



Étude et détection des gènes de résistance aux antibiotiques chez *Aeromonas salmonicida* sous-espèce *salmonicida*

Mémoire

Mélanie Trudel

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

Québec, Canada

© Mélanie Trudel, 2015

RÉSUMÉ

Aeromonas salmonicida sous-espèce *salmonicida*, une bactérie pathogène infectant les poissons, cause une maladie nommée la furunculose qui est traitée par antibiotique. À cause des résistances aux antibiotiques, ceux-ci ne sont plus aussi efficaces. Comme les tests d'antibiogrammes nécessitent sept jours, une PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux antibiotiques homologués (sulfonamides et triméthoprim, tétracyclines, chloramphénicols) permettrait de détecter rapidement ces résistances. Suite à la caractérisation de séquences génomiques et l'optimisation de PCR multiplex, plusieurs souches d'*A. salmonicida* sous-espèce *salmonicida* ont été testées et leurs résultats ont été comparés avec ceux obtenus par les tests d'antibiogrammes. Il en ressort que la trousse développée est très performante voire plus que les tests d'antibiogrammes pour détecter les résistances aux sulfonamides, tétracyclines et chloramphénicols tout en étant plus rapide. Une connaissance plus approfondie sur les résistances aux sulfonamides et triméthoprim demeure d'actualité puis l'amélioration de la trousse diagnostique est à envisager.

ABSTRACT

Aeromonas salmonicida subspecies *salmonicida*, a pathogenic bacterium that infects fish, causes a disease named furunculosis, which is treated with antibiotics. The latter are not as effective because of antibiotic resistances. As the susceptibility tests require seven days, a multiplex PCR targeting the genes coding resistances against homologated antibiotics (sulfonamides and trimethoprim, tetracyclines, chloramphenicols) would detect resistance rapidly. Following the characterization of genomic sequences and optimization of multiplex PCR, several strains of *A. salmonicida* subspecies *salmonicida* were tested and the results were compared with those obtained by the susceptibility tests. It shows that the kit is highly efficient even more rapidly than the susceptibility tests to detect resistance to sulfonamides, tetracyclines and chloramphenicols while being faster. A deeper knowledge about sulfonamides and trimethoprim resistance and the improvement of the diagnostic kit should be considered.

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
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION	1
1.1 L'aquaculture au Canada	1
1.2 La furonculose	2
1.3 <i>Aeromonas salmonicida</i> : une bactérie pathogène de poissons	3
1.4 Les traitements existants contre la furonculose : Vaccins et antibiotiques	4
1.5 Les antibiotiques utilisés en pisciculture au Québec	5
1.5.1 Famille des tétracyclines	7
1.5.2 Famille du chloramphénicol	9
1.5.3 Famille des sulfonamides et triméthoprimé	10
1.6 Résistances fréquentes aux antibiotiques homologués	12
1.6.1 Les résistances connues chez <i>Assal</i>	14
1.7 Méthode d'identification des résistances aux antibiotiques utilisés à l'Hôpital vétérinaire de Saint-Hyacinthe	16
1.8 PCR multiplex : une méthode de détection rapide?	16
CHAPITRE 2- HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	19
CHAPITRE 3- MATÉRIEL ET MÉTHODES	21
3.1 Souches bactériennes et conditions de croissance	21
3.2 Tests d'antibiogrammes	21
3.3 Préparation de lysats bactériens	22
3.4 Caractérisation de séquences génomiques de souches d' <i>Assal</i>	23
3.5 PCR uniplex pour l'identification des plasmides pAB5S9b et pSN254b	24
3.6 Alignement multiple des séquences des gènes analysés pour la création d'amorces	25
3.7 Amorces pour la PCR multiplex sur les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol créées avec MPprimer	25
3.7.1 Validation par PCR uniplex des diverses amorces créées avec MPprimer et ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol	26
3.7.2 Essai d'une PCR multiplex avec des concentrations d'amorces équimolaires (MPprimer)	27
3.7.3 Optimisation de la PCR multiplex (MPprimer)	27
3.7.4 Confirmation de l'interaction entre les amorces créées avec MPprimer	28
3.8. Création d'amorces pour les PCR multiplex sur les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol, aux sulfonamides et aux tétracyclines créées avec Primer3	28
3.8.1 Validation par PCR uniplex des diverses amorces créées avec Primer3 et ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol, aux sulfonamides et aux tétracyclines	29

3.8.2 Essai d'une PCR multiplex avec des amorces équimolaires (Primer3).....	30
3.8.3 Optimisation de la PCR multiplex (Primer3).....	31
3.9 PCR uniplex sur les gènes de résistance au triméthopime.....	31
3.10 Électrophorèse sur gel d'agarose.....	32
3.11 Comparaisons des résultats des tests d'antibiogrammes avec ceux des PCR multiplex.....	33
3.12 Comparaison des souches ayant un plasmide identifié avec leur origine géographique.....	33
CHAPITRE 4- RÉSULTATS.....	35
4.1 Tests d'antibiogrammes.....	35
4.2 Caractérisation de séquences génomiques de souches d' <i>Assal</i>	37
4.2.1 Caractérisation du plasmide de résistance aux antibiotiques pSN254b chez <i>A. salmonicida</i>	37
4.2.2 Caractérisation du plasmide de résistance aux antibiotiques pAB5S9b chez <i>A. salmonicida</i>	40
4.3 Identification des souches possédant les nouveaux plasmides.....	42
4.3.1 Analyses pour les plasmides pAsa4, pAsa4b et pAsa4c.....	42
4.3.2 Analyses pour les plasmides pAB5S9b et pSN254b.....	42
4.4 Alignement multiple des séquences des gènes analysés pour la création d'amorces.....	42
4.5 PCR uniplex des diverses amorces créées avec MPprimer et ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol.....	44
4.5.1 Essai d'une PCR multiplex ciblant les gènes de résistance au chloramphénicol avec des concentrations équimolaires d'amorces (MPprimer).....	45
4.5.2 Confirmation de l'interaction entre les amorces créées avec MPprimer.....	47
4.6 PCR uniplex des diverses amorces créées avec Primer3 et ciblant les gènes de résistance au chloramphénicol.....	48
4.6.1 Essai d'une PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol (Primer3).....	48
4.7 PCR uniplex des diverses amorces créées avec Primer3 et ciblant les gènes de résistance aux sulfonamides.....	49
4.7.1 Essai d'une PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux sulfonamides.....	50
4.8 PCR uniplex des diverses amorces créées avec Primer3 et ciblant les gènes de résistance à la tétracycline.....	52
4.8.1 Essai d'une PCR multiplex ciblant les gènes de résistance à la tétracycline.....	53
4.9 PCR uniplex sur les gènes de résistance au triméthopime.....	55
4.10 Comparaison des résultats des tests d'antibiogrammes avec ceux des PCR multiplex.....	55
4.11 Répartition géographique des souches ayant un plasmide identifié.....	57
CHAPITRE 5- DISCUSSION.....	59
5.1 Tests d'antibiogrammes.....	59
5.2 Caractérisation de nouveaux plasmides portant des résistances à des antibiotiques homologués.....	59
5.2.1 Plasmide pSN254b.....	59
5.2.2 Plasmide pAB5S9b.....	60
5.3 PCR multiplex mise au point à l'aide de deux logiciels : MPprimer et Primer3.....	61

5.4 Résistance aux antibiotiques déterminée à l'aide d'une PCR multiplex	62
5.4.1 Résistance au chloramphénicol/florfénicol.....	62
5.4.2 Résistance aux sulfonamides	63
5.4.3 Résistance aux tétracyclines	64
5.5 Concordance des résultats de résistance aux antibiotiques par tests d'antibiogrammes avec ceux par PCR.....	65
5.5.1 Résistance aux chloramphénicol/florfénicol.....	65
5.5.2 Résistance aux sulfonamides	65
5.5.3 Résistance aux tétracyclines	67
5.5.4 Résistance au triméthoprim.....	67
5.6 Comparaison des souches ayant un plasmide identifié avec leur lieu géographique	68
CHAPITRE 6- CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	69
CHAPITRE 7- BIBLIOGRAPHIE.....	73
CHAPITRE 8- ANNEXE	79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste des antibiotiques homologués en pisciculture au Québec.....	6
Tableau 2. Résumé des plasmides connus ayant des résistances à certains antibiotiques trouvés chez <i>Assal</i>	16
Tableau 3. Disques d'antibiotiques utilisés dans l'étude	22
Tableau 4. Souches séquencées présentant des résistances aux antibiotiques.....	24
Tableau 5. Identité de séquences des gènes de résistances trouvés chez <i>A. salmonicida</i>	44
Tableau 6. Comparaison des cibles identifiées par PCR multiplex avec les résultats obtenus par tests d'antibiogrammes.....	57
Tableau 7. Corrélation des souches ayant des plasmides identifiés avec leur lieu géographique.....	58
Tableau 8. Liste des souches utilisées dans l'étude avec leur résistance aux antibiotiques..	79
Tableau 9. Souches d'autres espèces d' <i>Aeromonas</i> ou de sous-espèces d' <i>A. salmonicida</i> utilisées dans cette étude.....	88
Tableau 10. Amorces utilisées dans l'étude	89

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Poisson malade de la furunculose..	2
Figure 2. Fréquence des maladies diagnostiquées chez l'omble de fontaine entre 1998-1999 et 2009-2010 à la Faculté de Médecine Vétérinaire de Saint-Hyacinthe.....	3
Figure 3. Une souche d' <i>Assal</i> typique étalée sur un milieu de culture contenant de la L-tyrosine.....	4
Figure 4. Nombre de prescriptions pour chacun des antibiotiques administrés entre 2008-2009 et 2013.....	7
Figure 5. Comparaison entre la structure de la tétracycline et de l'oxytétracycline..	8
Figure 6. Comparaison entre la structure du chloramphénicol et de deux substances dérivées.....	10
Figure 7. Mécanisme d'action et structure du sulfonamide et du triméthoprim.....	12
Figure 8. Nombre de cas de résistances aux antibiotiques homologués entre 2008-2009 et 2013.	13
Figure 9. Nombre de cas de résistances multiple aux antibiotiques homologués et utilisés entre 2008-2009 et 2013.	14
Figure 10. Schématisation de la PCR multiplex.....	18
Figure 11. Exemple d'antibiogrammes pour <i>Assal</i>	36
Figure 12. Analyse du nombre de cas de résistances multiples aux antibiotiques homologués et utilisés entre 2008-2009 et 2013..	37
Figure 13. Structure de pSN254b trouvé chez <i>A. salmonicida</i> et les différences avec pSN254 chez <i>Salmonella enterica</i>	39
Figure 14. Structure du plasmide pAB5S9 trouvé chez <i>Aeromonas bestiarum</i> comparée à celle de pAB5S9b trouvé chez <i>Assal</i>	41
Figure 15. PCR multiplex avec des concentrations d'amorces équimolaires ciblant les gènes <i>cat</i> , <i>catA2</i> , <i>floR</i> et le prophage 1 (MPprimer).....	46
Figure 16. Variation des conditions pour la PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol (MPprimer).....	47

Figure 17. PCR multiplex ciblant les gènes de résistance au chloramphénicol/florfénicol avec un ratio d'amorces de 1:1:1:1.....	49
Figure 18. PCR uniplex ciblant les gènes de résistance aux sulfonamides et permettant l'optimisation de la température d'hybridation entre 55 et 60 °C.....	50
Figure 19. PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux sulfonamides avec un ratio d'amorces de 1:1:1.....	52
Figure 20. PCR multiplex ciblant les gènes de résistance à la tétracycline avec un ratio d'amorces de 1:1:1:1.....	54

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAC: Aquaculture association of Canada

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMP : Ampicilline

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

Assal : *Aeromonas salmonicida* sous-espèce *salmonicida*

BLASTn: *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*

CAT : Chloramphénicol O-acétyltransférase

CHL : Chloramphénicol

ΔG : Delta G

DHF: Dihydrofolate

DHFR : Dihydrofolate réductase

DHPS: Dihydroptéroate synthétase

dNTP: Désoxyribonucléotide tri-phosphate

DO : Densité optique

ERY : Érythromycine

FFC : Florfénicol

GEN : Gentamycine

IDT: *Integrated DNA Technologies , Inc.*

MAPAQ : Ministère de l'Agriculture, Pêcheries et Alimentation du Québec

MUSCLE : *MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation*

NAL : Acide nalidixique

NCBI: *National Center of Biotechnology Information*

PABA: ρ -aminobenzoïque

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase (*Polymerase chain reaction*)

RAQ : Ressources Aquatiques Québec

RPM : Révolution par minute

SFM : Société Francophone de Microbiologie

SMX : Sulfaméthoxazole

SORDAC : Société de recherche et de développement en aquaculture continental inc.

SPT : Spectinomycine

STR : Streptomycine

SUL: Sulfonamide

SWL: *Single Worn Lysis*

SXT : Sulfaméthoxazole-triméthoprime

TET : Tétracycline

THF : Acide tétrahydrofolique

T_m : Température de fusion

TMP : Triméthoprime

UV : Ultraviolet

V : Volt

*À ma famille et mon fiancé qui m'ont
encouragée tout le long de mes études*

REMERCIEMENTS

Premièrement, j'aimerais remercier les organismes subventionnaires qui ont contribué à la réalisation de ce projet. Parmi ceux-ci, il y a la Société de recherche et de développement en aquaculture continentale (SORDAC) inc. qui a permis de subventionner ce projet de recherche. Aussi, je remercie énormément Ressources Aquatiques Québec (RAQ) qui m'a octroyé une bourse du Programme de formation orientée vers la nouveauté, la collaboration et l'expérience en recherche (FONCER) en 2014 ainsi que deux bourses de voyages en 2013 et 2014 pour participation à un congrès. Grâce à ces deux bourses, j'ai pu participer au congrès Aquaculture Canada en 2013 à Guelph (Ontario) et au 11e Symposium International sur *Aeromonas* et *Plesiomonas* en 2014 à Montpellier (France). Je remercie également l'*Aquaculture Association of Canada* (AAC) qui m'a octroyé une bourse de participation au congrès Aquaculture Canada en 2013 et la Société Francophone de Microbiologie (SFM) qui m'a octroyé une bourse de participation au congrès du 11e Symposium International sur *Aeromonas* et *Plesiomonas* en 2014.

J'aimerais aussi remercier le laboratoire de bactériologie clinique à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal, le centre de référence Félix d'Hérelle du département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique de l'Université Laval, le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, le Département de Santé Animale aquatique de Pêches et Océans Canada, Joachim Frey de l'Université de Bern et Roselynn M.W. Stevesson de l'Université de Guelph pour l'obtention de souches d'*A. salmonicida* sous-espèce *salmonicida*.

J'aimerais aussi remercier les membres de mon comité aviseur qui m'ont suivie et aidée par leurs conseils tout au long de mon projet : Steve Charette (Directeur), Nicolas Derome (Co-directeur), Michel Frenette et Daniel Grenier. Plus particulièrement, j'aimerais remercier Steve pour les nombreux conseils que tu m'as donnés tout au long de ce projet. Merci aussi pour la disponibilité que tu as envers tes étudiants. Merci d'avoir cru en moi. Merci de m'avoir donné la chance d'être stagiaire depuis la fin de ma technique de 2011 à 2013 et de m'avoir donné la chance de faire une maîtrise dans ton laboratoire.

Ensuite, j'aimerais remercier les collègues et les amis que j'ai pu côtoyer tout au long de ma maîtrise. Merci particulièrement à Valérie Paquet qui m'a accueillie et formée lors de mon entrée au laboratoire. Même si je venais du Cégep pour y faire un stage, tu as su bien m'expliquer le projet sur *A. salmonicida* et bien me transmettre tes connaissances techniques et théoriques. Tu es une super professionnelle de recherche dynamique et à l'écoute des membres du laboratoire. Merci à Katherine Tanaka pour les connaissances que tu m'as transmises, entre autres, sur le plasmide pAsa4.. Merci également à Myriam Ouellet et à Alix Denoncourt avec qui j'ai pu partager des discussions même si nous n'étions pas sur des projets similaires. Merci à Antony Vincent qui m'a beaucoup aidée sur les analyses bio-informatiques sur pSN254b et pAB5S9b. Merci à Jean-Guillaume Emond-Rheault qui m'a beaucoup aidée sur la découverte d'une cible à titre de contrôle positif pour la PCR multiplex. Merci à Stéphanie Dallaire-Dufresne avec qui j'ai fait de beaux voyages en congrès. Merci aussi à Sabrina Attéré avec qui j'ai pu discuter d'*A. salmonicida*, entre autres, sur les plasmides. Merci aussi à Geneviève Filion avec qui j'ai passé moins de temps, mais j'ai adoré partager le bureau avec toi. On a bien ri avec toi et tu étais une professionnelle de recherche formidable. Merci aussi à Jade Faucher et Cynthia Gagné-Thivierge.

J'aimerais remercier mes parents, Jocelyne et Daniel. Vous m'avez toujours encouragée dans tous mes projets autant professionnels que personnels. Vous êtes les meilleurs parents que j'aurais pu avoir. Je vous adore! Je remercie aussi ma grande sœur Émilie. Tu as toujours été là pour moi et tu es une sœur géniale. Même si tu as une passion opposée à la mienne pour la littérature, tu t'es toujours intéressée sur ce que j'étudiais (et même si tu ne semblais pas comprendre ce que je t'expliquais). Je t'adore aussi ma grande sœur!

Je ne peux finir ces remerciements sans remercier mon fiancé Francis qui partage ma vie depuis plus de trois ans. Tu m'as toujours encouragée lors de mes études pour réaliser mes projets et rêves même si cela entraînait de s'aimer à distance. Je t'aime mon amour! Tu es l'homme de ma vie! Merci pour tout ce que tu fais pour moi!

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

1.1 L'aquaculture au Canada

L'aquaculture est le mot utilisé pour désigner l'élevage de poissons, de mollusques, de crustacés et la culture de plantes aquatiques dans l'eau salée ou douce (Pêches et Océans Canada, 2013a). Selon les données émises sur la production aquacole au Canada par Pêches et Océans Canada en 2013, sur une quantité totale de 172 097 tonnes produites, 130 337 tonnes provenaient de l'élevage de poissons soit 76 % de la production aquacole totale. Le saumon a été l'espèce de poissons la plus produite en 2013 (Pêches et Océans Canada, 2013b). En 20 ans, la production marine a quadruplé (Pêches et Océans Canada, 2009). L'aquaculture est donc une pratique représentant une valeur économique importante au Canada.

Au Québec, l'omble chevalier, la truite arc-en-ciel et l'omble de fontaine sont les principaux poissons d'élevage (Pêches et Océans Canada, 2009). Par contre, selon le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) en 2011, l'omble de fontaine et la truite arc-en-ciel sont les espèces majoritairement produites au Québec. L'omble de fontaine est principalement destiné pour le marché de l'ensemencement tandis que la truite arc-en-ciel est exploitée majoritairement pour le marché de la table (MAPAQ, 2011). Ces poissons, de la famille des salmonidés, peuvent être affectés par diverses maladies provoquées par des facteurs occasionnant un stress chez le poisson. La température du bassin, l'entassement des poissons et l'approvisionnement en oxygène sont des facteurs à contrôler par les pisciculteurs pour prévenir le développement de maladies (Morin, 2010). Les maladies nuisent ainsi à l'économie puisque les poissons affectés deviennent impropres à la consommation. D'ailleurs, une maladie infectieuse nommée la furunculose affecte principalement les salmonidés, dont l'omble de fontaine et la truite arc-en-ciel. Cette maladie est causée par la bactérie pathogène *Aeromonas salmonicida* (Morin, 2010).

1.2 La furonculose

La furonculose a été décrite suite à l'observation d'une truite malade en Allemagne par Emmerich et Weibel en 1902. De nos jours, la furonculose fait des ravages dans plusieurs pays en Europe et en Amérique du Nord (Buchmann et al., 2009). Cette maladie infectieuse peut être soit chronique ou aiguë. Les infections chroniques affectent les poissons en causant des furoncles qui sont des lésions sur leur corps (Figure 1). Les infections aiguës engendrent de nombreux symptômes chez les poissons, telles des septicémies, des hémorragies, des nécroses tissulaires et des mélanoses. Ces infections mènent à la mort des poissons (Boyd et al., 2003). Les jeunes poissons sont infectés généralement par la forme aiguë en souffrant de perte d'appétit et de noircissement de la peau tandis que les poissons plus âgés sont plus fréquemment affectés par la forme chronique où la mortalité est habituellement plus lente (Buchmann et al., 2009). La forme chronique peut être convertie en forme aiguë à cause de conditions stressantes de l'environnement tel que la température de l'eau (Boyd et al., 2003). Cette maladie a un impact principalement en aquaculture où le taux de mortalité peut atteindre 10-20 % (Eiras C., 2008). Selon les données obtenues sur les fréquences des maladies entre 1998-1999 et 2009-2010 au Québec (Figure 2), la furonculose est la maladie qui est la plus fréquemment rencontrée chez l'omble de fontaine soit à une fréquence entre 30 et 60 % des maladies par année.



Figure 1. Poisson malade de la furonculose. La présence d'un furoncle sous-cutané situé dans le tissu musculaire est caractéristique d'une infection chronique. Cette figure est adaptée de (Dallaire-Dufresne et al., 2014).

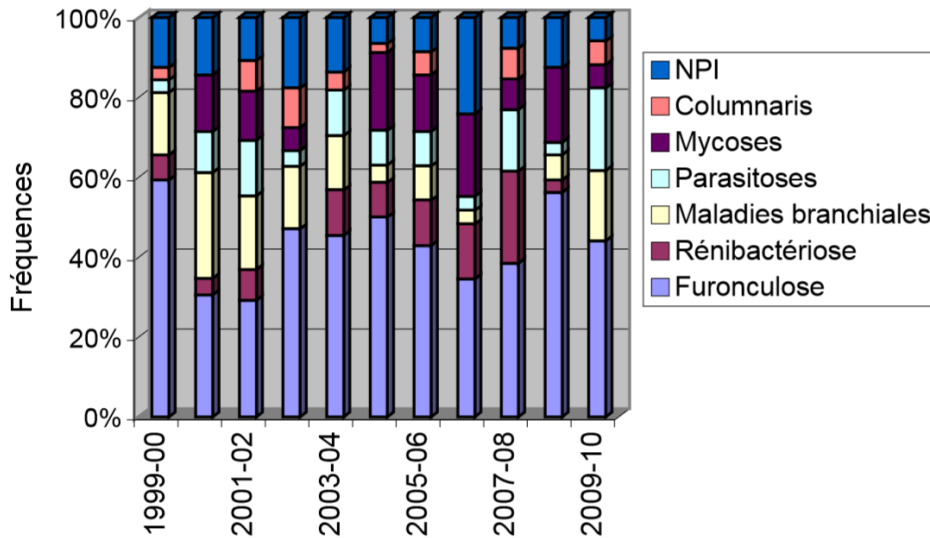


Figure 2. Fréquence des maladies diagnostiquées chez l'omble de fontaine entre 1998-1999 et 2009-2010 à la Faculté de Médecine Vétérinaire de Saint-Hyacinthe (Morin, 2010).

1.3 *Aeromonas salmonicida* : une bactérie pathogène de poissons

A. salmonicida est un agent pathogène opportuniste des milieux aquatiques qui affecte surtout les salmonidés (Hiney and Olivier, 1999). Faisant partie de la classe des *Gammaproteobacteria*, cette bactérie est de l'ordre des *Aeromonadales* et est dans la famille des *Aeromonadaceae*. Dans la famille des *Aeromonadaceae*, il y a trois genres : *Aeromonas*, *Oceanimonas* et *Tolumonas* (Brenner et al., 2005). *Aeromonas salmonicida* est constitué de cinq sous-espèces (*salmonicida*, *mascoicida*, *achromogenes*, *pectinolytica* et *smithia*) (Boone et al., 2001). Dans ce projet, *Aeromonas salmonicida* sous-espèce *salmonicida* (*Assal*) est la sous-espèce étudiée. Ce microorganisme est une bactérie à Gram négatif et non-motile (Janda and Abbott, 2010).

Au sein des salmonidés, certaines espèces seraient plus sensibles à cette bactérie que d'autres soient le saumon de l'atlantique et la truite brune. La truite arc-en-ciel serait plus résistante face à ce pathogène (Cipriano, 1983). Il existe deux types de souches; soit les souches typiques qui ont la capacité de produire un pigment brun soluble en présence de

0,1 % de tyrosine ou de phénylalanine (Figure 3) et les souches atypiques qui ne pigmentent pas (Brenner et al., 2005; Rasch et al., 2007).



Figure 3. Une souche d'*Assal* typique étalée sur un milieu de culture contenant de la L-tyrosine. La production du pigment brun en présence de tyrosine par une souche typique est visible sur l'image. Le milieu de culture utilisé est le furunculose agar qui contient de la L-tyrosine (Jean-Guillaume Emond-Rheault, comm. pers.).

1.4 Les traitements existants contre la furunculose : Vaccins et antibiotiques

Les traitements existants pour combattre *Assal* sont les antibiotiques homologués en pisciculture et la vaccination des poissons. Pour ce qui est de la vaccination, des vaccins commerciaux ont été conçus. Parmi ceux-ci, un vaccin contenant un adjuvant composé d'huile et des antigènes provenant d'*Assal* inactivé est administré par injection. Il possède certains effets secondaires tels que des réactions sur la cavité abdominale causées par l'huile et pouvant entraîner une congestion au site d'injection ou une péritonite sévère. De plus, l'huile peut mener au développement de réactions auto-immunes (Buchmann et al., 2009). La vaccination présente une importante lourdeur logistique puisqu'il faut traiter chaque poisson manuellement (MAPAQ, 1997). Un vaccin par immersion du poisson dans un bain a été aussi mis au point pour traiter la furunculose, mais celui-ci s'avère moins efficace que le vaccin utilisé par injection (MAPAQ, 1997).

Les antibiotiques peuvent être efficaces pour traiter l'infection si la bactérie attaquant le poisson n'est pas résistante à l'antibiotique prescrit. L'administration d'antibiotiques avec une dose et une durée de traitement inadéquates peut mener au développement de bactéries résistantes aux antibiotiques à cause de la pression sélective exercée sur celles-ci (Dixon, 2001; Morin et al., 2004). Les antibiotiques peuvent être administrés soit par voie orale par l'ajout d'antibiotiques dans la moulée, par injection ou par bain. La méthode la plus utilisée est par insertion dans la moulée (Morin et al., 2004). Cette méthode d'administration n'est pas toujours efficace puisque les poissons atteints de furonculose perdent l'appétit ce qui ne les incite pas à consommer les antibiotiques présents dans la moulée. Les poissons traités aux antibiotiques peuvent être réinfectés par la furonculose après le traitement contrairement à la vaccination qui immunise le poisson (Elis, 1988). D'un point de vue économique, les antibiotiques sont moins dispendieux à utiliser que la procédure de vaccination (Elis, 1988).

1.5 Les antibiotiques utilisés en pisciculture au Québec

Les familles d'antibiotiques homologués et utilisés en pisciculture au Québec sont les tétracyclines, les chloramphénicol et les sulfonamides (Morin et al., 2004). Plus spécifiquement, l'oxytétracycline, le florfenicol, le sulfadiméthoxine/orméthoprime et la sulfadiazine/triméthoprime peuvent être utilisés. L'enrofloxacin et l'érythromycine ne sont pas homologués, mais leur utilisation a été répertoriée dans des piscicultures au Québec (Morin, 2007). Ces antibiotiques sont prescrits à des fréquences variables (Tableau 1) (Morin, 2010). Un des facteurs qui influence le choix de l'antibiotique utilisé est la période de retrait à respecter. Les pisciculteurs ayant des poissons traités à l'aide d'antibiotiques doivent retirer ceux-ci pendant une certaine période à l'écart des autres poissons sains pour éviter la propagation de l'antibiorésistance dans l'environnement ainsi que pour empêcher la présence de résidus d'antibiotiques dans la chair du poisson qui sera éventuellement consommée.

Les antibiotiques n'ont pas tous la même période de retrait. Le respect de cette période de retrait est donc important, mais cela inflige des contraintes économiques pour les

pisciculteurs qui ont plusieurs poissons à traiter (Morin et al., 2004; Morin, 2010). Comme on peut voir au tableau 1, les poissons traités aux sulfadiazines/triméthoprimine doivent être ensemencés dans un cours d'eau au moins 80 jours après le traitement. Cet antibiotique n'est pas utilisé au Québec à cause de cette longue période de retrait (Morin, 2010). Selon les données obtenues sur le nombre de prescriptions pour chaque antibiotique administré entre 2008-2009 et 2013, le florfénicol est l'antibiotique le plus utilisé pour traiter les poissons atteints de furonculose (Figure 4) (Lafaille, 2012; Lafaille, 2013; Lafaille, 2014). Il a l'avantage de nécessiter une période de retrait beaucoup plus courte que les autres antibiotiques homologués (Tableau 1). Le sulfadiméthoxine combiné à l'orméthoprimine a été beaucoup utilisé entre 2008 et 2011. Par contre, il n'a pas été utilisé en 2012 et 2013 où le florfénicol a été majoritairement prescrit durant ces deux années. Pour ce qui est de l'oxytétracycline, il a été peu prescrit depuis 2008. L'érythromycine a été utilisée une fois en 2008-2009 et une fois en 2011 malgré le fait que cet antibiotique n'est pas homologué en pisciculture (Lafaille, 2012; Lafaille, 2013; Lafaille, 2014). Il a pu être utilisé grâce à l'autorisation de distribution d'un médicament d'urgence par un vétérinaire (Morin, 2010).

Tableau 1. Liste des antibiotiques homologués en pisciculture au Québec. Adaptée de (Morin, 2010).

Ingrédient actif	Statut légal	Période de retrait en jours à T=10 °C	Taux d'utilisation
Oxytétracycline	Homologué	40	Utilisé +
Florfénicol (chloramphénicol)	Homologué	12	Le plus utilisé depuis 1999-2000 ++
Sulfadiméthoxine/orméthoprimine	Homologué	42	Utilisé ++
Sulfadiazine/triméthoprimine	Homologué	80	Pas utilisé
Érythromycine	Non homologué	180	Usages spécifiques, utilisé à un taux inconnu
Enrofloxacin	Non homologué	-	Utilisé à un taux inconnu

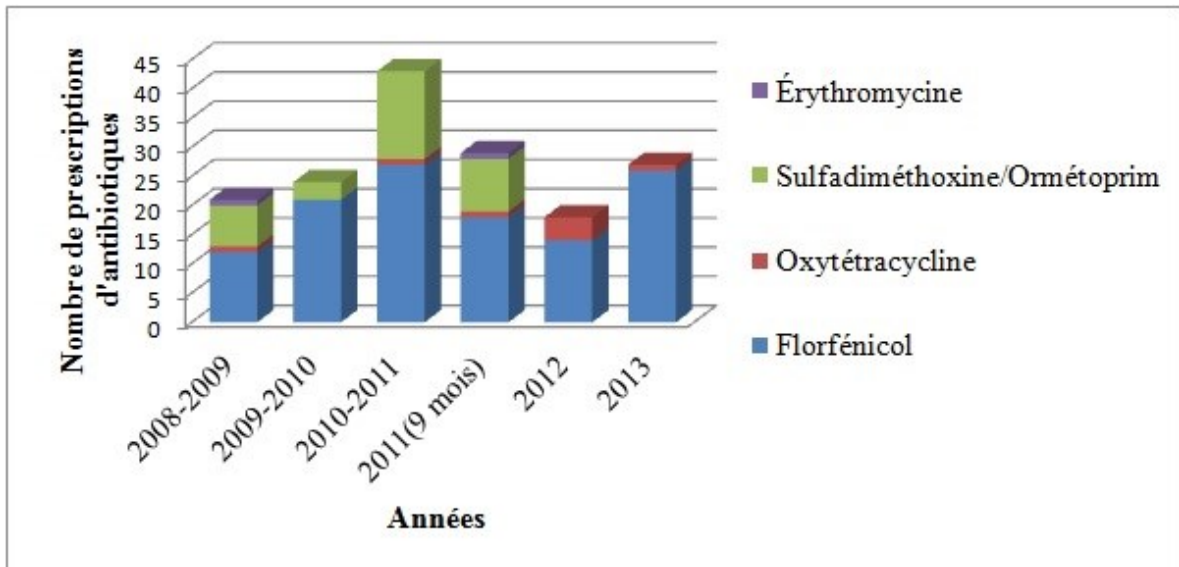


Figure 4. Nombre de prescriptions pour chacun des antibiotiques administrés entre 2008-2009 et 2013. Données compilées par le service de diagnostic en ichtyopatologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Saint-Hyacinthe (Lafaille, 2012; Lafaille, 2013; Lafaille, 2014).

1.5.1 Famille des tétracyclines

Les tétracyclines constituent un groupe d'antibiotiques ayant une structure de 4 cycles carbonés hexagonaux fusionnés. Les membres de ce groupe tels que la tétracycline et l'oxytétracycline ont des différences sur les carbones 5, 6, 7 des cycles fusionnés (Figure 5). Chez les bactéries à Gram négatif, la tétracycline pénètre la membrane externe par diffusion passive par l'intermédiaire de porines. Le passage à travers la membrane cytoplasmique se fait par un système énergie-dépendant. Une fois dans le cytoplasme de la bactérie, l'antibiotique se lie à la sous-unité 30S des ribosomes dans le but d'inhiber la synthèse protéique en empêchant l'accès à l'acide ribonucléique de transfert (ARNt) aminoacylé au site A du ribosome (Mascaretti, 2003). Les tétracyclines empêchent la liaison des facteurs RF-1 et RF-2 lors de la terminaison indépendamment du codon-stop.

Lorsqu'il y a résistance bactérienne à cet antibiotique, trois mécanismes peuvent survenir : par efflux, par protection ribosomale ou par modification chimique. La résistance par efflux est dépendante d'énergie et est causée par des protéines transmembranaires qui agissent en diminuant la concentration de tétracycline dans le cytosol. La majorité des gènes de

résistance trouvés utilise ce mécanisme. La protection ribosomale se fait par l'interaction de protéines solubles d'environ 72,5 kDa avec le ribosome (Mascaretti, 2003). Il y a 11 protéines cytoplasmiques utilisant ce mécanisme soient Tet(M), Tet(O), Tet(S), Tet(W), Tet(Q), Tet(T), Otr(A), TetB(P), Tet(32), Tet(36) et Tet(44) (Van Hoek et al., 2011). Le ribosome devient alors insensible à l'inhibition causée par la tétracycline (Mascaretti, 2003). La modification chimique ou l'inactivation enzymatique se fait en présence d'oxygène et de NADPH en changeant chimiquement la tétracycline. Les protéines encodées par les gènes *tet(X)*, *tet(34)* et *tet(37)* sont les seules connues qui utilisent ce mécanisme de résistance (Van Hoek et al., 2011). Ainsi, plusieurs gènes de résistances à la tétracycline existent et peuvent se trouver sur des plasmides ou sur le chromosome. À ce jour, 38 gènes *tet* codant pour la résistance à la tétracycline, 3 gènes *otr* codant pour la résistance à l'oxytétracycline et un gène *tcr* ont pu être identifiés (Roberts, 1996; Roberts, 2005; Brown et al., 2008). Les gènes *otr* ont été trouvés dans des souches du genre *Streptomyces* et *Mycobacterium* produisant de l'oxytétracycline tandis que le gène *tcr3* a été identifié à partir d'une souche de *Streptomyces aureofaciens* produisant du chlortétracycline (Van Hoek et al., 2011). Par contre, les gènes *otr* confèrent une résistance à la tétracycline et il n'y aurait pas de différence intrinsèque entre les gènes de résistance à la tétracycline et ceux de l'oxytétracycline (Chopra and Roberts, 2001).

Tétracycline

Oxytétracycline

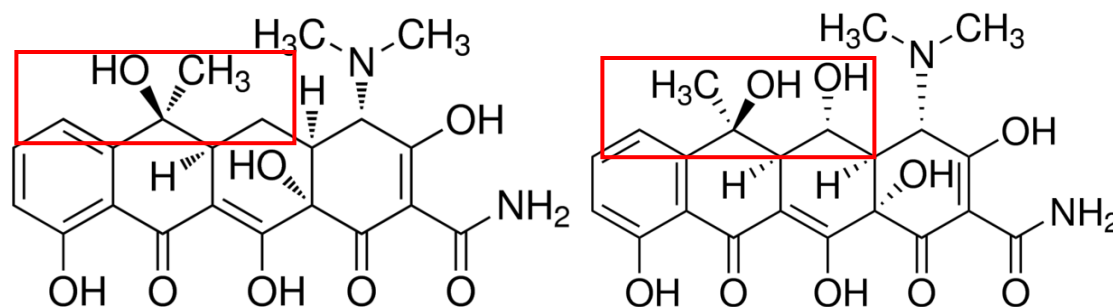


Figure 5. Comparaison entre la structure de la tétracycline et de l'oxytétracycline. L'encadré rouge montre la région qui différencie les membres de la famille des tétracyclines. Les deux images ont été tirées du catalogue en ligne de la compagnie Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaldrich.com>).

1.5.2 Famille du chloramphénicol

Le chloramphénicol est le seul de sa famille, mais des antibiotiques dérivés sont apparus avec des mécanismes d'action similaires au chloramphénicol (Mascaretti, 2003). La structure du chloramphénicol est caractérisée par la présence d'un paranitrobenzène lié à un groupe propanediol. Ce groupe est muni d'une chaîne de dichloroacétamide (Figure 6) (Bennett, 2014). Il y a plusieurs substances dérivées ayant une structure différente du chloramphénicol soit l'azidamfénicol, le florfénicol et le thiamphénicol (Figure 6) (Schwarz et al., 2004). Les différences entre le chloramphénicol et les substances dérivées se retrouvent sur la position para du benzène, sur le carbone 3 du propanediol et sur la chaîne du dichloroacétamide. Le mode d'action du chloramphénicol et de ses dérivées implique la liaison au site du peptidyltransférase de la sous-unité ribosomale 50S. Il va interagir avec certains nucléotides d'une boucle du domaine V de l'acide ribonucléique ribosomal (ARNr) 23S. Il empêche la formation de liens avec des peptides tels que l'aminocyl-ARNt avec le site A du ribosome. Le groupement hydroxyle sur le carbone 3 du groupe propanediol est fondamental pour l'activité du chloramphénicol, l'azidamfénicol et le thiamphénicol. Il affecte donc la synthèse des protéines bactériennes tout comme la tétracycline (Morin et al., 2004). S'il y a une modification *in vivo* sur ce carbone, il y aura une résistance au chloramphénicol (Mascaretti, 2003).

La résistance bactérienne au chloramphénicol peut survenir par deux mécanismes soient par inactivation enzymatique ou par efflux actif. L'inactivation enzymatique se fait par l'acétylation du groupement hydroxyle catalysé par l'enzyme chloramphénicol O-acétyltransférase (CAT). Grâce au groupement fluor sur le florfénicol, la résistance par l'enzyme CAT n'est pas possible. Les gènes codant pour cette enzyme sont nommés *cat* et sont habituellement situés sur des plasmides. Il y a trois types de gènes *cat*: type I, II et III (Mascaretti, 2003). Le mécanisme par efflux actif dépendrait d'une force protomotrice (McMurry et al., 1994). Les gènes codant pour ce mécanisme sont *cmlA1*, *cml*, *floR*, *fexA*, *cmlv*, *cmrA*, *cmr* et *pexA*. Si la résistance au chloramphénicol provient seulement de l'activité de CAT, la souche est sensible au florfénicol. Le gène *cmlA* procure une résistance au chloramphénicol et une sensibilité au florfénicol tandis que le gène *floR* amène une résistance à ces deux antibiotiques (Van Hoek et al., 2011). D'autres mécanismes de

résistances ont été rapportés telle que l'inactivation par des phosphotransférases, l'insertion de mutations dans un site cible et la présence de barrières de perméabilité (Schwarz et al., 2004).

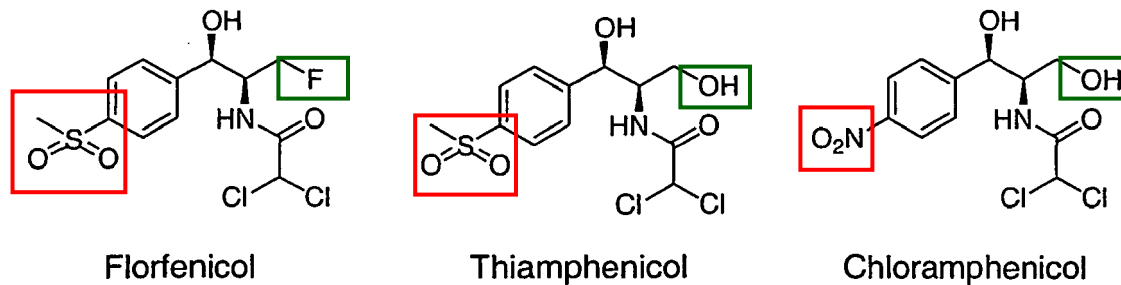


Figure 6. Comparaison entre la structure du chloramphénicol et de deux substances dérivées. L'encadré rouge montre les différences des structures des substances dérivées avec le chloramphénicol. L'encadré vert montre la différence du florfénicol par rapport au thiamphénicol et le chloramphénicol. Le florfénicol possède un groupement fluor tandis que le thiamphénicol et le chloramphénicol ont un groupe hydroxyle. Cette figure a été adaptée de celle trouvée dans (Hecker et al., 2013).

1.5.3 Famille des sulfonamides et triméthoprimine

La famille d'antibiotique des sulfonamides et triméthoprimine (TMP) constitue deux groupes d'agents synthétiques antibactériens. Cette famille interfère avec la biosynthèse de l'acide tétrahydrofolique (THF) (Mascaretti, 2003). Les sulfonamides dérivent des *p*-aminobenzènesulfonamide. La biosynthèse des sulfonamides se fait par l'intermédiaire de l'enzyme dihydroptéroate synthétase (DHPS) en déplaçant le pyrophosphate du substrat phtéridine. Les sulfonamides imitent le *p*-aminobenzoïque (PABA) qui est un substrat nécessaire à la biosynthèse du THF. Les sulfonamides vont compétitionner avec le PABA lors de la production de dihydroptéorate. Les sulfonamides ont la particularité d'avoir une grande affinité avec l'enzyme acide tétrahydroptéroïque synthétase en comparaison avec le PABA qui a une affinité plus faible (Figure 7). Le THF est important chez la bactérie puisqu'il est nécessaire pour sa croissance. Le THF est aussi présent et nécessaire chez la cellule humaine. Le mécanisme de transport de l'acide folique permet l'entrée de celui-ci à l'intérieur de la cellule humaine. Contrairement à la cellule humaine, l'acide folique n'entre pas dans la cellule bactérienne. Le dihydrofolate (DHF) et le THF sont synthétisés par la

bactérie à l'intérieur de son cytoplasme. Cette différence biochimique entre ces deux types de cellules fait en sorte que les sulfonamides ont une toxicité sélective pour les cellules bactériennes. Le sulfaméthoxazole (SMX) est un intermédiaire du sulfonamide et a une demi-vie semblable au TMP. Le SMX est souvent utilisé en combinaison avec le TMP. Le TMP porte aussi le nom de 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)pyrimidine et agit en tant qu'inhibiteur de la dihydrofolate réductase (DHFR) qui est l'enzyme permettant la réduction du DHF en THF. Le TMP est un analogue structural de la partie phtéridine du dihydrofolate. Il compétitionne avec le phtéridine pour inhiber le DHFR. Les sulfonamides et le TMP sont souvent utilisés en combinaison puisqu'ils agissent sur la même voie de biosynthèse et diminuent le taux de bactéries résistantes comparativement à l'utilisation d'un seul des deux antibiotiques (Figure 7). Ces deux antibiotiques combinés sont utilisés fréquemment pour traiter diverses infections cliniques telles que urinaires, respiratoires et gastro-intestinales ainsi qu'en pisciculture (Mascaretti, 2003). En pisciculture, la combinaison de sulfonamide et triméthoprimine utilisée et homologuée est le sulfadiméthoxine/ormétoprimine comme mentionné au tableau 1.

Des mécanismes de résistance bactérienne à ces antibiotiques sont possibles. Chez les sulfonamides, une résistance par mutation peut créer une surproduction de PABA ou un changement structural du DHPS diminuant ainsi l'affinité pour les sulfonamides. La résistance peut avoir lieu par mutation ou recombinaison dans le gène *dhps*. Elle peut aussi avoir lieu sur les plasmides par transfert horizontal du gène *dhps*. Elle peut aussi se faire par les gènes *sul1/sul2* (Mascaretti, 2003). Ces deux gènes codent pour une version insensible aux sulfonamides de l'enzyme dihydroptéroate synthase chez les bactéries à Gram négatif (Skold, 2001). Un autre gène de résistance aux sulfonamides a été trouvé soit *sul3*. Ce troisième gène code pour la même enzyme que les deux autres gènes et a été initialement trouvé sur un plasmide chez *Escherichia coli* (Perreten and Boerlin, 2003). Chez le TMP, les résistances peuvent avoir lieu par le transfert de gènes *dhfr* sur les plasmides ou par des mutations dans un gène *dhfr* sur le chromosome (Mascaretti, 2003). Les gènes *dhfr* ou *dfr* codent pour une enzyme DHFR différente du gène chromosomique *folA* qui est résistante au TMP (Brolund et al., 2010).

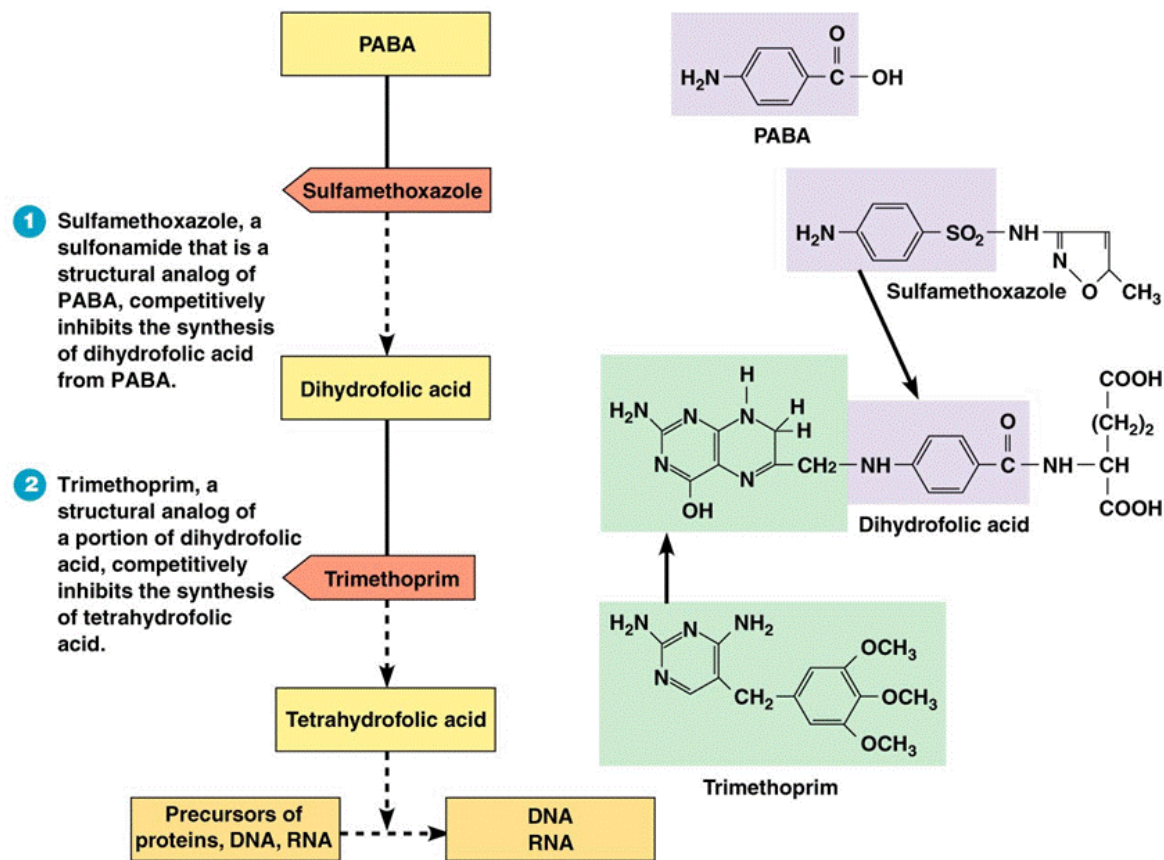


Figure 7. Mécanisme d'action et structure du sulfonamide et du triméthoprim. Image tirée de <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap20/lecture5.htm>. Ce schéma montre la voie de biosynthèse de l'acide tétrahydrofolique où les sulfonamides et le triméthoprim interviennent. Le sulfaméthoxazole inhibe la synthèse du dihydrofolate tandis que le triméthoprim bloque la synthèse de l'acide tétrahydrofolique. Puisqu'ils agissent sur la même voie de biosynthèse, ces deux antibiotiques sont souvent combinés pour être plus efficaces.

1.6 Résistances fréquentes aux antibiotiques homologués

L'apparition de résistances aux antibiotiques homologués est fréquente au fil des années chez les poissons infectés au Québec (Figure 8). Des cas de résistance à la tétracycline ont été observés de 2008-2009 à 2013 et atteignent un nombre record de 8 durant une de ces années malgré le fait qu'elle est peu prescrite. Le nombre de cas de résistance au sulfaméthoxine-orméthoprim est plus faible soit entre 0 et 3 cas par année durant la période étudiée. Les cas de résistance au florfénicol sont apparus plus tard soit en 2002-

2003 alors que pour les autres antibiotiques, les résistances étaient déjà présentes avant les années 2000. Ces cas de résistance tardive sont dus au fait que le florfénicol a été le dernier antibiotique à être introduit dans le domaine piscicole (Morin et al., 2004). Par contre, malgré l'utilisation fréquente de cet antibiotique, peu de cas de résistances au florfénicol ont été rapportés de 2008-2009 à 2013. Les cas de résistances sont variables et dépendent du nombre de souches analysées durant ces années. Selon les conditions environnementales comme la température, certaines années sont plus sujettes à avoir des éclosions de furunculose. Des cas de résistances à de multiples antibiotiques ont été observés entre 2008-2009 à 2013 (Figure 9). Des cas de résistances multiples aux trois antibiotiques homologués et utilisés ont été rapportés en 2008-2009 et 2011. Une seule souche résistante de façon simultanée à des antibiotiques homologués a été identifiée en 2012 et 2013. Il est très surprenant qu'il y ait de moins en moins de résistance multiple à des antibiotiques homologués. Ces souches d'*Assal* ayant des résistances aux trois antibiotiques homologués ne peuvent plus être éliminées efficacement à l'aide d'antibiotiques (Morin et al., 2004).

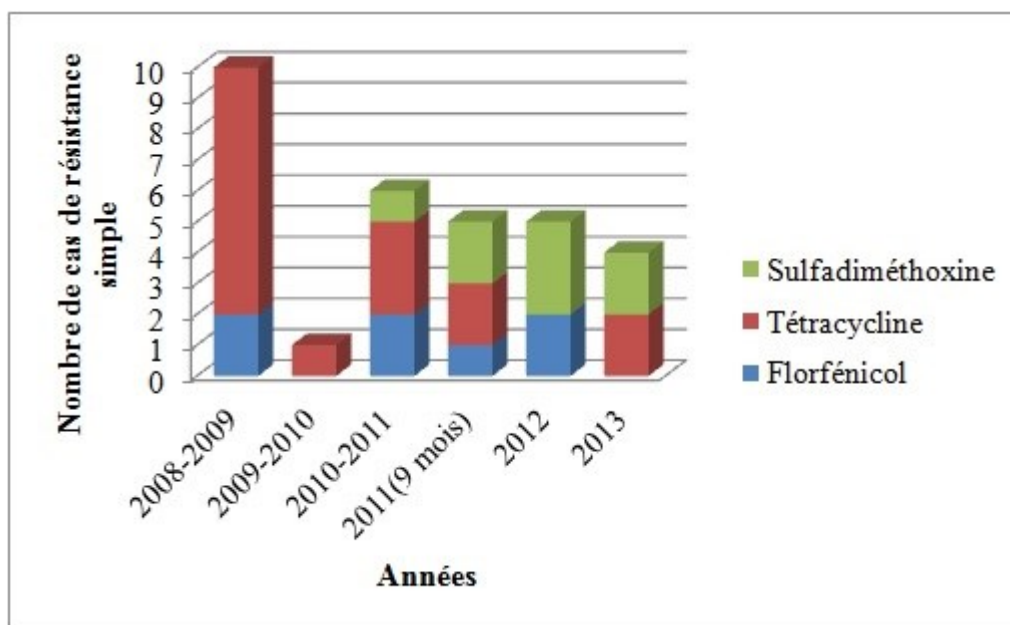


Figure 8. Nombre de cas de résistances aux antibiotiques homologués entre 2008-2009 et 2013 (Lafaille, 2012; Lafaille, 2013; Lafaille, 2014). Le graphique montre le nombre de cas répertoriés par année à la Faculté de Médecine Vétérinaire de Saint-Hyacinthe incluant les cas ayant des résistances limites ou intermédiaires.

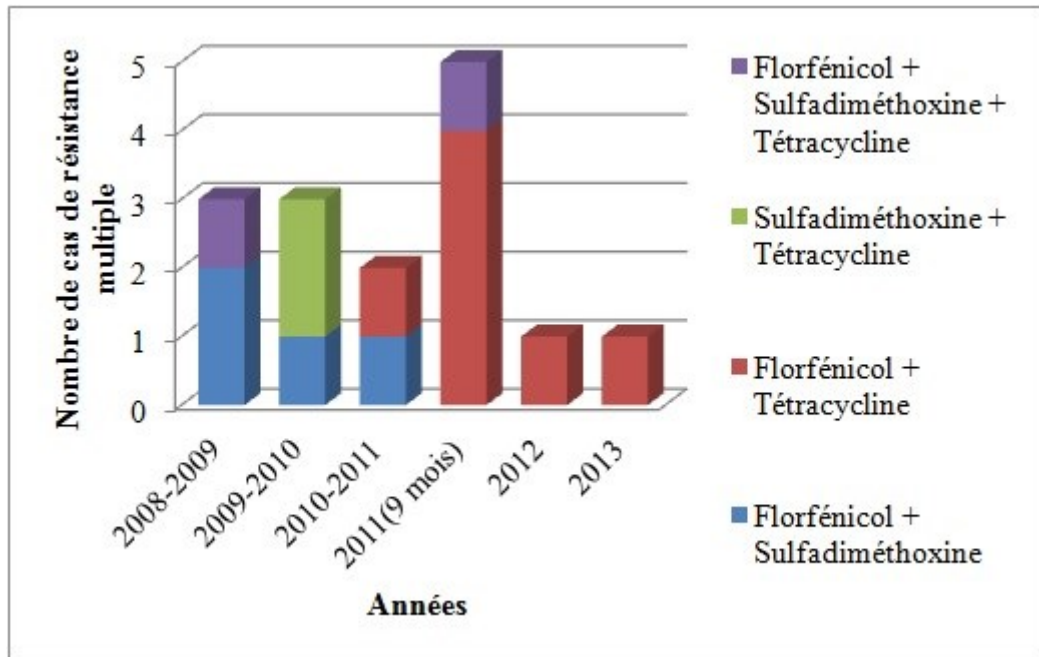


Figure 9. Nombre de cas de résistances multiple aux antibiotiques homologués et utilisés entre 2008-2009 et 2013 (Lafaille, 2012; Lafaille, 2013; Lafaille, 2014). Le graphique montre le nombre de cas répertoriés par année à la Faculté de Médecine Vétérinaire de Saint-Hyacinthe incluant les cas ayant des résistances limites ou intermédiaires.

1.6.1 Les résistances connues chez *Assal*

Chez *Assal*, de nombreux gènes de résistance à des antibiotiques sont situés sur des plasmides. La première souche d'*Assal* dont le génome a été séquencé est A449 qui provient de France et elle porte des résistances à des antibiotiques (Reith et al., 2008). Suite à l'analyse de la séquence génomique de cette souche, un plasmide nommé pAsa4 a pu être identifié. Ce plasmide a une taille de 166,7 kb et possède le transposon Tn21 avec un intégron de classe 2. Il possède des résistances à la spectinomycine (gène *aadA*), au chloramphénicol (*cat*), à la streptomycine (*aadA*), au sulfonamide (*sulI*) et à la tétracycline (*tetA(E)*). Le gène de résistance à la tétracycline *tetA(E)* est régulé par une protéine répresseur de tétracycline de classe E soit *tetR(E)* (Reith et al., 2008).

Assal peut aussi contenir d'autres plasmides de résistance aux antibiotiques comme pRAS1, pRAS2, pRAS3.1 et pRAS3.2. Le plasmide pRAS1 a une taille de 45 kb et possède un

transposon Tn1721 avec un intégron de classe 4. Il contient des gènes codant pour la résistance au sulfonamide (*sul1*), à la tétracycline de classe A (*tetA*) et au triméthoprime (*dfrA16*) (Sandaa and Enger, 1994; Sorum et al., 2003). Le plasmide pRAS2 a une taille de 48 kb et possède un transposon Tn5393. Il montre également des gènes codant pour la résistance à la tétracycline (*tetA(31)*), au sulfonamide (*sul2*) et à la streptomycine (*strA-strB*) (L'Abée-Lund and Sorum, 2000). pRAS3.1 et pRAS3.2 sont deux variants du plasmide pRAS3. Ils possèdent un gène codant pour la résistance à la tétracycline de classe C (*tetA(C)*) et ont une taille de 11,8 kb. La différence entre ces deux variants provient de deux séquences répétitives en nombre de copies différentes dans les deux plasmides (L'Abée-Lund and Sorum, 2002). Le plasmide pAr-32 a une taille de 44 kb et un intégron de classe 6. Il a des gènes codant pour la résistance au chloramphénicol (*catA2*), au sulfonamide (*sul1*) et à la streptomycine (*aadA2*) (Sorum et al., 2003). Les plasmides pASOT, pASOT2 et pASOT3 ont respectivement des tailles de 47 kb, 47 kb et de 39 kb. pASOT a le transposon Tn1721 ainsi qu'un intégron possédant la cassette *aadA2* ou *dfrIIc*. pASOT2 et pASOT3 ont un intégron possédant une cassette *aadA2* (L'Abée-Lund and Sorum, 2001; Adams et al., 1998; Rhodes et al., 2000).

Il a été trouvé chez des souches d'*Assal* du Canada la présence d'un plasmide dont la caractérisation est incomplète, mais ressemblant grandement au plasmide pSN254 possédant plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques tels que le gène *floR* conférant une résistance au chloramphénicol/florfénicol ainsi que des gènes de résistance au mercure (McIntosh et al., 2008). Le plasmide pSN254 a été identifié chez *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica* serovar Newport souche SL254 (Welch et al., 2007). Cette observation suggérait que les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent se transférer horizontalement entre *A. salmonicida* et d'autres genres bactériens (McIntosh et al., 2008). Un résumé des plasmides connus ayant des résistances à des antibiotiques trouvés chez *Assal* est présenté ci-dessous (Tableau 2). Aussi, il peut y avoir des résistances aux antibiotiques encodées sur le chromosome et causées par des mutations, toutefois, ces mutations confèrent des résistances à des antibiotiques qui ne sont pas homologués pour la pisciculture au Québec et ne seront donc pas présentées ici.

Tableau 2. Résumé des plasmides connus ayant des résistances à certains antibiotiques trouvés chez *Assal*. Les résistances aux antibiotiques soulignées indiquent celles pour des antibiotiques homologués en aquaculture au Québec.

Plasmide	Taille (kb)	Résistances aux antibiotiques ^a	Numéro d'accèsion
pAsa4	167	<u>CHL</u> , <u>SUL</u> , <u>TET</u> , <u>SPT</u> , <u>STR</u>	NC_009349
pRAS2	48	<u>TET</u> , <u>SUL</u> , <u>STR</u>	NG_035367.1
pRAS1	45	<u>SUL</u> , <u>TET</u> , <u>TMP</u>	AJ250203.1
pAr-32	44	<u>SUL</u> , <u>CHL</u> , <u>SPT</u> , <u>STR</u>	AJ517790
pASOT1	47	<u>TET</u> , <u>TMP</u> , <u>SPT</u> , <u>STR</u>	-
pASOT2	47	<u>TET</u> , <u>SPT</u> , <u>STR</u>	-
pASOT3	39	<u>TET</u> , <u>SPT</u> , <u>STR</u>	-
pRAS3.1	11.8	<u>TET</u>	NC_003123
pRAS3.2	11.8	<u>TET</u>	NC_003124

a. CHL: chloramphénicol, SUL: sulfonamide, TET: tétracycline, SPT: spectinomycine, STR: streptomycine, TMP: triméthoprim

1.7 Méthode d'identification des résistances aux antibiotiques utilisés à l'Hôpital vétérinaire de Saint-Hyacinthe

Une méthode de diagnostic des résistances aux antibiotiques existe chez *A. salmonicida*. Par contre, cette méthode nécessite beaucoup de temps avant l'obtention du résultat soit de 7 à 10 jours (Andrée Lafaille, comm. pers.). Il faut d'abord isoler l'agent pathogène sur un milieu sélectif qui exige un minimum de 3 jours d'incubation et faire le test d'antibiogrammes à l'aide de disques d'antibiotiques nécessitant un autre 3 jours avant d'obtenir le résultat. Les poissons atteints de furunculose sont susceptibles de mourir avant le diagnostic. Une méthode d'identification plus rapide accélérerait le processus et permettrait promptement d'utiliser l'antibiotique adéquat pour lequel la souche serait sensible.

1.8 PCR multiplex : une méthode de détection rapide?

La Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR) multiplex permet de détecter plusieurs cibles dans une même réaction PCR contrairement à une PCR uniplex standard où une seule cible est détectée. Cela est possible par l'utilisation simultanée de plusieurs paires d'amorces

ayant chacune une cible différente dans une même PCR (Markoulatos et al., 2002). Peu d'équipements sont nécessaires et cette méthode a donc l'avantage d'être peu coûteuse en plus de nécessiter peu de temps.

La figure 10 décrit le fonctionnement d'une PCR multiplex qui ciblerait la détection de résistances aux antibiotiques chez *Assal*. Une souche bactérienne contient deux plasmides (en orange) en plus de son chromosome (en gris). Différentes amorces lors de la PCR permettraient de cibler différents éléments génétiques de la bactérie. Une paire d'amorces contrôle cible une région spécifique à *Assal* sur le chromosome (région bleue sur la figure) et trois paires d'amorces ciblent trois gènes de résistances aux antibiotiques sur des plasmides (région en rouge, vert et violet sur la figure). Les bactéries sont lysées et mises dans une réaction PCR contenant les quatre paires d'amorces. Un programme utilisant des cycles de températures préétablis permet de faire la réaction de ces composantes dans la PCR. Les produits PCR sont ensuite migrés sur un gel d'agarose pour vérifier la présence des gènes de résistance aux antibiotiques si des amplicons de tailles attendues ont été générés via les paires d'amorces qui leur sont spécifiques. Une souche qui serait sensible à tous les antibiotiques d'intérêt ne présenterait aucun amplicon sauf pour la paire d'amorces contrôle qui aura amplifiée la cible chromosomique.

Deux articles appuient l'utilisation de la PCR multiplex pour le diagnostic de gènes de résistance aux antibiotiques chez des espèces d'*Aeromonas* originant de l'Asie (Han et al., 2012; Kim et al., 2011). Aussi, des essais ont été réalisés pour détecter les espèces d'*Aeromonas* dans une même réaction PCR (Mendes-Marques et al., 2013; Sen, 2005) et pour détecter des gènes d'entérotoxines chez *Assal* (Bin Kingombe et al., 2010). La PCR multiplex est moins coûteuse que la méthode de développement de puces à ADN qui a été essayée sur des bactéries à Gram positif (Perreten et al., 2005). La PCR multiplex est donc l'une des méthodes les plus avantageuses à utiliser dans ce contexte. Pour l'instant, aucune PCR multiplex n'est disponible pour détecter les gènes de résistance pour les antibiotiques homologués au Québec.

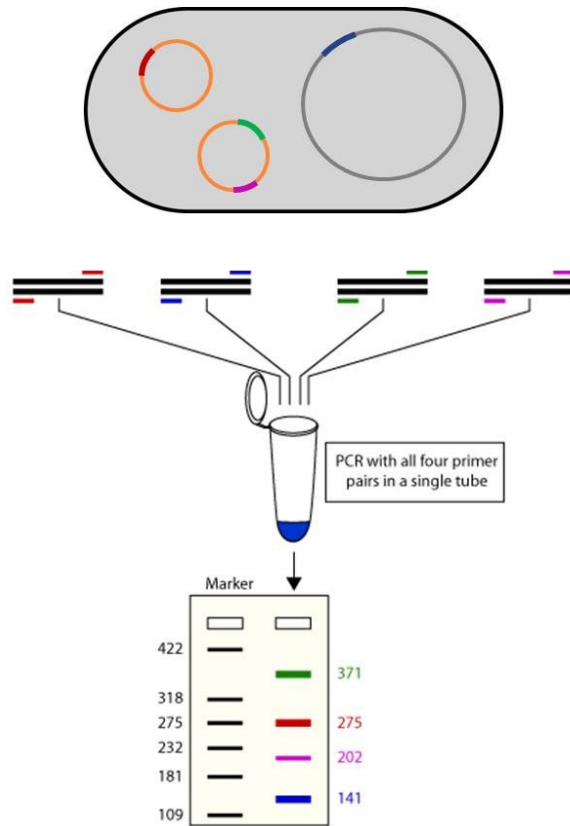


Figure 10. Schématisation de la PCR multiplex. La partie du haut de l'image représente une bactérie (en gris) avec son contenu génomique (chromosome sous la forme d'un cercle gris et les plasmides sous la forme de cercles oranges). Quatre paires d'amorces ciblant différentes régions d'un génome bactérien et de plasmides sont mises dans une réaction PCR avec le lysat de la bactérie à analyser. Suite à la PCR, les produits d'amplification sont migrés sur un gel d'agarose. L'apparition d'amplicons à des tailles attendues indique la présence des régions ciblées par les paires d'amorces. La figure est adaptée de celle tirée du site de la compagnie PREMIER Biosoft

(http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/multiplex-pcr.html).

CHAPITRE 2- HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Hypothèse de travail

Grâce à l'analyse de séquences génomiques de souches d'*Assal*, il sera possible de détecter la présence de résistances aux antibiotiques de diverses souches par la méthode de PCR multiplex.

Objectifs spécifiques

1. Caractériser les séquences génomiques de souches d'*Assal* séquencées afin d'identifier les gènes de résistance aux antibiotiques.
2. Mettre au point un protocole de PCR multiplex pour détecter les gènes de résistance aux antibiotiques homologués en aquaculture au Québec par optimisation des composantes de la réaction.

CHAPITRE 3- MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Souches bactériennes et conditions de croissance

Une collection de 178 souches d'*Aeromonas* a été utilisée dans cette étude. Les 167 souches d'*Assal* de cette collection sont présentées dans le tableau 8 en annexe. Les onze autres souches d'*A. salmonicida* appartenaient à d'autres sous-espèces et ont servi uniquement pour la mise au point de la paire d'amorces ciblant spécifiquement *Assal* (voir le tableau 9 en annexe). Les souches bactériennes d'*Assal*, *A. salmonicida* sous-espèce *pectinolytica* et *Aeromonas veronii* utilisées ont été cultivées sur le milieu furonculose agar (10 g/L de bactotryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 2.5 g/L de NaCl, 1 g/L de L-tyrosine, 15 g/L d'agar) à 18 °C durant 72 heures. Les souches d'*A. salmonicida* sous-espèce *achromogenes* et *A. salmonicida* sous-espèce *smithia* ont été cultivées sur le milieu *Tryptic soy agar* (TSA) (40 g/L) à 18 °C durant 72 heures.

3.2 Tests d'antibiogrammes

Une colonie des souches d'*Assal* à tester a été mélangée à 2 mL de milieu furonculose liquide (10 g/L de bactotryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 2.5 g/L de NaCl, 1 g/L de L-tyrosine). Cette culture a été agitée à 200 RPM toute la nuit à 18 °C. La densité optique (DO) des cultures a été ensuite ajustée à 0,9. La culture a été étalée sur deux boîtes de Petri contenant du milieu Mueller Hinton agar (38 g/L) à l'aide d'un coton-tige par striation simple. Trois striations en pivotant la boîte de pétri ont été nécessaires pour avoir un tapis bactérien adéquat. Les milieux ont été séchés avant de déposer les disques d'antibiogrammes. Les disques d'antibiogrammes ont été répartis sur les deux boîtes de Petri à l'aide d'un distributeur de disques (Becton Dickinson, Mississauga, ON). Onze disques d'antibiogrammes ont été testés (Tableau 3). Les milieux ont été incubés à 18 °C pendant 48 heures. Après cette incubation, les milieux ont été observés pour évaluer la sensibilité aux antibiotiques et ont été numérisés.

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée en comparant le résultat obtenu avec celui des souches utilisées à titre de contrôles (01-B526 sensible à tous les antibiotiques et M15879-11 qui a des résistances à la streptomycine (STR), au sulfaméthoxazole-triméthoprimine (SXT), à l'ampicilline (AMP), à la tétracycline (TET), au chloramphénicol (CHL) et au florfénicol (FFC) et par mesure de la taille de la zone d'inhibition de croissance. Les souches analysées se sont révélées soit résistantes, limites, intermédiaires ou sensibles aux antibiotiques. Les essais ont été faits en duplicata pour s'assurer de la reproductivité des résultats. Une souche résistante à un antibiotique présentait la présence du tapis bactérien jusqu'au disque tandis qu'une souche limite a montré une petite inhibition de sa croissance (environ 1 mm de rayon). Une souche intermédiaire a montré une plus grande inhibition de la croissance (entre 1 et 5 mm environ de rayon de zone d'inhibition), mais n'a pas été considérée sensible. Les essais ont été faits en duplicata pour s'assurer de la reproductivité des résultats (Daher, 2010).

Tableau 3. Disques d'antibiotiques utilisés dans l'étude

Disques d'antibiotiques	
Acide nalidixique 3 µg (NAL)	Érythromycine 15 µg (ERY)
Sulfaméthoxazole-triméthoprimine 23,74 µg; 1,25 µg (SXT)	Gentamycine 10 µg (GEN)
Streptomycine 10 µg (STR)	Triméthoprimine 5 µg (TMP)
Ampicilline 10 µg (AMP)	Chloramphénicol 30 µg (CHL)
Tétracycline 5 et 30 µg (TET)	

3.3 Préparation de lysats bactériens

Dans le but de tester l'ADN génomique de diverses souches disponibles au laboratoire par génotypage PCR, des lysats bactériens ont été conçus avec du tampon *Single Worn Lysis* (SWL) filtré et le tapis bactérien de souches à analyser (50 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 0.45 % NP-40, and 0.45 % Tween 20) (Charette and Cosson, 2004). Les lysats ont été chauffés à 95 °C pendant 15 minutes. La concentration des lysats a été ajustée à 100 ng/µL.

3.4 Caractérisation de séquences génomiques de souches d'*Assal*

Ce travail d'analyse a été fait en collaboration avec Antony Vincent et Jean-Guillaume Emond-Rheault, deux autres membres du laboratoire. Plusieurs souches du laboratoire ont été séquencées par Pyroséquençage 454 (Roche, Branford, USA) ou par Illumina (Illumina, San Diego, USA) puisqu'elles avaient des caractéristiques qui les distinguaient des autres souches. Huit souches ayant des résistances à des antibiotiques ont été séquencées au total; 4 souches ont été séquencées par Pyroséquençage 454 et les séquences génomiques de 4 autres souches ont été obtenues par la méthode Illumina (Tableau 4). L'extraction d'ADN des souches à séquencer s'est effectuée à l'aide de la trousse *DNeasy Blood and Tissue Kit* de la compagnie Qiagen (Qiagen, Toronto, ON). Les séquences des plasmides connus dans la littérature tels que le plasmide pAsa4, pRAS3, pSN254 et pAr-32 ont permis de faire l'analyse de ces souches. L'identification de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques potentiellement inconnus chez *Assal* a été possible suite à la caractérisation des séquences.

Puisqu'il n'y a que quatre antibiotiques homologués en pisciculture au Québec, les gènes de résistances ciblés se limitaient seulement aux trois familles d'antibiotiques concernées soit la famille du chloramphénicol/florfénicol, des tétracyclines et des sulfonamides et triméthoprimes (Morin et al., 2004). Les gènes trouvés ont été identifiés par homologie en utilisant le programme Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) sur le site internet de *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) et par l'analyse de l'annotation des génomes de souches d'*Assal* séquencées. Les paramètres utilisés sur NCBI avaient un seuil prévu de 10 et une taille de mot de 28.

Tableau 4. Souches séquencées présentant des résistances aux antibiotiques^a. Les résistances aux antibiotiques soulignées indiquent celles pour des antibiotiques homologués en aquaculture au Québec.

Souches séquencées	Résistances aux antibiotiques
JF2267 (Suisse)	<u>CHL</u> , STR
01-B522 (Québec)	<u>TET</u> , <u>TMP</u> , <u>SXT</u>
2004-05 MF26 (N.-B.)	<u>TET</u> , <u>CHL</u> , <u>SXT</u> , STR, NAL, AMP, ERY, GEN,
2009-144 K3 (N.-B.)	<u>TET</u> , <u>CHL</u> , STR
M15879-11 (Québec)	<u>TET</u> , <u>CHL</u> , <u>SXT</u> , STR
M13566-12 (Québec)	<u>TET</u> , <u>CHL</u> , <u>SXT</u> , AMP, STR
M16474-11 (Québec)	<u>TET</u> , <u>CHL</u> , <u>STR</u> , AMP, ERY
JF3791 (Suisse)	<u>CHL</u> , STR

a. N.-B.: Nouveau-Brunswick, CHL: chloramphénicol, SXT: sulfaméthoxazole-triméthoprimine, TMP: triméthoprimine, TET: tétracycline, STR: streptomycine, AMP: ampiciline, NAL: acide nalidixique, ERY: érythromycine, GEN: gentamycine

3.5 PCR uniplex pour l'identification des plasmides pAB5S9b et pSN254b

Des paires d'amorces ont été créées par Antony Vincent. Deux paires d'amorces ciblaient spécifiquement pAB5S9 et pAB5S9b et une autre paire ciblait pAB5S9b seulement. De plus, deux autres paires d'amorces ont été créées et qui visaient spécifiquement pSN254 et pSN254b et une autre paire ciblait pSN254b uniquement (Tableau 10 en annexe).

Les constituants et concentrations finales dans le mélange réactionnel pour détecter les plasmides étaient 1X de tampon Go-Taq (Promega, Madison, USA), 2 mM de désoxyribonucléotide tri-phosphate (dNTP), 100 ng de chacune des amorces anti sens et sens, 1 U de Taq polymérase GoTaq (Promega) et 100 ng de lysats de la souche bactérienne à analyser. Le programme de la PCR utilisé est : 2 min 30 s à 95 °C, 30 cycles de (30 s à 95 °C, 30 s à 60 °C et 3 min à 68 °C) avec une élongation finale de 5 minutes à 68 °C. Les essais PCR ont été effectués en duplicata. Des contrôles positifs et négatifs ont été ajoutés à chaque essai PCR. Les souches 2009-144K3 qui possèdent le plasmide pAB5S9b et

M15879-11 pour le plasmide pSN254b servaient de contrôle positif et la souche 01-B526 à titre de contrôle négatif.

3.6 Alignement multiple des séquences des gènes analysés pour la création d'amorces

À partir des gènes identifiés chez *A. salmonicida* dans la littérature et par la caractérisation de séquences génomiques décrite à la section 3.4, les séquences conservées ont été trouvées en faisant des alignements multiples à l'aide du logiciel Geneious 6.1.8 (<http://www.geneious.com>, (Kearse, 2012) qui possède l'outil Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE). Le nombre maximal d'itérations sélectionné pour ces alignements était de 39. Cet outil alignait les séquences d'ADN données des gènes identifiés dans la littérature chez *A. salmonicida*. Cette méthode a permis d'identifier le nombre de cibles à utiliser dans les PCR multiplex. Ensuite, un alignement multiple a été fait avec tous les gènes similaires à la séquence donnée qui se trouvent dans la base de données BLAST sur le site internet de NCBI. Les séquences conservées ont été utilisées pour la création des amorces utilisées en PCR multiplex.

3.7 Amorces pour la PCR multiplex sur les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol créées avec MPprimer

Un logiciel bio-informatique du nom de MPprimer permettant la création d'amorces pour la PCR multiplex a été publié dans la littérature (Shen et al., 2010). Ce logiciel génère en principe des paires d'amorces ne causant pas d'interaction entre elles. Des paramètres ont été ajustés pour avoir des paires ayant des caractéristiques similaires. La spécificité des amorces pouvait être testée par MPprimer pour les espèces modèles seulement. Comme *Assal* n'est pas un microorganisme modèle, cet outil n'a pas été utilisé. Les séquences conservées des gènes ont été identifiées en faisant un alignement multiple MUSCLE sur Geneious comme mentionné ci-dessus. Les écarts entre les tailles des produits obtenus ont été déterminés pour chaque séquence conservée inscrite. Les paramètres utilisés étaient un écart de taille de produit entre 140 et 175 pb pour la séquence du contrôle ciblant le prophage 1, entre 240 et 320 pb pour la séquence du gène *catA2*, entre 400 et 430 pb pour

la séquence du gène *cat* et entre 520 et 560 pb pour la séquence du gène *floR*. Les paramètres utilisés pour la création d'amorces étaient un T_m entre 57 et 63 °C avec une température optimale de 60 °C, une longueur d'amorce entre 18 et 27 pb avec un optimum de 22 pb et une teneur en GC entre 40 et 60 % avec un optimum de 50 %. Ces paramètres utilisés pour la création d'amorces avaient des écarts larges entre le minimum et le maximum dans le but d'avoir plus de résultats générés. Après l'obtention des paires d'amorces générées, à l'aide de l'outil PriDimerCheck, le delta G des amorces a été déterminé entre elles. Des amorces ciblant les gènes de résistance au chloramphénicol seulement ont été créées.

3.7.1 Validation par PCR uniplex des diverses amorces créées avec MPprimer et ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol

Suite à la création d'amorces avec le logiciel bio-informatique MPprimer, les amorces ont été testées en PCR uniplex, c'est-à-dire que l'amorce sens et anti-sens ciblant un gène spécifique ont été testées ensemble seulement. La PCR multiplex, en ajoutant toutes les amorces ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol, a été testée lorsque la PCR uniplex avait été optimisée. La PCR uniplex a été réalisée en utilisant une souche utilisée à titre de contrôle positif pour la paire d'amorces créée et ciblant un gène spécifique.

Pour la PCR uniplex ciblant des gènes codant pour la résistance aux chloramphénicol/florfénicol, les souches A449 et M15879-11 ont été utilisées comme contrôle positif pour optimiser cette PCR. La souche A449 qui a le plasmide pAsa4 contient le gène *cat* et M15879-11 possède le plasmide pSN254b qui a le gène *floR* (voir la section Résultats). La souche 01-B526 qui est sensible à tous les antibiotiques et l'eau ne contenant aucun acide désoxyribonucléique (ADN) d'*Assal* ont été utilisées comme contrôle négatif de cette PCR. Aussi, comme A449 n'a pas le gène *floR* et *catA2*, elle a été utilisée comme contrôle négatif pour les amorces ciblant ces gènes. Ceci est de même pour M15879-11 ne possédant pas les gènes *cat* et *catA2*. Comme aucune souche du Québec ne possède le gène *catA2* et qu'il y a seulement une souche asiatique (Ar-32) qui le possède

(Sorum et al., 2003), aucune souche utilisée à titre de contrôle positif pour cette paire d'amorces n'a été utilisée.

Les composantes du mélange réactionnel comprenaient 1X de tampon Go-Taq (Promega), 2 mM de dNTP, 100 ng/μL de chacune des amorces anti-sens et sens, 1 U de Taq polymérase GoTaq (5 U, Promega), 100 ng de lysats de la souche bactérienne à analyser à 100 ng/μL et un volume d'eau pour obtenir un volume final de 20 μL. Étant donné que les amplicons avaient une taille inférieure à 1 kb, le temps d'élongation a été ajusté à 1 min puisqu'un amplicon de 1 kb nécessitait 1 min d'élongation selon Promega. Le programme PCR contenait un gradient de température d'hybridation de 55 à 60 °C pour identifier la bonne température d'hybridation à utiliser. Pour s'y faire, trois PCR uniplex avec les souches contrôles ont été faites avec les amorces à tester; la première à une température d'hybridation de 55 °C, la deuxième à 57,7 °C et la dernière à 59,9 °C. Le programme PCR utilisé était : 2 min. 30 s à 95 °C, 30 cycles de 30 s à 95 °C, 30 s à 60 °C, et 1 min à 68 °C, suivi d'une élongation finale de 5 min à 68 °C. Compte tenu de la PCR uniplex obtenue, un gradient de température de 60 à 66 °C et une concentration d'amorces à 0,4 μM ont été modifiés.

3.7.2 Essai d'une PCR multiplex avec des concentrations d'amorces équimolaires

(MPprimer)

Le premier essai de la PCR multiplex a été fait avec des concentrations d'amorces équimolaires et à une température d'hybridation de 60 °C. Les conditions cycliques de cette PCR étaient les mêmes que celles utilisées pour la PCR uniplex de la section 3.7.1. Le mélange réactionnel et la concentration d'amorces ajustée à 0,4 μM étaient aussi les mêmes qu'utilisés à la section 3.7.1. Le volume d'eau était inférieur à celui utilisé lors de la PCR uniplex à cause de la présence de 8 amorces dans la PCR multiplex.

3.7.3 Optimisation de la PCR multiplex (MPprimer)

Suite au résultat obtenu à la PCR multiplex avec des concentrations d'amorces équimolaires, une optimisation de la PCR était nécessaire. Un gradient de la température

d'hybridation de 60 à 66 °C et une étape d'élongation de 2 minutes au lieu de 1 minute ont été sélectionnés. Aussi, l'étape d'élongation finale a été augmentée de 5 à 10 minutes afin d'augmenter le rendement des produits de plus grande taille dans la PCR.

3.7.4 Confirmation de l'interaction entre les amorces créées avec MPprimer

Suite à la PCR multiplex qui a tenté d'être optimisée, des PCR duplex, triplex et quadruplex ont été effectuées pour détecter s'il y avait de l'interaction entre les amorces en utilisant les contrôles positifs et négatifs. Une PCR duplex signifie la présence de deux paires d'amorces dans la réaction PCR, une PCR triplex contient trois paires d'amorces et une PCR quadruplex inclut quatre paires d'amorces. Le mélange réactionnel était le même qu'utilisé dans la PCR multiplex sauf le volume d'eau qui était différent selon le nombre d'amorces présentes dans la réaction. Le programme de température PCR était le même que celui utilisé dans la PCR à la section 3.7.1.

3.8. Création d'amorces pour les PCR multiplex sur les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol, aux sulfonamides et aux tétracyclines créées avec Primer3

Dans un second temps, la création d'amorces a été conçue à l'aide de l'outil Primer3 du logiciel Geneious. Les paramètres utilisés étaient un T_m entre 58 et 60 °C avec une température optimale de 59 °C, une longueur d'amorce entre 20 et 24 pb avec un optimum de 22 pb et une teneur en GC entre 45 et 60 % avec un optimum de 50 %. Un écart de taille minimum de 100 pb entre les amplicons était pris en compte pour la création d'amorces. De plus, pour assurer une amplification sans ambiguïté, un maximum de 4 cibles incluant le contrôle positif ont été ajoutées dans chacune des PCR multiplex. Les paramètres ont été ajustés pour empêcher qu'il y ait de l'interaction entre les amorces. Les amorces ont été analysées avec l'outil *OligoAnalyzer 3.1* présent sur le site internet de Integrated DNA Technologies (IDT, Kanata, ON) (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Cet outil a permis de savoir la valeur prédite du delta G (ΔG) pour les potentiels homodimères et hétérodimères qu'il pouvait y avoir entre les amorces. La valeur acceptable suggérée sur

IDT doit être supérieure à -9.0 kcal/mole (IDT, 2014). En respectant cette valeur entre toutes les amorces, la formation de dimères devait être minimale lors des PCR multiplex.

3.8.1 Validation par PCR uniplex des diverses amorces créées avec Primer3 et ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol, aux sulfonamides et aux tétracyclines

Lorsque les amorces ont été conçues, elles ont été testées en PCR uniplex. La PCR multiplex a été testée dans un deuxième temps. La concentration des amorces devait être inférieure à 0,5 μ M puisque la formation de dimères est possible à une concentration supérieure (Markoulatos et al., 2002). Ces amorces ont été testées avec un contrôle positif et un contrôle négatif. Les souches utilisées en ce sens ont été déterminées suite à la caractérisation des séquences génomiques des souches identifiées à la section 3.4.

Pour la PCR uniplex ciblant des gènes codant pour la résistance aux chloramphénicol/florfénicol, les souches utilisées à titre de contrôles positifs et négatifs étaient les mêmes que celles utilisées à la section 3.7.1.

Pour la PCR uniplex ciblant des gènes codant pour la résistance au sulfonamide, la souche M15879-11 a été utilisée comme contrôle positif vu qu'elle possède le plasmide pSN254b qui a les gènes *sul1* et *sul2* (voir la section Résultats). La souche 01-B526 qui ne possède pas de gène de résistance au sulfonamide a été utilisée comme contrôle négatif ainsi que l'eau filtrée millipore. Ces souches ont permis de faire la mise au point de l'essai.

Pour la première PCR uniplex ciblant des gènes codant pour la résistance à la tétracycline, la souche M15879-11 a été utilisée comme contrôle positif pour la paire d'amorces ciblant le gène *tetA* étant donné qu'elle possède le plasmide pSN254b qui a le gène *tetA* (voir la section Résultats) et A449 a aussi été utilisé comme contrôle positif pour la paire d'amorces ciblant le gène *tetA(E)* qui est présent sur le plasmide pAsa4. La souche 01-B526 qui ne possède pas de gène de résistance à la tétracycline a été utilisée comme contrôle négatif ainsi que l'eau sans ADN. Pour la deuxième PCR uniplex ciblant des gènes codant pour la

résistance à la tétracycline, la souche 2009-144 K3 qui possède le gène *tetA(C)* présent sur le plasmide pRAS3 et le gène *tetH* présent sur le plasmide pAB5S9b a été employée comme contrôle positif pour les paires d'amorces ciblant ces gènes (voir la section Résultats). La souche M16474-11 a été utilisée comme contrôle positif pour la paire d'amorces ciblant le gène *tetG* (voir la section Résultats). La souche 01-B526 et l'eau filtrée millipore ont été utilisées comme contrôle négatif pour les paires d'amorces ciblant ces gènes de résistance à la tétracycline.

En somme, les souches séquencées et caractérisées (Tableau 4) ont été utilisées pour la création d'amorces qui a permis la détection des gènes de résistance aux antibiotiques. Le mélange réactionnel pour les PCR uniplex contenait 1X de tampon Go-Taq (Promega), 2 mM de dNTP, 0,2 μ M de chacune des amorces anti-sens et sens, 1 U de Taq polymérase GoTaq (5 U, Promega) et 100 ng de lysats de la souche bactérienne à analyser à 100 ng/ μ L et un volume d'eau pour obtenir un volume de 20 μ L. Le programme PCR contenait un gradient de température d'hybridation de 55 à 60 °C pour identifier la bonne température d'hybridation à utiliser comme à la section 3.9.1. Le programme PCR utilisé était : 2 min 30 s à 95 °C, 30 cycles de 30 s à 95 °C, 30 s à 60 °C, et 1 min 30 s à 68 °C, suivi d'une élongation finale de 5 min à 68 °C. Selon les résultats obtenus, des modifications ont été apportées aux conditions cycliques.

3.8.2 Essai d'une PCR multiplex avec des amorces équimolaires (Primer3)

Pour le premier essai d'une PCR multiplex, il était préférable d'utiliser la même concentration pour toutes les amorces et par la suite, modifier celle-ci ainsi que les autres paramètres selon l'amplification des produits PCR obtenus (Henegariu et al., 1997). Les concentrations des composantes de la PCR étaient les mêmes que celles utilisés dans la PCR uniplex. L'eau filtrée avait un volume plus faible à cause de la présence des 6 ou 8 amorces au lieu de deux dans une PCR uniplex. Le programme PCR était le même que celui utilisé à la section 3.8.2 avec une température d'hybridation de 60 °C.

3.8.3 Optimisation de la PCR multiplex (Primer3)

Peu d'optimisation a été nécessaire pour ces PCR puisque la création d'une PCR multiplex ciblant les gènes impliqués dans le système de sécrétion de type trois a été utilisée comme banc d'essai pour optimiser en début de maîtrise les paramètres de la PCR multiplex et a permis de cibler les paramètres importants à contrôler (résultats non montrés). Parmi ceux-ci, l'utilisation de concentrations d'amorces inférieures à 0,5 μM , l'ajustement du temps d'élongation selon l'amplification obtenue et le delta G supérieur à -9,0 Kcal entre les diverses amorces constituaient des paramètres importants à prendre en compte pour avoir une PCR multiplex donnant des résultats clairs. Aussi, la PCR multiplex ciblant les gènes de résistance au chloramphénicol/florfénicol dont les amorces avaient été créées avec le logiciel MPprimer a permis aussi de reconnaître l'importance d'éviter la création d'amorces interagissant ensemble.

3.9 PCR uniplex sur les gènes de résistance au triméthoprim

Une paire d'amorces ciblant spécifiquement le gène *dfmA16* a été créée avec MPprimer et l'autre paire d'amorces ciblant spécifiquement le gène *dfrIIIc* a été créée avec Primer3 comme décrite à la section 3.7.1 et 3.8.1. Chacune des paires d'amorces a été analysée avec l'outil *OligoAnalyzer 3.1* présent sur le site internet IDT pour s'assurer que le ΔG était supérieur à -9,0 Kcal/mole.

Une PCR uniplex a été effectuée pour voir si, parmi les souches montrant une résistance au triméthoprim par test d'antibiogrammes, celles-ci possédaient un de ces gènes identifiés dans la littérature d'*A. salmonicida*. Les souches montrant une résistance (résistante, limite ou intermédiaire) soient 01-B522, M19878-11, M17930-12, SHY13-2188, SHY13-2630 ont été analysées par PCR uniplex avec les amorces créées (voir la section Résultats). Par contre, aucune souche utilisée comme contrôle positif n'était disponible pour ces deux gènes analysés. L'eau filtrée millipore a été utilisée comme contrôle négatif.

La paire d'amorces ciblant le prophage 1 a été créée avec Primer3 à la section 3.8.1 et a été utilisée pour la PCR ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol à la

section 3.8.2. Cette paire d'amorces a été utilisée comme contrôle positif. Le mélange réactionnel contenait 1X de tampon Go-Taq (Promega), 2 mM de dNTP, 0,2 μ M de chacune des amorces anti-sens et sens, 1 U de Taq polymérase GoTaq (5 U, Promega) et 100 ng de lysats de la souche bactérienne à analyser à 100 ng/ μ L et un volume d'eau pour obtenir un volume de 20 μ L. Le programme PCR utilisé était : 2 min 30 s à 95 °C, 30 cycles de 30 s à 95 °C, 30 s à 60 °C, et 1 min à 68 °C, suivi d'une élongation finale de 5 min à 68 °C. Les essais PCR ont été effectués en duplicata. Les contrôles positifs et négatifs ont été ajoutés à chaque essai PCR.

3.10 Électrophorèse sur gel d'agarose

Pour les PCR sur les plasmides pAB5S9b et pSN254b, les amplicons ont été migrés sur un gel d'agarose à 0,7 % avec du TBE 1X et avec une concentration de bromure d'éthidium à 0,5 μ g/mL. Une migration à 90 V pendant 45 minutes a été nécessaire pour séparer les échantillons. Les essais PCR sur les gènes de résistance aux antibiotiques ont pu être analysés en migrant les réactions PCR sur un gel d'agarose à 1,3 %. Ce pourcentage d'agarose a été utilisé pour faire migrer les amplicons de la PCR sur les gènes de résistance aux antibiotiques afin de standardiser la méthode selon les normes de l'Hôpital vétérinaire de Saint-Hyacinthe qui utilise ce pourcentage d'agarose. Comme cette trousse de PCR multiplex sera éventuellement conçue pour l'analyse des résistances aux antibiotiques chez *A. salmonicida* dans ce laboratoire, il était préférable de suivre les procédures qu'ils utilisent. Une migration à 90 V pendant 45 minutes pour les produits de la réaction sur les gènes de résistance au chloramphénicol et à la tétracycline a été effectuée et le gel a été visualisé sous les ultraviolets (UV). Pour la PCR multiplex ciblant les gènes de résistance au sulfonamides, comme deux amplicons générés avaient seulement une centaine de paires de bases qui les séparaient, il était donc nécessaire de migrer l'électrophorèse à 90 V pendant 50 minutes pour bien séparer les amplicons sur gel.

3.11 Comparaisons des résultats des tests d'antibiogrammes avec ceux des PCR multiplex

Les résultats obtenus pour les PCR multiplex ciblant des gènes de résistance au chloramphénicol/florfénicol, aux sulfonamides et aux tétracyclines ont été comparés aux résultats obtenus par les tests d'antibiogrammes. Cette comparaison a permis d'évaluer la robustesse des PCR multiplex créées. Ces PCR multiplex devaient être efficaces pour permettre leur utilisation dans une trousse de diagnostic. Des statistiques ont été faites avec le nombre de souches d'*Assal* possédant des résistances aux antibiotiques par rapport au nombre total de souches analysées.

3.12 Comparaison des souches ayant un plasmide identifié avec leur origine géographique

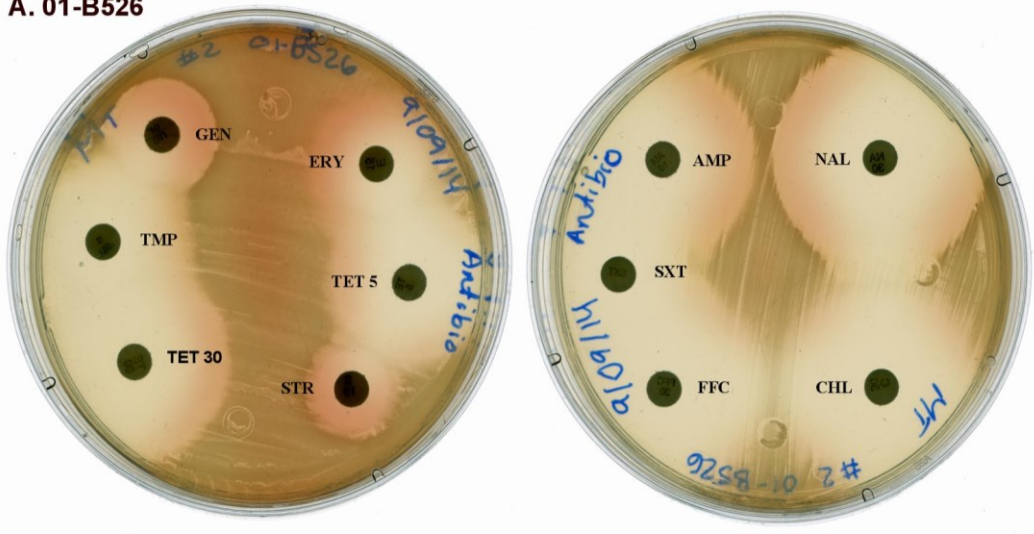
Suite à la caractérisation génomique des souches séquencées, l'analyse des données a été effectuée en comparant avec l'origine géographique des souches possédant des plasmides qui ont des gènes codant pour des résistances à des antibiotiques. Cette analyse avait pour but de vérifier l'existence de liens entre ces plasmides et leur provenance.

CHAPITRE 4- RÉSULTATS

4.1 Tests d'antibiogrammes

Les souches d'*Assal* de la collection Charette ont toutes été analysées pour déterminer leur résistance aux 10 antibiotiques étudiés (Tableau 8 en annexe). Un exemple de résultats d'une souche sensible à tous les antibiotiques (01-B526) et d'une souche résistante à plusieurs antibiotiques (M15879-11) est présenté à la figure 11. Plusieurs souches du laboratoire possédaient une résistance à au moins un antibiotique soit 67 souches sur 168. Sur ce nombre, 51 présentaient une résistance à un antibiotique homologué en pisciculture au Québec. Ainsi, un peu plus du tiers des souches avaient au moins une résistance à un antibiotique et les résistances les plus souvent rencontrées étaient à la tétracycline (43) et au chloramphénicol (38). Ce résultat n'est pas surprenant puisque les antibiotiques utilisés en pisciculture comprennent ces deux familles d'antibiotiques. La figure 12 montre le nombre de cas de résistances multiples obtenu pour les souches isolées par le service de diagnostic de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Saint-Hyacinthe. Le service de diagnostic a identifié seulement un cas de résistance multiple entre 2008 et 2013 (figure 9). Ce nombre indiquait qu'il y avait peu de résistance et montrait une baisse drastique de cas entre 2011 et 2012. Par contre, nos analyses démontrent plutôt cinq cas de résistance multiples en 2012 et quatre cas en 2013. Cette différence peut avoir été causée par le fait que l'interprétation des résultats a été faite après 24 heures d'incubation par le service de diagnostic de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Saint-Hyacinthe au lieu de 48 heures dans notre cas. Après 48 heures d'incubation, le tapis bactérien ainsi que les zones d'inhibition étaient clairement plus visibles ce qui facilite l'interprétation des tests.

A. 01-B526



B. M15879-11

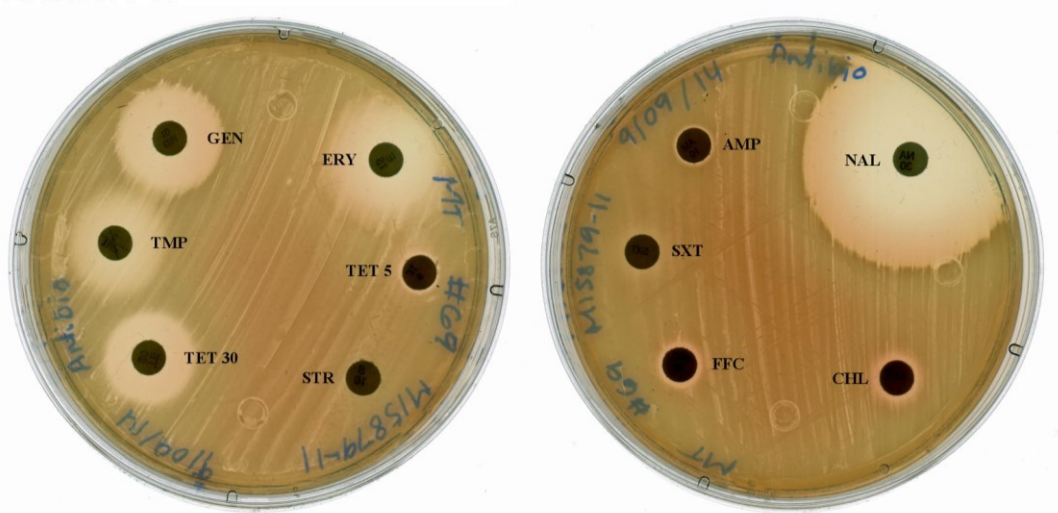


Figure 11. Exemple d'antibiogrammes pour *Assal*. **A.** Résultats d'une souche sensible à tous les antibiotiques (01-B526). Elle a été utilisée comme contrôle de sensibilité. **B.** Résultats d'une souche ayant plusieurs résistances. La souche M15879-11 étant résistante à six antibiotiques sur dix a aussi été utilisée comme contrôle positif lors des antibiogrammes réalisés dans cette étude. Le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque a été comparé à ceux de ces deux souches à chaque essai de test d'antibiogrammes. CHL: chloramphénicol, SXT: sulfaméthoxazole-triméthoprime, TMP: triméthoprime, TET: tétracycline, STR: streptomycine, AMP: ampiciline, NAL: acide nalidixique, ERY: érythromycine, GEN: gentamycine, FFC : florfénicol.

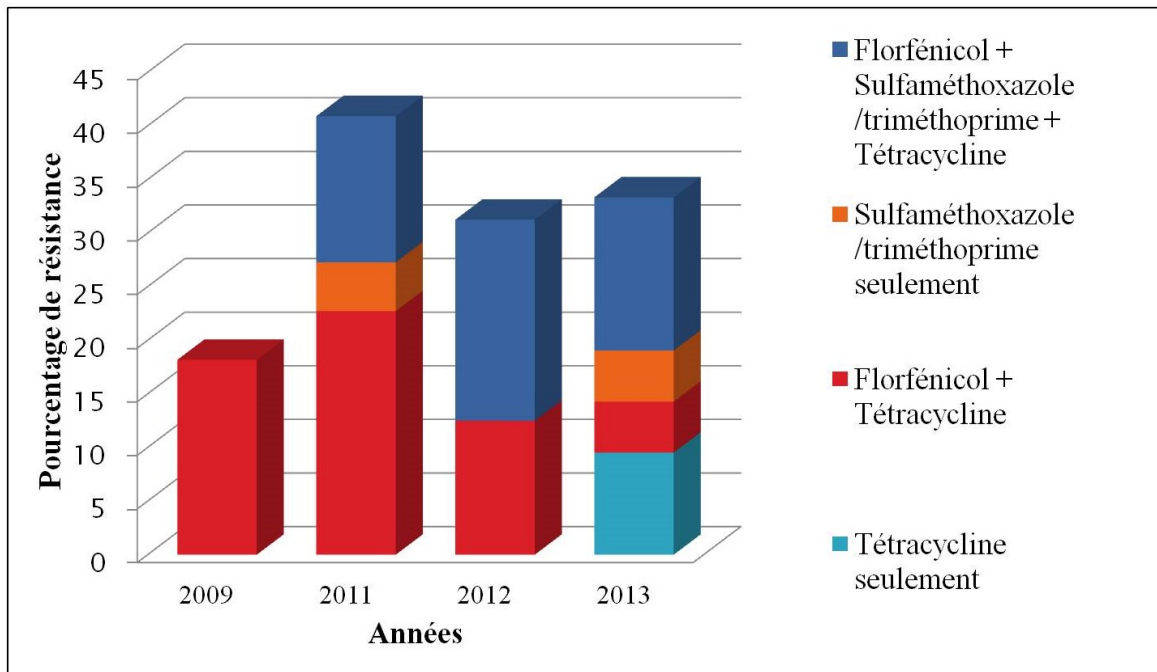


Figure 12. Analyse du nombre de cas de résistances multiples aux antibiotiques homologués et utilisés entre 2008-2009 et 2013. Les résultats que l'on a obtenus n'ont pas été les mêmes pour les souches québécoises que ceux obtenus par le service de diagnostic de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Saint-Hyacinthe pour les années 2012 et 2013.

4.2 Caractérisation de séquences génomiques de souches d'*Assal*

4.2.1 Caractérisation du plasmide de résistance aux antibiotiques pSN254b chez *A.*

salmonicida

Après une analyse BLASTn de la séquence des échafaudages génomiques, un contig présentant une forte identité avec le plasmide pSN254 trouvé initialement chez *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica* serovar Newport souche SL254 (Welch et al., 2007) a été observé chez la souche québécoise d'*Assal* M15879-11. En fait, le plasmide présent dans la souche M15879-11 est un variant du plasmide pSN254 et a été nommé pSN254b. Une autre souche qui a été séquencée possède aussi pSN254b soit la souche 2004-05 MF26 provenant du Nouveau-Brunswick.

Plusieurs gènes de résistances aux antibiotiques sont portés par le plasmide pSN254 de *S. enterica* et ont été retrouvés aussi sur les plasmides pSN254b des souches M15879-11 et

2004-05 MF26. Parmi ces gènes, certains codent pour la résistance à des antibiotiques qui font partie des familles d'antibiotiques utilisées en pisciculture comme le gène *floR* codant pour la résistance au chloramphénicol et au florfénicol, le gène *tetA* codant pour la résistance aux tétracyclines, et deux gènes, *sul1* et *sul2*, codant pour la résistance aux sulfonamides (Figure 13). D'autres gènes de résistance aux antibiotiques étaient présents sur ce plasmide, mais les antibiotiques qui sont ciblés par l'action de ces gènes ne sont pas utilisés pour traiter la furonculose tels que les gènes *strA* et *strB* (résistance à la streptomycine), le gène *blaCMY* (résistance aux antibiotiques β -lactames) et *aadA* (résistance aux aminoglycosides). Des gènes de résistance au mercure (*merE-D-B-A-P-T-R*) et aux composantes d'ammonium quaternaire (*qacEdelta1* et *sugE2*) sont aussi présents sur le plasmide. Ce plasmide confère donc plusieurs résistances.

Sur la figure 13 (B et C), on peut voir trois régions encadrées soit : une de 11,6 kb, une de 6,4 kb et une de 6 kb environ qui n'étaient pas présentes sur le plasmide pSN254b, mais présentes sur le plasmide pSN254 trouvé chez *S. enterica*. On peut voir, sur cette figure, le transposon Tn21 qui est aussi présent sur le plasmide pAsa4 identifié dans la souche A449. Par contre, ce transposon n'est pas exactement le même que celui trouvé sur le plasmide pAsa4. La différence se situe par l'absence des gènes *cat*, *tniA*, *tniB*, *merC* et un gène codant pour une protéine hypothétique sur le plasmide pSN254b. De plus, ce transposon porte l'IS6100 et le gène *merB* qui sont absents sur le plasmide pAsa4 (Antony Vincent, comm. pers.).

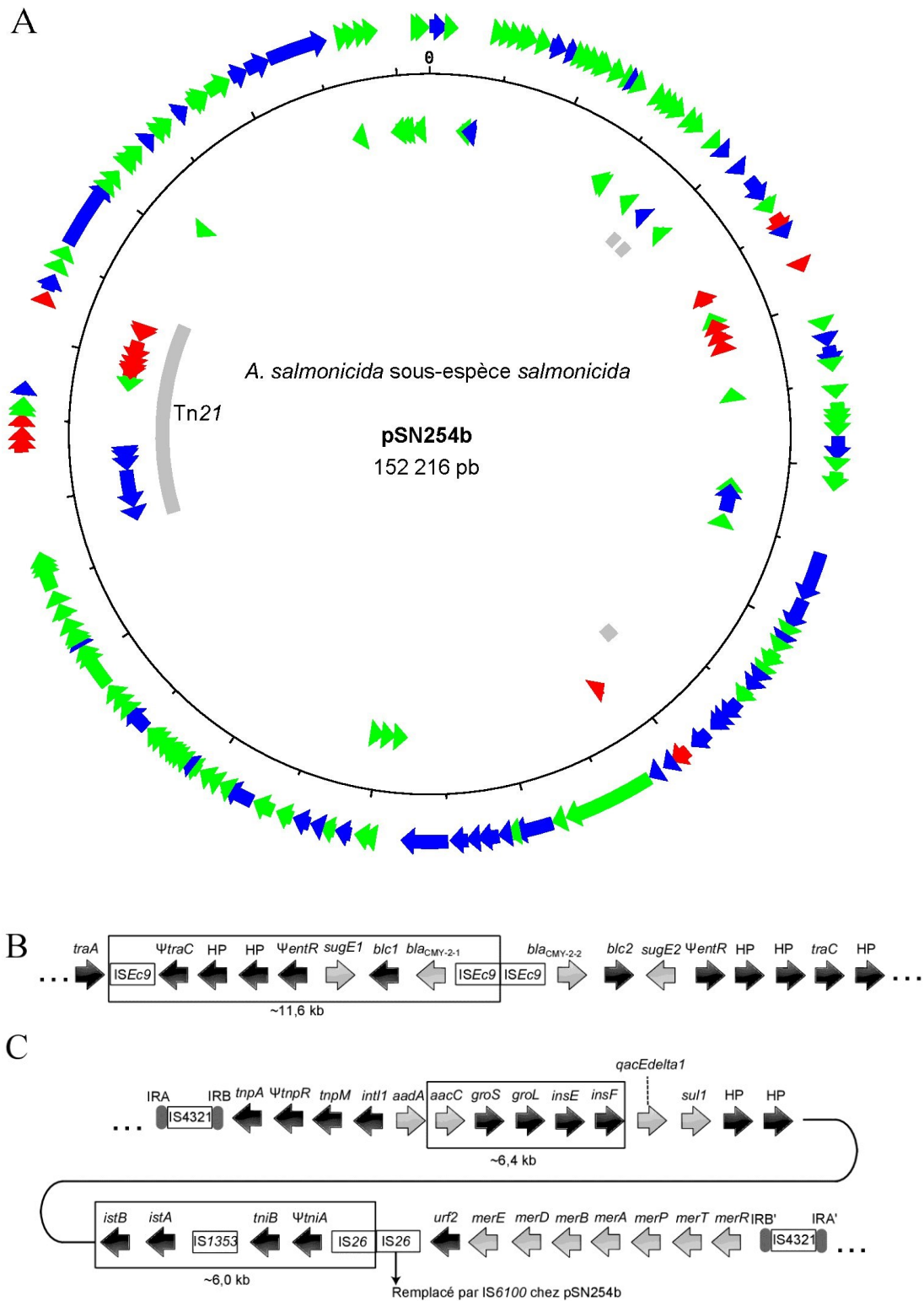


Figure 13. Structure de pSN254b trouvé chez *A. salmonicida* et les différences avec pSN254 chez *Salmonella enterica*. En A, la carte du plasmide pSN254b est illustrée. Une échelle de 500 pb est utilisée entre chaque tiret sur la carte du plasmide. Les flèches en

rouge représentent les gènes de résistance aux antibiotiques. Les flèches en bleu identifient les gènes codant pour d'autres fonctions et les flèches en vert indiquent les gènes codant pour des protéines hypothétiques. Le transposon Tn21 est identifié en gris. En B et en C, les différences observées entre le plasmide pSN254 trouvé chez *Salmonella enterica* et pSN254b identifié chez *A. salmonicida* ont été démontrées. Les flèches en gris indiquent les gènes codant pour la résistance à un antibiotique ou au mercure. Plus précisément, en B, la figure montre un transposon composite putatif ayant une délétion d'une région sur le plasmide trouvé chez *A. salmonicida*. La région absente a une taille d'environ 11,6 kb chez le plasmide trouvé initialement. En C, la figure montre le transposon Tn21 ayant subi une délétion de deux régions présentes sur le plasmide identifié chez *Salmonella enterica*. La substitution d'une séquence d'insertion sur le plasmide pSN254b a aussi été démontrée. Les régions perdues avaient une taille d'environ 6,4 kb et 6,0 kb. Puis, la substitution a été faite par le remplacement de la séquence d'insertion IS26 identifié sur le plasmide pSN254 de *S. enterica* avec la séquence d'insertion IS6100 sur le plasmide pSN254b. La figure a été adaptée de (Vincent et al., 2014).

4.2.2 Caractérisation du plasmide de résistance aux antibiotiques pAB5S9b chez *A.*

salmonicida

Après une analyse BLASTn de la séquence des *contigs* de la souche 2009-144K3 provenant du Nouveau-Brunswick, un plasmide similaire à pAB5S9 trouvé initialement chez *Aeromonas bestiarum* (Gordon, 2008) a été identifié. Ce nouveau plasmide a été nommé pAB5S9b. Les séquences d'ADN entre les plasmides trouvés chez *Aeromonas bestiarum* et celui chez *Assal* étaient très similaires. Par contre, il y a eu la transposition de deux éléments soit la partie A et la partie B identifiées sur la figure 14 qui les différenciait. Aussi, la classe de gène de résistance à la tétracycline était différente de pAB5S9 soit un gène de résistance *tetH* au lieu de *tetY* chez pAB5S9. De plus, le plasmide pAB5S9b possédait d'autres gènes de résistance aux antibiotiques homologués dont le gène de résistance au chloramphénicol et florfenicol *floR* et le gène de résistance aux sulfonamides *sul2*. Deux gènes de résistance à la streptomycine *strA* et *strB* étaient aussi présents sur ce plasmide. Le plasmide trouvé chez *Assal* avait une taille sensiblement similaire à celui trouvé chez pAB5S9.

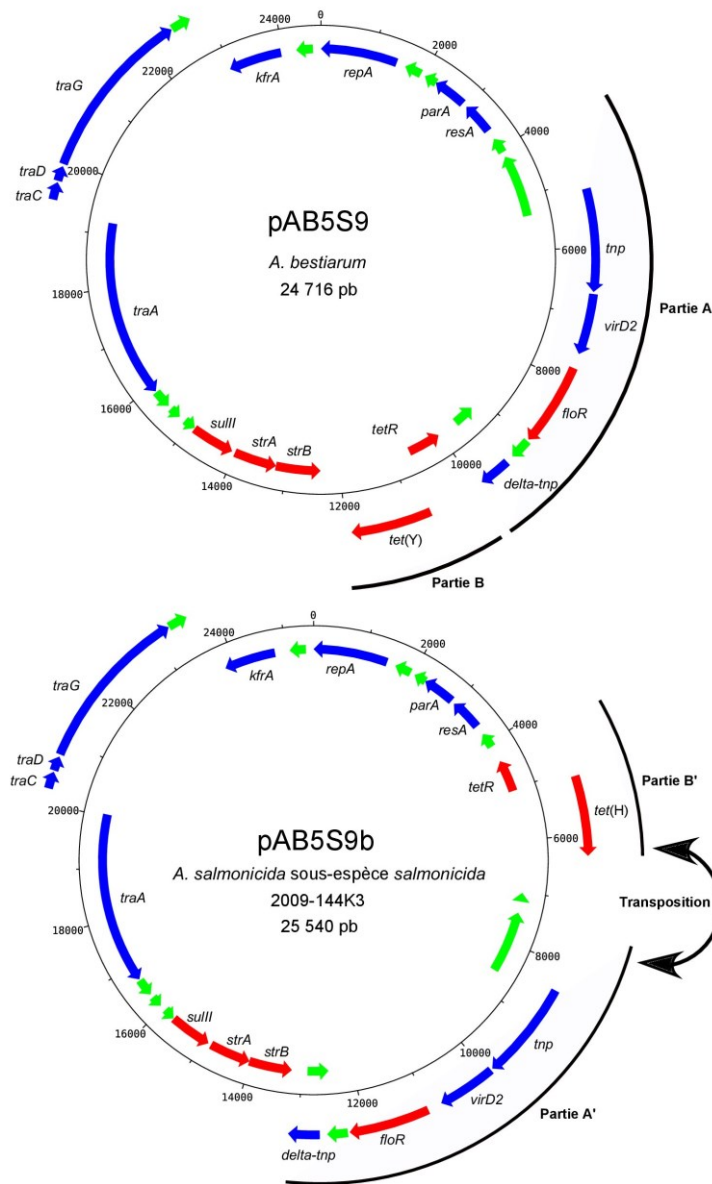


Figure 14. Structure du plasmide pAB5S9 trouvé chez *Aeromonas bestiarum* comparée à celle de pAB5S9b trouvé chez *Assal*. Les flèches en rouge représentent les gènes de résistance aux antibiotiques. Les flèches en bleu identifient les gènes codant pour d'autres fonctions et les flèches en vert indiquent les gènes codant pour des protéines hypothétiques. La structure du plasmide pAB5S9b se distingue de celle du plasmide pAB5S9 par la transposition de la partie A et de la partie B comme démontrée sur la figure. Aussi, le gène codant pour la résistance à la tétracycline *tetY* a été remplacé par une autre classe de gène soit *tetH* chez pAB5S9b. La figure a été adaptée de (Vincent et al., 2014).

4.3 Identification des souches possédant les nouveaux plasmides

4.3.1 Analyses pour les plasmides pAsa4, pAsa4b et pAsa4c

Sept souches de la collection soupçonnées d'avoir un variant du plasmide pAsa4 initialement identifié dans la souche A449 ont été testées par PCR. Les variants de ce plasmide ont été nommés pAsa4b pour celui découvert chez 01-B522 et pAsa4c pour celui identifié chez JF2267. Les souches analysées étaient HER1107, RS 534, JF3517, JF3518, JF2869, SHY13-2627 et SHY13-3799. La souche RS 534 possède un plasmide pAsa4. Les souches HER1107, SHY13-2627 et SHY13-3799 ont un plasmide pAsa4b. Puis, les souches JF3517, JF3518 et JF2869 contiennent un plasmide pAsa4c (Tableau 9 en annexe). L'identification des souches possédant les différentes formes du plasmide pAsa4 a été réalisée par Katherine Tanaka.

4.3.2 Analyses pour les plasmides pAB5S9b et pSN254b

Suite à la création d'amorces ciblant les plasmides pAB5S9b et pSN254b par Antony Vincent (Tableau 10 en annexe), la PCR uniplex a été testée sur les souches d'*Assal* possédant au moins une résistance aux tétracyclines. Cette PCR a permis d'observer que ces deux plasmides étaient présents dans plusieurs souches de la collection (Tableau 8 en annexe). En somme, sur un total de 41 souches testées, 25 souches possèdent pSN254b et 2 souches ont pAB5S9b. Les souches ayant pSN254b provenaient du Québec et du Nouveau-Brunswick tandis que celles ayant pAB5S9b provenaient toutes les deux du Nouveau-Brunswick. Les résistances obtenues par les tests d'antibiogrammes correspondaient avec les résistances conférées par ce plasmide sauf pour la résistance au sulfonamide (Tableau 8 en annexe). Quatorze souches sur 27 étaient sensibles au disque de SXT. Parmi ces 14 souches, 13 avaient le plasmide pSN254b et une possédait le plasmide pAB5S9b par PCR.

4.4 Alignement multiple des séquences des gènes analysés pour la création d'amorces

Suite à l'alignement multiple effectué avec les gènes rapportés dans la littérature d'*A. salmonicida* et ceux identifiés dans la présente étude, l'identité des séquences de gènes de résistance aux antibiotiques homologués a été obtenue (Tableau 5). Les mêmes gènes

présents sur divers plasmides chez *A. salmonicida* tels *floR*, *sul1*, *sul2*, *tetA(C)*, *tetA(A)* étaient très conservés avec des identités de près de 100 %. Les gènes *cat* et *catA2* étaient très différents entre eux tout comme les gènes *dfrA16* et *dfrIIc* avec un pourcentage d'identité de seulement 25 % suggérant dans ces deux derniers cas qu'il s'agit de gènes distincts ne pouvant pas être ciblés par une unique paire d'amorces. Comme attendu, les diverses classes de gènes *tet* étaient aussi très différentes entre elles.

Ainsi, 12 cibles différentes ont été identifiées pour le développement des PCR multiplex (*cat*, *catA2*, *floR*, *sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetA(E)*, *tetA(C)*, *tetH*, *tetG*, *dfrIIc* et *dfrA16*). Étant donné le grand nombre de cibles, il semblait opportun de faire quatre PCR multiplex, chacune pour un type d'antibiotique précis (chloramphénicol/florfénicol, sulfonamides et deux pour les tétracyclines). L'addition d'une paire d'amorces contrôle ciblant le prophage 1 a été ajoutée à chaque PCR multiplex. Le prophage 1 s'est révélé, suite à nos analyses, être un marqueur très fiable pour identifier *Assal* (Jean-Guillaume Emond-Rheault, comm. pers.). Pour la PCR multiplex ciblant les gènes de résistance au chloramphénicol/florfénicol, il y avait trois cibles (*cat*, *catA2* et *floR*). Pour la PCR multiplex sur les gènes de résistance aux sulfonamides, deux cibles ont été sélectionnées soit les gènes *sul1* et *sul2*. Pour les PCR multiplex portant sur les gènes de résistance aux tétracyclines, la première PCR multiplex cible les gènes *tetA* et *tetA(E)* et la deuxième les gènes *tetA(C)*, *tetH* et *tetG*. Puisque les deux gènes de résistance au triméthoprim ont été trouvés chez des souches d'*A. salmonicida* provenant d'Europe seulement et peu de souches étaient résistantes au triméthoprim selon les tests d'antibiogrammes, les deux autres cibles soient les gènes *dfrA16* et *dfrIIc* ont été analysées par PCR uniplex uniquement et n'ont pas été incluses dans l'une des PCR multiplex.

Tableau 5. Identité de séquences des gènes de résistances trouvés chez *A. salmonicida*

Gène de résistance aux antibiotiques à analyser	Pourcentage d'identité ^a (%)
<i>floR</i> (pAB5S9b et pSN254b)	99 %
<i>cat</i> (pAsa4) et <i>catA2</i> (pAr-32)	23 %
<i>sul1</i> (pAsa4, pRAS1, pSN254b et pAr-32)	100 %
<i>sul2</i> (pAB5S9b, pSN254b et partiel sur pRAS2)	100 %
<i>dfrA16</i> (pRAS1) et <i>dfrIIc</i>	25 %
<i>tetA(C)</i> (pRAS3.1 et pRAS3.2)	100 %
<i>tetA(A)</i> (pSN254b et pRAS1)	100 %
<i>tetA(E)</i> (pAsa4), <i>tetH</i> (pAB5S9b), <i>tetG</i> (souche M16474-11)	Différents

a. Le pourcentage a été obtenu en faisant un alignement multiple entre ces gènes grâce au logiciel Geneious. Il permet de déterminer le nombre de cibles à utiliser dans les PCR multiplex.

4.5 PCR uniplex des diverses amorces créées avec MPprimer et ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol

Des amorces ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol ont été créées avec le logiciel MPprimer (Tableau 10 en annexe). Les résultats de cette PCR uniplex avec un gradient de température d'hybridation de 55 à 60 °C ont été infructueux à cause d'hybridations non spécifiques qui étaient visibles par la présence d'amplicons de tailles inadéquates ou par l'absence de certains amplicons avec les contrôles positifs. Par contre, la concentration des amorces était supérieure à 0,5 µM. Cette concentration élevée avait pu entraîner la formation de dimères (données non présentées). Ensuite, le résultat d'une PCR uniplex avec un gradient de température d'hybridation de 60 à 66 °C et avec des concentrations d'amorces à 0,4 µM a été obtenu (données non présentées). Cet essai a permis de voir que la concentration d'amorces était importante à respecter puisqu'à 60 °C, il n'y avait plus d'amplicons non spécifique. Les amplicons obtenus pour les souches A449 et M15879-11 utilisées à titre de contrôles positifs montraient la taille prévue.

4.5.1 Essai d'une PCR multiplex ciblant les gènes de résistance au chloramphénicol avec des concentrations équimolaires d'amorces (MPprimer)

Le résultat obtenu pour la PCR multiplex avec des concentrations d'amorces équimolaires n'a pas été satisfaisant puisque des interactions entre les amorces ont été soupçonnées (Figure 15). Seulement la paire d'amorces ciblant le prophage 1 a permis une amplification pour les souches A449 et M15879-11 (contrôle positif). En réalisant un gradient de température d'hybridation de 60 à 66 °C et en modifiant la durée d'élongation lors des cycles ainsi que l'élongation finale respectivement à 2 minutes et 10 minutes, la PCR multiplex a généré un amplicon de bonne taille pour celui du contrôle ciblant le prophage 1 pour les souches A449 et M15879-11, mais la paire d'amorces ciblant le gène *cat* n'a produit aucune amplification pour la souche A449 alors que cela aurait dû être le cas (Figure 16). La paire d'amorces ciblant le gène *floR* a produit un amplicon à la bonne taille pour la souche M15879-11. Par contre, la souche M15879-11 a montré deux petits amplicons à 200 et 400 pb environ autant à la température d'hybridation de 60 qu'à 66 °C. Il y avait donc des interactions entre les amorces lorsqu'elles étaient présentes dans la même réaction.

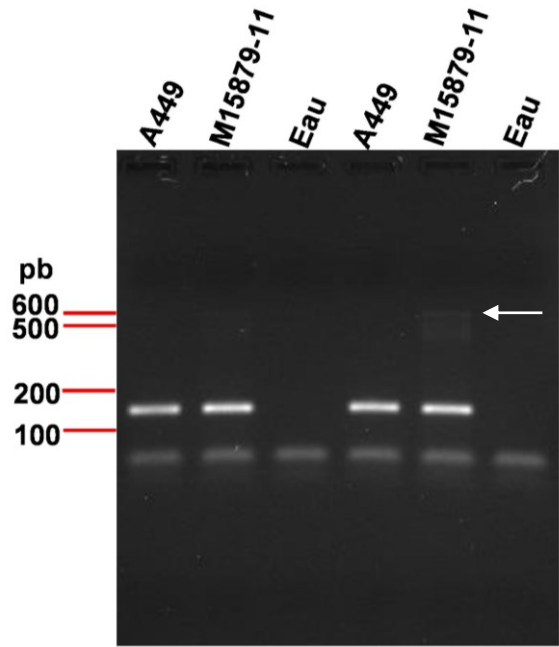


Figure 15. PCR multiplex avec des concentrations d'amorces équimolaires ciblant les gènes *cat*, *catA2*, *floR* et le prophage 1 (MPprimer). Les produits PCR ont été migrés sur un gel d'agarose de 1,3 %. La paire d'amorces ciblant le prophage 1 a permis une amplification pour les deux souches d'*Assal* soient A449 et M15879-11 lors des deux essais. Par contre, le premier essai et le deuxième essai n'ont pas montré tout à fait les mêmes résultats. Lors du premier essai, aucun gène de résistance aux chloramphénicol/florfénicol n'a produit d'amplicon pour les deux souches testées. Aucune amplification n'a été observée quand l'ADN des souches était remplacé par de l'eau. À l'essai 2, la souche M15879-11 a obtenu un amplicon de faible signal entre 500 et 600 pb avec une trainée identifiée par une flèche blanche sur l'image. Comme M15879-11 a le gène *floR*, cet amplicon correspondrait à la paire d'amorces ciblant le gène *floR* avec une taille de 564 pb. Dans les deux essais, la paire d'amorces ciblant le gène *cat* n'a pas permis la production d'un amplicon pour la souche A449. Une interaction entre les paires d'amorces ciblant le gène *cat* a été soupçonnée.

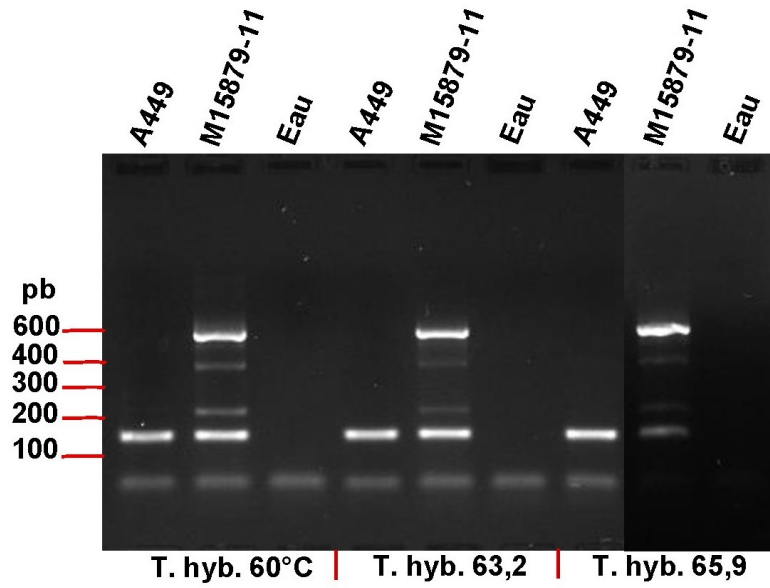


Figure 16. Variation des conditions pour la PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol (MPprimer). La PCR a été réalisée avec des concentrations d'amorces équimolaires, une température d'élongation de 2 minutes et en utilisant un gradient de température d'hybridation de 60 à 66 °C. Les produits PCR ont migrés sur un gel d'agarose de 1,3 %. Cette PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol a montré des résultats similaires aux trois températures d'hybridation testées. La souche M15879-11 a généré un amplicon d'environ 564 pb pour la paire d'amorces ciblant le gène *floR*. Par contre, deux amplicons ayant une taille entre 200 et 400 pb étaient aussi visibles suggérant la possibilité d'interaction dans la PCR. De plus, la souche A449 n'a toujours pas amplifié pour la paire d'amorces ciblant le gène *cat*. Aucune amplification n'a été observée quand l'ADN des souches était remplacé par de l'eau.

4.5.2 Confirmation de l'interaction entre les amorces créées avec MPprimer

Suite à la PCR duplex, triplex et quadruplex avec les paires d'amorces ciblant des gènes de résistance au chloramphénicol, il y avait de l'interaction entre les amorces (données non présentées). La création d'amorces à l'aide de Primer3 en vérifiant manuellement le delta G° entre ces amorces était donc à privilégier.

4.6 PCR uniplex des diverses amorces créées avec Primer3 et ciblant les gènes de résistance au chloramphénicol

D'autres amorces ciblant les gènes de résistance au chloramphénicol ont été créées en utilisant une seconde approche faisant appel au logiciel Primer3. Aucune hybridation non spécifique n'était visible et les amplicons avaient un signal satisfaisant à toutes les températures d'hybridation testées soit de 55 à 60 °C. Les résultats obtenus pour les contrôles positifs et négatifs étaient tels qu'attendus (données non présentées). Aucune modification aux conditions cycliques ne fut nécessaire. La PCR multiplex a été faite par la suite avec une température d'hybridation à 60 °C.

4.6.1 Essai d'une PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol (Primer3)

Comme aucune modification aux conditions cycliques n'était à apporter, une PCR multiplex avec des concentrations d'amorces équimolaires a été faite. Les amplicons obtenus pour les souches utilisées à titre de contrôles positifs soient M15879-11 mélangée avec la souche A449 avaient un signal intense et avaient les tailles attendues. Les souches utilisées à titre de contrôles négatifs soit 01-B526 et l'eau filtrée n'ont amplifié pour aucune paire d'amorces ciblant des gènes de résistance au chloramphénicol (Figure 17). La paire d'amorces ciblant le prophage 1 a permis une amplification pour A449, M15879-11 et 01-B526. Aucune optimisation n'a été nécessaire. Le ratio équimolaire entre les amorces pouvait donc être utilisé pour l'analyse des souches d'*Assal* du laboratoire.

Parmi les souches du laboratoire, les souches ayant le plasmide pSN254b ou pAB5S9b identifiées à la section 4.3 possédaient toutes le gène *floR*. Les souches M15448-11 et M16474-11 n'ayant pas le plasmide pSN254b ou pAB5S9b selon les PCR avaient le gène *floR* aussi. Les souches ayant un plasmide pAsa4 ou pAsa4c avaient le gène *cat* selon cette PCR multiplex soient 7 souches sur 168. Aucune souche ne possédait le gène *catA2*. Par contre, il n'y avait pas de contrôle positif disponible pour la paire d'amorces ciblant ce gène.

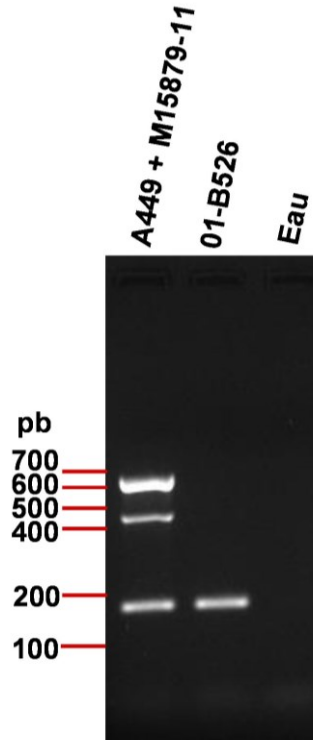


Figure 17. PCR multiplex ciblant les gènes de résistance au chloramphénicol/florfénicol avec un ratio d'amorces de 1:1:1:1. Les produits PCR ont été migrés sur un gel d'agarose de 1,3 %. La PCR multiplex ciblant les gènes de résistance au chloramphénicol/florfénicol est fonctionnelle. Les souches A449+M15879-11 et 01-B526 ont amplifié pour la paire d'amorces contrôle ciblant le prophage 1 à une taille de 172 pb. L'eau n'a amplifié pour aucune paire d'amorces. La souche sensible au chloramphénicol/florfénicol, 01-B526 n'a permis aucune amplification pour les paires d'amorces ciblant des gènes de résistance ces antibiotiques. Le mélange des souches A449 et M15879-11 a amplifié pour les paires d'amorces ciblant le gène *cat* et *floR* à des tailles respectives de 448 et 632 pb.

4.7 PCR uniplex des diverses amorces créées avec Primer3 et ciblant les gènes de résistance aux sulfonamides

Des amorces ciblant les gènes de résistance aux sulfonamides ont été créées (Tableau 10 en annexe). Les amplicons démontraient un signal fort à toutes les températures d'hybridation testées entre 55 et 60 °C (Figure 18). La souche utilisée à titre de contrôle positif, M15879-11, a permis d'amplifier pour les paires d'amorces ciblant le gène *sul1*, *sul2* et le prophage 1. La souche 01-B526 étant sensible aux sulfonamides mène à un produit PCR seulement

pour la paire d'amorces ciblant le prophage 1. Par contre, à la température d'hybridation de 55 °C, le cinquième puits comprenant la souche utilisée à titre de contrôle négatif 01-B526 a amplifié avec un faible signal pour la paire d'amorces ciblant le gène *sul2* à environ 200 pb (voir où la flèche blanche). La température d'hybridation à 55 °C n'était pas l'idéal à utiliser pour la PCR multiplex. La température d'hybridation qui a été utilisée pour la PCR multiplex était de 60 °C. Les résultats obtenus pour les souches utilisées à titre de contrôles positifs et négatifs étaient les mêmes qu'attendus. Aucune modification aux conditions cycliques n'était nécessaire.

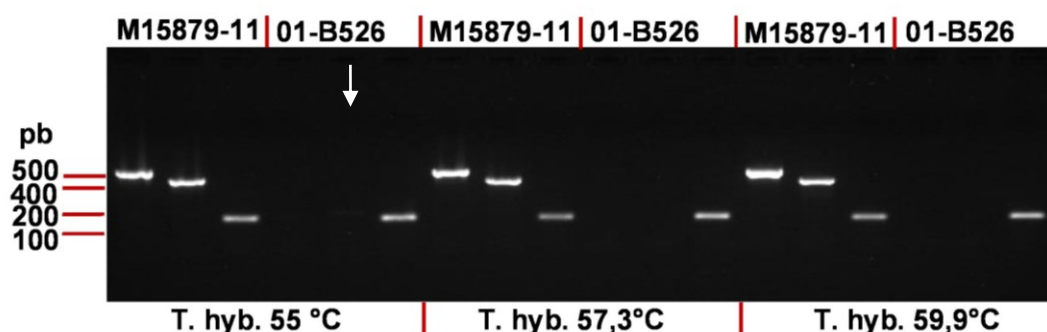


Figure 18. PCR uniplex ciblant les gènes de résistance aux sulfonamides et permettant l'optimisation de la température d'hybridation entre 55 et 60 °C. Dans cette PCR uniplex, M15879-11 était la souche servant de contrôle positif et 01-B526 à titre de contrôle négatif pour les gènes de résistance au sulfonamide. Dans le premier puits, la paire d'amorces ciblant le gène *sull* était testée et dans le deuxième puits, la paire d'amorces ciblant le gène *sul2* était analysée. Dans le troisième puits, la paire d'amorces contrôle ciblant le prophage 1 était mise dans la réaction PCR. La souche utilisée à titre de contrôle positif a amplifié à des tailles de 550 pb pour la paire d'amorces ciblant le gène *sull*, 449 pb pour la paire d'amorces ciblant le gène *sul2* et 175 pb pour la paire d'amorces ciblant le prophage 1 à toutes les températures d'hybridation analysées. La souche 01-B526 a amplifié seulement pour la paire d'amorces ciblant le prophage 1. Par contre, il est possible de visualiser un amplicon d'environ 200 pb de faible signal pour la paire d'amorces ciblant le gène *sul2* à la température d'hybridation de 55 °C; celui-ci n'était pas visible aux autres températures d'hybridation.

4.7.1 Essai d'une PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux sulfonamides

Une PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux sulfonamides avec des concentrations d'amorces équimolaires a été faite suite à la PCR uniplex et à l'optimisation

des conditions PCR. Les amplicons obtenus pour la souche M15879-11 (contrôle positif) montraient un signal intense également. La souche 01-B526 (contrôle négatif) avait un signal intense seulement pour la paire d'amorces ciblant le prophage 1 tel qu'attendu et l'eau filtrée n'a permis aucune amplification (Figure 19). Aucune optimisation n'a été nécessaire. Le ratio 1:1:1 entre les amorces pouvait donc être utilisé pour l'analyse des souches d'*Assal* du laboratoire.

Parmi les souches du laboratoire analysées, celles possédant le plasmide pSN254b et identifiées à la section 4.3 avaient les gènes *sul1* et *sul2*. Les souches ayant le plasmide pAB5S9b et identifiées à la section 4.3 avaient le gène *sul2*. Les souches ayant le plasmide pAsa4, pAsa4b ou pAsa4c avaient le gène *sul1* soient 10 souches sur 168. Les souches M15448-11 et M16474-11 n'ayant pas le plasmide pSN254b ou pAB5S9b selon les PCR avaient aussi le gène *sul1* (Tableau 8 en annexe).

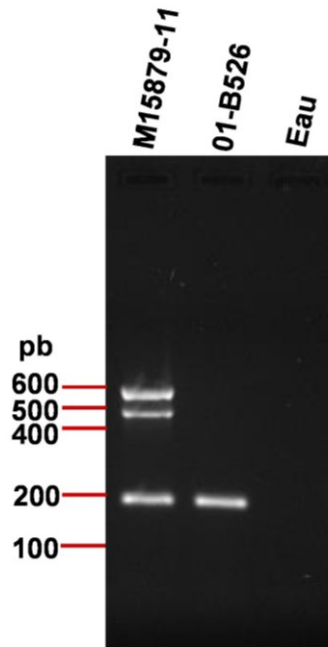


Figure 19. PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux sulfonamides avec un ratio d'amorces de 1:1:1. Le contrôle positif (M15879-11) a amplifié pour toutes les paires d'amorces testées en générant des amplicons de 175 pb, 449 pb et 550 pb ciblant respectivement le prophage 1, *sul2* et *sul1*. La souche sensible aux sulfonamides 01-B526 a généré un amplicon de 175 pb pour la paire d'amorces ciblant le prophage 1 commun à toutes les souches d'*Assal*. L'eau n'a produit, tel qu'attendu, aucune amplification.

4.8 PCR uniplex des diverses amorces créées avec Primer3 et ciblant les gènes de résistance à la tétracycline

Des amorces ciblant les gènes de résistance à la tétracycline ont été créées (Tableau 10 en annexe). Deux PCR uniplex indépendantes ont été réalisées dû au nombre plus élevé de gènes codant pour la résistance à la tétracycline chez *Assal*. Les deux PCR uniplex testées n'ont montré aucune hybridation non spécifique et les amplicons avaient un signal à la taille attendue pour les souches utilisées à titre de contrôles positifs. Les souches utilisées à titre de contrôles négatifs n'ont amplifié pour aucune paire d'amorces testées sauf pour la paire d'amorces ciblant le prophage 1 qui a amplifié avec un amplicon à la taille attendue chez la souche 01-B526 (données non présentées). Même si à toutes les températures d'hybridation testées, les résultats ont été clairs dans tous les cas, la température

d'hybridation qui a été utilisée dans les deux PCR multiplex était de 60 °C. Les conditions cycliques sont les mêmes pour toutes les PCR multiplex effectuées.

4.8.1 Essai d'une PCR multiplex ciblant les gènes de résistance à la tétracycline

Deux PCR multiplex ciblant les gènes de résistance à la tétracycline avec des concentrations d'amorces équimolaires ont été faites suite à la PCR uniplex qui ne nécessitait pas de changement aux conditions cycliques. Pour la première PCR multiplex ciblant les gènes *tetA(E)*, *tetA* et le prophage 1 qui était la paire d'amorces utilisée à titre de contrôle positif, les souches A449 ayant le gène *tetA(E)* et M15879-11 ayant le gène *tetA* (contrôles positifs) ont permis d'obtenir des amplicons à la taille attendue avec un signal intense pour les paires d'amorces ciblant ces gènes. La souche 01-B526 (contrôle négatif) ne possédant aucun gène de résistance à la tétracycline a amplifié seulement pour la paire d'amorces ciblant le prophage 1. L'eau filtrée (contrôle négatif) n'a amplifié pour aucune paire d'amorces (Figure 20). Pour la deuxième PCR multiplex ciblant les gènes *tetA(C)*, *tetH*, *tetG* et le prophage 1, les souches 2009-144K3 ayant le gène *tetA(C)* et *tetH* puis M16474-11 ayant le gène *tetG* (contrôles positifs) ont montrés des amplicons avec un signal intense pour les paires d'amorces ciblant ces gènes. La souche 01-B526 (contrôle négatif) ne possédant aucun gène de résistance à la tétracycline a amplifié seulement pour la paire d'amorces ciblant le prophage 1. L'eau filtrée (contrôle négatif) n'a amplifié pour aucune paire d'amorces (Figure 20). Aucune optimisation n'a été nécessaire pour ces deux PCR multiplex. La concentration équimolaire a été conservée lors de l'analyse des souches du laboratoire.

Selon ces PCR multiplex, les souches ayant le plasmide pAsa4 ou pAsa4b ou soupçonné de le porter, avaient le gène *tetA(E)* soit 11 souches sur 168. Les souches ayant le plasmide pSN254b et identifiées à la section 4.3 avaient le gène *tetA*. Les souches ayant le plasmide pRAS3 (Vincent et al., 2014) avaient le gène *tetA(C)* soit 4 souches sur 168. Les deux souches possédant le plasmide pAB5S9b et identifiées à la section 4.3 avaient le gène *tetH*. Les souches M15448-11 et M16474-11 étaient les seules à posséder le gène *tetG*. En somme, 42 souches d'*Assal* sur 168 ont au moins un gène de résistance à la tétracycline (Tableau 9 en annexe).

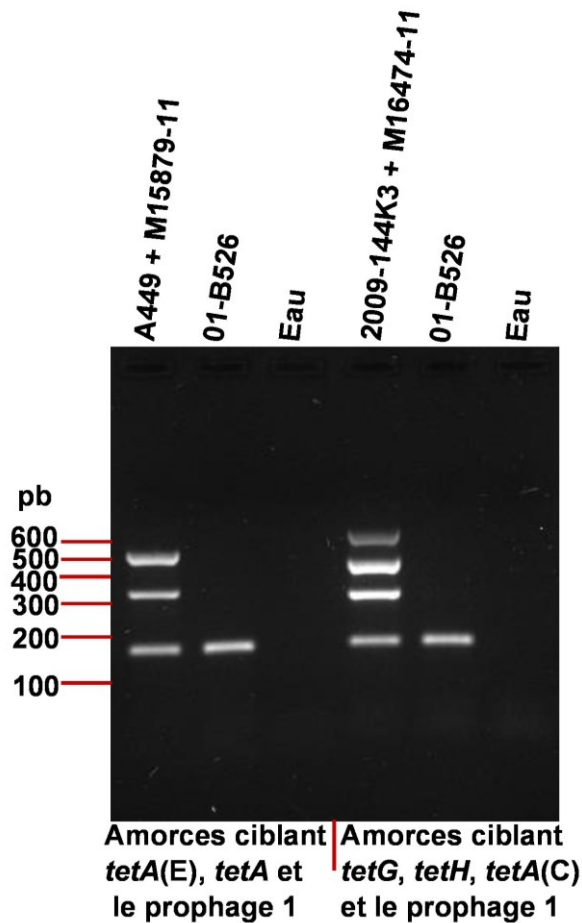


Figure 20. PCR multiplex ciblant les gènes de résistance à la tétracycline avec un ratio d'amorces de 1:1:1:1. Pour la première PCR faite avec les amorces ciblant le gène *tetA(E)*, *tetA* et le prophage 1 (trois premiers puits), la combinaison des souches A449 et M15879-11 (contrôle positif) a amplifié pour les trois paires d'amorces testées soit à une taille de 175 pb (prophage 1), 351 pb (*tetA(E)*) et 526 pb (*tetA*). La souche sensible à la tétracycline, 01-B526 permet seulement l'amplification avec les amorces contrôles à 175 pb. Pour la deuxième PCR multiplex effectuée avec les amorces ciblant les gènes *tetH*, *tetG*, *tetA(C)* et le prophage 1 (trois derniers puits), un mélange de souches 2009-144K3 et M16474-11 (contrôles positifs) permet la production d'amplicons pour les quatre paires d'amorces analysées soit à une taille de 176 pb (prophage 1), 326 pb (*tetH*), 460 pb (*tetG*) et 629 pb (*tetA(C)*). La souche sensible à la tétracycline, 01-B526 permet seulement l'amplification avec les amorces contrôles à 175 pb (1^{ère} PCR) ou 176 pb (2^e PCR). L'eau ne produit aucune amplification pour les deux PCR multiplex.

4.9 PCR uniplex sur les gènes de résistance au triméthoprim

Les amorces ont été créées dans une région conservée des deux gènes de résistance au triméthoprim (Tableau 10 en annexe). Aucune souche provenant du Québec ne possédait les gènes *dfrA16* et *dfrIIc* selon la PCR uniplex réalisée en duplicata (données non présentées). De plus, aucune souche n'a pu être utilisée à titre de contrôle positif dans ces essais puisque l'obtention des souches européennes 2402-89 (718) et 324-94 AS44 ayant ces gènes n'a pas été possible. Un autre gène méconnu serait responsable de la résistance observée chez les souches québécoises 01-B522, M19878-11, M17930-12, SHY13-2188, SHY13-2630. Des études pour comprendre ce mécanisme de résistance seront réalisées dans le futur par d'autres membres de l'équipe.

4.10 Comparaison des résultats des tests d'antibiogrammes avec ceux des PCR

multiplex

Les résultats de la PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol concordent avec ceux obtenus au test d'antibiogrammes (Tableau 6). Les souches démontrant en gélose une résistance aux chloramphénicol et florfénicol portent le gène *floR* soit 29 souches sur 168. Les souches démontrant une résistance au chloramphénicol et une sensibilité au florfénicol possèdent le gène *cat* soit 7 souches sur 168. Par contre, la souche JF3791 présentait en gélose une résistance au chloramphénicol et une sensibilité au florfénicol, toutefois, la PCR multiplex n'a pas montré la présence du gène *cat* ni du gène *catA2*. Puisque le génome de cette souche a été séquencé, un nouveau gène *cat* méconnu dans la littérature d'*Assal* se trouvant sur un plasmide pAsa2 modifié a pu être identifié (Antony Vincent, comm. pers.). Étant donné que cette souche provient de la Suisse et que la PCR multiplex a été conçue pour être utilisée au Québec seulement, des amorces ciblant ce nouveau gène n'ont pas été incluses dans la trousse diagnostique. Les gènes codant pour la résistance aux chloramphénicol/florfénicol sont tous sur des plasmides sur la base des résultats de notre étude. Certains gènes *cat* sont identifiés ou soupçonnés de se situer sur un variant du plasmide pAsa4. Le gène *floR* a été confirmé par PCR pour être présent sur les plasmides pSN254b, pAB5S9b et sur le

nouveau plasmide découvert dans la souche M16474-11. Aucun gène *catA2* n'a été trouvé parmi les 168 souches testées, mais aucune souche ne pouvait être utilisée à titre de contrôle positif lors de nos tests.

Les résultats de la PCR multiplex ciblant des gènes de résistance aux sulfonamides ne concordaient pas complètement avec ceux obtenus avec les tests d'antibiogrammes avec les disques de SXT (Tableau 6). Plusieurs souches possédaient le gène *sul1* ou *sul2* ou les deux, mais ne montraient pas de résistance au SXT. Au total, 40 souches sur 168 avaient au moins un gène de résistance aux sulfonamides (*sul1*, *sul2* ou les deux). Parmi celles-ci, 26 souches montraient la présence d'au moins un gène *sul*, mais étaient sensibles au disque d'antibiotique de SXT lors du test d'antibiogramme. Aussi, deux souches (M19878-11 et SHY13-2222) montrant une résistance intermédiaire au SXT n'avaient pas la présence d'un gène de résistance aux sulfonamides selon la PCR multiplex. Un nouveau gène de résistance pour ces antibiotiques est probablement responsable de cette résistance. Les gènes codant pour les résistances aux sulfonamides seraient tous sur des plasmides. Le gène *sul1* se retrouve sur certains variants de pAsa4 identifiés ou soupçonnés, sur le plasmide pSN254b et sur le nouveau plasmide de M16474-11. Le gène *sul2* se retrouve sur les plasmides pSN254b et pAB5S9b.

Les résultats obtenus par les deux PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux tétracyclines concordaient complètement avec ceux obtenus avec les disques de tétracycline au test d'antibiogrammes. Aucun résultat faux positif ni faux négatif n'a été observé (Tableau 6). De nombreuses souches possédaient un gène de résistance aux tétracyclines. Les gènes codant pour la résistance aux tétracyclines sont tous sur des plasmides. Le gène *tetA(E)* a été identifié ou soupçonné de se situer sur un variant de pAsa4 et le gène *tetH* se retrouve seulement sur les souches ayant le plasmide pAB5S9b. Le gène *tetG* est présent sur le nouveau plasmide identifié dans la souche M16474-11 et le gène *tetA(C)* a été identifié sur des souches ayant le plasmide pRAS3.

Tableau 6. Comparaison des cibles identifiées par PCR multiplex avec les résultats obtenus par tests d'antibiogrammes

Cible	Nombre de souche(s) positive(s)	Corrélation avec les antibiogrammes	Corrélation avec les plasmides identifiés
<i>cat</i>	7	Oui, résistantes au chloramphénicol et sensibles au florfénicol	Oui, certains variants de pAsa4 identifiés ou soupçonnés
<i>catA2</i>	0	-	-
<i>floR</i>	29	Oui, résistantes au chloramphénicol et florfénicol	Oui, pSN254b, pAB5S9b et le nouveau plasmide chez M16474-11
<i>sul1</i>	38	Non, 25 souches sur 38 étaient sensibles au SXT.	Oui, pSN254b, certains variants de pAsa4 identifiés ou soupçonnés et le nouveau plasmide chez M16474-11
<i>sul2</i>	27	Non, 14 souches sur 27 étaient sensibles au SXT.	Oui, pSN254b et pAB5S9b
<i>tetA(E)</i>	12	Oui, résistantes à la tétracycline	Oui, certains variants de pAsa4 identifiés ou soupçonnés
<i>tetA</i>	25	Oui, résistantes à la tétracycline	Oui, pSN254b
<i>tetA(C)</i>	4	Oui, résistantes à la tétracycline	Oui, pRAS3
<i>tetH</i>	2	Oui, résistantes à la tétracycline	Oui, pAB5S9b
<i>tetG</i>	2	Oui, résistantes à la tétracycline	Oui, nouveau plasmide identifié chez M16474-11

4.11 Répartition géographique des souches ayant un plasmide identifié

Comme présenté à la section 4.10, les gènes de résistance aux antibiotiques homologués sont retrouvés sur divers plasmides. Une corrélation existe entre les souches ayant des plasmides et leur lieu géographique (Tableau 7). En se référant à ce tableau, le plasmide pSN254b a été retrouvé chez des souches québécoises et des souches provenant des maritimes. Les plasmides pAB5S9b et pRAS3 ont été identifiés seulement dans les isolats provenant des maritimes. Par contre, ces deux plasmides ont été identifiés dans peu de souches. Les variants de pAsa4 ont été identifiés sur deux continents soit en Amérique (plus précisément au Québec) et en Europe. Les plasmides pAsa4 et pAsa4c ont été

retrouvés dans des souches européennes tandis que le plasmide pAsa4b a été identifié dans des souches québécoises. Deux souches possédant un plasmide de la famille pAsa4 ont une origine géographique inconnue. Une de ces souches possède un plasmide pAsa4b et l'autre pAsa4c. Les variants de pAsa4 qui sont soupçonnés proviennent de l'Ontario et des États-Unis. Cependant, ces souches seront analysées par PCR pour confirmer la présence de variants de pAsa4 ou devront être séquencées. En somme, les plasmides pSN254b, pAB5S9b et pRAS3 semblent se concentrer dans les mêmes régions (Québec, Maritimes) tandis que les variants de pAsa4 semblent être plus dispersés géographiquement (Europe, Québec, Ontario, États-Unis).

Tableau 7. Corrélation des souches ayant des plasmides identifiés avec leur lieu géographique

Plasmide	Nombre de souches ayant ces plasmides						Total
	Québec	Maritimes	Ontario	États-Unis	Europe	Inconnu	
pSN254b	23	2	0	0	0	0	25
pAB5S9b	0	2	0	0	0	0	2
pRAS3	0	4	0	0	0	0	4
pAsa4	0	0	0	0	2	0	2
pAsa4b	3	0	0	0	0	1	4
pAsa4c	0	0	0	0	3	1	4
Variant de pAsa4 soupçonné	0	0	1	4	0	0	5

CHAPITRE 5- DISCUSSION

5.1 Tests d'antibiogrammes

La grande majorité des souches de la collection provenant du Québec ont été isolées par le service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire de Saint-Hyacinthe. Suite aux tests d'antibiogrammes effectués sur celles-ci, les résultats d'analyses de certaines souches ne concordent pas avec ceux obtenus par le service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire (Figure 12). Comme le service de diagnostic de la faculté de médecine vétérinaire utilise une incubation de 24 heures au lieu de 48 heures, il est possible que cette différence influence les résultats observés. Aussi, comme *Assal* est cultivé à 18 °C, il n'y a pas de charte d'interprétation des tests d'antibiogrammes. Concernant les bactéries cultivées à 37 °C comme *E. coli* dans le domaine médical, plusieurs bactéries ont des chartes d'interprétation permettant de mieux évaluer la résistance réelle à l'antibiotique testé. Ces chartes sont standardisées et émises par le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007). Ce document présente l'écart entre les valeurs de mesures d'inhibition à respecter pour estimer si la souche testée est sensible, intermédiaire ou résistante à l'antibiotique. Il serait donc nécessaire d'établir une charte pour *Assal* à 18 °C ce qui permettrait d'uniformiser les résultats d'antibiogrammes. Le travail associé à la conception de cette charte serait fastidieux, mais serait d'une grande utilité.

5.2 Caractérisation de nouveaux plasmides portant des résistances à des antibiotiques homologués

5.2.1 Plasmide pSN254b

Grâce au séquençage de la souche M15879-11, il a été possible d'identifier la présence d'un variant du plasmide pSN254 trouvé chez *S. enterica*. La transmission de plasmides entre divers genres bactériens est donc possible. *A. salmonicida* peut donc être un réservoir potentiel de gènes de résistance aux antibiotiques pouvant être transmis à des bactéries pathogènes infectant les humains (Vincent et al., 2014). Cependant, le variant a une taille beaucoup plus petite que pSN254. Cela est dû à la perte de trois régions. La présence de

gènes sur ce plasmide avait été évoquée auparavant dans des souches canadiennes (McIntosh et al., 2008). Les analyses PCR ont confirmé que plusieurs souches d'*Assal* provenant du Québec et du Nouveau-Brunswick possèdent ce plasmide. Il semble y avoir une corrélation entre l'origine géographique des souches et la présence de ce plasmide.

Le plasmide pSN254b confère des résistances multiples à des antibiotiques soit par la présence de gènes codant pour la résistance aux florfénicol et chloramphénicol, aux tétracyclines, aux sulfonamides et à la streptomycine. Ce plasmide constitue une menace pour le traitement de la furonculose au Québec puisqu'il amène la résistance aux trois antibiotiques homologués (florfénicol, oxytétracycline et sulfaméthoxazole-triméthoprime). La propagation de ce plasmide dans les souches infectant les poissons mènera à l'obligation d'homologuer un autre antibiotique en pisciculture ou l'utilisation d'un autre moyen thérapeutique (probiotique, thérapie par les phages, bactériocines etc.).

5.2.2 Plasmide pAB5S9b

Grâce à l'analyse de la séquence génomique de la souche 2009-144K3, la présence d'un variant du plasmide pAB5S9 retrouvé chez *Aeromonas bestiarum* a été mise en évidence (Gordon, 2008). La souche ayant le plasmide pAB5S9 provient de la France tandis que la souche ayant le variant pAb5S9b origine du Nouveau-Brunswick. Malgré le fait qu'ils ne viennent pas du même continent, il y a peu de différences entre le plasmide trouvé initialement et le variant chez *Assal* contrairement à ce que nous avons observé pour les plasmides pSN254 et pSN254b qui ont des tailles différentes. Ces plasmides sont d'autres exemples que la transmission de plasmides entre diverses espèces bactériennes est possible.

Suite à l'analyse PCR de souches ayant au moins une résistance à la tétracycline, seulement une souche supplémentaire provenant elle aussi du Nouveau-Brunswick possédait pAB5S9b. Étant donné le nombre restreint de souches ayant ce plasmide, il n'est pas possible d'établir de corrélation entre le lieu géographique et la présence de ce plasmide.

Tout comme pSN254b, le plasmide pAB5S9b possède plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques. Certains gènes présents sur ce plasmide codent aussi pour la résistance aux

antibiotiques homologués en pisciculture (*floR*, *sul2* et *tetH*). Par contre, les analyses PCR montrent qu'aucune souche québécoise ne possède ce plasmide. Ce réplicon semble constituer moins une menace pour l'aquaculture au Québec que pSN254b. Cependant, étant donné la proximité du Nouveau-Brunswick, il n'est pas exclu que ce plasmide puisse être transmis ou ait déjà été transmis à des souches québécoises.

5.3 PCR multiplex mise au point à l'aide de deux logiciels : MPprimer et Primer3

Grâce à l'optimisation d'une PCR multiplex ciblant les gènes impliqués dans le Système de Sécrétion de Type Trois (résultats non montrés), peu d'optimisation a été nécessaire lors des PCR multiplex ciblant des gènes de résistance. Les conditions cycliques et les concentrations optimums des produits dans la PCR avaient été établies par cette analyse préliminaire.

Deux logiciels pour la création d'amorces ont été testés: MPprimer (Shen et al., 2010) et Primer3 (Koressaar and Remm, 2007; Untergrasser A, 2012) en combinaison avec Oligoanalyzer qui est un outil sur le site de IDT. Suite à l'essai de PCR multiplex avec ces deux méthodes, il a été conclu que l'utilisation de Primer3 en combinaison avec Oligoanalyzer était nettement plus fiable que l'utilisation de MPprimer. Les amorces créées avec MPprimer interagissaient ensemble lorsqu'elles étaient combinées dans la même PCR. Cependant, Primer3 en combinaison avec Oligoanalyzer nécessite plus de temps pour créer des amorces, puisqu'il faut tester les amorces présentes dans la même PCR manuellement. MPprimer permettait de créer des amorces plus rapidement, car le logiciel comprend un script bio-informatique Python qui calcule automatiquement les ΔG des amorces testées (Shen et al., 2010). Par contre, leur outil bio-informatique ne doit pas utiliser les mêmes paramètres qu'Oligoanalyzer pour avoir autant de divergence entre les ΔG obtenus avec Oligoanalyzer comparativement à ceux obtenus avec MPprimer. Sur la base de la présente étude, il s'avère primordial de prendre plus de temps pour créer des amorces avec Primer3 et Oligoanalyzer qu'utiliser le logiciel MPprimer.

D'autres logiciels pourraient être envisagés dans d'autres essais de PCR multiplex. Par exemple, les logiciels gratuits AmplifX et Fast PCR pourraient être essayés. AmplifX est un logiciel qui permet de tester, gérer et créer des amorces. Ce logiciel semble prometteur puisqu'il permet de créer des amorces avec des tailles d'amplicons désirées, de tester ces amorces pour les T_m, % GC et dimères prédits puis de trier les amorces générées (Jullien, 2013). Fast PCR est un deuxième logiciel qui permet aussi de créer des amorces à partir de séquences données et de tester les amorces à l'aide d'outils bio-informatiques conçus pour la PCR multiplex (Kalendar et al., 2011; Kalendar et al., 2014). Ce logiciel semble plus spécialisé pour la PCR multiplex qu'AmplifX. Oligo7 est un autre logiciel qui nécessite une licence pour avoir un accès complet au logiciel et permettant aussi de créer et de tester les amorces (Rychlik, 2007). Cependant, si ces logiciels ne sont pas satisfaisants, on pourrait combiner la création d'amorces faite avec Primer3 avec le logiciel AutoDimer (Vallone and Butler, 2004) ou OligoEvaluator sur le site de Sigma-Aldrich (<http://www.oligoevaluator.com>). Ces deux logiciels permettraient de tester plusieurs séquences en même temps pour les propriétés physiques (dimères prédits, T_m...) comparativement à Oligoanalyzer qui analyse une séquence à la fois. Ces logiciels suggérés n'ont pas été testés lors de mes études, mais permettraient de réduire considérablement le temps de création d'amorces. Les résultats étaient clairs en utilisant les outils fiables Primer3 et Oligoanalyzer comparativement au logiciel plus rapide de création d'amorces pour PCR multiplex MPprimer. Étant donné les résultats obtenus, l'utilisation de Primer3 et Oligoanalyzer a donc été privilégiée.

5.4 Résistance aux antibiotiques déterminée à l'aide d'une PCR multiplex

5.4.1 Résistance au chloramphénicol/florfénicol

La PCR multiplex a nécessité peu d'optimisation. Les souches ayant le plasmide pSN254b ou pAB5S9b possédaient tous le gène *flor*. Ceci a permis de constater qu'il n'y avait pas de polymorphisme dans ce gène de résistance au chloramphénicol et au florfénicol chez les souches ayant le plasmide pSN254b et pAB5S9b. Les souches M15448-11 et M16474-11 avaient le gène *flor* aussi, mais elles ne possédaient pas le plasmide pSN254b ou pAB5S9b. Ce résultat a permis de nous intéresser à ces deux souches québécoises et de

faire séquencer une des deux souches pour identifier le plasmide qui possède ce gène. Ce nouveau plasmide de grande taille est présentement analysé dans le cadre d'un autre projet.

Les souches ayant un plasmide pAsa4 et pAsa4c avaient le gène *cat* soient 7 souches sur 168. Les souches ayant un plasmide pAsa4b n'ont pas de gène de résistance au chloramphénicol. Aucune souche ne possédait le gène *catA2*. Ce gène n'a été identifié seulement que chez une souche asiatique (Sorum et al., 2003). Il était donc attendu de ne pas retrouver ce gène dans les souches du laboratoire puisqu'il n'y a pas actuellement de souches asiatiques dans la collection de souches d'*Assal* utilisée dans cette étude. Le gène de résistance dominant au Québec est donc le gène *floR* codant pour la résistance au chloramphénicol et au florfénicol. Ceci corrobore avec le fait que le florfénicol est l'antibiotique le plus utilisé en pisciculture au cours des dernières années et conséquemment produisant la plus forte pression sélective (Figure 4).

5.4.2 Résistance aux sulfonamides

La PCR multiplex n'a nécessité aucune optimisation. Cette PCR multiplex a permis de confirmer que les souches ayant le plasmide pSN254b avaient toutes les gènes *sul1* et *sul2*. Aussi, cette PCR a permis d'identifier que les deux souches ayant le plasmide pAB5S9b possédaient le gène *sul2*. Ces deux confirmations montrent qu'il n'y a pas de variation des gènes de résistance aux sulfonamides pour ces deux plasmides. En plus du gène *floR*, les souches québécoises M15448-11 et M16474-11 possèdent le gène *sul1*. Cette observation a ajouté un intérêt de plus pour le séquençage de l'une des deux souches puisqu'aucun plasmide ayant ces deux gènes n'avait été identifié dans la littérature sur *Assal*. L'analyse de ce plasmide permettra de déterminer si un lien existe entre ce nouveau plasmide et pSN254b et pAB5S9b. Les souches ayant un variant du plasmide pAsa4 présentaient toutes un gène *sul1* soit 10 souches sur 168. Les deux gènes de résistance aux sulfonamides sont souvent retrouvés dans les souches québécoises. Cette observation coïncide avec le fait que le SXT est utilisé en pisciculture.

5.4.3 Résistance aux tétracyclines

Les deux PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux tétracyclines n'ont pas eu besoin d'optimisation, elles ont été réalisées en utilisant les mêmes conditions que les deux autres PCR multiplex. Lors de la conception des amorces, une nouvelle cible a pu être ajoutée à cette PCR soit le gène *tetG*. Ce gène a été identifié suite au séquençage de la souche M16474-11 ayant aussi les gènes *floR* et *sull* identifiés par PCR multiplex. Comme mentionné plus haut, cette souche possède un nouveau plasmide qui n'a jamais été identifié auparavant. Tous les gènes identifiés pour la résistance aux tétracyclines (*tetA*, *tetA(E)*, *tetA(C)*, *tetG*, *tetH*) chez *Assal* utilisent le mécanisme de résistance par pompe à efflux (Van Hoek et al, 2011). Le gène qui est le plus retrouvé dans les souches québécoises est *tetA*.

La première PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux tétracyclines *tetA* et *tetA(E)* réunissait dans une même PCR, les gènes les plus rencontrés dans les souches québécoises. Cette PCR a permis de constater que les souches ayant le plasmide pSN254b avaient toutes le gène *tetA*. Toutes les souches possédant le plasmide pSN254b ont donc tous les mêmes gènes de résistance aux antibiotiques homologués en pisciculture. Les souches ayant un plasmide pAsa4 et pAsa4b ont le gène *tetA(E)* soit 6 souches sur 168. Le plasmide pAsa4c ne possède pas de gène de résistance aux tétracyclines. Cinq autres souches possèdent le gène *tetA(E)* sans montrer la présence d'autres gènes de résistance aux antibiotiques homologués. Ces cinq souches provenant de l'Ontario et des États-Unis sont soupçonnées de posséder un autre variant du plasmide pAsa4 méconnu dans la littérature. Des analyses PCR sur ces souches ou le séquençage d'une de celles-ci seront nécessaires pour identifier le plasmide qui confère la résistance aux tétracyclines.

La deuxième PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux tétracyclines *tetH*, *tetG* et *tetA(C)* a été conçue pour identifier les gènes de résistance aux tétracyclines étant moins présents dans les souches québécoises. Les deux souches ayant uniquement le plasmide pRAS3 ont toutes le gène *tetA(C)* et les deux souches ayant les plasmides pAB5S9b et pRAS3 ont le gène *tetH* et *tetA(C)* (Tableau 8 en annexe). Les deux souches québécoises M15448-11 et M16474-11 ont toutes les deux le gène *tetG*. Suite au séquençage de la

souche M16474-11, des analyses PCR seront nécessaires pour identifier que la souche M15448-11 a acquis le même plasmide. En somme, moins de souches résistantes aux tétracyclines ont été identifiées avec cette PCR multiplex soit 8 souches sur 168 dont deux seulement proviennent du Québec.

5.5 Concordance des résultats de résistance aux antibiotiques par tests d'antibiogrammes avec ceux par PCR

5.5.1 Résistance aux chloramphénicol/florfénicol

La PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux chloramphénicol/florfénicol peut être considérée 100 % fiable au Québec. Si on considère l'ensemble des souches de la collection Charette et non seulement les souches d'origine québécoise, les tests d'antibiogrammes réalisés avec les disques de chloramphénicol et florfenicol concordent bien pour la très grande majorité des souches avec les résultats obtenus par la PCR multiplex. Les souches montrant une résistance au disque de chloramphénicol et au florfenicol avaient toutes le gène *floR*. Les souches montrant une résistance au disque de chloramphénicol et une sensibilité au florfenicol avaient le gène *cat* sauf pour la souche JF3791. La souche JF3791 provenant de Suisse a été séquencée suite à l'obtention de cette incohérence. Un gène inconnu de type *cat* a été trouvé sur un variant du plasmide pAsa2 (Antony Vincent, comm. pers.). Ce gène n'a pas été ajouté comme cible dans la PCR multiplex puisqu'il a été seulement identifié chez une souche provenant de l'Europe. La PCR multiplex a généré 0,6 % de faux négatifs lorsque l'ensemble des souches de la collection est considéré et aucun faux positif.

5.5.2 Résistance aux sulfonamides

La PCR multiplex détectant les résistances aux sulfonamides n'est pas entièrement fiable; certaines incohérences ayant été observées. Certaines souches présentent une sensibilité au disque de SXT par test d'antibiogrammes tout en possédant un ou deux gènes de résistance aux sulfonamides (*sul1*, *sul2* ou *sul1* et *sul2*). Soixante-six pour cent des souches ayant le gène *sul1* et cinquante-deux pour cent des souches contenant le gène *sul2* étaient sensibles

au disque de SXT. 52 % des souches possédant le plasmide pSN254b étaient considérées sensibles au SXT par les tests d'antibiogrammes. La combinaison de sulfonamide et de triméthoprimine soit SXT est composée de 23,75 µg de sulfaméthoxazole et de 1,25 µg de triméthoprimine. Dans les disques de SXT, il y a donc une plus grande quantité de sulfaméthoxazole que de triméthoprimine. Un disque de triméthoprimine de 5 µg a aussi été testé, mais seulement cinq souches de la collection *Aeromonas* sont considérées résistantes à cet antibiotique. Comme la combinaison des deux antibiotiques permet de diminuer le nombre de souches résistantes (Mascaretti, 2003), le triméthoprimine fait peut-être en sorte de diminuer la résistance au SXT étant donné sa sensibilité dans la majorité des cas. Aurait-on sous-évalué les résistances aux sulfonamides? Est-ce qu'il y a un mécanisme d'inhibition de l'expression du gène de résistance aux sulfonamides inconnus qui fait que certaines souches sont sensibles au SXT tandis que d'autres sont résistantes? Puisque plus de la moitié des souches montrent une sensibilité au SXT, mais possèdent un gène de résistance aux sulfonamides, cela laisse présager que la PCR multiplex est plus efficace que les tests d'antibiogrammes lorsque la résistance au SXT est plus faible. Suite à l'évaluation de la concordance entre les tests d'antibiogrammes et la PCR multiplex ciblant des gènes de résistance aux sulfonamides, il devient primordial de faire une charte d'interprétation de la mesure de la zone d'inhibition de croissance autour des disques d'antibiotiques pour mieux évaluer la résistance aux sulfonamides et au triméthoprimine. Pour y arriver, une étude plus approfondie sur les résistances aux sulfonamides devra être réalisée en évaluant la concentration minimale inhibitrice pour les souches considérées sensibles au SXT comparativement à celles qui y sont résistantes. Des ajustements sur l'évaluation de la résistance au SXT par les tests d'antibiogrammes doivent être envisagés selon les résultats obtenus. De plus, six souches québécoises montrent une résistance au SXT dont cinq sont aussi résistantes au TMP, mais aucun gène de résistance aux sulfonamides n'a été identifié. Des analyses génétiques devront être réalisées dans le futur pour détecter encore plus efficacement les résistances aux sulfonamides. Entre autres, une résistance chromosomale soit par des mutations sur le gène *folP* qui code pour le DHPS est aussi possible même si elle est moins fréquemment rencontrée et devrait être vérifiée lors de l'analyse de séquences génomiques (Grape, 2006; Huovinen et al., 1995; Skold, 2000; Skold, 2001). De plus, le

gène *sul3* devrait aussi être analysé même s'il n'a pas été identifié chez le genre *Aeromonas* (Perreten and Boerlin, 2003).

5.5.3 Résistance aux tétracyclines

La PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux tétracyclines est 100 % fiable sur les 168 souches testées. Aucun faux positif ni faux négatif n'a été identifié puisque les résultats obtenus avec le disque de tétracycline coïncidaient avec ceux obtenus par PCR multiplex. Aucune amélioration n'est à faire pour l'utilisation dans la trousse pour la détection de la résistance à la tétracycline. Sur un total de 99 souches provenant du Québec, 27 souches (27 %) sont résistantes à cet antibiotique.

5.5.4 Résistance au triméthoprim

Les résultats obtenus par test d'antibiogrammes avec le disque de triméthoprim ne concordent pas avec le résultat obtenu par PCR uniplex. Les deux gènes identifiés dans la littérature (*dfrA16* et *dfrIIc*) n'ont pas été identifiés par PCR dans les cinq souches, toutes du Québec, résistantes au disque de triméthoprim. L'identification d'autres gènes de résistance au triméthoprim sera à privilégier suite au séquençage de souches résistantes au triméthoprim. De plus, en scrutant de façon plus spécifique dans la littérature, d'autres cibles à analyser devront être envisagées. D'autres gènes identifiés chez le genre *Aeromonas* seront à analyser. Parmi ceux-ci, les gènes *dfrA5*, *dfrA12*, *dfrA14*, *dfrA16*, *dfrA28*, *dfrB1*, *dfrB4*, *dfrB7* et *dfrB8* ont été identifiés (Van Hoek et al., 2011). Comme la souche 01-B522 a été séquencée et qu'elle possède une résistance au triméthoprim, il sera possible de faire des analyses BLASTn en alignant la séquence génomique de cette souche avec les gènes identifiés chez le genre *Aeromonas*. Les autres souches montrant une résistance au triméthoprim et qui seront séquencées seront aussi analysées avec BLASTn. Ensuite, selon les résultats obtenus, la création d'amorces ciblant certains gènes devrait être effectuée. Outre les gènes *dfr*, des gènes de résistance situés sur le chromosome peuvent survenir malgré le fait qu'ils soient moins fréquents que ceux conférés par les gènes *dfr* et ceux-ci seraient intéressants à rechercher chez des souches séquencées (Van Hoek et al., 2011). Dans ce cas, la résistance est soit conférée par la perte de l'activité enzymatique de

la thymidylate synthase, soit par la modification dans la structure, par l'expression de porines ou par des mutations dans le gène *folA* codant pour l'enzyme dihydrofolate réductase (Grape, 2006).

5.6 Comparaison des souches ayant un plasmide identifié avec leur lieu géographique

Il y a une corrélation entre les divers plasmides et leur lieu géographique. Le plasmide pSN254b se concentre au Québec et dans les maritimes (Nouveau-Brunswick). Les plasmides pAB5S9b et pRAS3 a été retrouvé seulement dans les maritimes (Nouveau-Brunswick). Les divers variants du plasmide pAsa4 sont plus dispersés: les plasmides pAsa4 et pAsa4c sont retrouvés dans des souches provenant respectivement de France et du reste de l'Europe tandis que le plasmide pAsa4b a été identifié dans des souches québécoises. Suite à cette observation, on peut constater que chaque variant semble se concentrer dans le même lieu géographique. Cette corrélation permet d'évaluer les gènes potentiels de résistance et les plasmides que l'on pourrait rencontrer au Québec. Le plasmide pAsa4b ayant un gène de résistance aux sulfonamides *sulI* et aux tétracyclines *tetA(E)* fait partie des plasmides pouvant être rencontrés au Québec même si seulement trois souches le possèdent (1 souche isolée en 2001 et 2 souches isolées en 2013). Il confère une résistance à deux des trois antibiotiques homologués. Aussi, le plasmide pSN254b résistant aux trois antibiotiques homologués semble être prédominant au Québec et est une menace considérable en pisciculture pour le traitement de la furonculose. Vingt-trois souches québécoises possèdent ce plasmide multirésistant.

CHAPITRE 6- CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus pour les tests d'antibiogrammes n'ont pas été totalement les mêmes que ceux obtenus par le service de diagnostic de la faculté de médecine vétérinaire de Saint-Hyacinthe. Ces incohérences suggèrent l'importance de créer une charte d'interprétation pour l'évaluation de la mesure de zone d'inhibition d'*Assal*. La caractérisation de séquences génomiques a permis d'identifier de nouveaux plasmides méconnus chez cette bactérie comme les plasmides pAB5S9b et pSN254b, deux plasmides conférant des résistances multiples aux trois antibiotiques homologués en pisciculture. Un troisième plasmide inconnu chez *Assal* à ce jour et conférant une résistance multiple aux trois antibiotiques homologués a été identifié chez la souche M16474-11. La découverte de ces plasmides a permis d'identifier de nouveaux gènes de résistance méconnus chez *Assal* tels que les gènes *floR*, *tetA*, *tetH* et *tetG*. L'identification de ces gènes dans quelques souches a permis de les ajouter comme cibles additionnelles dans les PCR multiplex.

La PCR multiplex permet d'identifier plusieurs gènes dans une même réaction PCR. Parmi les quatre PCR multiplex mises au point, trois se sont révélées fiables à 100 % pour l'analyse des souches québécoises. Par contre, les résultats obtenus par la PCR multiplex ciblant les gènes de résistance aux sulfonamides ne concordaient pas avec ceux obtenus par les tests d'antibiogrammes. Étant donné l'absence de charte d'interprétation pour les tests d'antibiogrammes d'*Assal*, la PCR multiplex détectant les résistances aux sulfonamides est plus fiable pour identifier les résistances lorsque celles-ci sont plus faibles. Une première version de la trousse diagnostique a donc été créée. Les quatre PCR multiplex optimisées à l'aide de souches utilisées à titre de contrôles positifs et négatifs permettent de réduire considérablement le temps d'analyse de résistance aux antibiotiques puisqu'actuellement, les analyses sont beaucoup trop longues et celles-ci mettent en péril les cheptels infectés. La détection de résistances aux antibiotiques homologuées nécessitera 4 à 7 jours au lieu de 7 à 10 jours. Cette trousse guidera le vétérinaire à faire le bon choix d'antibiotique à prescrire pour un traitement efficace contre la furonculose. Cette trousse diagnostique sera transférée vers le service de diagnostic de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université

de Montréal dans les prochains mois. En plus de donner une idée sur la résistance aux antibiotiques de certaines souches, il est possible de soupçonner la présence de plasmide existant ou inconnu chez *Assal*. Par exemple, la PCR multiplex a permis de soupçonner et d'identifier la présence du plasmide pAsa4, pAsa4b et pAsa4c dans d'autres souches de la collection analysée grâce à la présence ou l'absence de certains gènes chez celles-ci. Aussi, grâce à ces PCR, on a pu identifier un potentiel nouveau variant du plasmide pAsa4 par la présence d'un seul gène de résistance *tetA(E)* chez cinq souches provenant de l'Ontario ou des États-Unis. Des analyses supplémentaires seront cependant nécessaires pour confirmer le tout.

Suite à la comparaison de certaines souches ayant des plasmides avec leur lieu géographique, on a pu conclure qu'il y avait une corrélation entre les souches possédant le même plasmide et leur provenance. Parmi les observations faites, il a été possible d'affirmer que le plasmide pSN254b semble se concentrer au Québec et au Nouveau-Brunswick tandis que pAB5S9b et pRAS3 ont été trouvés seulement dans des souches provenant du Nouveau-Brunswick. Les plasmides pAsa4, pAsa4b et pAsa4c se différencient aussi par l'endroit où ils ont été identifiés.

En perspective, l'analyse de séquences génomiques d'autres souches devrait être réalisée. Entre autres, des souches présentant des résistances au triméthoprime doivent être séquencées dans le but d'identifier des gènes de résistance à cet antibiotique et d'ajouter ces cibles dans une PCR multiplex. Une connaissance plus approfondie sur les résistances aux SXT et TMP sera primordiale pour l'identification de résistance aux sulfonamides et au triméthoprime sans incohérence entre les résultats observés par PCR multiplex et ceux observés par tests d'antibiogrammes. Des expériences sur la concentration minimale inhibitrice en présence du SMX et du TMP pour des souches ayant un gène *sul*, mais qui sont soit sensibles ou résistantes au disque de SXT aideraient à mieux comprendre les incohérences obtenues. Suivant l'analyse des résultats, une meilleure compréhension des résistances aux sulfonamides et triméthoprime va probablement provoquer des ajustements face à l'interprétation des résultats (modification de l'évaluation des résistances avec les disques de SXT et TMP lors des tests d'antibiogramme par exemple). Ensuite, la création

d'une version optimisée de la trousse de diagnostic pourra être envisagée. De plus, cette trousse pourrait être testée directement sur des poissons infectés pour diminuer encore plus le temps d'analyse. L'étape de la croissance de la bactérie pourrait être enlevée pour tester la PCR à partir des tissus infectés du poisson.

CHAPITRE 7- BIBLIOGRAPHIE

- Adams CA, Austin B, Meaden PG, McIntosh D. Molecular characterization of plasmid-mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonas salmonicida*. *Applied and Environmental Microbiology* (1998) 64:4194-4201.
- Bennett J.E. DR, Blaser M.J. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (2014): Elsevier Health Sciences. 4320 p.
- Bin Kingombe CI, D'Aoust J-Y, Huys G, Hofmann L, Rao M, Kwan J. Multiplex PCR method for detection of three *Aeromonas* enterotoxin genes. *Applied and Environmental Microbiology* (2010) 76:425-433.
- Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (2001) 2nd edn. New York: Springer.
- Boyd J, Williams J, Curtis B, Kozera C, Singh R, Reith M. Three small, cryptic plasmids from *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* A449. *Plasmid* (2003) 50:131-144.
- Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, Boone DR, De Vos P, Goodfellow M, Rainey FA, Schleifer K. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. In: *The Gammaproteobacteria* (2005) United States: Springer. 1106 p.
- Brolund A, Sundqvist M, Kahlmeter G, Grape M. Molecular characterisation of trimethoprim resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a two year intervention on trimethoprim use. *PLoS One* (2010) 5:e9233.
- Brown MG, Mitchell EH, Balkwill DL. Tet 42, a novel tetracycline resistance determinant isolated from deep terrestrial subsurface bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2008) 52:4518-4521.
- Buchmann K, Bresciani J, Pedersen K, Ariel E, Dalsgaard I, Madsen L. *Fish diseases-an introduction* (2009) Denmark: Biofolia. 131 p.
- Charette SJ, Cosson P. Preparation of genomic DNA from *Dictyostelium discoideum* for PCR analysis. *Biotechniques* (2004) 36:574-575.
- Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (2001) 65:232-260.
- Cipriano RC. Resistance of Salmonids to *Aeromonas salmonicida*: Relation between Agglutinins and Neutralizing Activities. *Transactions of the American Fisheries Society* (1983) 112:95-99.

- CLSI CaLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Tests, as used in Clinical Laboratories (2007). 177 p.
- Daher RK. Heat-induced of rearrangement of the pAsa5 plasmid of *Aeromonas salmonicida* is associated with loss of virulence. In: Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique (2010) Québec: Université Laval. 88 p.
- Dallaire-Dufresne S, Tanaka KH, Trudel MV, Lafaille A, Charette SJ. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary Microbiology* (2014) 169:1-7.
- Dixon BA. The biology of antibiotic resistance. *World Aquaculture* (2001) 32:63-65.
- Eiras C. J, Segner, H., Wahli, T., Kapoor, B.G. *Fish diseases* (2008) New Hampshire: Science Publishers. 612.
- Elis AE. *Fish vaccination* (1988): Academic Press Limited. 255 p.
- Gordon L. Complete sequence of the floR-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2008) 62:65-71.
- Grape M. Molecular Basis for Trimethoprim and Sulphonamide Resistance in Gram Negative Pathogens. In: *Microbiology and Tumor Biology Center (MTC)* (2006) Stockholm: Karolinska Institutet. 79 p.
- Han JE, Kim JH, Choresca CH, Jr., Shin SP, Jun JW, Chai JY, Park SC. Prevalence of tet gene and complete genome sequencing of tet gene-encoded plasmid (pAHH01) isolated from *Aeromonas* species in South Korea. *Journal of Applied Microbiology* (2012) 112:631-638.
- Hecker SJ, Pansare SV, Glinka TW. Florfenicol prodrug having improved water solubility. Brevet américain #EP 1696934 B1.(2013), U.S. Patent and Trademark Office.
- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* (1997) 23:504-511.
- Hiney M, Olivier G. Furunculosis (*Aeromonas salmonicida*). In: *Fish Diseases and Disorders III: Viral, Bacterial and Fungal Infections*--Woo P, Bruno D, eds. (1999) Oxford: CAB publishing 341-425.
- Huovinen P, Sundstrom L, Swedberg G, Skold O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1995) 39:279-289.
- IDT IDT. What should I be concerned about when designing multiplex qPCR assays? (2014) <http://www.idtdna.com/pages/support/technical-vault/faq/application/pcr-qpcr/what-should-i-be-concerned-about-when-designing-multiplex-qpcr-assays->.

- Janda JM, Abbott SL. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews* (2010) 23:35-73.
- Jullien N. AmplifX XXX [1.7.0] (2013) <http://crn2m.univ-mrs.fr/pub/amplifx-dist>.
- Kalendar R, Lee D, Schulman AH. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics* (2011) 98:137-144.
- Kalendar R, Lee D, Schulman AH. FastPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Methods in Molecular Biology* (2014) 1116:271-302.
- Kearse M, Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. . Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* (2012) 28:1647-1649.
- Kim JH, Hwang SY, Son JS, Han JE, Jun JW, Shin SP, Choresca C, Jr., Choi YJ, Park YH, Park SC. Molecular characterization of tetracycline- and quinolone-resistant *Aeromonas salmonicida* isolated in Korea. *Journal of Veterinary Science* (2011) 12:41-48.
- Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* (2007) 23:1289-1291.
- L'Abee-Lund TM, Sorum H. Functional Tn5393-like transposon in the R plasmid pRAS2 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* isolated in Norway. *Applied and Environmental Microbiology* (2000) 66:5533-5535.
- L'Abee-Lund TM, Sorum H. Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease* (2001) 7:263-272.
- L'Abee-Lund TM, Sorum H. A global non-conjugative Tet C plasmid, pRAS3, from *Aeromonas salmonicida*. *Plasmid* (2002) 47:172-181.
- Lafaille A. Rapport des activités en Ichtyopathologie du 1er avril 2011 au 31 décembre 2011. In: Service de diagnostic en Ichtyopathologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal (2012) Saint-Hyacinthe. 18 p.
- Lafaille A. Rapport des activités en Ichtyopathologie du 1er janvier 2012 au 31 décembre 2012. In: Service de diagnostic en Ichtyopathologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal (2013) Saint-Hyacinthe. 20 p.

- Lafaille A. Rapport des activités en Ichtyopathologie du 1er janvier 2013 au 31 décembre 2013. In: Service de diagnostic en Ichtyopathologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal (2014) Saint-Hyacinthe. 21 p.
- MAPAQ. Guide: Élevage des salmonidés (1997). 90 p.
- MAPAQ. Aquaculture (2011)
<http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Peche/aquaculture/Pages/aquaculture.aspx>.
- Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* (2002) 16:47-51.
- Mascaretti OA. Bacteria versus antibacterial agents: an integrated approach (2003)
 Washington D.C.: ASM Press. 393 p.
- McIntosh D, Cunningham M, Ji B, Fekete FA, Parry EM, Clark SE, Zalinger ZB, Gilg IC, Danner GR, Johnson KA, Beattie M, Ritchie R. 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2008) 61:1221-1228.
- McMurry LM, George AM, Levy SB. Active efflux of chloramphenicol in susceptible *Escherichia coli* strains and in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1994) 38:542-546.
- Mendes-Marques CL, Hofer E, Leal NC. Development of duplex-PCR for identification of *Aeromonas* species. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* (2013) 46.
- Morin R. Les produits de traitements utilisés en pisciculture, À quoi servent-ils? Lesquels sont permis et lesquels ne le sont pas? *L'aquicole* (2007) 12:3-16.
- Morin R. L'utilisation des antibiotiques pour combattre la furonculose chez l'omble de fontaine génère de l'antibiorésistance chez *Aeromonas salmonicida*. *L'aquicole* (2010) 15:2-6.
- Morin R, Uhland C, Lévesque G. L'utilisation des antibiotiques en pisciculture au Québec. *L'aquicole* (2004) 9:5-15.
- Pêches et Océans Canada C. L'aquaculture au Canada: Faits et chiffres (2009)
<http://www.dfo-mpo.gc.ca/aquaculture/ref/stats/aqua-ff-fc-2009-fra.htm>.
- Pêches et Océans Canada C. Aquaculture (2013a) <http://www.dfo-mpo.gc.ca/stats/aquaculture-fra.htm>.

- Pêches et Océans Canada C. Production aquacole du Canada en 2013 (2013b)
<http://www.dfo-mpo.gc.ca/stats/aqua/aqua13-fra.htm>.
- Perreten V, Boerlin P. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2003) 47:1169-1172.
- Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, Ehricht R, Kuhnert P, Frey J. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* (2005) 43:2291-2302.
- Rasch M, Kastbjerg VG, Bruhn JB, Dalsgaard I, Givskov M, Gram L. Quorum sensing signals are produced by *Aeromonas salmonicida* and quorum sensing inhibitors can reduce production of a potential virulence factor. *Diseases of Aquatic Organisms* (2007) 78:105-113.
- Reith ME, Singh RK, Curtis B, Boyd JM, Bouevitch A, Kimball J, Munholland J, Murphy C, Sarty D, Williams J, Nash JHE, Johnson SC, Brown LL. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics* (2008) 9:427.
- Rhodes G, Huys G, Swings J, McGann P, Hiney M, Smith P, Pickup RW. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Applied and Environmental Microbiology* (2000) 66:3883-3890.
- Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews* (1996) 19:1-24.
- Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* (2005) 245:195-203.
- Rychlik W. OLIGO 7 primer analysis software. *Methods in Molecular Biology* (2007) 402:35-60.
- Sandaa RA, Enger O. Transfer in marine-sediments of the naturally-occurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic-resistance. *Applied and Environmental Microbiology* (1994) 60:4234-4238.
- Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews* (2004) 28:519-542.

- Sen K. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. *Canadian Journal of Microbiology* (2005) 51:957-966.
- Shen Z, Qu W, Wang W, Lu Y, Wu Y, Li Z, Hang X, Wang X, Zhao D, Zhang C. MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. *BMC Bioinformatics* (2010) 11:143.
- Skold O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates* (2000) 3:155-160.
- Skold O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research* (2001) 32:261-273.
- Sorum H, L'Abee-Lund TM, Solberg A, Wold A. Integron-containing IncU R plasmids pRAS1 and pAr-32 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2003) 47:1285-1290.
- Untergrasser A CI, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* (2012) 40:e115.
- Vallone PM, Butler JM. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques* (2004) 37:226-231.
- Van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology* (2011) 2:203.
- Vincent AT, Trudel MV, Paquet VE, Boyle B, Tanaka KH, Dallaire-Dufresne S, Daher RK, Frenette M, Derome N, Charette SJ. Detection of variants of the pRAS3, pAB5S9, and pSN254 plasmids in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: multidrug resistance, interspecies exchanges, and plasmid reshaping. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2014) 58:7367-7374.
- Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF, White DG, Rosso ML, Rasko DA, Mammel MK, Eppinger M, Rosovitz MJ, Wagner D, Rahalison L, Leclerc JE, Hinshaw JM, Lindler LE, Cebula TA, Carniel E, Ravel J. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS One* (2007) 2:e309.

CHAPITRE 8- ANNEXE

Tableau 8. Liste des souches utilisées dans l'étude avec leur résistance aux antibiotiques

Souche	Provenance ^a	Résistances selon les tests d'antibiogrammes ^b	Gènes présents selon la PCR multiplex ^c	Plasmide(s) ayant des résistances aux antibiotiques
1. 01-B522	Québec (9)	SXT, TET, TMP	<i>sul1</i> , <i>tetA(E)</i>	pAsa4b
2. 01-B526	Québec (10)	-	-	-
3. 01-B516	Québec (15)	-	-	-
4. 866 HER1098	États-Unis	-	-	-
5. 35-69 HER1110	Japon	-	-	-
6. HER1108	Danemark	-	-	-
7. HER1104	France, souche 132-66 = RS595	-	-	-
8. HER1085	Norvège	-	-	-
9. HER1084	France	-	-	-
10. HER1107	-	TET	<i>sul1</i> , <i>tetA(E)</i>	pAsa4b
11. A449	France	STR, TET, CHL	<i>cat</i> , <i>sul1</i> , <i>tetA(E)</i>	pAsa4
12. 07-9324	Québec (9)	TET, AMP, STR, CHL, FFC	<i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	pSN254b
13. 07-7817	Québec (9)	TET, AMP, STR, CHL, FFC	<i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	pSN254b
14. 07-7346	Québec (19)	-	-	-
15. 07-5957	Québec (19)	NAL	-	-
16. 08-2647	Québec (9)	TET, AMP, STR, SXT, CHL, FFC	<i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	pSN254b
17. 09-0167	Québec (19)	NAL	-	-
18. 07-7287	Québec (5)	TET, AMP, STR, CHL, FFC	<i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	pSN254b
19. 08-2783	Québec (5)	TET, AMP, STR, CHL, FFC	<i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	pSN254b

20. 08-4188	Québec (9)	TET, AMP, STR, CHL, FFC	<i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	pSN254b
21. A449 GFP	France (A449)	TET, AMP, STR, CHL	<i>cat</i> , <i>sul1</i> , <i>tetA</i> (E)	pAsa4
22. 5093-3	Québec, Région?	-	-	-
23. 5093-4	Québec, Région?	-	-	-
24. 5490-1	Québec, Région?	-	-	-
25. 5490-2	Québec, Région?	-	-	-
26. 5490-4	Québec, Région?	-	-	-
27. 5490-5	Québec, Région?	-	-	-
28. 5704-1	Québec, Région?	-	-	-
29. 5704-2	Québec, Région?	-	-	-
30. 5704-4	Québec, Région?	-	-	-
31. 5704-5	Québec, Région?	-	-	-
32. 5704-6	Québec, Région?	-	-	-
33. 5704-3	Québec, Région?	-	-	-
34. m17524-09	Québec (9)	-	-	-
35. m14349-09	Québec (9)	TET, STR, CHL, FFC	<i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	pSN254b
36. m23281-09	Québec (14)	-	-	-
37. m23067-09	Québec (18)	-	-	-
38. m19438-09	Québec (9)	-	-	-
39. m16583-09	Québec (9)	-	-	-
40. m14231-09	Québec (19)	-	-	-
41. m11743-09	Québec (5)	-	-	-
42. m11431-09	Québec (5)	-	-	-
43. m10419-09	Québec (5)	-	-	-

44. m9906-09	Québec (5)	TET, STR, CHL, FFC	<i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	pSN254b
45. m9954-10	Québec (9)	-	-	-
46. m8029-10	Québec (9)	-	-	-
47. m11603-10	Québec (9)	-	-	-
48. m6363-10	Québec (18)	-	-	-
49. m9221-10	Québec (18)	-	-	-
50. 2009-178 K9	Mactaquac, NB	STR, ERY	-	-
51. 2009-157 K5	Charlo, NB	STR, TET, ERY	<i>tetA</i> (C)	pRAS3
52. 2010-47 K18	Miramichi, NB	STR, TET, CHL, FFC	<i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tetH</i> , <i>tetA</i> (C)	pAB5S9b, pRAS3
53. 2004-05 MF26	Baie de Fundy, NB	STR, SXT, NAL, AMP, TET, CHL, FFC, ERY, GEN	<i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	pSN254b
54. 2004-68 K52	Bailey's Brook, NS	STR, SXT, NAL, AMP, TET, CHL, FFC,	<i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	pSN254b
55. 2009-195 K29	Miramichi, NB	STR, TET, ERY	<i>tetA</i> (C)	pRAS3
56. 2005-70	West Coast	STR, ERY, GEN	-	-
57. 2009-144 K3	Miramichi, NB	STR, SXT, TET, ERY, CHL, FFC	<i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tetH</i> , <i>tetA</i> (C)	pAB5S9b, pRAS3
58. 2005-175 K2	Little Main Restigouche River, NB	STR, ERY	-	-
59. 2004-208	-	STR, ERY	-	-
60. M10935-11	Québec (9)	-	-	-
61. M15448-11	Québec (9)	STR, AMP, TET, CHL, FFC	<i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>tetG</i>	Nouveau plasmide
62. M16474-11	Québec (9)	STR, AMP, TET, ERY, CHL, FFC	<i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>tetG</i>	Nouveau plasmide
63. M19878-11	Québec (9)	STR, SXT, ERY, TMP	-	-
64. M11500-11	Québec (15)	-	-	-
65. M16486-11	Québec (15)	-	-	-

66. M13460-11	Québec (3)	-	-	-
67. M13729-11	Québec (3)	-	-	-
68. M14481-11	Québec (4)	STR, SXT, AMP, TET, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b
69. M15879-11	Québec (4)	STR, SXT, AMP, TET, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b
70. M17739-11	Québec (4)	STR, SXT, AMP, TET, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b
71. M13732-11	Québec (5)	STR, AMP, TET, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b
72. M17053-11	Québec (5)	STR, AMP, TET, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b
73. M15878-11	Québec (4)	-	-	-
74. M13182-11	Québec (18)	-	-	-
75. M17735-11	Québec (18)	-	-	-
76. M15576-11	Québec (9)	-	-	-
77. M15469-11	Québec (9)	STR, AMP, TET, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b
78. M22710-11	Québec (5)	-	-	-
79. M13764-11	Québec (14)	STR	-	-
80. M18076-11	Québec (3)	STR, AMP	-	-
81. M23911-11	Québec (9)	-	-	-
82. JF2267	Suisse	CHL	<i>cat, sul1</i>	pAsa4c
83. RS 1458	Ganaraska River, Ontario	STR, TET	<i>tetA(E)</i>	Variant de pAsa4 soupçonné
84. RS 1706	Credit River, Ontario	-	-	-
85. RS 1835	Credit River, Ontario	-	-	-
86. RS 530	Angleterre, Pays de Galles	-	-	-
87. RS 595	souche RS595 = HER1104	-	-	-
88. RS 534	France	STR, TET, ERY, CHL	<i>cat, sul1, tetA(E)</i>	pAsa4

89. RS 1752	Mississippi Lake, Ontario	-	-	-
90. RS 1705	Tarentorus Fish Culture Station, Sault Ste-Marie, Ontario	-	-	-
91. RS 1744	Credit River, Ontario	-	-	-
92. RS 887	Kamchatka west coast, Russie	STR, ERY, GEN	-	-
93. M12357-12	Québec (9)	STR, SXT, AMP, TET, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b
94. M21375-12	Québec (18)	STR	-	-
95. M16237-12	Québec (18)	STR	-	-
96. M12976-12	Québec (15)	STR	-	-
97. M22895-12	Québec (14)	STR	-	-
98. M10745-12	Québec (9)	STR, AMP, TET, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b
99. M9754-12	Québec (14)	-	-	-
100. M17930-12	Québec (5)	TMP	-	-
101. M12418-12	Québec (9)	-	-	-
102. M21368-12	Québec (10)	-	-	-
103. M13050-12	Québec (15)	NAL, STR, AMP, TET, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b
104. M24783-12	-	NAL	-	-
105. M13566-12	Québec (4)	STR, SXT, AMP, TET, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b
106. M14404-12	Québec (18)	-	-	-
107. M16671-12	Québec (15)	-	-	-
108. M16042-12	Québec (4)	STR, SXT, AMP, TET, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b
109. JF2506	Norvège	-	-	-
110. JF2507	Western Écosse	-	-	-
111. JF2510	Norvège	NAL	-	-

112. JF3224	river, Suisse	-	-	-
113. JF3327	Suisse	-	-	-
114. JF3496	Rivière, Suisse	-	-	-
115. JF3517	Norvège	NAL, STR, CHL	<i>cat</i> , <i>sul1</i>	pAsa4c
116. JF3518	Norvège	NAL, STR, CHL	<i>cat</i> , <i>sul1</i>	pAsa4c
117. JF3844	Aquaculture dans Rubigen, Suisse	-	-	-
118. JF2869	-	CHL	<i>cat</i> , <i>sul1</i>	pAsa4c
119. JF3223	Suisse	NAL	-	-
120. JF3507	Angleterre, Pays de Galles	-	-	-
121. JF3519	Suisse	NAL	-	-
122. JF3791	Suisse	STR, CHL	Gène <i>cat</i> méconnu	Variante de pAsa2
123. JF4111	Suisse	-	-	-
124. JF4112	Suisse	-	-	-
125. JF4113	Suisse	-	-	-
126. JF4114	Suisse	-	-	-
127. As5	Little Manistee River Weir, Michigan	-	-	-
128. As10	Little Manistee River Weir, Michigan	-	-	-
129. As12	Little Manistee River Weir, Michigan	STR, TET	<i>tetA(E)</i>	Variante de pAsa4 soupçonné
130. As14	Little Manistee River Weir, Michigan	-	-	-

131. As16	Little Manistee River Weir, Michigan	-	-	-
132. As19	Little Manistee River Weir, Michigan	STR, TET	<i>tetA</i> (E)	Variant de pAsa4 soupçonné
133. As26	Plate River Weir, Michigan	-	-	-
134. As34	Plate River Weir, Michigan	-	-	-
135. As37	Plate River State Fish Hatchery, Michigan	-	-	-
136. As38	Newaygo County, Michigan	-	-	-
137. As8	Little Manistee River Weir, Michigan	-	-	-
138. As20	Little Manistee River Weir, Michigan	STR, TET	<i>tetA</i> (E)	Variant de pAsa4 soupçonné
139. As29	Plate River Weir, Michigan	-	-	-
140. As30	Plate River Weir, Michigan	-	-	-
141. As41	St Mary's River, Michigan	-	-	-
142. As43	Alcona County, Michigan	-	-	-
143. As44	Gogebic County, Michigan	-	-	-
144. As49	St Mary's River,	-	-	-

	Michigan			
145. 050906-1 4Les	Platte River State Fish Hatchery, Michigan	-	-	-
146. 060921-1 13As	Little Manistee River Weir, Michigan	STR, TET	<i>tetA(E)</i>	Variant de pAsa4 soupçonné
158. SHY13-162	Québec (18)	-	-	-
159. SHY13-574	Québec (18)	-	-	-
160. SHY13-1470	Québec (15)	-	-	-
161. SHY13-2188	Québec (9)	STR, SXT, AMP, TET, TMP, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b
162. SHY13-2222	Québec (18)	SXT	-	-
163. SHY13-2257	Québec (14)	-	-	-
164. SHY13-2263	Québec (15)	-	-	-
165. SHY13-2317	Québec (4)	-	-	-
166. SHY13-2425	Québec (5)	-	-	-
167. SHY13-2458	Québec (9)	STR, SXT, AMP, TET, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b
168. SHY13-2534	Québec (19)	NAL	-	-
169. SHY13-2627	Québec (15)	TET	<i>sul1, tetA(E)</i>	pAsa4b
170. SHY13-2630	Québec (9)	STR, SXT, AMP, TET, TMP, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b
171. SHY13-2825	Québec (4)	-	-	-
172. SHY13-2873	Québec (5)	-	-	-
173. SHY13-2909	Québec (15)	-	-	-
174. SHY13-3101	Québec (5)	-	-	-
175. SHY13-3127	Québec (9)	-	-	-
176. SHY13-3795	Québec (5)	STR, AMP, TET, CHL, FFC	<i>floR, sul1, sul2, tetA</i>	pSN254b

177. SHY13-3798	Québec (15)	-	-	-
178. SHY13-3799	Québec (15)	TET	<i>sulI</i> , <i>tetA(E)</i>	pAsa4b

- a. Les chiffres entre parenthèses indiquent la région piscicole où la souche provient au Québec.
- b. Certains de ces résultats se retrouvent également dans le mémoire de Rana Daher (Daher, 2010) puisqu'elle avait effectué des tests d'antibiogrammes sur 20 souches. Stéphanie Dallaire-Dufresne et Katherine Tanaka ont analysé 23 souches et Mathilde Goldsmith a testé 20 souches. J'ai fait l'analyse des 105 autres souches.
- c. Surligné en jaune: gène présent selon la PCR multiplex mais sensible à l'antibiogramme testé.

Tableau 9. Souches d'autres espèces d'*Aeromonas* ou de sous-espèces d'*A. salmonicida* utilisées dans cette étude.

Souches bactériennes analysées	Provenance
<i>Aeromonas sobria</i> JF2635	Suisse
<i>Aeromonas veronii</i> JF3071; ATCC51106	-
<i>Aeromonas molluscorum</i> JF3328	-
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> JF2997	Islande
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> JF3115	-
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> JF3116	Écosse
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> JF3499	Islande
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> JF3118	Japon
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i> JF3120	River water
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i> JF4097	Australie
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i> JF4460	Australie

Tableau 10. Amorces utilisées dans l'étude

Nom de l'amorce	Séquence 5'-3'	Tm (°C)	Taille de l'amplicon (pb)
Identification du plasmide pAB5S9 et pAB5S9b			
ORF101-strB_F1 ^a	CTCGTGAATGTCGGTATCCTGTCT	57,4	1994
ORF101-strB_R1 ^a	CTCGGTCGTGAGAACAATCTGATG	57,4	
parA-resA_F1	CGTCAATGATGATGTGGTCGTACC	57,6	458
parA-resA_R1	CTGATCGACCAGGAAGGCTATAGC	58,7	
ORF397-tnp_F1	TGTTAGCACTCGGTTGCCTTCGAT	57,4	1107
ORF397-tnp_R1	GACATACACACCGTTCGAGAAACAG	57,4	
Identification du plasmide pSN254 et pSN254b			
tnp-urf2_F1 ^b	CATTTTCGGTCGACCATACGACGATC	59,3	1340
tnp-urf2_R1 ^b	CTGCGTGTGCTGCAAGGAAATCC	58,8	
traC_F1	CTACGACAATGGCTTGATCCAAGAC	57,7	796
traC_R1	GTACAGAATGGCAGGCAGTTGAGG	59,1	
ORF1417_F1	CGAGACCTTCCCTTTTACTGATGC	57,4	700
ORF1417_R1	CAGACAGAGGACGAGTTGTAGAAC	57,4	
Résistance au triméthoprime créées avec MPprimer (<i>dfrA16</i>) et Primer3 (<i>dfrIIc</i>)			
MT-dfrA16_0_285_F1	TGGCTGCCAAGTCGAAGAACGG	62,1	285
MT-dfrA16_0_285_R1	CACCACCACCAGAAACGATAACATG A	59	
MT-dfrIIc-F1	TGGACCAACACAACAATGGAG	55,5	161
MT-dfrIIc-R1	GCCTTCAGGGGTCAGTTTGTG	56,4	
Résistance au chloramphénicol créées avec MPprimer			
MT-ctrl-chloram_0_145_F2	TTTCCCCATGTCGCCAAGCAGC	62,9	145
MT-ctrl-chloram_0_145_R2	AAGCATTTCGGATGGTCCGCC	62,5	
MT-catA2_0_249_F2	TTCTCTGCACTGTCCTGCCGTT	61,1	249
MT-catA2_0_249_R2	TACGCGGTCACCTTCCTGCTGA	62,7	
MT-cat_0_402_F2	ACACGAAGAGTTCAGGACGGCA	60,7	402
MT-cat_0_402_R2	ACATGAAAGCCATCACAAACGGCA	59,9	
MT-floR_0_564_F2	CGGCCTTTGTGCTTTCCTCT	62,3	564
MT-floR_0_564_R2	CGCAAACAAGCAACGCCATCCC	62,2	
Résistance au chloramphénicol créée avec Primer3			
MT-ctrl-chloram-F1	GCTTACCTCAGATAATGAGTCGTC	54,8	172
MT-ctrl-chloram-R1	GCCAATAAGAGCCCTACTCTTC	55	
MT-catA2-F1	AAACATTCTCTGCACTGTCCTG	55,3	297
MT-catA2-R1	CATCACAGACTGCATGATGAAC	54	
MT-cat-F1	CTATTTTGACAATACGCCCTGC	54,3	448
MT-cat-R1	CTTCCCAAACGTAATATCGGC	54	
MT-floR-F1	TTGAGCCTCTATATGGTGATGC	54,4	632
MT-floR-R1	GTTGTCACGATCATTACAAGCG	54,3	

Résistance au sulfonamide créée avec Primer3			
MT-ctrl_sul-F1	TTCATTTCGTCTTGGGTCTAGC	54,8	175
MT-ctrl_sul-R1	GGACTACAGATCTACCATAATCCG	54	
MT-sul1-F1	GGGCTACCTGAACGATATCC	54,7	550
MT-sul1-R1	CTAGGCATGATCTAACCTCG	54,4	
MT-sul2-F1	ATCATCTGCCAAACTCGTCG	55,2	449
MT-sul2-R1	TTCTTGCGGTTTCTTTCAGC	53,9	
Résistance à la tétracycline créée avec Primer3			
MT-ctrltet1-F1	CCAGAATGACGAATTGAATGTCG	54,3	175
MT-ctrltet1-R1	GGACCTCTTACTCCAGTCG	54,4	
MT-tetA(E)pAsa4-F1	GATGTCACACCTGAGGAATCC	55,1	351
MT-tetA(E)pAsa4-R1	TCCGAATAAAACCCATAATGTTGC	53,9	
MT-tetApSN54b-F1	CAAGCAGGATGTAGCCTGTG	55,9	526
MT-tetApSN54b-R1	ATTGCCGATATCACTGATGG	52,4	
MT-ctrltet2-F1	ATTCATTTCGTCTTGGGTCTAGC	55	176
MT-ctrltet2-R1	GGACTACAGATCTACCATAATCCG	54	
MT-tetHpAB5S9b-F1	ACGACTGTCTGATAAATACGGC	54,6	326
MT-tetHpAB5S9b-R1	ATATCGAGTGTGAAATAGCGGC	54,9	
MT-tetGs62-F1	GGTTCGCATCAAACCATTCG	54,8	460
MT-tetGs62-R1	GCTTAGATTGGTGAGGCTCG	55,6	
MT-tetA(C)pRAS3-F1	CTGTAGGCATAGGCTTGGTTAT	54,4	629
MT-tetA(C)pRAS3-R1	CTGTCCTACGAGTTGCATGATA	54,1	

a. La paire d'amorces ORF101-strB a été créée pour donner des amplicons de différentes tailles pour pAB5S9 et pAB5S9b.

b. La paire d'amorces tnp-urf2 a été créée spécifiquement pour pSN254b.