Disease Challenge. *Appl Environ Microbiol* **81**, 658–665.
- Scott, M. (1968).** The Pathogenicity of *Aeromonas salmonicida* (Griffin) in Sea and Brackish Waters. *J Gen Microbiol* **50**, 321–327.
- Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. (2016).** Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *bioRxiv* 036103.
- Shida, K., Kiyoshima-Shibata, J., Kaji, R., Nagaoka, M. & Nanno, M. (2009).** Peptidoglycan from lactobacilli inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through Toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. *Immunology* **128**, e858–869.

- Shinabarger, D. L., Marotti, K. R., Murray, R. W., Lin, A. H., Melchior, E. P., Swaney, S. M., Dunyak, D. S., Demyan, W. F. & Buysse, J. M. (1997).** Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2132–2136.
- Silby, M. W., Cerdeño-Tárraga, A. M., Vernikos, G. S., Giddens, S. R., Jackson, R. W., Preston, G. M., Zhang, X.-X., Moon, C. D., Gehrig, S. M. & other authors. (2009).** Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol* **10**, R51.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B. & Jackson, R. W. (2011).** *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 652–680.
- Singh, K., Sun, S. & Vézina, C. (1979).** Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. IV. Mechanism of action. *J Antibiot (Tokyo)* **32**, 630–645.
- Stecher, B., Maier, L. & Hardt, W.-D. (2013).** ‘Blooming’ in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nat Rev Microbiol* **11**, 277–284.
- Tello, A., Austin, B. & Telfer, T. C. (2012).** Selective Pressure of Antibiotic Pollution on Bacteria of Importance to Public Health. *Environ Health Perspect* **120**, 1100–1106.
- Tosi, T., Pflug, A., Discola, K. F., Neves, D. & Dessen, A. (2013).** Structural basis of eukaryotic cell targeting by type III secretion system (T3SS) effectors. *Res Microbiol*, Bacterial secretion systems: function and structural biology **164**, 605–619.
- Trapezar, M., Leouffre, T., Faure, M., Jensen, H. E., Granum, P. E., Cencic, A. & Hardy, S. P. (2011).** The use of a porcine intestinal cell model system for evaluating the food safety risk of *Bacillus cereus* probiotics and the implications for assessing enterotoxigenicity. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* **119**, 877–884.
- Tritt, A., Eisen, J. A., Facciotti, M. T. & Darling, A. E. (2012).** An Integrated Pipeline for *de novo* Assembly of Microbial Genomes. *PLoS ONE* **7**, e42304.
- Udey, L. & Fryer, J. (1978).** Immunization of fish with bacterins of *Aeromonas salmonicida*. *Mar Fish Rev* **40**, 12–17.
- Vaughan, L. M., Smith, P. R. & Foster, T. J. (1993).** An aromatic-dependent mutant of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* is attenuated in fish and is effective as a live vaccine against the salmonid disease furunculosis. *Infect Immun* **61**, 2172–2181.
- Vijayan, M. M. & Leatherland, J. F. (1988).** Effect of stocking density on the growth and stress-response in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture* **75**, 159–170.
- Vijayan, M. M. & Leatherland, J. F. (1990).** High stocking density affects cortisol secretion and tissue distribution in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *J Endocrinol* **124**, 311–318.
- Vijayan, M. M., Ballantyne, J. S. & Leatherland, J. F. (1990).** High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture* **88**, 371–381.

- Vincent, A. T., Trudel, M. V., Paquet, V. E., Boyle, B., Tanaka, K. H., Dallaire-Dufresne, S., Daher, R. K., Frenette, M., Derome, N. & Charette, S. J. (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.
- Vincent, A. T., Emond-Rheault, J.-G., Barbeau, X., Attéré, S. A., Frenette, M., Lagüe, P. & Charette, S. J. (2016).** Antibiotic resistance due to an unusual ColE1-type replicon plasmid in *Aeromonas salmonicida*. *Microbiology* **162**, 942–53.
- Weiss, B. L., Wang, J. & Aksoy, S. (2011).** Tsetse Immune System Maturation Requires the Presence of Obligate Symbionts in Larvae. *PLoS Biol* **9**, e1000619.
- Welch, T. J., Fricke, W. F., McDermott, P. F., White, D. G., Rosso, M.-L., Rasko, D. A., Mammel, M. K., Eppinger, M., Rosovitz, M. J. & other authors. (2007).** Multiple Antimicrobial Resistance in Plague: An Emerging Public Health Risk. *PLoS ONE* **2**, e309.
- Wells, J. M. (2011).** Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb Cell Factories* **10**, 1–15.
- Workentine, M. L., Harrison, J. J., Weljie, A. M., Tran, V. A., Stenroos, P. U., Tremaroli, V., Vogel, H. J., Ceri, H. & Turner, R. J. (2010).** Phenotypic and metabolic profiling of colony morphology variants evolved from *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Environ Microbiol* **12**, 1565–1577.
- Yan, F. & Polk, D. B. (2002).** Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **277**, 50959–50965.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. (2000).** A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol J Comput Mol Cell Biol* **7**, 203–214.
- Zyrek, A. A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U. & Schmidt, M. A. (2007).** Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol* **9**, 804–816.

Annexe A – Script GetContigCoverage.pl

Les dépendances

- Toute distribution basée sur un système UNIX (MacOS, Linux, FreeBSD, ...) contenant les librairies Perl v5.18.x;
- Les logiciels CONSED (<http://www.phrap.org/consed/consed.html>) et TABLET (<https://ics.hutton.ac.uk/tablet/>) installés de manière globale;
- Un fichier FASTA contenant la séquence des contigs du génome étudié.

Comment exécuter le script

- Créer un fichier d'assemblage CONSED (*.ace.1) en utilisant comme entrée le fichier de contigs en format FASTA.
- À l'aide de TABLET, ouvrir le fichier d'assemblage *.ace.1 puis créer un rapport de couverture par nucléotide en cliquant sur File -> Export -> Export Coverage Summary.
- Dans un terminal, écrire `./GetContigCoverage.pl -help` et suivre les instructions d'usage.

Le code du script

```
#!/usr/bin/perl

# Script for extracting contig coverage information
# in a CONSED ace assembly file.
# By Jeff Gauthier - v1 - 20/07/15

# LICENSE

# This program is free software: you can redistribute it and/or modify
# it under the terms of the GNU General Public License as published by
```

```

# the Free Software Foundation, version 3.
#
# This program is distributed in the hope that it will be useful, but
# WITHOUT ANY WARRANTY; without even the implied warranty of
# MERCHANTABILITY or FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. See the GNU
# General Public License for more details.
#
# You should have received a copy of the GNU General Public License
# along with this program. If not, see <http://www.gnu.org/licenses/>.

use warnings;
use Getopt::Long;

#command-line arguments
my ($ace, $tablet, $out, $help);
GetOptions('ace:s' => \$ace, 'tablet:s' => \$tablet, 'out=s' => \$out,
'help|?' => \$help);

if ($help) {die "Usage: GetContigCoverage.pl [options]\n\nOptions:\n\t-
help\tthis help message\n\t-ace\tCONSED assembly file\n\t-tablet\tTABLET
coverage summary file\n\t-out\toutput name\n\nTo generate TABLET coverage
summary file, open ACE file with TABLET, click File, Export, Export
Coverage Summary in working folder.\n";}

open (TABLET, "<", $tablet) or die $!;
open (TMP, ">", "$tablet.tmp") or die $!;
while (<TABLET>) {
    chomp $_;
    if (/([a-z]+)/) {$pat = $1; $_ =~ s/$pat/\n$pat/;}
    print TMP $_;
}

close TABLET;
close TMP;

#extract general stats
open (ACE, "<", $ace) or die $!;
open (OUT, ">", $out) or die $!;
print OUT "Contig\tLength(bp) \tNumReads\tContigCoverage\n";
while (<ACE>) {
    if (/CO\s(.+)?\s(\d+)?\s(\d+)?\s\d/) { #capture info in contig
headers - $1 = contig name, $2 = length, $3 = numreads, store in hash
        $contigName = $1;
        $len = $2;
        $reads = $3;
        print OUT $contigName, "\t", $len, "\t", $reads, "\t";
        open (TMP, "<", "$tablet.tmp") or die $!;
        while (<TMP>){
            if (/(($contigName)\s(.+)?\n/) {
                @numbers = split(" ", $2);
                my $sum = 0;
                foreach my $var (@numbers) {
                    $sum = $sum + $var;
                }
                $cov = sprintf("%.1f", ($sum/$#numbers));
            }
        }
    }
}
#COVERAGE = Sum of Coverage-per-site values in contig X / length of

```

```

contig X                                print OUT $cov, "\n";
    }
    elif (/${contigName}\s(.+)?\Z/) { #to match last
coverage data on last entry (\Z matches EOF)
    @numbers = split(" ", $2);
    my $sum = 0;
    foreach my $var (@numbers) {
        $sum = $sum + $var;
    }
    $cov = sprintf("%.1f", ($sum/$#numbers));
#COVERAGE = Sum of Coverage-per-site values in contig X / length of
contig X
    print OUT $cov, "\n";
    }
}
close TMP;
}
}
close ACE;
close OUT;

system ("rm $tablet.tmp");

```


Annexe B – Pipeline AccessoryGenome.pl v1.0

B.1 – Exemple de fichier de sortie (format CSV)

Protein	Function	Coords	tobacco.gbk_%id	thalecress.gbk_%id
human.gbk_%id	beef.gbk_%id			
fungus.gbk.1.tfa	cytochrome b	1..1158	52.8	52.6 52.6 55.3
fungus.gbk.2.tfa	NADH dehydrogenase subunit 1	1778..2827	49.2	46.1
41.1 43.5				
fungus.gbk.3.tfa	ORF1	2836..3747	N/S	N/S
fungus.gbk.4.tfa	ORF2	3764..4525	N/S	N/S
fungus.gbk.5.tfa	NADH dehydrogenase subunit 4	5394..6860	45.7	44.4
30.0 31.7				
fungus.gbk.6.tfa	ATP synthase subunit 8	7213..7359	N/S	N/S
N/S				
fungus.gbk.7.tfa	ATP synthase subunit 6	7523..8296	39.8	43.4 29.4
30.8				
fungus.gbk.8.tfa	NADH dehydrogenase subunit 6	10622..11275		N/S
N/S	N/S	N/S		
fungus.gbk.9.tfa	cytochrome oxidase subunit 3	11314..12123		49.8
50.6 51.0	53.7			
fungus.gbk.10.tfa	cytochrome oxidase subunit 1	join(19768..20614,21640..22495)	30.1 33.1	28.6 33.9
fungus.gbk.11.tfa	ATP synthase subunit 9	23436..23660	57.5	61.3
N/S	N/S			
fungus.gbk.12.tfa	NADH dehydrogenase subunit 3	23843..24250		N/S
33.9 35.6	36.6			
fungus.gbk.13.tfa	cytochrome oxidase subunit 2	24527..25288		53.0
49.1 41.5	46.5			
fungus.gbk.14.tfa	NADH dehydrogenase subunit 4L	join(25713..25951,26429..26459)	48.2 47.7	N/S N/S
fungus.gbk.15.tfa	NADH dehydrogenase subunit 5	26459..28429		50.5
52.3 33.5	33.2			
fungus.gbk.16.tfa	NADH dehydrogenase subunit 2	28592..30280		33.6
33.6 23.5	N/S			

B.2 – Arborescence du script et des modules

```
└─ AccessoryGenome.pl (Annexe B.3)
   └─ scripts
      └─ 1-gbk-extract.pl (Annexe B.4)
         └─ 2-parse-results.pl (Annexe B.5)
```

B.3 – Script principal ./AccessoryGenome.pl

Les dépendances

- Toute distribution basée sur un système UNIX (MacOS, Linux, FreeBSD, ...) contenant les librairies Perl v5.18.x;
- La suite la suite logicielle EMBOSS la plus récente, accompagnée de la suite d'outils FASTA v36.x.x, installées dans un répertoire global (p. ex. **/usr/bin** ou **/usr/local/bin**)
- La séquence de plusieurs génomes annotés par RAST en format GenBank. Pour générer ces fichiers, choisir sur l'interface RAST le format « GenBank merged (i.e. for use with Artemis).

```
#!/usr/bin/perl

#####
# Script that finds shared and unique CDS genes among pairs of genomes.
# By Jeff Gauthier - v1.0 - 7/2/2016
# Usage: ./AccessoryGenome.pl genome1.gbk genome2.gbk ... genomeN.gbk
# Dependencies: EMBOSS and tfastx from FASTA v36.X.X suite.
#####

#####
# VERSION HISTORY
# v1.0 - Fully operational pipeline w/ annotations in result files.
# v0.9999 - Simplified pipeline. No annotation feature for now.
#####

#####
# LICENSE

# This program is free software: you can redistribute it and/or modify
# it under the terms of the GNU General Public License as published by
# the Free Software Foundation, version 3.
#
# This program is distributed in the hope that it will be useful, but
# WITHOUT ANY WARRANTY; without even the implied warranty of
# MERCHANTABILITY or FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. See the GNU
# General Public License for more details.
#
# You should have received a copy of the GNU General Public License
```

```

# along with this program. If not, see <http://www.gnu.org/licenses/>.
#####

# COMMAND-LINE ARGUMENTS
# Stored in @ARGV.

use warnings;
use Math::Combinatorics;

# FASTA TOOL USED (tfastx36 ~ faster) (tfasty36 ~ slower but corrects
frameshifts -- useful for 454 WGS contigs)
$engine = "tfastx36";

# NUMBER OF THREADS
$threads = "3";

# E-VALUE THRESHOLD FOR REMOVING FALSE POSITIVE ALIGNMENTS
$threshold = "1e-10";

### MAIN CODE BLOCK #####

# STEP ZERO - Are there more than 2 genomes to compare?
unless ($#ARGV >= 1) {die
"_____ \nAccessoryGenome.pl
v1.0\nScript that finds shared and unique genes among pairs of
genomes.\nUsage: ./AccessoryGenome.pl genome1.gbk genome2.gbk ...
genomeN.gbk\nDependencies: EMBOSS and tfastx from FASTA v36.X.X
suite.\n\n"
}

#startup message
print "_____ \nAccessoryGenome.pl
v1.0\nScript that finds shared and unique genes among pairs of
genomes.\nUsage: ./AccessoryGenome.pl genome1.gbk genome2.gbk ...
genomeN.gbk\nDependencies: EMBOSS and tfastx from FASTA v36.X.X
suite.\n\n";

#1st step - extracting CDS and Protein sequences
foreach my $gbk (@ARGV) {
    system ("./scripts/l-gbk-extract.pl $gbk");
    system("seqret -sequence $gbk -osf fasta -
outseq ./$gbk.seq/$gbk.fasta 2>/dev/null"); # generate library file
    system("ls -v ./$gbk.seq/PEP > ./$gbk.seq/$gbk.pep.list");
#generate queries list
}

# 2nd step - making a list of all possible pairwise genome searches
my $set = Math::Combinatorics -> new (count => 2, data => [@ARGV]); #
combinatorics module
open (BATCH, ">", "batch.txt") or die $!;
while (my @combo = $set->next_combination) { # print permutations of
@ARGV elements in BATCH file
    print BATCH "$combo[0] $combo[1]". "\n";
    print BATCH "$combo[1] $combo[0]". "\n";
}

```

```

close BATCH;

# 3rd step - store BATCH elements in arrays and execute fasty36
system("mkdir ./Results");
open (BATCH, "<", "batch.txt") or die $!;
while (<BATCH>) {

    #store fasty inputs from each BATCH line in array
    chomp $_;
    @args = (split(" ", $_));

    print "Searching homologies in ", join (" x ", @args), "\n";
    system("mkdir ./Results/$args[0]_$args[1]");
    system("mkdir ./Results/$args[0]_$args[1]/raw");
    #execute tfasty36 using arguments stored in array
    open (QUERIES, "<", ".$args[0].seq/$args[0].pep.list");
    while (<QUERIES>){
        chomp $_;
        system("$engine -b 1 -d 1 -E $threshold -s BP62 -T
$threads ./args[0].seq/PEP/$_ ./args[1].seq/$args[1].fasta > ./Results/
$args[0]_$args[1]/raw/$_out 2>/dev/null");
        print "...";
    }
    close QUERIES;
    print "done!\n";

# 4th step - parse TFASTY results

#make list of results to parse in current folder
$folder = "./Results/$args[0]_$args[1]";
system ("ls -v ./folder/raw >> ./folder/raw-list.txt");

# open each file in list and store Results in a hash
# keys = CDS name, values = Identity percentage
open (LIST, "<", ".$folder/raw-list.txt") or die $!;
open (RESULTS, ">", ".$folder/results.txt");
print RESULTS "$args[1]_%id\n"; #header
while (<LIST>) {
    chomp $_; #remove newline
    open (FILE, "<", ".$folder/raw/$_");
    while (<FILE>) {
        if (/(\d+\.\d)% identity/o){
            print RESULTS "$1", "\n"; #print matching pattern

            last;
        }
        elsif (/No sequences with E/){
            print RESULTS "N/S", "\n"; #print
(N)ot/(S)ignificant

            last;
        }
    }
}
    close FILE;
close LIST;

```

```

        close RESULTS;
    }

close BATCH;

### FINAL STEP -- SUMMARIZING RESULTS #####

system("./scripts/2-parse-results.pl");
print "Run is over! Back to shell...\n";
system("rm batch.txt");

```

B.4 – Module ./scripts/1-gbk-extract.pl

```

#!/usr/bin/perl

#####
# Accessory script to main script: AccessoryGenome.pl
# 1st step of the workflow: extracting protein sequences
# from GenBank accessions and store in respective folders.
# By Jeff Gauthier - v1 - 7/2/2016
#-----
# Usage: ./scripts/1-gbk-extract.pl seq1.gbk seq2.gbk ... seqN.gbk
# Dependencies: EMBOSS v6.x.x.x (extractseq and transeq)
#
# INPUT VARIABLES
# Input file names are stored in @ARGV.
#####

#####
# LICENSE

# This program is free software: you can redistribute it and/or modify
# it under the terms of the GNU General Public License as published by
# the Free Software Foundation, version 3.
#
# This program is distributed in the hope that it will be useful, but
# WITHOUT ANY WARRANTY; without even the implied warranty of
# MERCHANTABILITY or FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. See the GNU
# General Public License for more details.
#
# You should have received a copy of the GNU General Public License
# along with this program. If not, see <http://www.gnu.org/licenses/>.
#####

use warnings;

### CHECK IF EMBOSS IS HERE #####

system('embossversion 1> embv.txt 2>/dev/null');
open (EMBV, '<', 'embv.txt') or die $!;
if (<EMBV> eq "") {
    close EMBV;

```

```

    system ('rm embv.txt');
    die "EMBOSS not installed! Please install by typing \"sudo apt-get
install emboss\" in your shell\n";
}
else {
    close EMBV;
    system ('rm embv.txt');
    print "EMBOSS installed on this machine. Continuing...\n";
}

### EXTRACT CDS AND PROTEIN SEQUENCES
#####
### Approach - pipeline for extractseq and transeq
(EMBOSS)#####

foreach my $gbk (@ARGV) {      #for each gbk file included as command-line
arguments...

    print "Processing GenBank file $gbk...\n";
    system("mkdir $gbk.seq");
    system ("mkdir $gbk.seq/CDS $gbk.seq/PEP");

    open (GENBANK, "<", "$gbk") or die $!;      #input GBK file
    open (FEATURES, ">>", "$gbk.seq/$gbk.features") or die $!; #output
features list

    while (<GENBANK>){          #read genbank file and keep only CDS
coordinates.
        @lines = grep (/CDS /, $_);
        print FEATURES join ("\n", @lines);
    }

    close GENBANK;
    close FEATURES;

    # generate one-line genbank string for pattern matching
    open (GENBANK, "<", "$gbk") or die $!;
    open (TEMP, ">", ".$gbk.seq/$gbk.temp") or die $!;
    while (<GENBANK>){
        chomp $_;
        $temp .= $_;
    }
    @temp_lines = $temp =~ /CDS.+?product="\.+?\"/g;
    print TEMP join ("\n", @temp_lines);
    close TEMP;
    close GENBANK;

    #store CDS functions in a separate file
    open (TEMP, "<", ".$gbk.seq/$gbk.temp") or die $!;
    open (FUNCTIONS, ">", "$gbk.seq/$gbk.functions") or die $!;
    print FUNCTIONS "Function\n";
    while (<TEMP>) {
        if (/CDS.+?product="\(.+?)\"/) {print FUNCTIONS $1, "\n";}
    }
    close TEMP;
    close FUNCTIONS;
}

```

```

#store coordinates of CDS in an array
open (FEATURES, "<", "$gbk.seq/$gbk.features") or die $!;
open (COORDS, ">", "$gbk.seq/$gbk.coords") or die $!;
while (<FEATURES>){ #remove tags and spaces and store in
@features array
    $_ =~ s/CDS//g;
    $_ =~ s/ //g;
    push (@features, $_);
}
print COORDS "Coords\n"; #header
print COORDS join ("", @features);
close COORDS;
close FEATURES;

$num = 1; #annotation numbering variable

foreach my $i (@features) {

    if (grep (/complement/, $i)) { #if the CDS needs
reverse-complementation...
        chomp ($i);
        print "Extracting sequence $num ($i) of $gbk\n";
        #print "found $i no newline\n";
        $i =~ s/complement//; #remove tags and brackets
        $i =~ s/join//; #remove join comment
        $i =~ s/\(//g;
        $i =~ s/\)//g;
        #time to launch emboss commands
        system("extractseq -sequence ./ $gbk -regions $i -
outseq ./ $gbk.seq/CDS/$gbk.$num.fna 2>/dev/null");
        system("revseq -sequence ./ $gbk.seq/CDS/$gbk.$num.fna -
outseq ./ $gbk.seq/CDS/$gbk.$num.fna 2>/dev/null");
        system("transeq -sequence ./ $gbk.seq/CDS/$gbk.$num.fna
-table 11 -outseq $gbk.seq/PEP/$gbk.$num.tfa 2>/dev/null");
        $num = $num + 1;
    }
    else { # if it does not...
        chomp ($i);
        print "Extracting sequence $num ($i) of $gbk\n";
        #print "found $i no newline\n";
        $i =~ s/join//; #remove join comment
        $i =~ s/\(//g;
        $i =~ s/\)//g;
        #time to launch emboss commands
        system("extractseq -sequence ./ $gbk -regions $i -
outseq ./ $gbk.seq/CDS/$gbk.$num.fna 2>/dev/null");
        system("transeq -sequence ./ $gbk.seq/CDS/$gbk.$num.fna
-table 11 -outseq $gbk.seq/PEP/$gbk.$num.tfa 2>/dev/null");
        $num = $num + 1;
    }
}
@features = (); #reset features array
}
$temp = "";
print "Done!\n";

```

B.5 – Module ./scripts/2-parse-results.pl

```
#!/usr/bin/perl

# Script for parsing results generated by
# the AccessoryGenome.pl pipeline.
# By Jeff Gauthier - v1.0 - 7/2/2016

#####
# LICENSE

# This program is free software: you can redistribute it and/or modify
# it under the terms of the GNU General Public License as published by
# the Free Software Foundation, version 3.
#
# This program is distributed in the hope that it will be useful, but
# WITHOUT ANY WARRANTY; without even the implied warranty of
# MERCHANTABILITY or FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. See the GNU
# General Public License for more details.
#
# You should have received a copy of the GNU General Public License
# along with this program. If not, see <http://www.gnu.org/licenses/>.
#####

$align_dir = "./Results/Alignments";
system ("mkdir $align_dir");

### STEP 1 - CLEANUP AND CREATE OUTPUT FILES #####

open (BATCH, "<", "batch.txt") or die $!; # batch file generated by main
script
while (<BATCH>){
    chomp $_;
    @args = (split(" ", $_)); # store batch arguments in an array
    system("mv ./Results/$args[0]_args[1] $align_dir"); # clean-up the
mess in Results folder
    unless (-e "./Results/$args[0].scores.csv") { # if output file has
been created, no need to overwrite it again.
        system ("echo \"Protein\" >./Results/header.txt");

        system ("cat ./Results/header.txt
$align_dir/$args[0]_args[1]/raw-
list.txt > ./Results/$args[0].scores.csv");
        system
("paste ./Results/$args[0].scores.csv ./args[0].seq/$args[0].functions >
./Results/$args[0].temp.csv"); #append functions
        system
("cat ./Results/$args[0].temp.csv >./Results/$args[0].scores.csv");
#overwrite file with temp
        system
("paste ./Results/$args[0].scores.csv ./args[0].seq/$args[0].coords >./R
esults/$args[0].temp.csv"); #append coords
```



```

        system
("cat ./Results/$args[0].temp.csv >./Results/$args[0].scores.csv");
#overwrite file with temp
        system ("rm ./Results/header.txt");
        system ("rm ./Results/$args[0].temp.csv");
    }
}
close BATCH;

### STEP 3 - APPEND IDENTITY SCORES TO OUTPUT FILE #####

open (BATCH, "<", "batch.txt") or die $!; # batch file generated by main
script
while (<BATCH>) {
    chomp $_;
    @args = (split(" ", $_)); # store batch arguments in an array
    system ("paste ./Results/$args[0].scores.csv
$align_dir/$args[0]_args[1]/results.txt > ./Results/$args[0].temp.csv");
    system
("cat ./Results/$args[0].temp.csv >./Results/$args[0].scores.csv");
    system ("rm ./Results/$args[0].temp.csv");
}
close BATCH;

### STEP 4 - FINISHING OUTPUT FILES AND QUIT #####

open (BATCH, "<", "batch.txt") or die $!; # batch file generated by main
script
while (<BATCH>) {
    chomp $_;
    @args = (split(" ", $_)); # store batch arguments in an array
    system ("sed -i \"s/\.out//g\" ./Results/$args[0].scores.csv");
}
close BATCH;

print "Generating result files in ./Results/ .....Done!\n";

```


Annexe C – Analyse comparative détaillée du contenu en gènes de virulence

C.1 – Script VFDB_search.sh

Les dépendances

- Toute distribution basée sur un système UNIX (MacOS, Linux, FreeBSD, ...);
- Exécutable **getorf** de la suite logicielle EMBOSS la plus récente, installé dans un répertoire global (p. ex. **/usr/bin** ou **/usr/local/bin**);
- Exécutable **blastp** de la suite BLAST 2.2.28+, installé dans un répertoire global (p. ex. **/usr/bin** ou **/usr/local/bin**);

Comment exécuter le script

Dans un terminal, écrire `./VFDB_search.sh sequence.fasta` où **sequence.fasta** est une séquence d'ADN quelconque en format FASTA. Ce fichier doit être dans le même répertoire que le script. Le script génère une table d'annotations des ORF prédits dans le fichier de sortie `./sequence.vfdb.csv`.

Le code du script

```
#!/bin/bash

# extract ORFs in a multifasta file
echo "Extracting ORFs"
getorf -sequence $1 -find 1 -table 11 -minsize 60 -circular -outseq
$1.prot.fa
# clean getorf output
sed -i 's/unknown//g' $1.prot.fa
sed -i 's/(REVERSE SENSE)//g' $1.prot.fa
sed -i 's/\s/_/g' $1.prot.fa
```

```

sed -i 's/_/_/./g' $1.prot.fa
sed -i 's/]_*/]/g' $1.prot.fa

# blast output header for 6 std qcovs stitle
HEADER="qseqid pident ppos length qcovs mismatch gapopen qstart qend
sstart send evaluate bitscore stitle"

echo "BLASTing query $1 against VFDB core set..."
blastp -query $1.prot.fa -db vfdb -evaluate 1E-30 -out $1.tmp -outfmt "6
$HEADER" -max_target_seqs 1

# filtering results below 35% identity, 85% query coverage (the twilight
zone) and 60% similarity (to keep orthologs only)
awk '{ if ($2 >= 35 && $3 >= 60 && $5 >= 85) print }' $1.tmp > $1.tmp2

# generating output
printf "$HEADER\n" > blast_header && sed -i 's/\s/\t/g' blast_header
cat blast_header $1.tmp2 >> $1.vfdb.csv
rm $1.tmp $1.tmp2 blast_header

```

C.2 – Script insert_vfs_into_comparison.pl

Les dépendances

- Toute distribution basée sur un système UNIX (MacOS, Linux, FreeBSD, ...).

Comment exécuter le script

Dans un terminal, écrire `./insert_vfs_into_comparison.pl sequence.vfdb.csv` où `sequence.vfdb.csv` est une table d'annotation des gènes de virulence prédits dans le génome `sequence.fasta` à l'aide de `VFDB_search.sh`. Le fichier `sequence.vfdb.csv` doit être dans le même répertoire que le script.

Le code du script

```

#!/usr/bin/perl

open (OUT, ">", "data.csv") or die $!;

```

```

# headers
print OUT "Comparative pathogenomics of Pseudomonas (Total 17 genomes
available)\n";

print OUT "Virulence factors  Related genes      P. aeruginosa LESB58
P. aeruginosa PA7 P. aeruginosa PA01      P. aeruginosa UCBPP-PA14
P. entomophila L48      P. fluorescens Pf-5      P. fluorescens Pf0-
1 P. fluorescens SBW25      P. mendocina ymp P. putida F1      P.
putida GB-1 P. putida KT2440 P. putida W619      P. stutzeri A1501 P.
syringae pv. phaseolicola 1448A      P. syringae pv. syringae B728a
P. syringae pv. tomato str. DC3000 ", join("\t", @ARGV), "\n";

while (<DATA>) {
  chomp $_;
  $stable = $_;
  if (/^.*?\t(.+)\t/) {
    print OUT "$stable\t";
    $subject = $1;
    foreach my $input (@ARGV) {
      open (IN, "<", $input) or die $!;
      <IN>; #skip header
      while (<IN>) {
        chomp $_;
        if (/^\($subject\)/) {print OUT (split /\t/,
$_)[0]; last;}
      }
      close IN;
      print OUT "\t";
    }
    print OUT "\n";
  }
  else {print OUT "$stable\n";}
}
close OUT;

```

```

### DATA source: intra-genera VF comparison table (Pseudomonas). Source:
VFDB #####

```

```

__DATA__
Adherence

```

```

Flagella      flgB  PLES_42441  PSPA7_4300  PA1077      PA14_50480
PSEEN3842     PFL_4480   Pfl_4251   PFLU4731   Pmen_2850
Pput_1464     PputGB1_3952  PP_4391   PputW619_3732
PST_1388     PSPPH_3408  Psyr_3481  PSPTO_1933
flgC  PLES_42431  PSPA7_4299  PA1078      PA14_50470  PSEEN3841
PFL_4479     Pfl_4250   PFLU4730   Pmen_2849   Pput_1465
PputGB1_3951  PP_4390    PputW619_3731  PST_1389
PSPPH_3407  Psyr_3480  PSPTO_1934

```

```
//
```

(La table incluse dans __DATA__ est partiellement affichée. La version complète est disponible en format Excel sur le site web de la VFDB.)

C.3 – Table comparative détaillée

Description

Cette table a été générée manuellement en modifiant la sortie de `insert_vfs_into_comparison.pl` à l'aide d'un logiciel de tablage. La **Table 11** de ce mémoire est dérivée de cette table (voir Matériel et Méthodes). Pour mieux visualiser cette table, il suffit de la sauvegarder dans un fichier CSV, puis de l'ouvrir à l'aide d'Excel ou tout autre logiciel de tablage.

La table détaillée

Comparative pathogenomics of *Pseudomonas* (Total 17 genomes available)

Category	Virulence factors	Related genes	<i>P. aeruginosa</i> LESB58
	<i>P. aeruginosa</i> PA7	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14
	<i>P. entomophila</i> L48	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	<i>P. fluorescens</i> Pf0-
1	<i>P. fluorescens</i> SBW25	<i>P. mendocina</i> ymp	<i>P. putida</i> F1
	<i>P. putida</i> GB-1	<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. putida</i> W619
	<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. putida</i> W619	<i>P. stutzeri</i> A1501
	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000	<i>cpm15.cat.fasta.vfdb.csv</i>	
	<i>isolla.cat.fasta.vfdb.csv</i>	<i>isollb.cat.fasta.vfdb.csv</i>	
	<i>isol3.cat.fasta.vfdb.csv</i>	<i>PSEUfluor_A506_merged.fasta.vfdb.csv</i>	
	<i>PSEUputid_B001_merged.fasta.vfdb.csv</i>		

Offensive Adherence

Flagella	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46
46	46	46	46	46	46	46	46	46	36	35
35	35	35	33							
LPS O-antigen (<i>P. aeruginosa</i>)	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0						
Type IV pili biosynthesis	24	24	24	24	24	24	24	21	11	
14	22	12	23	11	11	11	11	24	18	19
19	4	4	4	4	3	3				
Type IV pili twitching motility related proteins	10	10	10	6	6	6	8	9	6	10
10	10	10	6	6	6	8	9	6	6	6

8 6 6 6 5 4 4 4 5 5

Defensive Antimicrobial activity

Phenazines biosynthesis 17 17 16 17 17 0 0 0
 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
 0 0 0 0

Defensive Antiphagocytosis

Alginate biosynthesis 13 13 13 13 13 13 13 13
 13 13 13 13 13 13 13 4 13 13 13
 11 10 10 10 10 12
 Alginate regulation 12 12 12 12 12 9 9 9
 9 11 9 9 9 9 11 10 10 10 6 6
 6 6 6 8

Offensive Biosurfactant

Rhamnolipid biosynthesis 3 3 2 3 3 0 0
 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
 2 2 2 2 1

Non-specific Iron uptake

Achromobactin biosynthesis and transport 8 0 3 0 0
 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 8 8
 0 0 0 0 0 0 0
 Pyochelin 10 10 10 10 10 3 9 0 0 0
 0 0 0 0 0 2 0 2 0 0 0 0
 0 0
 Pyochelin receptor 1 1 1 1 1 0 1 0
 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
 0 0 0 0
 Pyoverdine 17 17 16 17 17 12 15 10 14 3
 10 10 12 13 0 12 12 11 13 14 14
 14 14 9
 Pyoverdine receptors 1 1 1 1 1 1 1 1 1
 1 1 1 1 1 0 0 1 1 1 1 1
 1 1 1 0
 Yersiniabactin 9 0 0 0 0 0 0 0 0 0
 0 0 0 0 0 0 9 0 9 0 0 0
 0 0 0

Offensive Lipase

Hemolytic phospholipase C	1	1	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0			
Non-hemolytic phospholipase C	1	1	1	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0			
Phospholipase C	1	1	1	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0					
Phospholipase D	1	0	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0					

Offensive Protease

Alkaline protease	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1	1	0							
Elastase	2	2	2	2	2	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0								
Protease IV	1	1	1	1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0								

Regulation Quorum sensing systems

Acylhomoserine lactone synthase	1	1	1	1	1	1	1		
1	1	1	1	1	1	1	1		
0	0	0	0	0	0				
N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone QS system	2	2	0	0	0	1	0	0	0
2	2	0	0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0	0	0	0		
N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone QS system	2	2	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0		
2	2	2	0	0	0	0	0		
N-(butanoyl)-L-homoserine lactone QS system	2	2	2	2	2	2	2		
2	0	0	0	0	0	0	0		
0	0	0	1	1	1	1	0		

Regulation Regulation

GacS/GacA two-component system	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2

0 0 0 0 0 0

Offensive Secretion system

"Harpins helpers"	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	4	4	5	0	0	0	0	0	
0												
Hcp secretion island-1 encoded type VI secretion system (H-T6SS)	21	21	21	21	21	0	20	0	20	20	7	9
	8	7	0	6	10	5	5	5	5	5	5	0
P. aeruginosa TTSS				36	33	0	36	36	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1	1	1	0								
P. aeruginosa TTSS translocated effectors						4		3	0	3	3	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	1	1	1	0					
P. syringae TTSS				32	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	27	26	32	0	0	0
	0	0	0									
P. syringae TTSS effectors					81	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	33	24	53	0
	0	0	0	0	0							

Offensive Toxin

Exotoxin-A (ETA)				1	1	0	1	1	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0								
Hydrogen cyanide production					3	3	3	3	3	3	3	3
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0							
Phytotoxin coronatine				20	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0
	0	0	0	0								
Phytotoxin phaseolotoxin					21	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	0
	0	0	0	0	0							
Phytotoxin syringomycin				7	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0
	0	0	0	0								
Phytotoxin syringopeptin					3	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
	0	0	0	0								
TccC-type insecticidal toxins				1	0	0	0	0	0	1	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
	0	0	0	0								