



# **Investigation des éléments génomiques impliqués dans la perte de virulence d'*Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* suite à un stress thermique**

**Mémoire**

**Pierre-Étienne Marcoux**

**Maîtrise en microbiologie - avec mémoire**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Pierre-Étienne Marcoux, 2021

**Investigation des éléments génomiques impliqués dans la  
perte de virulence d'*Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*  
suite à un stress thermique**

**Mémoire**

**Pierre-Étienne Marcoux**

Sous la direction de :

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

## Résumé

*Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* est l'agent étiologique de la furonculose chez les salmonidés, spécialement les poissons d'élevage. Les pertes économiques pour l'aquaculture au Québec liées à cette maladie sont considérables. En raison des traitements par antibiotiques, on observe une émergence de souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* résistantes aux antibiotiques. C'est pourquoi différentes alternatives, dont la vaccination, sont étudiées afin de prévenir la furonculose. Généralement, les vaccins utilisés injectent des bactéries mortes. En revanche cette méthode peut être laborieuse et inefficace.

Ce projet s'intéresse au développement de souches vivantes atténuées qui pourraient être utilisées comme vaccin dans les piscicultures. Des études antérieures ont démontré que la virulence de la bactérie pouvait être atténuée lorsqu'exposée à un stress. Cela est expliqué par la perte des gènes du système de sécrétion de type trois (SSTT), qui ont un rôle essentiel dans la virulence de la bactérie. Cependant, le mécanisme reste encore inconnu et conséquemment, ce projet avait comme principal objectif d'identifier et caractériser les différents éléments génomiques pouvant contribuer à l'instabilité du SSTT.

Tout d'abord, plusieurs souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* ont été cultivées à 25 °C, ce qui est supérieur à leur température optimale de 18 °C. Les résultats ont révélé que certaines souches pouvaient perdre leur SSTT, mais que d'autres étaient réfractaires à la délétion des gènes malgré leur exposition à un stress. Une analyse génomique de ces différentes souches a permis d'identifier la présence d'un regroupement de gènes qui semble jouer un rôle dans l'instabilité du SSTT. Ces gènes sont retrouvés en majorité chez les souches sensibles et ils sont absents pour les souches réfractaires. Ce regroupement de gènes sera étudié en vue de créer des souches atténuées à partir de souches réfractaires. Ces souches seront ensuite testées sur les poissons pour déterminer l'efficacité de cette approche vaccinale contre la furonculose.

## Abstract

*Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* is the causative agent of furunculosis in salmonids, especially in farmed fish. The economic losses for aquaculture in Quebec related to this disease are considerable. As a result of antibiotic treatments, there is the emergence of antibiotic-resistant strains of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. This is why different alternatives, including vaccination, are being studied to prevent furunculosis. Historically, the vaccines used are composed of dead bacteria. However, this method can be laborious and inefficient.

This project is interested in the development of live attenuated strains that could be used as a vaccine in fish farms. Previous studies have shown that the virulence of the bacteria can be reduced when exposed to stress. This is explained by the loss of the genes of the type three secretion system (TTSS), which is essential in the virulence of the bacteria. However, the mechanism is still not fully understood and consequently the main objective of this project was to identify and characterize the different genomic elements that can contribute to the instability of TTSS.

First, several strains of *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* were grown at 25 ° C, which is above their optimum temperature of 18 ° C. The results revealed that some strains could lose their TTSS, but others were resistant to gene deletion despite their exposure to stress. Genomic analysis of these different strains identified the presence of a cluster of genes that appears to play a role in the instability of TTSS. These genes are found mostly in sensitive strains and they are absent in refractory strains. This cluster of genes will be studied to create attenuated strains from refractory strains. These strains will then be tested on fish to determine the effectiveness of these strains as a vaccine approach against furunculosis.

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract .....	iii
Table des matières .....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations .....	viii
Remerciements.....	xi
Avant-propos.....	xiii
Introduction .....	1
<b>Chapitre 1 – Mise en contexte .....</b>	<b>4</b>
1.1 Furonculose .....	4
1.2 <i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i> .....	5
1.3 Système de sécrétion de type trois .....	7
1.4 Génome d’ <i>A. salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i> .....	9
1.4.1 Les séquences d’insertions .....	11
1.4.2 Les îlots génomiques d’ <i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i> ( <i>AsaGEI</i> ) .....	12
1.4.3 Les prophages.....	14
1.5 Plasticité du génome : .....	14
1.6 Traitement actuel contre la furunculose : .....	17
1.7 Hypothèses et objectifs .....	18
<b>Chapitre 2 - Analyse systémique de l’instabilité du système de sécrétion de type trois pour <i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i>.....</b>	<b>20</b>
2.1 Résumé.....	20
Systematic Analysis of the Stress-Induced Genomic Instability of Type Three Secretion System in <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> .....	21
2.2 Abstract .....	22
2.3 Introduction .....	23
2.4 Materials and Methods.....	26
2.4.1 Bacterial strains and regular growth conditions .....	26
2.4.2 Production of TTSS-rearranged strains .....	26
2.4.3 PCR multiplex.....	26
2.4.4 Comparative genomics .....	27
2.4.5 PCR analyses for genotyping .....	27

2.5 Results .....	27
2.6. Discussion .....	34
2.7. Conclusions .....	36
2.8 References .....	38
<b>Chapitre 3 – Discussion .....</b>	<b>42</b>
3.1 <i>Inoviridae</i> .....	42
3.2 <i>AsaGEI2a</i> sans prophage 3 .....	44
3.3 Vaccination .....	46
<b>Conclusion .....</b>	<b>50</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>52</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1. Les différentes régions géographiques associées aux types d' <i>AsaGEI</i> retrouvés chez <i>A. salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i> .....	13
Tableau 2. Les différents antibiotiques homologués utilisés en aquaculture au Canada et le nombre de prescriptions des traitements au cours des dernières années .....	17
Table 3. Strains of <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> which have already lost the genes encoding TTSS before their inclusion in our strain collection or which have lost it in the laboratory following incubation at 25 °C. ....	28
Table 4. Correlation between the presence of the ASA_2927 to ASA_2933 genes and certain groups of <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> . ....	33

## Liste des figures

Figure 1. Production aquacole mondiale d'animaux aquatiques et d'algues entre 1990 et 2018. ....	1
Figure 2. Poisson infecté par la furunculose.....	4
Figure 3. Représentation du système de sécrétion de type trois de la bactérie <i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i> . ....	9
Figure 4. Représentation linéaire du plasmide pAsa5 d' <i>A. salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i> pour la souche 01-B526. ....	10
Figure 5. Schéma d'une séquence d'insertion et son intégration dans l'ADN cible. ....	12
Figure 6. Représentation schématique de la recombinaison homologue de pAsa5 entre deux séquences d'insertion.....	16
Figure 7. (A) Schematic representation of three recombination patterns of pAsa5 according to the ISs present on the plasmid. (B) An example of the PCR multiplex result from the SHY14-2246 strain, which contains an unaltered pAsa5 plasmid (TTSS +) and a strain that has lost its TTSS genes (TTSS -) generated from SHY16-3432 parental strain. ....	24
Figure 8. Systematic analysis of the TTSS locus loss in Canadian strains of <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> after incubation at 25 °C for two consecutive periods of 3 days. ....	30
Figure 9. Map of the chromosomal region of the A449 strain where the ASA_2927 to ASA_2933 genes are found. ....	31
Figure 10. PCR amplification of the region that contains the gene cluster. ....	32
Figure 11. Schéma d'interactions possibles pour la perte du SSTT à partir des différents gènes identifiés au cours du projet. ....	45



## Liste des abréviations

ADN / DNA	Acide désoxyribonucléique / <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ARN / RNA	Acide ribonucléique / <i>Ribonucleic acid</i>
<i>AsaGEI</i>	Îlots génomiques d' <i>Aeromonas salmonicida</i> / <i>A. salmonicida genomic islands</i>
DR	Répétition directe / <i>Direct repeat</i>
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture / <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GCAT	Glycérophospholipide-cholestérol acyltransférase / <i>Cholesterol acyl-transferase</i>
GEI	Îlots génomiques / <i>Genomic islands</i>
kDa	Kilodalton
kpb / kbp	Kilopaires de bases / <i>Kilobase pairs</i>
LPS	Lipopolysaccharide
IS	Séquence d'insertion / <i>Insertion sequence</i>
IR	Inversion répétée / <i>Inverted repeat</i>
MAPAQ	Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PacBio	Pacific Biosciences
pb	Paire de bases / <i>Base pair</i>
PCR	Réaction en chaîne par polymérase / <i>Polymerase chain reaction</i>
SMRT	Molécule unique en temps réel / <i>Single molecule real-time</i>
ssp. /subsp.	Sous-espèce / <i>Subspecies</i>
SSTT / TTSS	Système de sécrétion de type trois / <i>Type three secretion system</i>

*À mes parents*

*Sometimes I'll start a sentence and I don't  
even know where it's going.  
-Michael Scott (Season 5, The Duel)*

## Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Steve, mon directeur de recherche. Merci d'avoir toujours cru en moi. Je ne pouvais pas tomber sur un meilleur directeur de recherche. Tu as une approche pédagogique incroyable et grâce à toi j'ai pu apprendre à repousser mes limites. Ta curiosité pour la recherche est contagieuse et j'ai déjà hâte de voir ce que l'avenir de la recherche nous réserve. Merci d'avoir pris le temps de m'épauler à travers toutes les étapes de ma maîtrise.

Merci aussi à tous les membres du laboratoire Charette que j'ai pu côtoyer lors de ma maîtrise: William, Cynthia, Alicia, Nava, Marie-Stéphanie, Gabrielle, Sarah, Catherine, Perrine, Marie-Ange et Kevin. Un gros merci à Valérie qui m'a toujours accueilli avec un sourire lorsque j'avais des questions. Tu as été d'une aide très précieuse. Merci beaucoup à Antony pour les analyses bio-informatiques et pour ton aide dans l'article.

Je tiens à remercier également mon comité d'encadrement pour tous vos conseils qui m'ont été très utiles dans l'avancement de ma maîtrise. Merci aussi à Michel Frenette d'avoir été mon codirecteur, tes commentaires lors des rencontres du laboratoire ont toujours été constructifs et pertinents pour le développement de mon projet.

Ce projet n'aurait pas été possible sans le financement du CRNSG (Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada), du RAQ (Ressources Aquatiques Québec) et du MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec).

Je veux aussi adresser un énorme merci à Gabrielle qui m'a toujours encouragé et supporté. Même si la microbiologie peut être parfois compliquée à comprendre, tu es toujours à l'écoute pour en apprendre plus sur mon projet. Ta confiance inébranlable envers moi m'a vraiment aidé à traverser les moments difficiles. Cette maîtrise aurait été très différente si je n'avais pas eu tout ton appui. La maîtrise a été comme un voyage en voiture et il n'aurait eu personne que j'aurais préféré avoir comme copilote.

Finalement je tiens à remercier toute ma famille qui a toujours été derrière moi pour m'encourager. Marielle, Lionel, Alexandrine et Louis-Thomas votre intérêt envers mon parcours me touche beaucoup. Un énorme merci à mes parents qui m'ont toujours supporté

bien au-delà de mon parcours académique. Si j'ai réussi à me rendre jusqu'ici, c'est grâce à votre appui, car je sais que peu importe ce qu'il arrive, vous allez toujours être présent pour moi. Papa, j'ai encore l'impression que c'était hier le moment où tu m'apprenais les mathématiques tard le soir avec ces sacrées réglettes. Maintenant je peux dire que ce temps passé avec toi en valait la peine. Au-delà des mathématiques, ces moments m'ont montré qu'il est important de travailler fort et de s'asseoir pour avoir du succès. Maman, je ne pourrais jamais te remercier assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu as toujours placé mes besoins avant les tiens et tu as toujours été présente pour m'offrir du réconfort dans les moments difficiles. J'ai toujours eu les ressources nécessaires et tu t'es toujours assuré que j'aie les meilleures conditions pour réussir. Je suis tellement reconnaissant de tout ce que vous avez fait pour moi et c'est pour cette raison que je vous dédis ce mémoire. J'aimerais aussi faire une petite mention spéciale à Rico et Luna qui sont une grande source d'amour.

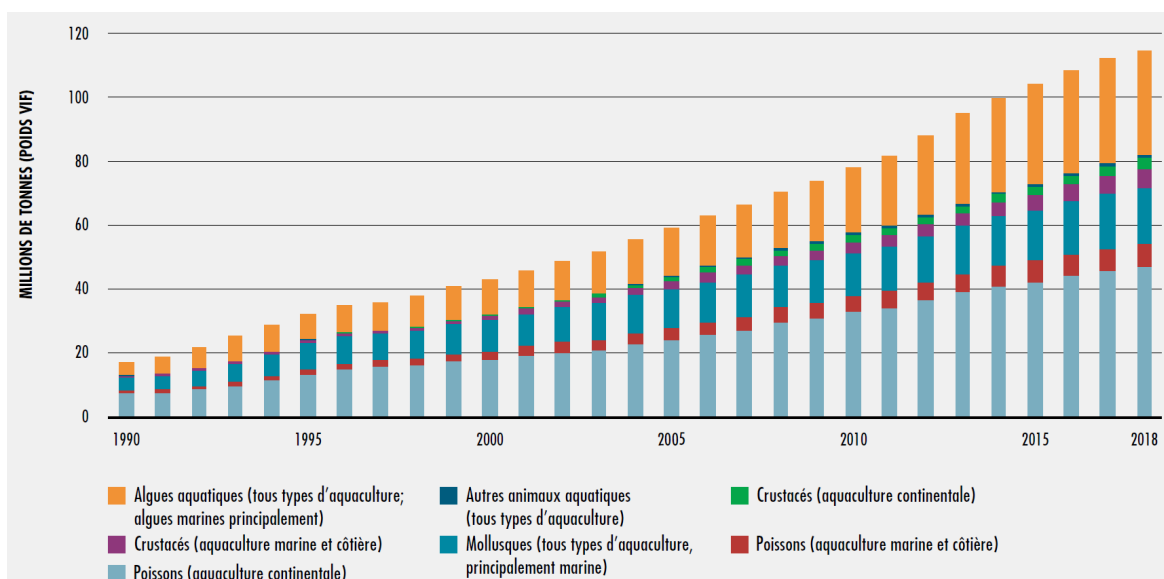
## Avant-propos

Le présent mémoire est divisé en trois chapitres. Le premier chapitre fait un survol des connaissances théoriques abordées dans cette étude, suivi d'une hypothèse et des objectifs liés à mon projet. Le deuxième chapitre, rédigé sous la forme d'un article scientifique, constitue les méthodologies et les résultats obtenus lors de cette recherche. Le dernier chapitre présente une analyse plus approfondie et les différentes perspectives liées à cette étude.

Le second chapitre correspond à l'article « Systematic Analysis of the Stress-Induced Genomic Instability of Type Three Secretion System in *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* », publié dans le journal *Microorganisms* le 31 décembre 2020 (<https://doi.org/10.3390/microorganisms9010085>). Les auteurs de cet article sont Pierre-Étienne Marcoux, Antony T. Vincent, Marie-Ange Massicotte, Valérie E. Paquet, Émilie J. Doucet, Nava Hosseini, Mélanie V. Trudel, Gabriel Byatt, Mathilde Laurent, Michel Frenette et Steve J. Charette. Mon rôle en étant premier auteur a été la rédaction de l'article conjointement avec S.J. Charette à l'exception de la section abordant la génomique comparative dans la section Matériels et méthodes et les paragraphes sur le nouveau prophage dans les sections Résultats et Discussion qui ont été rédigées par A.T. Vincent. J'ai également généré les figures hormis la Figure 9 qui a été produite par A.T. Vincent. En ce qui concerne les expérimentations en laboratoire, j'ai réalisé la majorité des expériences et accru le nombre de souches soumises au protocole de stress thermique. Ce travail d'analyse des souches avait déjà été entamé par ces auteurs: M.V. Trudel, M.-A. Massicotte, V.E. Paquet, É.J. Doucet, N. Hosseini, G. Byatt et M. Laurent. J'ai eu l'aide d'A.T. Vincent pour l'analyse de la nouvelle région chromosomique qui a été découverte par cet auteur. Cette étude a été conceptualisée par S.J. Charette qui a aussi obtenu le financement pour sa réalisation. Les numéros des figures et des tableaux ont été modifiés dans l'article pour être en concordance avec le mémoire.

# Introduction

Avec l'accroissement de la population et l'augmentation de consommation de poisson par habitant, l'aquaculture apporte une sécurité alimentaire importante dans le monde. Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), l'aquaculture se définit comme étant la culture de nombreux organismes aquatiques tels que les poissons, les crustacés, les plantes aquatiques et les mollusques (FAO, 2020). La pêche et l'aquaculture (excluant les plantes aquatiques et les mammifères aquatiques) ont généré 179 millions de tonnes juste pour l'année 2018. À partir de ce total, il y a eu 156 millions de tonnes qui ont été destinées à la consommation humaine (FAO, 2020). En ce qui concerne la production aquacole (incluant les plantes aquatiques), la production s'élevait à 114,5 millions de tonnes et continue d'augmenter chaque année (Figure 1).



**Figure 1. Production aquacole mondiale d'animaux aquatiques et d'algues entre 1990 et 2018.** La production aquacole est quantifiée par la production en million de tonnes du poids vif pour les différents organismes aquatiques. La figure est tirée de FAO 2020 disponible à cette adresse : <https://doi.org/10.4060/ca9229fr>

L'aquaculture se divise en différents types de culture selon l'organisme aquatique cultivé. La pisciculture est une catégorie de l'aquaculture qui correspond à l'élevage des poissons et qui occupe une place importante pour la production aquacole (MAPAQ, 2019b).

L'aquaculture est un secteur économique non négligeable pour la province de Québec. En plus des emplois créés, ce secteur a permis de générer un montant qui avoisine les 9,5 M\$ en 2016 (MAPAQ, 2019b). Les revenus se divisent selon deux marchés : celui de l'ensemencement et celui de la table. Le premier marché permet d'approvisionner les différents lieux liés à la pêche tels que les pourvoiries, les zones d'exploitations contrôlées et les réserves fauniques (MAPAQ, 2019a), alors que le marché de la table est destiné à l'alimentation. Dépendamment du marché ciblé, les espèces de poissons vont être différentes. L'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykisi*) sont les espèces les plus utilisées pour l'ensemencement. Pour le marché de la table, ces deux espèces sont également utilisées avec l'addition de l'omble de chevalier (*Salvelinus alpinus*). Ainsi ces trois espèces représentent environ 99% de la production piscicole québécoise (MAPAQ, 2019b).

Comparativement aux poissons à l'état sauvage, ceux en aquaculture sont soumis à divers stress, ce qui favorise le développement de différentes maladies (Snieszko, 1974). La forte densité de population dans les bassins, une faible qualité de l'eau et les différentes opérations liées aux poissons sont des conditions qui peuvent entraîner un stress (Barton and Iwama, 1991; Ruane et al., 2002). Ainsi, ces facteurs rendent les poissons plus susceptibles à développer des infections et peuvent même avoir des effets négatifs sur la survie du poisson (Barton and Iwama, 1991).

Au Québec, les maladies prédominantes dans le secteur piscicole sont la furunculose, la maladie bactérienne des branchies, les mycoses, les nécroses pancréatiques infectieuses, les parasitoses et la columnariose. La furunculose est la maladie la plus fréquemment diagnostiquée par le Service de diagnostic en ichtyopathologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Annuellement, cette maladie est responsable de 25 à 50% des infections répertoriées (Lafaille, 2019). L'Omble de fontaine est le poisson d'élevage le plus touché par les maladies diagnostiquées. Cette espèce est très sensible contrairement à la truite arc-en-ciel qui est plus résistante (MAPAQ, 2018).

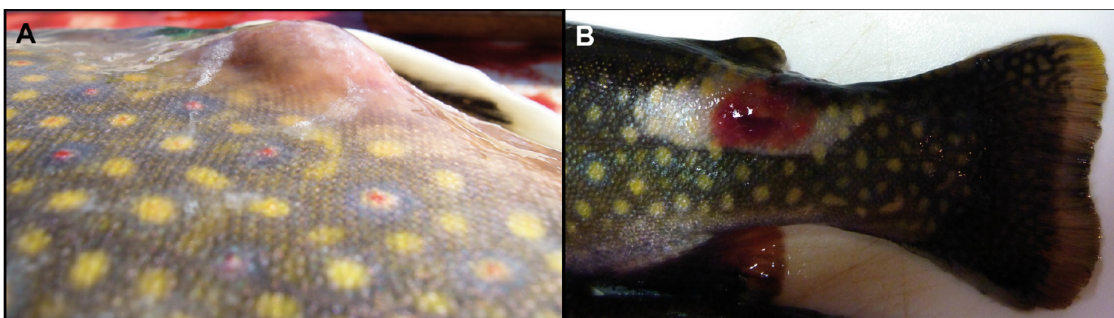


L'agent pathogène responsable de la furunculose est la bactérie *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. En raison du haut taux de mortalité, cette maladie cause de grandes pertes économiques pour les pisciculteurs. C'est pourquoi cette étude s'intéresse à la création d'un vaccin qui pourrait permettre de prévenir la furunculose dans les piscicultures. Plus précisément, un vaccin composé de bactéries vivantes dont la virulence a été atténuée et qui serait administré par balnéation. Ce mémoire portera donc sur l'analyse des éléments génomiques liés à la perte de virulence qui est encore incomprise à ce jour.

# Chapitre 1 – Mise en contexte

## 1.1 Furonculose

La furunculose est une maladie qui touche principalement les salmonidés élevés dans les piscicultures en raison de la proximité entre les poissons (Derome et al., 2016). Cependant, il est possible de retrouver également cette infection dans la nature (Dallaire-Dufresne et al., 2014b). La furunculose se divise en différentes formes, la forme suraiguë, la forme aiguë et la forme chronique. Le type de furunculose va varier selon différents facteurs, dont les symptômes, et l'âge des poissons (Cipriano and Austin, 2011). Premièrement, la forme suraiguë touche seulement les poissons juvéniles et va entraîner la mort sans la présence de symptômes apparents. La deuxième forme, nommée la forme aiguë, provoque une infection septicémique qui touche majoritairement les poissons plus jeunes (Groff and Lapatra, 2000). Les poissons affectés par ce type de furunculose vont manifester un manque d'appétit, de la léthargie et ils vont développer différentes hémorragies aux organes internes. En raison de la gravité des symptômes, les poissons vont mourir rapidement après 2 ou 3 jours (Austin and Austin, 2016). Finalement, les poissons qui survivent à la forme aiguë peuvent développer la forme chronique. Cette forme de la furunculose a un taux de mortalité moins élevé que la forme aiguë et elle affecte les poissons plus âgés. Il peut y avoir la présence de furoncle qui se forme à la surface de la peau ou sur les muscles, d'où l'origine du nom de la maladie. Ces lésions cutanées sont généralement présentes chez les poissons affectés par la forme chronique de furunculose. L'intérieur des furoncles va contenir un liquide composé de sang et des débris cellulaires (Figure 2) (Cipriano and Bullock, 2001; MAPAQ, 2018).



**Figure 2. Poisson infecté par la furunculose.** (A) Furoncle causé par une infection du type chronique. (B) Liquide hémorragique présent à l'intérieur d'un furoncle contenant du sang et des tissus nécrosés. Image tirée de Dallaire-Dufresne *et al.* (2014).

## 1.2 *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*

*Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* est la bactérie responsable de la furonculose chez les salmonidés. La famille *Aeromonadaceae* se divise en plusieurs branches dont le genre *Aeromonas* (Martin-Carnahan and Joseph, 2015). Ce genre est étroitement lié aux différents milieux aquatiques (rivières, lacs, eau potable, etc.). Selon l'espèce, il est également possible d'isoler *Aeromonas* à partir des animaux, des humains et de la nourriture. La taxonomie de ce genre a connu beaucoup de changement au cours des années. La classification se base principalement sur les caractéristiques phénotypiques. Or, cette méthode de classification peut mener à beaucoup d'erreurs en raison de la variabilité du genre (Beaz-Hidalgo et al., 2010).

Selon la littérature récente, il existerait au moins 36 espèces appartenant au genre *Aeromonas*, dont *Aeromonas salmonicida* (Fernandez-Bravo and Figueras, 2020). Cette bactérie à Gram négatif en forme de bacille non-motile est anaérobie facultative et peut se diviser en deux groupes de sous-espèces : les psychrophiles et les mésophiles. Le premier groupe consiste des sous-espèces *salmonicida*, *smithia*, *achromogenes* et *masoucida*. La température optimale de croissance pour ces sous-espèces se situe typiquement en dessous de 20°C (Austin and Austin, 2016; Daher et al., 2011). Les souches psychrophiles sont reconnues comme étant capables d'infecter différentes espèces de poissons. Les bactéries de la sous-espèce *salmonicida* sont considérées « typiques » puisque ce sont celles qui causent la forme classique de la furonculose et vont infecter principalement les salmonidés. Les bactéries classées dans les autres sous-espèces sont nommées « atypiques » et vont présenter des différences biochimiques, un plus large spectre d'hôtes et des infections avec des symptômes variés (Austin and Austin, 2016; Burr and Frey, 2007). Concernant les souches mésophiles, ce groupe inclut la sous-espèce *pectinolytica* ainsi que plusieurs autres souches non classées (Pavan et al., 2000; Rouleau et al., 2018; Vincent et al., 2017). Puisqu'elles sont capables de croître à 37 °C, plusieurs ont le potentiel de causer des infections chez les humains et les animaux (Vincent et al., 2019a; Vincent et al., 2019b).

Par définition, la pathogénicité ou le pouvoir pathogène est la capacité d'un organisme à causer une maladie. Pour ce faire, l'agent pathogène nécessite de nombreux facteurs de virulence qui vont donner un avantage à la bactérie pour entraîner une infection. Ces facteurs

vont permettre à la bactérie d'adhérer aux surfaces, de se multiplier, d'échapper aux défenses de l'hôte et de causer des lésions (Brogden et al., 2007). Concernant *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, la virulence de cette bactérie implique des structures protéiques et des produits extracellulaires qui vont interagir avec les cellules hôtes (Cipriano and Bullock, 2001; Groff and Lapatra, 2000). Il a été démontré que ces produits extracellulaires ont des activités protéolytiques, hémolytiques et leucocytolytiques (Ellis et al., 1981). Il peut même y avoir une inhibition de la réponse humorale du système immunitaire (Hussain et al., 2000). Parmi les différentes protéases produites par *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, une sérine protéase de 64 kDa, nommée AspA a été largement décrite dans la littérature (Coleman and Whitby, 1993; Whitby et al., 1992). Son activité enzymatique va entraîner la dégradation des tissus ce qui va produire des nutriments pour la bactérie et ainsi favoriser sa croissance (Fyfe et al., 1986; Price et al., 1989; Sakai, 1985a; Sakai, 1985b). Cette protéase a également un rôle dans l'activation de la glycérophospholipide-cholestérol acyltransférase (GCAT). Une fois liée à un lipopolysaccharide (LPS), la GCAT va former un complexe (GCAT/LPS) qui va entraîner la lyse des érythrocytes (Ellis, 1991; Lee and Ellis, 1989; Lee and Ellis, 1990; Titball et al., 1985). Ces deux produits extracellulaires peuvent travailler en concert pour perturber la santé du poisson, par exemple, favoriser la coagulation du sang (Price et al., 1990; Salte et al., 1992). Or, la virulence de la bactérie ne se limite pas à la présence de ces produits extracellulaires (Vipond et al., 1998).

Les couches de surface sont des structures protéiques situées à l'extérieur de la membrane externe qui peuvent contribuer à la virulence de la bactérie (Koval and Murray, 1984). Chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, cette couche est nommée la couche de surface A (Udey and Fryer, 1978). Cette couche est constituée d'une seule protéine, nommée protéine A. Le gène *vapA* code cette protéine, qui a un poids moléculaire de 49 kDa (Chu et al., 1991; Ishiguro et al., 1981; Kay et al., 1981). La formation de cette couche se fait grâce à un système de sécrétion de type deux qui permet à la protéine A de traverser la membrane interne, l'espace périplasmique et la membrane externe. Une fois à l'extérieur, la protéine se lie aux LPS présents à la surface de la bactérie (Belland and Trust, 1985; Noonan and Trust, 1995; Reith et al., 2008).

Les implications de cette couche dans la virulence d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* sont nombreuses. En premier lieu, elle permet à la bactérie d'adhérer aux différentes surfaces et cellules de l'hôte (Doig et al., 1992; Trust et al., 1983). En deuxième lieu, elle permet aussi l'autoaggrégation de la bactérie (Ishiguro et al., 1981; Kay et al., 1981). Finalement, elle permet de protéger la bactérie contre les différents facteurs lytiques et contre les cellules phagocytaires (Garduño et al., 1993). En effet, la couche de surface A attachée aux LPS agit comme barrière contre le système immunitaire en empêchant son accès aux cibles membranaires (Munn et al., 1982). Cette protection des récepteurs a également été observée pour contrer l'action des bactériophages (Ishiguro et al., 1981; Paquet et al., 2019). Ainsi, la couche de surface A favorise la colonisation et la pénétration d'*A. salmonicida* lors des premiers stades de l'infection, et ce, en plus d'agir comme barrière contre les défenses de l'hôte (Trust, 1986). Malgré le fait que plusieurs chercheurs ont démontré que la couche de surface A a un rôle majeur dans la virulence d'*A. salmonicida*. Il existe certaines souches qui contiennent cette couche et qui ne sont pas virulentes pour les poissons (Adams et al., 1988).

### **1.3 Système de sécrétion de type trois**

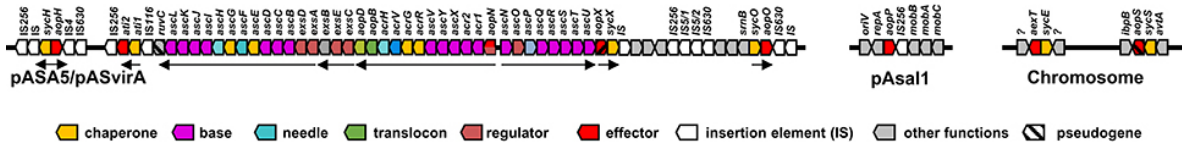
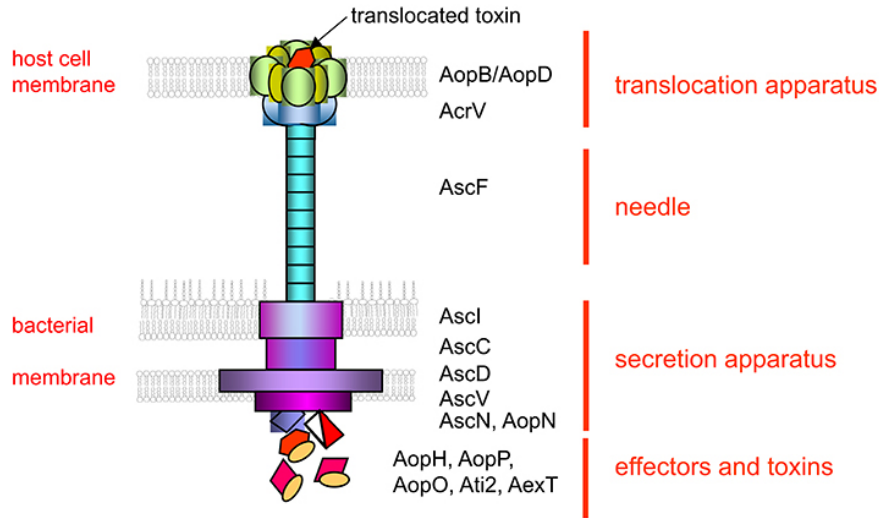
Le système de sécrétion de type trois (SSTT) est un facteur de virulence essentiel pour le développement de la furunculose. Ces structures sont très communes chez les agents pathogènes à Gram négatif (Galán and Collmer, 1999). Le SSTT chez *A. salmonicida* est très similaire à ceux de *Yersinia* et *Salmonella* (Burr et al., 2002). Son rôle est de permettre la translocation de toxines présentes dans le cytoplasme de la bactérie jusque dans le cytoplasme des cellules de l'hôte. Pour ce faire, la bactérie va faire interagir différentes protéines qui vont permettre d'assembler une structure en forme d'aiguille. Au total, plus de 30 protéines sont impliquées dans la formation du SSTT en incluant les régulateurs, les protéines chaperones et les effecteurs (Figure 3).

Cette aiguille se divise en trois sections : la structure de sécrétion, l'aiguille et la structure de translocation. La première structure permet aux toxines qui sont situées dans le cytoplasme de la bactérie de traverser la membrane interne et la membrane externe. Ensuite, l'aiguille est responsable de lier la bactérie et la cellule hôte, afin de déplacer les toxines jusqu'à la cellule hôte. Finalement, l'appareil de translocation permet de pénétrer la membrane de la cellule eucaryote et ainsi les toxines vont être capables d'entrer dans le cytoplasme. Par la

suite, ces toxines vont cibler différentes voies de signalisation ce qui va perturber les fonctions et la viabilité des cellules eucaryotes (Frey and Origgi, 2016; Vanden Bergh and Frey, 2014).

Ils existent de nombreuses toxines en lien avec le SSTT, également nommés des effecteurs. Chez *A. salmonicida*, les principales toxines sont AexT, Ati2, AopH, AopO, AopP et AopN (Vanden Bergh et al., 2013). Les toxines AexT, Ati2, AopH et AopO possèdent différentes activités enzymatiques qui perturbent le cytosquelette des cellules de l'hôte. Cela a comme conséquence la lyse des cellules en raison d'un changement morphologique (Braun et al., 2002; Fehr et al., 2007). Plus précisément, AexT va entraîner la dépolymérisation des filaments d'actine à l'aide de deux activités enzymatiques distinctes. Pour Ati2, son activité enzymatique va causer le détachement de l'actine à la membrane. Par la suite, AopH va s'attaquer aux protéines membranaires responsables de l'adhésion. En plus d'entraîner une lyse des cellules, la perturbation du cytosquelette va réduire la phagocytose des cellules hôtes (Dallaire-Dufresne et al., 2013; Frey and Origgi, 2016). Quoique que le cytosquelette est une cible commune pour ces effecteurs, il est possible que les toxines inhibent aussi des voies de signalisation (Fehr et al., 2006).

Les gènes responsables de l'expression des protéines structurantes sont situés sur un grand plasmide, nommé pAsa5 ou pASvirA (Reith et al., 2008; Stuber et al., 2003). Ces gènes sont situés dans la même région sur le plasmide. Ce locus contient également les gènes codant pour quatre effecteurs (Ati2, AopH, AopN et AopO). Pour AexT et AopP, leurs gènes sont présents sur le chromosome et le petit plasmide pAsa11 respectivement (Fehr et al., 2007; Fehr et al., 2006).



**Figure 3. Représentation du système de sécrétion de type trois de la bactérie *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*.** Le nom des protéines et leur emplacement dans la structure sont indiqués à droite de l'image. Les gènes du SSTT sont situés sur les plasmides pAsa5/pASvirA et pAsa1, mais également à l'intérieur du chromosome. L'image provient de Frey et Origgi (2016) disponible à cette adresse: <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00130>.

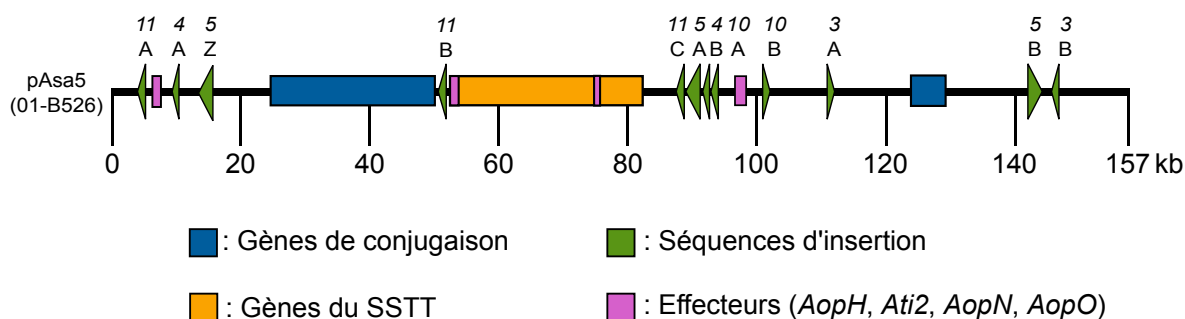
#### 1.4 Génome d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida*

Afin de mieux comprendre la virulence de cet agent pathogène, le génome d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* a été largement étudié. Le séquençage du génome complet a été réalisé pour la première fois en 2008 sur la souche A449 isolée d'une truite brune retrouvée dans une rivière en France (Chart et al., 1984; Reith et al., 2008). Il est bien connu dans la littérature que le génome d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* inclut différents plasmides (Belland and Trust, 1989; Toranzo et al., 1983). Pour les souches typiques d'*A. salmonicida*, le plasmidome de base est composé de plasmides cryptiques et d'un grand plasmide. À cela s'ajoutent des plasmides spécifiques retrouvés dans certaines souches ou groupes de souches de la bactérie (Vincent et al., 2020).

Tout d'abord, les plasmides cryptiques sont des plasmides qui ne codent pour aucune fonction particulière à l'exception de leurs mobilisation, répllication et maintien dans la

cellule. Ils sont de petites tailles et présents en grande quantité dans la cellule (32 à 326 copies) (Attere et al., 2015; Hackett et al., 1984). À l'intérieur de la souche A449, on retrouve les petits plasmides pAsa1, pAsa2 et pAsa3 qui ont une taille de 5.4 kb, 5.2 kb et 5.6 kb respectivement (Belland and Trust, 1989; Boyd et al., 2003). Chez certaines souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, on retrouve également un petit plasmide nommé pAsa11 qui n'est pas considéré cryptique. Contrairement aux autres petits plasmides, ce plasmide de 6.3 kb contient un gène codant pour l'effecteur AopP et porte une séquence d'insertion (IS) (Charette et al., 2012; Fehr et al., 2006).

Lors du séquençage de la souche A449, deux grands plasmides ont été révélés (pAsa4 et pAsa5). Le plasmide pAsa4 a une taille de 166 kpb et pAsa5 a une taille de 155 kpb. Comme il a été décrit précédemment, le plasmide pAsa5 contient une région qui inclut les gènes des protéines structurales du SSTT chez *A. salmonicida*. Les gènes responsables de la conjugaison de ce plasmide sont situés principalement en aval de la région du SSTT. Ce plasmide porte également des gènes qui codent pour les protéines chaperones des régulateurs du SSTT. Il y a également présence de nombreuses IS qui sont réparties à différents endroits sur le plasmide (Figure 4). De son côté, le plasmide pAsa4 code pour des gènes de résistance aux antibiotiques (Reith et al., 2008). Or ce plasmide n'est pas commun à toutes les souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* comparativement à pAsa5.



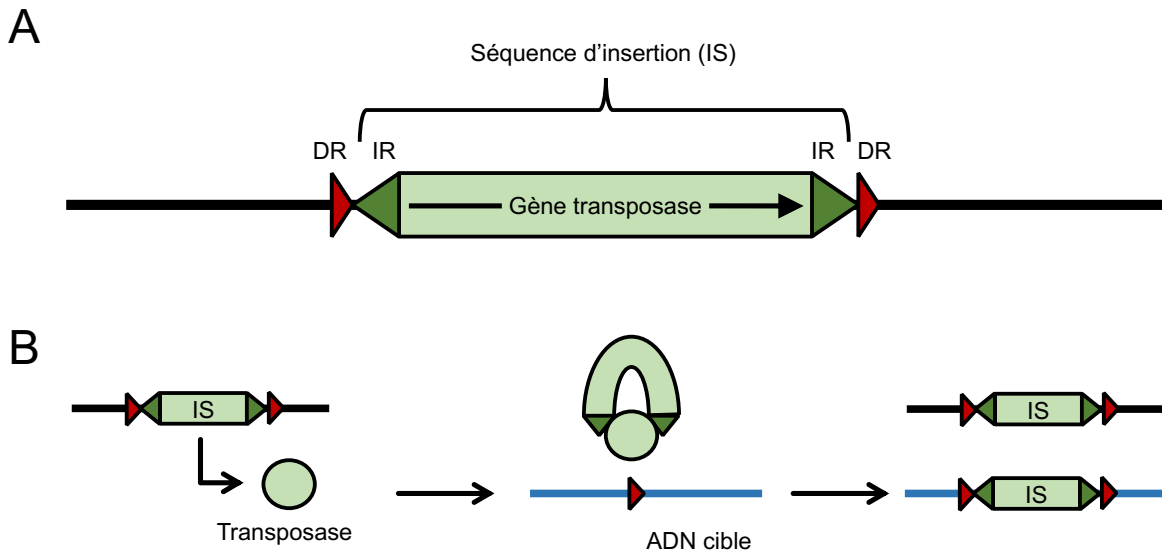
**Figure 4. Représentation linéaire du plasmide pAsa5 d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* pour la souche 01-B526.** L'image a été produite à partir de la séquence de référence annotée (KY555069) disponible sur NCBI.



#### 1.4.1 Les séquences d'insertions

Le séquençage de multiples souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* à partir de 2010 a permis la découverte de nombreux éléments d'ADN mobile tels que des IS, des îlots génomiques (GEI) et des prophages. Par la suite, des études spécifiques ont pu être réalisées sur ces éléments pour mieux comprendre leur rôle dans la bactérie (Emond-Rheault et al., 2015a; Reith et al., 2008). Tout d'abord, les IS sont des séquences d'ADN qui codent uniquement pour une transposase (constitué d'un ou deux cadres de lecture) nécessaire à leur transposition. Les IS sont aussi caractérisées par la présence de séquences inversées répétées à leurs extrémités. C'est grâce à ces séquences que la transposase pourra de s'attacher à l'IS et l'insérer à un autre endroit dans le génome (Figure 5B). La mobilisation des IS va générer des séquences de répétitions directes (DR) qui vont entourer l'IS (Figure 5A). (Mahillon and Chandler, 1998).

La classification des IS dans différentes familles est faite selon leur transposase. Les séquences répétées inversées, la longueur de l'IS et les séquences directes vont également être des facteurs à considérer pour la classification des IS (Mahillon and Chandler, 1998; Siguier et al., 2014). Dépendamment de la souche d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, les types et le nombre d'IS vont être différents et surtout en lien avec le génome accessoire (Massicotte et al., 2019; Vincent et al., 2015). Pour la souche de référence A449, le nombre d'IS s'élève à 88 copies qui se divisent selon 10 types différents (Reith et al., 2008). Les effets que peuvent causer les IS chez un hôte sont nombreux, entre autres, leur mobilisation dans le génome peut résulter en l'inactivation de gènes ou la modulation d'un gène voisin (Collins and Gutman, 1992; Vandecraen et al., 2017).



**Figure 5. Schéma d'une séquence d'insertion et son intégration dans l'ADN cible.** A) L'IS est composé d'un gène qui code pour la transposase suivi de séquences inversées répétées (IR) aux extrémités. À l'extérieur de l'IS, il va avoir présence de séquences directes répétées (DR) qui sont dans la même orientation. B) La mobilisation de l'IS se fait grâce à une transposase codée par l'IS qui va s'attacher aux IR et cibler une séquence d'ADN. L'intégration va entraîner la duplication d'une séquence de 2 à 14 pb aux extrémités de l'IS qui sont les séquences directes répétées (Mahillon and Chandler, 1998). L'image représente une transposition répliquative inspirée de l'article de Tanaka *et al.* (2013) et de Snyder *et al.* (2013).

#### 1.4.2 Les îlots génomiques d'*Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida* (AsaGEI)

Les îlots génomiques sont des éléments d'ADN mobiles qui sont présents à l'intérieur de nombreux génomes bactériens. La taille de ces régions peut varier entre 10 et 200 kb (Hacker and Kaper, 2000). Principalement acquis par transferts horizontaux, ces régions chromosomiques vont être importantes dans l'évolution et l'adaptation des bactéries. En effet, les GEI contiennent des gènes accessoires comme des gènes de résistance, des facteurs de virulence ou des enzymes qui donnent un avantage sélectif (Dobrindt et al., 2004). En plus de ces gènes, il y a présence d'un gène codant pour une intégrase. Cette enzyme va cibler un site spécifique dans le chromosome qui correspond à l'endroit auquel le GEI va s'intégrer. Une fois à l'intérieur du génome, l'îlot génomique va être entouré d'une séquence directe répétée à chaque extrémité qui a été engendrée par l'insertion. Il est également possible que les GEI contiennent des IS ou des transposons qui sont responsables de la mobilisation des gènes accessoires à l'intérieur de l'îlot génomique. L'intégrase va permettre l'excision du

GEI qui est nécessaire pour le transfert dans une autre cellule (Hacker et al., 1997; Hacker and Kaper, 2000; Juhas et al., 2009).

Le premier îlot génomique chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* (*AsaGEI*) a été découvert à la suite d'une comparaison génomique entre la souche A449 et la souche 01-B526. Il a été démontré que la souche 01-B526 contenait un élément additionnel de 51 kb qui a été décrit comme étant un îlot génomique (Charette et al., 2012; Emond-Rheault et al., 2015a). Jusqu'à présent six types d'*AsaGEI* différents (*1a*, *1b*, *2a*, *2b*, *2c* et *2d*) ont été découverts à l'intérieur de différentes souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* (Emond-Rheault et al., 2015a; Emond-Rheault et al., 2015b; Long et al., 2016; Vincent et al., 2021). Il est important de souligner que les souches possédant un *AsaGEI* dans leur génome n'en possèdent qu'un seul et de nombreuses souches n'en possèdent pas. La différence entre les *AsaGEI1(a,b)* et *2(a,b,c)* est expliquée par le site d'insertion. Dépendamment du type d'*AsaGEI*, l'intégrase située au début de la région va être différente, ce qui explique des sites d'insertion distincts dans le chromosome. Pour les *AsaGEI2*, ils sont localisés en aval d'un ARN de transfert pour la leucine (Emond-Rheault et al., 2015b; Long et al., 2016; Vincent et al., 2021). De plus, concernant les *AsaGEI2a* uniquement, habituellement le prophage 3 est présent entre l'*AsaGEI* et le gène de transfert (voir la prochaine section). Quant aux *AsaGEI1*, ils sont situés au début d'un gène codant pour une protéine hypothétique (Emond-Rheault et al., 2015a). Le rôle des *AsaGEI* chez la bactérie est encore inconnu. Néanmoins, plusieurs gènes qui composent l'*AsaGEI* codent pour des protéines de phages. Cependant, ils sont intéressants d'un point de vue épidémiologique puisque chaque *AsaGEI* peut être liée à une région géographique (Tableau 1).

**Tableau 1. Les différentes régions géographiques associées aux types d'*AsaGEI* retrouvés chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida***

Régions géographiques	Types d' <i>AsaGEI</i>	Références
Amérique du Nord	<i>1a</i> et <i>2a</i>	(Emond-Rheault et al., 2015a)
Europe	<i>1b</i> , <i>2b</i> et <i>2d</i>	(Emond-Rheault et al., 2015a) (Emond-Rheault et al., 2015b) (Vincent et al., 2021)
Chine	<i>2c</i>	(Long et al., 2016)

### 1.4.3 Les prophages

Lors d'une infection par un bactériophage, le virus va injecter son matériel génétique à l'intérieur de la bactérie. À partir de cette étape, l'ADN du phage peut soit être répliqué et suivre le cycle lytique ou s'intégrer à l'intérieur du chromosome de la bactérie et suivre le cycle lysogène. Le segment d'ADN provenant du phage se définit comme étant un prophage. Contrairement au cycle lytique qui entraîne la mort de la cellule, l'insertion du prophage n'est pas létale pour la bactérie et il va être conservé par la cellule lors de la réplication du chromosome (Snyder et al., 2013; Sulakvelidze et al., 2001). Il est possible pour le prophage de s'exciser du chromosome lors d'une exposition à un stress. Une fois excisé, le prophage pourra être répliqué et transcrit par la machinerie cellulaire de l'hôte. Ainsi, on se retrouve à poursuivre les étapes du cycle lytique qui mène à l'assemblage de nouveaux phages et à la mort de la cellule.

Concernant *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, deux prophages ont été découverts lors du séquençage de la souche A449, nommés prophage 1 et prophage 2 (Reith et al., 2008). Un autre prophage, nommé prophage 3, a été identifié conjointement dans les souches possédant un *AsaGEI2a*. Cependant, il est également possible pour une minorité de souches de retrouver exclusivement l'*AsaGEI2a* sans le prophage 3 (Emond-Rheault et al., 2015a).

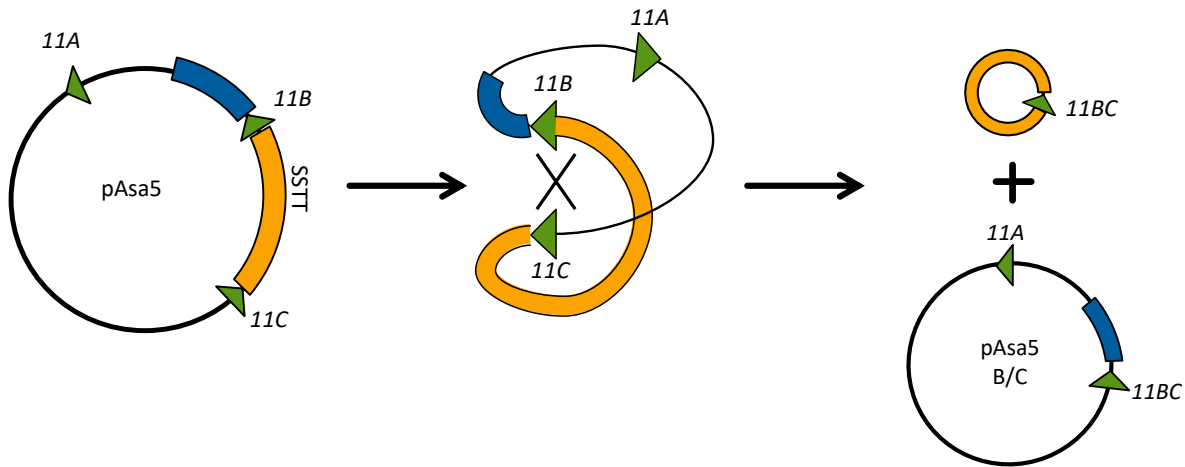
## 1.5 Plasticité du génome :

Comme il a été décrit précédemment, de nombreux plasmides ont été identifiés chez *A. salmonicida* et suggère une grande diversité dans le plasmidome (Vincent et al., 2020). Or, la diversité n'est pas seulement dans la présence ou l'absence de plasmides, il existe également différents variants de plasmides. Par exemple, les plasmides pAsal1B, pAsal1C et pAsal1D dérivent du plasmide original, mais contiennent une IS supplémentaire (ISAS5) en partie ou en totalité et insérée à des endroits différents selon le variant (Attere et al., 2015; Trudel et al., 2013). Une ISAS5 supplémentaire, nommée ISAS5Z, a également été observé sur le plasmide pAsa5 de la souche 01-B526 (Massicotte et al., 2019).

La présence de ces éléments d'ADN mobile permet une grande plasticité au génome d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida*. Lorsque la bactérie est soumise à un stress, des altérations peuvent se produire dans le génome de la bactérie. Ces changements peuvent provoquer

l'inactivation de gènes ou des réarrangements qui peut avoir comme conséquence la perte de facteurs de virulence (Daher et al., 2011; Ishiguro et al., 1981). Par exemple, certaines IS peuvent s'insérer à l'intérieur du gène et dans le promoteur de *vapA*. Cette mobilisation a pour conséquence d'inactiver le gène et de réprimer la production de la protéine A, qui est essentielle pour la couche de surface (Gustafson et al., 1994). Il est également possible que l'IS puisse s'insérer à l'intérieur du gène *abcA* qui est situé en aval de *VapA*. Cette insertion va empêcher la formation de la couche de surface en raison d'une perturbation de la synthèse des LPS (Chu et al., 1995; Chu and Trust, 1993).

Le plasmide pAsa5 a été identifié comme étant un plasmide thermolabile. Ainsi, une altération du plasmide peut survenir lorsqu'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* est soumise à une température supérieure à 20 °C (Stuber et al., 2003). Plus précisément, certaines IS présentes sur le plasmide pAsa5 vont entraîner la perte des gènes du SSTT dû à une recombinaison homologue. Cet évènement génétique implique deux IS identiques et dans la même orientation qui vont interagir ensemble pour entraîner la perte de la région située entre ces deux IS par recombinaison homologue (Figure 6). Or, ce n'est pas toutes les IS présentes sur pAsa5 qui sont impliquées dans ce type de recombinaison homologue. Selon les différents profils de recombinaison du plasmide pAsa5 qui ont été observés, il est possible de savoir quels IS sont impliqués dans la recombinaison homologue. Le premier profil de recombinaison implique l'ISAS11B et l'ISAS11C (B/C), ces deux IS sont situées directement en aval et en amont des gènes du SSTT, respectivement. Ainsi le profil 1 cause seulement la délétion des gènes du SSTT. Le deuxième profil fait interagir l'ISAS11A et l'ISAS11C (A/C), donc en plus des gènes du SSTT il va avoir la délétion de gènes en aval de la région du SSTT (Daher et al., 2011; Tanaka et al., 2012; Tanaka et al., 2013). Un autre profil de recombinaison qui implique les ISAS5 a été identifié (Tanaka et al., 2017). Cependant ce ne sont pas toutes les souches d'*A. salmonicida* qui contiennent cet IS à l'intérieur de leur plasmide pAsa5. Celles le possédant peuvent avoir un profil de recombinaison additionnel qui implique l'ISAS5Z et l'ISAS5A (Z/A) (Tanaka et al., 2017). Ainsi il est possible de produire des souches réarrangées en exposant *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* à un stress thermique.



**Figure 6. Représentation schématique de la recombinaison homologue de pAsa5 entre deux séquences d'insertion.** Le rectangle bleu représente les gènes de conjugaison du plasmide. Le rectangle orange correspond aux gènes de structure pour le SSTT et les flèches vertes sont des séquences d'insertion. À des fins de simplicité de l'image, seulement les *ISAS11* ont été schématisés dans la figure inspirée de Tanaka *et al.* (2013).

Dans l'étude de Daher *et al.*, le taux de recombinaison était différent selon la souche d'*A. salmonicida ssp. salmonicida* utilisée. La souche A449 avait un taux de recombinaison de 5%. Pour la souche 01-B526, 17% des colonies testées avaient perdu leur SSTT. La souche 01-B516 avait un taux de recombinaison de 1,9% (Daher *et al.*, 2011). Plus tard, il fut identifié que les colonies sans SSTT de 01-B516 avaient été mal annotées et étaient en réalité des souches de 01-B526 (Tanaka *et al.*, 2017). Donc la souche 01-B516 n'a jamais produit de souches réarrangées. La raison pourquoi certaines souches semblent résister au stress thermique et les mécanismes impliqués dans les pertes du SSTT reste encore à élucider.

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* se sont intéressées au rôle que peut avoir le SSTT sur l'immunité des poissons (Burr *et al.*, 2005; Dacanay *et al.*, 2006; Daher *et al.*, 2011; Stuber *et al.*, 2003). Différentes souches d'*A. salmonicida* qui contiennent une mutation dans les gènes du SSTT ou une délétion complète du SSTT montraient une baisse de virulence significative pour les poissons et avec l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Daher *et al.*, 2011; Froquet *et al.*, 2007). Ce qui suggère que le SSTT est étroitement lié à la virulence d'*A. salmonicida ssp. salmonicida*. Lors des expériences *in vivo*, l'inactivation d'un gène codant pour la structure du SSTT était suffisante pour réduire la mortalité des poissons (Burr *et al.*, 2005; Dacanay *et al.*, 2006). Cependant, la présence l'aiguille à la surface de la bactérie même si elle est défectueuse permet d'inhiber l'activation du système immunitaire du poisson

(Origgi et al., 2017). En effet, la présence des effecteurs et des autres facteurs de virulence est suffisante pour inactiver le système immunitaire. Or, seulement les souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* qui ont perdu complètement leur SSTT permettent d'activer le système immunitaire. Ainsi ces souches sans SSTT peuvent procurer aux poissons une protection immunitaire et être utilisées à titre de souches vaccinales (Origgi et al., 2017).

## 1.6 Traitement actuel contre la furunculose :

L'utilisation d'antibiotiques pour le traitement de différentes maladies infectieuses est encore très répandue dans le secteur de l'aquaculture (Vincent et al., 2019c). Le plus grand problème associé à l'utilisation d'antibiotiques est le développement de bactéries résistantes. Pour ce faire, la bactérie peut utiliser différentes stratégies pour se protéger, comme l'acquisition de gènes de résistances. Ces gènes peuvent se retrouver à l'intérieur de plasmides que la bactérie acquiert via, entre autres, la conjugaison (Munita et al., 2016; Partridge et al., 2018). Au Québec, la furunculose est traitée à l'aide d'antibiotiques qui ont été prescrits à la suite d'un épisode de mortalité (Tableau 2) (Lafaille, 2019). Chez *A. salmonicida*, de nombreux gènes de résistance ont été identifiés à l'intérieur de différents plasmides. Il est même possible que certaines souches soient résistantes à plusieurs antibiotiques (McIntosh et al., 2008; Vincent et al., 2014b). Chaque année, de nombreuses souches résistantes sont isolées. Ainsi les traitements aux antibiotiques deviennent de plus en plus désuets dû à la résistance qui devient une menace pour la santé publique (OMS, 2014).

**Tableau 2. Les différents antibiotiques homologués utilisés en aquaculture au Canada et le nombre de prescriptions des traitements au cours des dernières années**

Antibiotique <sup>a</sup>	Nom commercial <sup>b</sup>	Nombre de prescriptions/année <sup>a</sup>			
		2015	2016	2017	2018
Florfénicol	Aquaflor®	26 (92%)	28 (70%)	29 (83%)	31 (94%)
Oxytétracycline	Terramycin-Aqua®	0	12 (30%)	6 (17%)	2 (6%)
Sulfadiméthoxine/ Ornémoprime	Romet-30®	2 (7,1%)	0	0	0

<sup>a</sup> Les données proviennent du rapport des activités en ichtyopathologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal (Lafaille, 2019).

<sup>b</sup> Données tirées du document d'information spécialisée des produits de traitement utilisés en pisciculture provenant de la MAPAQ (MAPAQ, 2020).

Tel que décrit auparavant, la furonculose entraîne des pertes économiques considérables pour les piscicultures au Québec. À ce jour, les traitements pour cette maladie utilisent des antibiotiques à titre curatif. Cependant, puisque l'utilisation d'antibiotiques favorise le développement de souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* résistantes (Morin, 2010), c'est pourquoi différentes études s'intéressent à la vaccination comme alternative. Comme mentionné plus haut, il est possible pour les souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* de perdre de façon définitive leur SSTT en étant exposée à des conditions stressantes de culture. Puisque ces souches modifiées sont non virulentes, elles représentent des bactéries très intéressantes pour le développement de vaccins (Daher et al., 2011; Origgi et al., 2017).

Au Québec, il est possible pour les pisciculteurs de faire des autovaccins. Or, ces vaccins sont formulés à partir de bactéries mortes et l'efficacité n'est pas très concluante. Ainsi l'utilisation de bactéries atténuées à titre de souches vaccinales pourrait s'avérer un choix intéressant pour augmenter l'efficacité et représenter un outil de prévention contre la furonculose (Origgi et al., 2017).

## **1.7 Hypothèses et objectifs**

Afin de créer un vaccin personnalisé aux différentes régions piscicoles du Québec, le présent projet s'intéresse aux mécanismes impliqués dans l'instabilité du SSTT afin de déterminer quelles souches sont susceptibles de perdre leur SSTT.

Sachant que l'exposition d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* à un stress peut entraîner la délétion des gènes du SSTT et que certaines souches peuvent être sensibles ou réfractaires, l'hypothèse de ce projet est que différents éléments génomiques peuvent inhiber ou stimuler la délétion du SSTT. Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons établi différents objectifs :

1. **Identification des souches réfractaires et des souches sensibles chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*.** La collection du laboratoire regroupe plus de 200 souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* provenant de différentes régions dans le monde. Ainsi plusieurs souches ont été soumises à un stress thermique afin d'évaluer si elles étaient capables de perdre leur SSTT.



2. **Analyse génomique des souches sensibles et réfractaires.** Différents éléments génomiques ont été ciblés pour déterminer s'il y a une corrélation entre la présence de certains gènes et l'instabilité du SSTT.

## **Chapitre 2 - Analyse systématique de l'instabilité du système de sécrétion de type trois pour *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida***

### **2.1 Résumé**

Le locus du système de sécrétion de type trois (SSTT) d'*Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, situé sur le plasmide pAsa5, est connu pour être perdu lorsque la bactérie est cultivée à une température de 25 °C. La perte du locus est due à la recombinaison des séquences d'insertion flanquant la région du SSTT. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette recombinaison restent incompris. Dans cette étude, nous avons analysé 22 souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* qui avaient déjà perdu leur SSTT, et nous avons systématiquement exploré 47 autres souches pour leur susceptibilité à perdre le même locus lorsqu'elles sont cultivées à 25 °C. Il est apparu que les souches d'Europe étaient plus susceptibles de perdre leur locus SSTT que les souches canadiennes. Plus précisément, il n'a pas été possible d'induire une perte du SSTT dans les souches canadiennes qui ont *AsaGEI2a*, un îlot génomique, et le prophage 3, ou dans les souches canadiennes sans îlot génomique. Une approche en génomique comparative a révélé une corrélation presque parfaite entre la présence d'un groupe de gènes, pas encore caractérisé, et la susceptibilité de divers groupes de souches à perdre leur locus. Ce groupe de gènes code pour des protéines putatives avec une capacité de liaison à l'ADN et des protéines phagiques. Cette découverte crée de nouvelles opportunités dans l'étude de la thermosensibilité pAsa5.

## **Systematic Analysis of the Stress-Induced Genomic Instability of Type Three Secretion System in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida***

Pierre-Étienne Marcoux<sup>1,2,3</sup>, Antony T. Vincent<sup>4</sup>, Marie-Ange Massicotte<sup>1,2,3</sup>, Valérie E. Paquet<sup>1,2,3</sup>, Émilie J. Doucet<sup>1,2,3</sup>, Nava Hosseini<sup>1,2,3</sup>, Mélanie V. Trudel<sup>1,2,3</sup>, Gabriel Byatt<sup>1,2,3</sup>, Mathilde Laurent<sup>1,2,3</sup>, Michel Frenette<sup>3,5</sup> and Steve J. Charette<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes, Pavillon Charles-Eugène-Marchand, Université Laval; Quebec City, QC G1V 0A6, Canada; pierre-etienne.marcoux.1@ulaval.ca (P.-E.M.); massicom@mcmaster.ca (M.-A.M.); valerie.paquet@criucpq.ulaval.ca (V.E.P.); emilie.doucet.4@ulaval.ca (E.J.D.); nava.hosseini.1@ulaval.ca (N.H.); melanie.trudel@live.ca (M.V.T.); gabriel.byatt.1@ulaval.ca (G.B.); mathilde.laurent@gmx.com (M.L.)

<sup>2</sup> Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Hôpital Laval; Quebec City, QC G1V 4G5, Canada

<sup>3</sup> Département de Biochimie, de Microbiologie et de Bio-informatique; Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Quebec City, QC G1V 0A6, Canada; michel.frenette@bcm.ulaval.ca

<sup>4</sup> Département des Sciences Animales, Faculté des Sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Quebec City, QC G1V 0A6, Canada; antony.vincent@fsaa.ulaval.ca

<sup>5</sup> Groupe de Recherche en Écologie Buccale (GREB), Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Quebec City, QC G1V 0A6, Canada

\* Correspondence: steve.charette@bcm.ulaval.ca; Tel.: +418-656-2131 (ext. 406914)

## 2.2 Abstract

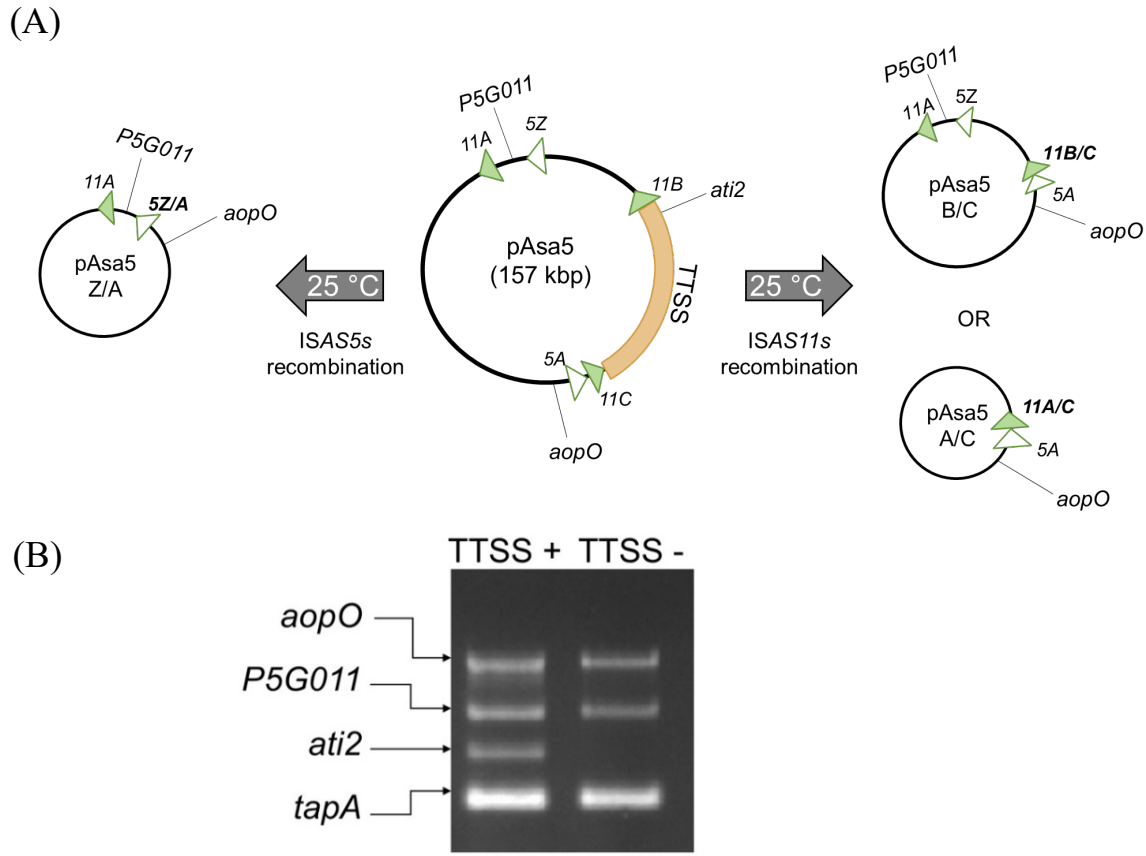
The type three secretion system (TTSS) locus of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, located on the plasmid pAsa5, is known to be lost when the bacterium is grown at temperatures of 25 °C. The loss of the locus is due to the recombination of the insertion sequences flanking the TTSS region. However, the mechanism involved in this recombination is still elusive. Here, we analyzed 22 *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains that had already lost their TTSS locus, and we systematically explored another 47 strains for their susceptibility to lose the same locus when grown at 25 °C. It appeared that strains from Europe were more prone to lose their TTSS locus compared to Canadian strains. More specifically, it was not possible to induce TTSS loss in Canadian strains that have *AsaGEI2a*, a genomic island, and prophage 3, or in Canadian strains without a genomic island. A comparative genomic approach revealed an almost perfect correlation between the presence of a cluster of genes, not yet characterized, and the susceptibility of various groups of strains to lose their locus. This cluster of genes encodes putative proteins with DNA binding capacity and phage proteins. This discovery creates new opportunities in the study of pAsa5 thermosensitivity.

## 2.3 Introduction

The type three secretion system (TTSS) is a virulence factor found in many Gram-negative bacteria and is essential for the virulence of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. This needle-like protein structure allows for the translocation of effectors from the bacteria's cytosol directly into the host cell. Once in the host cells, the effectors disrupt various cellular functions and thus contribute to the pathogenicity of the bacteria (Vanden Bergh and Frey, 2014)

*A. salmonicida* subsp. *salmonicida* is a psychrophilic bacterium with an optimum growth temperature below 20 °C. The proteins that form the structure of the TTSS are encoded in a region of the large 155 kbp plasmid named pAsa5, also known as pASvirA (Reith et al., 2008; Stuber et al., 2003). The pAsa5 plasmid is unstable during growth at a high temperature such as 25 °C and can lose the region that encodes for the TTSS. Given the high importance of the TTSS in the pathogenicity of the bacterium, the strains that lose their TTSS locus are avirulent (Burr et al., 2005; Dacanay et al., 2006; Daher et al., 2011; Stuber et al., 2003).

Though this phenomenon was initially suspected to be due to a complete loss of the pAsa5 plasmid (Stuber et al., 2003), it is, in fact, homologous recombination between insertion sequences (ISs) present on the plasmid that results in the loss of the coding region for the TTSS (Tanaka et al., 2012; Tanaka et al., 2017). The recombination between copies of the same ISs induced by growth at high temperatures is not exclusive to *A. salmonicida*. In other species like *Bacillus*, the heat-induced transposition of ISs has already been observed (Takahashi et al., 2007) and the use of ISs as a template for recombination was reported for other bacterial species (Vandecraen et al., 2017). For the *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 reference strain, the rearrangements of pAsa5 that led to the loss of the TTSS were observed between the ISAS11A and ISAS11C (A/C) or ISAS11B and ISAS11C (B/C). The pAsa5 plasmid of the 01-B526 strain has an additional ISAS5 compared to the A449 strain, which can undergo rearrangements via ISAS5Z and ISAS5A (Z/A), in addition to the A-C and B-C rearrangements (Tanaka et al., 2012; Tanaka et al., 2017) (Figure 7).



**Figure 7. (A)** Schematic representation of three recombination patterns of pAsa5 according to the ISs present on the plasmid. The region in orange corresponds to the TTSS locus, the ISAS11s are represented by green triangles and the ISAS5s are shown by white triangles. This figure is inspired by Tanaka et al. (Tanaka et al., 2017) **(B)** An example of the PCR multiplex result from the SHY14-2246 strain, which contains an unaltered pAsa5 plasmid (TTSS +) and a strain that has lost its TTSS genes (TTSS -) generated from SHY16-3432 parental strain. The *AopO* and *P5G011* genes are located downstream and upstream, respectively, of the region encoding the TTSS. The third gene corresponds to *ati2*, which is located inside the TTSS locus. The last gene (*tapA*) is located in the chromosome and it is used as a positive control.

In a previous study, an analysis of three strains showed that they exhibited a different ability to generate rearrangement for the pAsa5. It was possible to produce derivatives that had lost their TTSS locus for the 01-B526 and A449 strains, whereas no clone without the TTSS could be obtained for the 01-B516 strain (Daher et al., 2011; Tanaka et al., 2017). This result suggests that it is unlikely that all strains lose their TTSS when exposed to a stress. As the strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* have a rich accessory genome (plasmids, prophages, genomic islands, etc.), which varies from strain to strain, it is possible that one or

more of these mobile DNA elements may contribute to the difference in susceptibility between strains to lose their TTSS.

Among the mobile DNA elements found in *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, there are the *Aeromonas salmonicida* genomic islands (*AsaGEIs*) present in several strains of the bacterium. Genomic islands are genetic elements acquired by horizontal transfers and inserted into the chromosome (Bellanger et al., 2014). *AsaGEIs* genes encode for putative prophage proteins but their role in the bacteria is still unknown. However, they are interesting from an epidemiological point of view, because each type of *AsaGEI* is associated with a distinct geographic region (Emond-Rheault et al., 2015a). Depending on their sequence and especially their integrase gene, *AsaGEIs* can be divided into 5 types (*1a*, *1b*, *2a*, *2b*, and *2c*) and have a size varying from 50 to 53 kb (Emond-Rheault et al., 2015a; Emond-Rheault et al., 2015b; Long et al., 2016). Strains with an *AsaGEI1a* or *2a* are from North America and strains with an *AsaGEI1b* and *2b* are found in Europe. A strain that has an *AsaGEI2c* has been described in China. The *AsaGEI1s* have the same insertion site in the chromosome which is different from the one of the *AsaGEI2s* (Emond-Rheault et al., 2015a). Furthermore, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains only contain one of the 5 types within their genome at a time and some strains contain no *AsaGEI* at all (Emond-Rheault et al., 2015a).

Two prophages are found in nearly all strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. These are prophages 1 and 2, which were originally described in the A449 strain (Reith et al., 2008). Another prophage, prophage 3, was described later and has so far only been found in North American isolates along with *AsaGEI2a* (Emond-Rheault et al., 2015a).

To better understand why certain strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* are more likely to lose their TTSS locus, we systematically studied the phenomenon in nearly 50 strains from various origins. This study confirms that the strains have a variable propensity to lose their TTSS locus. To further study this phenomenon, we performed a comparative genomic analysis which allowed us to identify a cluster of genes that could be involved in the molecular mechanism underlying the TTSS rearrangement.

## 2.4 Materials and Methods

### 2.4.1 Bacterial strains and regular growth conditions

The *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains used in this study are described in Table 3 and the Supplementary Materials. They were grown from the frozen stock for three days at 18 °C on furunculosis agar (Daher et al., 2011).

### 2.4.2 Production of TTSS-rearranged strains

For each studied strain, clones without TTSS were produced by the previously described protocol (Daher et al., 2011) but with shorter incubation periods. Briefly, each strain was streaked on furunculosis agar from a stock at -80 °C and incubated at 25 °C for 3 days. Subsequently, 5 isolated colonies were subcultured, streaked on furunculosis agar and incubated at 25 °C for 3 additional days. After this incubation, a multiplex PCR analysis (see next section) was performed on 6 isolated colonies per Petri dish, for a total of 30 colonies tested for each strain under study.

### 2.4.3 PCR multiplex

This method was designed to identify strains that have lost certain genes present on pAsa5. The primers used are listed in Table S1. These primers targeted 3 genes (*P5G011*, *ati2* and *aopO*) located at different positions on the plasmid. The fourth gene targeted is *tapA*, which is a positive control for each bacterial lysate. DNA templates were prepared by lysing one bacterial colony in 20 µL of SWL buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8.3, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45% NP-40, and 0.45% Tween 20) (Charette and Cosson, 2004). The lysates were heated at 95 °C for 10 min. The PCR mixture and conditions were the same as previously described (Attere et al., 2015), except that the four primer pairs were mixed together. The ratio of each primer pair in the mix was: 1,6:1,2:0,6:1 for *aopO*, *P5G011*, *ati2* and *tapA*, respectively). The PCR program was as follows: 2 min 30 s at 95 °C, 30 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, and 1 min at 68 °C, followed by a final 10 min extension at 68 °C. The samples were separated on 1.3% agarose gels, which were stained with 0.5 µg/mL ethidium bromide.



#### 2.4.4 Comparative genomics

To learn more about genomic determinants, which may help explain the propensity of certain strains to rearrange their genome, genes unique to strains with an *AsaGEI1a*, *1b*, or, without *AsaGEI* from Europe, were compared to Canadian strains with an *AsaGEI2a* (Table S2). To do this, the genomes were annotated by RASTtk through the PATRIC web server (Davis et al., 2020). Subsequently, PATRIC's Protein Family Sorter was used to define groups of homologous proteins according to the stringent parameter (MCL inflation = 3.0) genus-specific families (PLfams) as recommended by PATRIC for close strain comparisons. The genomic sequences were visualized with Artemis version 18.1.0 (Carver et al., 2012) and Easyfig version 2.2.2 (Sullivan et al., 2011).

#### 2.4.5 PCR analyses for genotyping

The PCR primers that were used are listed in Table S1. The procedure is similar to multiplex PCR, except that only one pair of primers was used at a time, and the incubation period at 68 °C was 30 s instead of one minute. For amplicons longer than 3 kbp, the LongAmp Taq (New England BioLabs, Whitby, ON, Canada) (Tanaka et al., 2017). The PCR assays were performed at least twice, and appropriate positive and negative controls were included with each assay.

### 2.5 Results

In 2011, we demonstrated that many *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains had abnormalities in their pAsa5 plasmid with the absence of the TTSS locus and other regions (Daher et al., 2011). In the years that followed, our team accumulated a large collection of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* and several of these also lacked the TTSS locus on their pAsa5 (Table 3). Throughout additional studies, we have produced strains without their TTSS locus using different heat stress protocols (Table 3). The compilation of all these 22 strains without TTSS locus shows that 8 of these strains came from Europe and do not have *AsaGEI*, 5 rearranged strains were from Quebec and bear *AsaGEI1a*, and 9 other strains without TTSS have various origins.

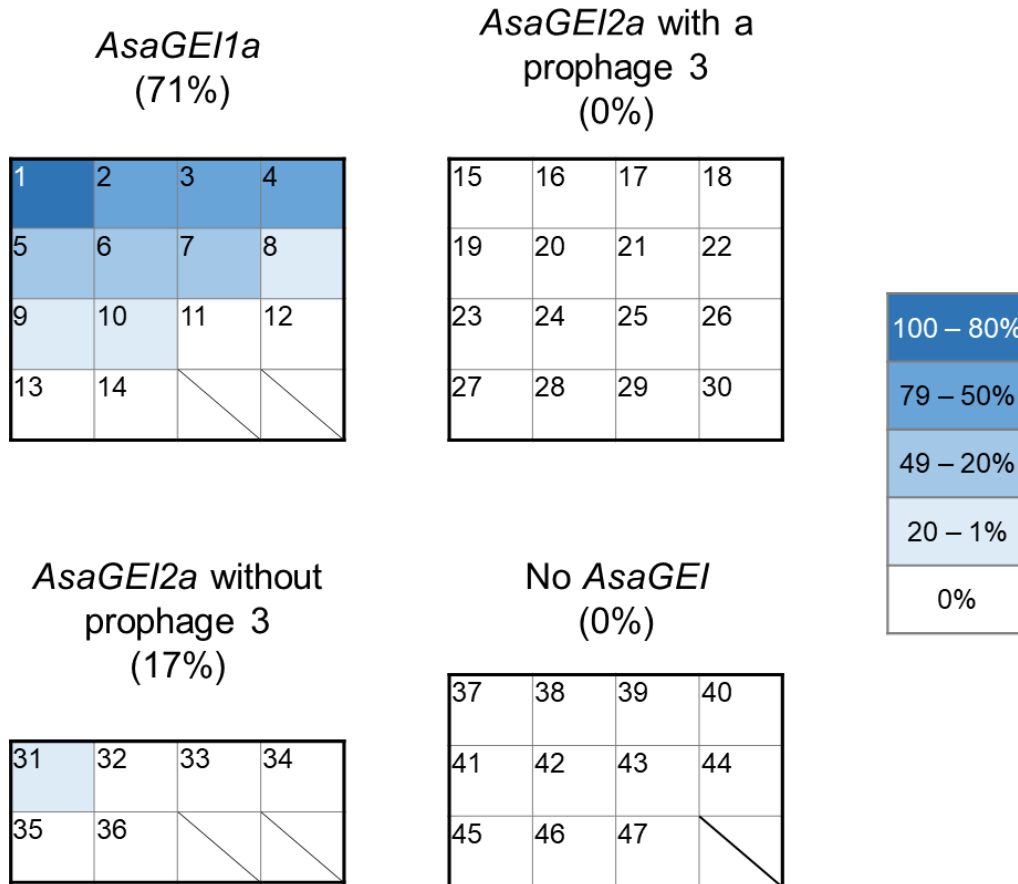
**Table 3.** Strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* which have already lost the genes encoding TTSS before their inclusion in our strain collection or which have lost it in the laboratory following incubation at 25 °C.

Type of <i>AsaGEI</i>	Strains	Origin	How TTSS has been lost <sup>a</sup>	Reference
No <i>AsaGEI</i>	HER1098	USA	Already lost	(Daher et al., 2011)
	HER1110	Japan	Already lost	(Daher et al., 2011)
	HER1104	France	Already lost	(Daher et al., 2011)
	HER1084	France	Already lost	(Daher et al., 2011)
	RS 534	France	Already lost	This study
	RS 887	Russia	Already lost	This study
	JF3519	Switzerland	Already lost	(Attere et al., 2015)
	JF3791	Switzerland	Already lost	(Attere et al., 2015)
	A449	France	2 weeks	(Daher et al., 2011)
JF2267	Switzerland	Few hours	(Stuber et al., 2003)	
<i>AsaGEI2a</i> (without prophage 3)	07-5957	Quebec, Canada	Already lost	(Daher et al., 2011)
	07-7346	Quebec, Canada	3 days	This study
<i>AsaGEI2b</i>	JF3224	Switzerland	Already lost	(Emond-Rheault et al., 2015b)
<i>AsaGEI1a</i>	07-7287	Quebec, Canada	Already lost	(Daher et al., 2011)
	m14349-09	Quebec, Canada	3 days	This study
	RS 1705	Ontario, Canada	3 days	This study
	M10745-12	Quebec, Canada	3 days	This study
	M17930-12	Quebec, Canada	3 days	This study
	01-B526	Quebec, Canada	2 weeks	(Daher et al., 2011)
<i>AsaGEI1b</i>	HER1108	Denmark	Already lost	(Daher et al., 2011)
	JF2869	Switzerland	Already lost	This study
	HER1085	Norway	3 days	(Daher et al., 2011)

a: This column indicates the culture protocol at 25 °C which was used and which led to the observation of the loss of TTSS. These protocols lasted a few hours, 3 days, or two weeks depending on the case. Several strains had lost their TTSS even before our laboratory

acquired them. In these cases, it is not possible to know the culture conditions that led to the loss of the TTSS.

To have a more precise and complete understanding of the phenomenon for the loss of the TTSS by rearrangement of the pAsa5 plasmid and the factors that may influence it, we selected 47 strains from Canada, particularly from the Province of Quebec, to study their ability to lose their TTSS during heat stress. These strains fall into four groups, depending on the type of *AsaGEI* they have or lack, and the presence of prophage 3 (Figure 8). These strains were cultured under stressful conditions at 25 °C for two consecutive periods of 3 days then 30 colonies of each of these strains were analyzed by PCR genotyping to investigate the presence of the TTSS (Figure 7). As shown in Figure 2, 71% of the strains bearing an *AsaGEI1a* had colonies that lost their TTSS. This was the case for only one strain with an *AsaGEI2a* without prophage 3. Strains with an *AsaGEI2a* and a prophage 3 or without an *AsaGEI* did not lose their TTSS at all. However, even within the group of strains that have *AsaGEI1a*, there is great variability in the predisposition of strains losing their TTSS (Figure 8 and Table S3).



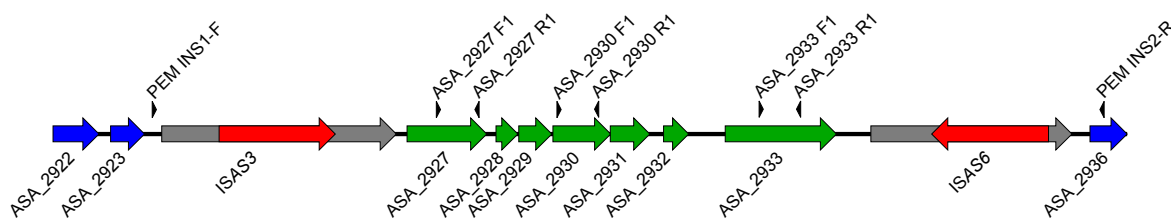
**Figure 8.** Systematic analysis of the TTSS locus loss in Canadian strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* after incubation at 25 °C for two consecutive periods of 3 days. Each numbered square corresponds to a strain. The strains where the TTSS locus loss has been observed are shown in blue. The percentage of rearrangement was calculated by the number of colonies that lost their TTSS out of the colonies tested (see Table S3 for the complete results).

Following this systematic heat stress protocol, it does not seem possible to induce TTSS loss in Canadian strains that bear *AsaGEI2a* and prophage 3 and strains without *AsaGEI* from Canada under the tested conditions. However, since we were only testing 30 colonies per strain, we hypothesized that TTSS loss can be lower than 3% (i.e., less than 1 colony on 30 analyzed) for these groups of strains and that more colonies needed to be tested to detect at least one rearranged strain. To this end, all the colonies isolated on different agar plates for the 01-B516 strain, which is a refractory strain with *AsaGEI2a* and prophage 3, were analyzed to test this hypothesis. A total of 967 colonies were tested and none of them lost the TTSS locus based on the presence of the *ati2* gene in all the PCR tests (Table S3).

Consequently, based on this result, we proposed a second hypothesis: a genetic element present or absent in susceptible strains must explain the loss of the TTSS locus during heat stress. Since European strains without *AsaGEI* are susceptible to lose their TTSS locus, this genetic element does not appear to be an *AsaGEI*. Therefore, a comparative genomic analysis was mandatory.

Based on the genomic sequences already available for several of the strains included in this study (Table S2), we searched for genetic elements specific to groups of strains that may lose their TTSS locus, or, conversely, elements specific to the strains that cannot lose it. An analysis carried out with the PATRIC web server identified only seven adjacent genes (ASA\_2927 to ASA\_2933 according to the genome annotation of the reference strain A449) specifically present in strains A449, 01-B522, 01-B526, CIP 103209, 170-68, RS534, JF3791, JF3517, JF2267, and JF2506, which all can lose their TTSS; and absent from the genomes of strains 2004-05MF26 and M22710-11, which cannot lose their TTSS by rearrangement.

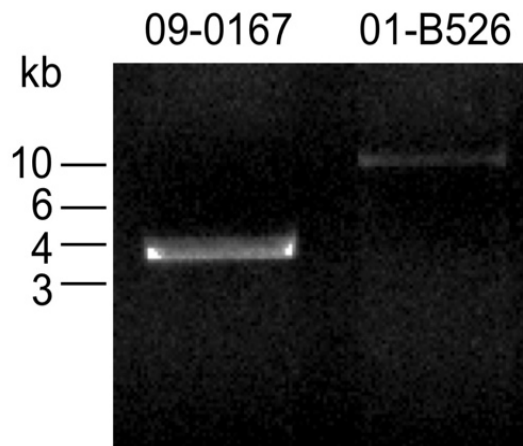
The chromosomal locus of strain A449, where the ASA-2927 to ASA-2933 genes are located, is shown in Figure 9. These 7 genes are flanked by two genes which are both interrupted by ISs. The first of these genes, upstream of ASA\_2927, codes for a putative integrase. The proteins produced by the seven genes have the following putative functions: ASA\_2927 = hypothetical protein, ASA\_2928 = AlpA family transcriptional regulator, ASA\_2929 = helix-turn-helix domain-containing protein, ASA\_2930 = ash family protein, ASA\_2931 = hypothetical protein, ASA\_2932 = hypothetical protein, ASA\_2933 = inovirus-type Gp2 protein.



**Figure 9.** Map of the chromosomal region of the A449 strain where the ASA\_2927 to ASA\_2933 genes are found. These genes are specific to strains that can lose their TTSS locus. The ASA\_2927 through ASA\_2933 genes are shown in green. A gene encoding a putative integrase (in gray on the left of the figure) is interrupted by an ISAS3, an IS (in red).

Another gene (in gray on the right of the figure), coding for a hypothetical protein, is interrupted by ISAS6, another IS (in red). The arrowheads above the genes indicate the position of primers used in genotyping PCR.

Primers PEM\_INS1-F and PEM\_INS2-R were designed to analyze the presence of this entire gene cluster by PCR (Figure 9). The primer pair amplifies a 10 kb region in 01-B526, a strain capable of losing its TTSS locus. In the 09-0167 strain, which is unable to lose its TTSS locus, an amplicon of about 3.7 kb is obtained (Figure 10). The difference in size between the amplicons is consistent with the presence of the ASA\_2927 to ASA\_2933 genes in the 01-B526 strain compared to the 09-0167 strain. By analyzing the genome of the 09-0167 strain (RefSeq assembly accession: GCF\_001902165.1), it was possible to determine that the two ISs are still present but the entire segment between the two ISs, except for 13 nucleotides, is not present in this strain. The sequence portion of the putative integrase gene upstream of ISAS3 and the sequence portion of the last gene downstream of ISAS6 are present in the 09-0167 genome, which suggests that the ancestor of this strain has lost the genes between the ISs.



**Figure 10.** PCR amplification of the region that contains the gene cluster. The primers PEM\_INS1-F and PEM\_INS2-R were used (see Figure 9 for their position on the chromosome). Based on genomic analysis, the 01-B526 strain contains the gene cluster while the 09-0167 strain does not.

Following genomic analysis, the 69 strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* from Tables 3 and S3 were tested to see if they contain the gene cluster by using primer pairs that target genes ASA\_2927, ASA\_2930, and ASA\_2933 (Figure 9). Table 4 shows that the gene cluster is present in all the AsaGEI1a-bearing strains and all the strains without AsaGEI originating from outside Canada. For the AsaGEI2a strains and the Quebec strains without AsaGEI, the gene cluster is absent. For strains that do not have the gene cluster, the same 3.7 kb as for the 09-0167 strain is obtained with the PEM\_INS1-F and PEM\_INS2-R primers (Figure 10). All these results propose a link between TTSS loss and the presence of the gene cluster. The only group of strains where this conclusion does not fit is for the strains bearing an AsaGEI2a without prophage 3. Based on Tables 3 and S3, from the 8 strains of this group that were analyzed, three can lose their TTSS, even if the gene cluster was not detected in their genome.

**Table 4.** Correlation between the presence of the ASA\_2927 to ASA\_2933 genes and certain groups of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.

Type of <i>AsaGEI</i>	Total Number of Strains Tested <sup>a</sup>	TTSS Loss Sensitivity <sup>b</sup>	Strains with ASA_2927 to ASA_2933 (%)
<i>AsaGEI1a</i>	20	++	100%
<i>AsaGEI2a</i> with prophage 3	16	-	0%
<i>AsaGEI2a</i> without prophage 3	8	+	0%
No <i>AsaGEI</i> and originating from Prov. of Quebec	11	-	0%
No <i>AsaGEI</i> and originating outside the Prov. of Quebec	10	+++	100%

<sup>a</sup>: The numbers indicated represent the sum of Tables 3 and S3.

<sup>b</sup>: +++: 100% of the strains tested gave TTSS loss; ++: 50 to 99% of the strains tested gave TTSS loss; +: 1 to 49% of the strains tested gave TTSS loss; -: 0% of the strains tested gave TTSS loss.

## 2.6. Discussion

In this study, we confirmed the previously proposed idea that *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains are not all susceptible to the loss of their TTSS when exposed to stressful temperatures (Daher et al., 2011; Tanaka et al., 2012; Tanaka et al., 2017). We performed a systematic analysis of 69 strains, while the previous conclusions had been based on analyses of only three strains (A449, 01-B516, and 01-B526). Our in-depth analysis has made it possible to divide strains according to their ability to lose their TTSS locus, and according to the presence of different genetic elements like *AsaGEIs* and prophage 3, which are in part linked to their geographical origin (Emond-Rheault et al., 2015a).

The majority of the strains that can lose their TTSS are strains with an *AsaGEI1a* (from Quebec, Canada), or strains that come from outside Canada, regardless of the presence of an *AsaGEI*. This study identified two groups of totally refractory strains: strains that have *AsaGEI2a* and prophage 3, as well as strains without *AsaGEI* from the province of Quebec. In these two groups, none of the strains have lost their TTSS locus (Table 4). Despite testing nearly one thousand colonies for 01-B516, no colony without the TTSS has been obtained. This clearly demonstrates that some strains are refractory to the loss of the TTSS with the heat stress protocol used. Moreover, in Daher et al., 2011, we tested strain 01-B516 for 2 weeks instead of 6 days without success for a total of 90 colonies. Therefore, increasing the incubation time may not have the additional impact of losing the TTSS locus (Daher et al., 2011).

The discovery of a gene cluster within *AsaGEI1a*-bearing strains and in strains from outside Canada is very interesting. The presence of this gene cluster correlates with many of the strains that lose their TTSS, suggesting that this genetic element could be involved in the rearrangement of pAsa5. That said, only 71% of the strains from the susceptible group with an *AsaGEI1a* lose their TTSS locus. Among the sensitive strains, some, such as 07-9324, 08-2783, 08-4188, and M15879-11, had more than 50% of their tested colonies devoid of TTSS locus. By comparison, only one or two colonies without the TTSS locus were found in three strains (01-B522, SHY16-3432, and SHY18-3337, see Table S3).



Consequently, the mechanism behind the recombination of the ISs found on each side of the TTSS locus in pAsa5 is more complex than an on/off process. Regulatory mechanisms are likely included in this process since the loss of the TTSS has major consequences on the virulence of the bacterium (Burr et al., 2005; Dacanay et al., 2006; Daher et al., 2011; Stuber et al., 2003). On the other hand, we should also consider that *AsaGEIIa*-bearing strains that did not lose their TTSS may need greater stress to induce the process; another possibility is that the gene cluster they contain that is suspected of being involved in the process may contain mutations that inhibit its action in the recombination of pAsa5. In the present study, our systematic approach was applied on *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains isolated in Canada only and mainly from the Province of Quebec, because of the availability of these strains in our bacterial collection. Based on the results we obtained for the *AsaGEIIa*-bearing strains, where their sensitivity to lose their TTSS was variable from one strain to the other, we can predict that a similar observation would apply for strains from outside Canada that bear the gene cluster.

*A. salmonicida* subsp. *salmonicida* has a rich plasmidome. Some plasmids, such as the cryptic plasmids pAsa1, pAsa2, and pAsa3, are found in nearly all the strains (Attere et al., 2015; Boyd et al., 2003). Other plasmids, especially the antibiotic resistance plasmids, are distributed heterogeneously (Vincent et al., 2020). Considering the non-uniform distribution of plasmids, we wanted to know if the presence or absence of some plasmids was a factor in the strain's ability to lose their TTSS.

As shown in Table S4, there is no support for this idea. The pAsa9 plasmid is only present in the first sensitive group (*AsaGEIIa*). The plasmid pSN254b is present in many strains that have *AsaGEIIa*, but it is also in one *AsaGEI2a* strain with prophage 3. These two plasmids are absent from the sensitive strains outside Canada without an *AsaGEI*. Consequently, the presence or absence of pAsa9 and pSN254b plasmids, or indeed any other plasmid, does not correlate with the ability of a strain to lose its TTSS genes.

The loss of the TTSS in some *AsaGEI2a*-bearing strains without prophage 3 compared to strains that have both *AsaGEI2a* and prophage 3 may suggest a negative regulation of the pAsa5 recombination processes by elements encoded by prophage 3. However, it could be another genetic element, not yet identified in *AsaGEI2a*-bearing strains without prophage 3,

that could explain their sensitivity to heat stress. Further analysis, including sequencing and analyzing additional genomes, will be required to shed light on this.

The strains which do not have the gene cluster composed of ASA\_2927 to ASA\_2933 still bear traces of the presence of the latter. This suggests that these strains have evolved to stop losing their TTSS and opens interesting ecological questions for future research. In addition, the molecular mechanism that led to the loss of the ASA\_2927 to ASA\_2933 genes is puzzling, since it is not possible to explain how this loss of genes could have occurred. The two unrelated ISs ended up aligned with each other. It is therefore possible that these ISs are involved in the process leading to the loss of this gene cluster. However, compared to the loss of the TTSS from pAsa5, the mechanism of which is starting to be clarified, the process behind the loss of the gene cluster remains unknown at this time. It is also interesting to note that the ISs bordering the gene cluster (ISAS3 and ISAS6) are not the same as those known to be able to generate a rearrangement of the TTSS (ISAS5 and ISAS11). However, ISAS3 and ISAS6 are of the same family (IS3), while ISAS5 and ISAS11 are members of the IS21 and IS256 families, respectively (Reith et al., 2008).

## **2.7. Conclusions**

The bacterium *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* is the causative agent for furunculosis in salmonids. This disease causes a high mortality rate, which results in heavy economic losses in aquaculture around the world (Janda and Abbott, 2010). Generally, the vaccines available in aquaculture use dead bacteria that have been inactivated by different processes (Mohd-Aris et al., 2019). However, the efficacy rate for these vaccines is low for all methods of delivery (Austin and Austin, 2016). Vaccine formulation from live attenuated strains is an attractive alternative for vaccine development and has been studied with live strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* whose virulence has been attenuated (Thornton et al., 1991). A study by Origgi et al. suggested using strains without TTSS as vaccines to develop an immune response (Origgi et al., 2017). Our study revealed that a large proportion of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains can lose their TTSS locus to become vaccine candidates.

As a next step in our study of the TTSS locus instability, it will be of interest to dissect the molecular mechanism that links the newly discovered gene cluster to the TTSS locus lost by the pAsa5 rearrangement driven by the IS recombination. It is also possible that bacterial host mechanisms are also involved in the process and hijacked by the proteins encoded in the gene cluster. However, as suggested by strains bearing the *AsaGEI2a* who lost their TTSS in the absence of the gene cluster, at least another mechanism yet to be discovered can also trigger the rearrangement of pAsa5.

Finally, in addition to studying the exact role of the gene cluster in TTSS locus loss, it will be interesting to determine the spread of this genetic element in the genome of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains from various regions of the world.

### **Supplementary Materials**

The following are available online at <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/1/85/s1>, Table S1: Primers used in this study; Table S2: Genome sequences of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* used for the comparative genomic analysis; Table S3: Systematic analysis of the TTSS locus loss in Canadian strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* after incubation at 25 °C for two consecutive periods of 3 days. Table S4: Plasmids present in the strains used in this study.

### **Author Contributions**

Conceptualization, S.J.C., P.-E.M., A.T.V., and M.F.; methodology, S.J.C., M.V.T., P.-E.M.; formal analysis, P.-E.M.; investigation, P.-E.M., A.T.V., M.-A.M., V.E.P., E.J.D., N.H., G.B., M.L.; resources, M.V.T.; data curation, A.T.V.; writing—original draft preparation, P.-E.M., S.J.C., A.T.V.; writing—review and editing, P.-E.M., S.J.C., A.T.V., M.-A.M., V.E.P., E.J.D., N.H., and M.F.; visualization, P.-E.M., S.J.C., A.T.V.; supervision, S.J.C.; project administration, S.J.C.; funding acquisition, S.J.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## **Funding**

This research was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada grant RGPIN-2019-04444 to SJC; and the Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec (INNOVAMER Program) and Ressources Aquatiques Québec grant to SJC. An Alexander Graham Bell Canada Graduate Scholarship from NSERC was received by MAM. SJC is a research scholar of the Fonds de Recherche du Québec en Santé.

## **Institutional Review Board Statement**

Not applicable.

## **Informed Consent Statement**

Not applicable.

## **Data Availability Statement**

The data presented in this study are available in the article's figures and tables and in the supplementary materials. The analyzed genome sequences are available on GenBank (NCBI). The raw data presented in this study are available on request from the corresponding author.

## **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

## **2.8 References**

Attere, S.A., A.T. Vincent, M.V. Trudel, R. Chanut, and S.J. Charette. 2015. Diversity and Homogeneity among Small Plasmids of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* Linked with Geographical Origin. *Front Microbiol.* 6:1274.

- Austin, B., and D.A. Austin. 2016. *Aeromonadaceae* Representative (*Aeromonas salmonicida*). In *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. Springer International Publishing, Cham. 215-321.
- Bellanger, X., S. Payot, N. Leblond-Bourget, and G. Guedon. 2014. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol Rev.* 38:720-760.
- Boyd, J., J. Williams, B. Curtis, C. Kozera, R. Singh, and M. Reith. 2003. Three small, cryptic plasmids from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449. *Plasmid.* 50:131-144.
- Burr, S.E., D. Pugovkin, T. Wahli, H. Segner, and J. Frey. 2005. Attenuated virulence of an *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model. *Microbiology (Reading).* 151:2111-2118.
- Carver, T., S.R. Harris, M. Berriman, J. Parkhill, and J.A. McQuillan. 2012. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics.* 28:464-469.
- Charette, S.J., and P. Cosson. 2004. Preparation of genomic DNA from *Dictyostelium discoideum* for PCR analysis. *Biotechniques.* 36:574-575.
- Dacanay, A., L. Knickle, K.S. Solanky, J.M. Boyd, J.A. Walter, L.L. Brown, S.C. Johnson, and M. Reith. 2006. Contribution of the type III secretion system (TTSS) to virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Microbiology.* 152:1847-1856.
- Daher, R.K., G. Filion, S.G. Tan, S. Dallaire-Dufresne, V.E. Paquet, and S.J. Charette. 2011. Alteration of virulence factors and rearrangement of pAsa5 plasmid caused by the growth of *Aeromonas salmonicida* in stressful conditions. *Vet Microbiol.* 152:353-360.
- Davis, J.J., A.R. Wattam, R.K. Aziz, T. Brettin, R. Butler, R.M. Butler, P. Chlenski, N. Conrad, A. Dickerman, E.M. Dietrich, J.L. Gabbard, S. Gerdes, A. Guard, R.W. Kenyon, D. Machi, C. Mao, D. Murphy-Olson, M. Nguyen, E.K. Nordberg, G.J. Olsen, R.D. Olson, J.C. Overbeek, R. Overbeek, B. Parrello, G.D. Pusch, M. Shukla, C. Thomas, M. VanOeffelen, V. Vonstein, A.S. Warren, F. Xia, D. Xie, H. Yoo, and R. Stevens. 2020.

- The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. *Nucleic Acids Res.* 48:D606-D612.
- Emond-Rheault, J.G., A.T. Vincent, M.V. Trudel, F. Brochu, B. Boyle, K.H. Tanaka, S.A. Attere, E. Jubinville, T.P. Loch, A.D. Winters, M. Faisal, M. Frenette, N. Derome, and S.J. Charette. 2015a. Variants of a genomic island in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* link isolates with their geographical origins. *Vet Microbiol.* 175:68-76.
- Emond-Rheault, J.G., A.T. Vincent, M.V. Trudel, J. Frey, M. Frenette, and S.J. Charette. 2015b. *AsaGEI2b*: a new variant of a genomic island identified in the *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* JF3224 strain isolated from a wild fish in Switzerland. *FEMS Microbiol Lett.* 362:fnv093.
- Janda, J.M., and S.L. Abbott. 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev.* 23:35-73.
- Long, M., T.K. Nielsen, J.J. Leisner, L.H. Hansen, Z.X. Shen, Q.Q. Zhang, and A. Li. 2016. *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* strains isolated from Chinese freshwater fish contain a novel genomic island and possible regional-specific mobile genetic elements profiles. *FEMS Microbiol Lett.* 363.
- Mohd-Aris, A., M.H.N. Muhamad-Sofie, M. Zamri-Saad, H.M. Daud, and M.Y. Ina-Salwany. 2019. Live vaccines against bacterial fish diseases: A review. *Vet World.* 12:1806-1815.
- Origgi, F.C., O. Benedicenti, H. Segner, U. Sattler, T. Wahli, and J. Frey. 2017. *Aeromonas salmonicida* type III secretion system-effectors-mediated immune suppression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 60:334-345.
- Reith, M.E., R.K. Singh, B. Curtis, J.M. Boyd, A. Bouevitch, J. Kimball, J. Munholland, C. Murphy, D. Sarty, J. Williams, J.H. Nash, S.C. Johnson, and L.L. Brown. 2008. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics.* 9:427.

- Stuber, K., S.E. Burr, M. Braun, T. Wahli, and J. Frey. 2003. Type III secretion genes in *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* are located on a large thermolabile virulence plasmid. *J Clin Microbiol.* 41:3854-3856.
- Sullivan, M.J., N.K. Petty, and S.A. Beatson. 2011. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics.* 27:1009-1010.
- Takahashi, K., Y. Sekine, T. Chibazakura, and H. Yoshikawa. 2007. Development of an intermolecular transposition assay system in *Bacillus subtilis* 168 using IS4*BsuI* from *Bacillus subtilis* (*natto*). *Microbiology.* 153:2553-2559.
- Tanaka, K.H., S. Dallaire-Dufresne, R.K. Daher, M. Frenette, and S.J. Charette. 2012. An insertion sequence-dependent plasmid rearrangement in *Aeromonas salmonicida* causes the loss of the type three secretion system. *PLoS One.* 7:e33725.
- Tanaka, K.H., A.T. Vincent, J.G. Emond-Rheault, M. Adamczuk, M. Frenette, and S.J. Charette. 2017. Plasmid composition in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 unravels unsuspected type three secretion system loss patterns. *BMC Genomics.* 18:528.
- Thornton, J.C., R.A. Garduno, S.G. Newman, and W.W. Kay. 1991. Surface-disorganized, attenuated mutants of *Aeromonas salmonicida* as furunculosis live vaccines. *Microb Pathog.* 11:85-99.
- Vandecraen, J., M. Chandler, A. Aertsen, and R. Van Houdt. 2017. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Crit Rev Microbiol.* 43:709-730.
- Vanden Bergh, P., and J. Frey. 2014. *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in the light of its type-three secretion system. *Microb Biotechnol.* 7:381-400.
- Vincent, A.T., N. Hosseini, and S.J. Charette. 2020. The *Aeromonas salmonicida* plasmidome: a model of modular evolution and genetic diversity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*

## Chapitre 3 – Discussion

La furunculose qui touche les salmonidés élevés dans les piscicultures constitue une problématique importante pour l'industrie piscicole (Janda and Abbott, 2010). Avec l'émergence de souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* résistantes aux antibiotiques, il est important d'identifier de nouvelles solutions pour traiter cette maladie (Morin, 2010). Une des alternatives est la vaccination à partir de souches atténuées d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, c'est-à-dire des souches sans SSTT. L'hypothèse de recherche était que différents éléments génomiques pourraient être impliqués dans la délétion des gènes, puisque certaines souches sont sensibles et d'autres sont réfractaires à la perte du SSTT. Ce projet de maîtrise avait donc pour objectif d'améliorer la compréhension de l'instabilité génomique du SSTT, et ce, pour produire des souches vaccinales. Plus précisément deux objectifs avaient été formulés. 1) Identifier les souches réfractaires et les souches sensibles chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*. 2) Faire une analyse génomique des souches sensibles et des souches réfractaires.

Le chapitre précédent démontre que ce ne sont pas toutes les souches qui sont capables de perdre leur SSTT suite à l'exposition d'un stress thermique. La découverte d'un nouveau petit prophage présent chez les souches sensibles pourrait expliquer la capacité d'une souche à perdre son SSTT. Le présent chapitre montre une analyse plus approfondie des différents résultats obtenus et présentés dans l'article. Il expose aussi différentes perspectives possibles pour la suite de cette étude.

### 3.1 *Inoviridae*

Grâce à une analyse BLAST, les gènes Asa\_2927 à Asa\_2933 seraient en fait un prophage appartenant à la famille des *Inoviridae*. Ces virus sont caractérisés par leur génome qui a une longueur qui se situe entre 4 à 12 kb et qui code pour seulement 4 à 17 gènes (King et al., 2011). Une autre particularité de cette famille de virus est qu'ils n'entraînent pas la lyse des cellules après l'infection. Il est également possible pour le virus d'intégrer son génome à l'intérieur du chromosome bactérien. Il est connu que la présence de ce type de prophage peut influencer certains comportements de la bactérie. Par exemple, chez *Pseudomonas aeruginosa*, Pf4 est un prophage faisant partie de la famille des *Inoviridae* (King et al., 2011).



La présence de ce prophage a un effet important dans la formation et l'intégrité du biofilm. De plus, une mutation ou une délétion de ce prophage diminue la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* (Rice et al., 2009; Webb et al., 2004).

Dans le cas d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, le prophage nouvellement identifié contient une intégrase qui est interrompue par une ISAS3 suivi des 7 gènes Asa\_2927 à Asa\_2933. À la fin de la séquence, il y a la présence d'un gène additionnel interrompu par une ISAS6. Incluant l'intégrase et le dernier gène altéré, la séquence a une longueur d'environ 10 kbp. Considérant que le gène de l'intégrase est coupée par une IS, cela pourrait empêcher l'excision du prophage.

La machinerie du prophage pourrait être responsable d'une façon ou d'une autre de la recombinaison du SSTT. Pour rappel, à l'exception de quelques souches possédant un *AsaGEI2a*, il y a une corrélation forte entre les souches qui perdent leur SSTT et la présence de ce prophage dans leur génome (voir chapitre précédent). Le gène Asa\_2929 correspondrait à une protéine qui détient un domaine hélice-coude-hélice. Ce motif, qui permet l'interaction avec l'ADN, permet de remplir différentes fonctions biologiques (Matthews et al., 1982; Sauer et al., 1982). Ces domaines sont étroitement liés aux protéines impliquées dans la régulation des gènes, tels que des répresseurs ou des activateurs (Anderson et al., 1981; Aravind et al., 2005; Zubay et al., 1970). Il est également possible de retrouver ce motif chez les recombinases qui sont des protéines impliquées dans la recombinaison (Grindley et al., 2006; Mouw et al., 2008; Yang and Steitz, 1995).

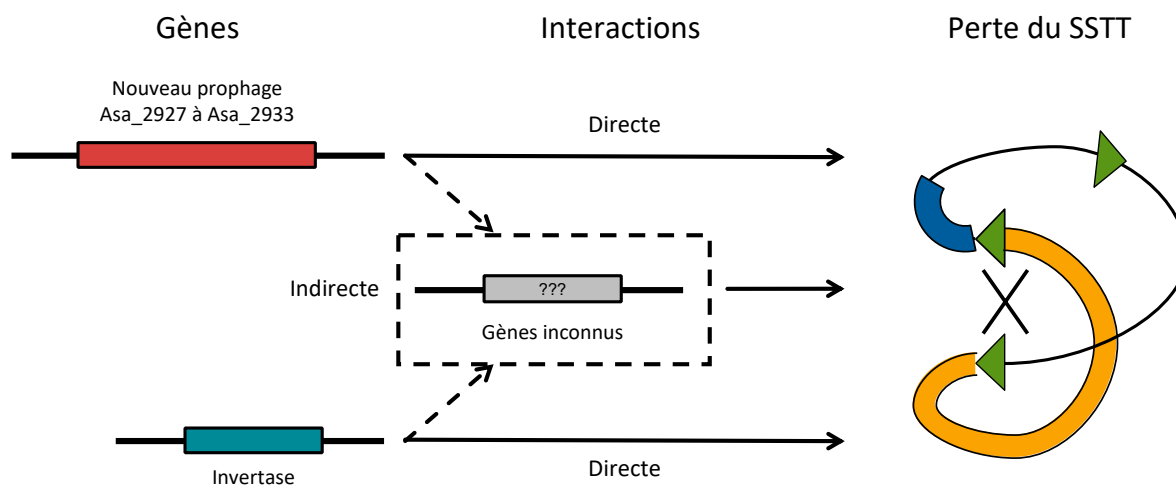
Concernant les autres gènes du prophage, l'analyse génomique a permis d'identifier des fonctions potentielles à 3 autres gènes, dont un gène qui coderait pour une protéine de structure. Cependant, à partir des informations fragmentaires retrouvées dans les banques de données, il est difficile d'établir un lien entre les autres gènes et la perte du SSTT. Néanmoins, il n'est pas exclu que ces gènes puissent avoir un rôle indirect dans la perte du SSTT. Diverses protéines peuvent être transcrites à partir du prophage et interagir avec d'autres composantes cellulaires qui pourraient être responsables de la délétion du facteur de virulence (Figure 11). Or, le scénario par lequel le prophage influence directement ou indirectement le SSTT demeure hautement hypothétique et des analyses plus approfondies doivent être réalisées.

La présence de ce nouveau prophage soulève de nombreuses questions quant à son implication dans le réarrangement. Pour la suite du projet, il pourrait être pertinent d'insérer le nouveau prophage à l'intérieur des souches réfractaires. Le protocole de transformation peut être inspiré d'une étude de 2019 qui insère le gène *VapA* à l'intérieur de souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* grâce à l'électroporation (Dallaire-Dufresne et al., 2014a; Paquet et al., 2019). Une fois le prophage inséré, il sera possible de déterminer si une souche réfractaire a acquis la capacité de perdre son SSTT en appliquant le protocole de stress thermique.

### 3.2 *AsaGEI2a* sans prophage 3

Jusqu'à présent deux souches d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* (07-7346 et SHY15-2461) ont montré la capacité de perdre leur SSTT sans la présence du prophage nouvellement identifié. Malgré le fait que le prophage puisse avoir un effet sur l'instabilité du SSTT, d'autres éléments génomiques pourraient également jouer un rôle dans la perte du SSTT. Ainsi un séquençage génomique de la souche 07-7346 a été fait. L'analyse génomique a montré la présence d'un plasmide similaire à pRA3 généralement retrouvé chez *Aeromonas hydrophila* (Kulinska et al., 2008). Ce nouveau plasmide contient la séquence d'un gène qui code pour une invertase Hin. Les invertases Hin font partie du groupe des recombinases à sérines dues à l'acide aminé présent à son site actif (Grindley et al., 2006). Ces protéines sont responsables de recombinaisons de l'ADN qui engendre une inversion à des sites spécifiques. Cette inversion d'un segment d'ADN peut influencer l'expression de certains gènes (Snyder et al., 2013). En effet, pour certaines souches de *Salmonella*, une inversion d'un segment d'environ 1 kb dû à une invertase Hin permet de changer les antigènes présents à leurs surfaces (Zieg et al., 1977). Cela est dû à la présence d'un promoteur à l'intérieur du segment d'ADN qui accroît la transcription lorsque l'ADN est dans une orientation précise (Osuna et al., 1995; Zieg et al., 1977). Ainsi, l'organisation génétique pour l'invertase Hin est importante pour engendrer une inversion. En plus du gène qui code pour l'invertase, la séquence contient un site de recombinaison situé à chaque extrémité de 26 pb (*hixL* et *hixR*). Ainsi la protéine Hin va se lier à ces deux séquences et permettre l'inversion du segment d'ADN situé entre *hixL* et *hixR* (Johnson and Simon, 1985).

Afin de vérifier si l'invertase retrouvée dans la souche 07-7346 joue un rôle dans l'instabilité du SSTT, la même méthode que présentée à la section précédente pourra être utilisée. L'invertase sera ajoutée à un plasmide qui va s'introduire dans *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* grâce à un protocole d'électroporation (Dallaire-Dufresne et al., 2014a). Il est important de mentionner que plusieurs protéines jouent un facteur important dans l'inversion du segment d'ADN (Johnson, 2015). C'est pourquoi il n'est pas exclu que l'invertase puisse activer un gène en aval ou en amont qui favorise le réarrangement du SSTT (Figure 11). Un autre point intéressant à développer est la souche SHY15-2461 qui correspond à une souche sans le nouveau prophage, mais qui est capable de perdre son SSTT. Une première approche PCR pourrait être utilisée afin de vérifier si cette souche contient également le plasmide pRA3 retrouvé chez 07-7346.



**Figure 11. Schéma d'interactions possibles pour la perte du SSTT à partir des différents gènes identifiés au cours du projet.** Les flèches pleines correspondent à une interaction directe pour la perte du SSTT contrairement aux flèches pointillées qui représentent les interactions indirectes sur différents gènes. Tout d'abord, on retrouve les deux scénarios possibles à partir des gènes identifiés. Le premier est que la machinerie du prophage ou de l'invertase, selon la souche, ait un effet direct sur l'instabilité du SSTT. Le deuxième scénario est que l'invertase ou le prophage interagissent avec d'autres gènes encore inconnus qui sont responsables de la perte du SSTT.

Les analyses bio-informatiques ont été très importantes, que ce soit pour révéler la présence du nouveau prophage ou de l'invertase à l'intérieur du nouveau plasmide. Il est à noter qu'aucun séquençage n'a été fait sur une souche d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* qui a

perdu son SSTT suite à l'exposition d'un stress thermique jusqu'à maintenant. C'est pourquoi il serait pertinent de séquencer une souche réarrangée dans le but d'identifier d'autres régions qui ont pu être perdues dans son génome. Or, la forte présence d'IS et de séquences répétées chez *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* peuvent rendre l'assemblage difficile pour différents outils bio-informatiques (Vincent et al., 2014a; Vincent et al., 2016). Ce problème est rencontré fréquemment lors d'utilisation d'un séquençage à courtes lectures comme la technologie Illumina, puisque les séquences peuvent être plus petites que les séquences répétées, ce qui va créer des bris de contigs lors de l'assemblage (Phillippy et al., 2008). Ainsi, le séquençage de molécules uniques en temps réel (SMRT) qui produit des longues lectures serait un choix optimal pour contourner ce problème (van Dijk et al., 2018). De plus, cette technologie produite par Pacific Bioscience (PacBio) a été un atout dans l'étude du génome d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida*. Le SMRT a permis la découverte du nouveau plasmide pAsa9 et d'un nouveau variant de pAsa5, qui n'aurait pas été possible avec un séquençage à courtes lectures (Massicotte et al., 2019; Tanaka et al., 2017). La compagnie Nanopore offre aussi une technologie de séquençage à longues lectures qui a aussi fait ses preuves en permettant l'assemblage du plasmide pAsa8 (Trudel et al., 2016).

### **3.3 Vaccination**

La vaccination est une méthode qui permet la prévention et le contrôle de diverses maladies infectieuses (Gudding et al., 2014). En 1942, une première étude s'est intéressée à l'utilisation d'*A. salmonicida* inactivée pour développer une immunité chez les poissons. Les bactéries ont été inactivées à l'aide de chloroforme et elles ont été administrées de manière orale (Duff, 1942). Depuis cette étude, différentes méthodes d'administration et de formulation du vaccin ont été approfondies (Austin and Austin, 2016).

Dans le secteur de l'aquaculture, la majorité des vaccins homologués sont composés de bactéries inactivées (Evensen, 2016). Ces vaccins sont créés directement à partir de l'agent pathogène. Grâce à des processus d'inactivation, il sera impossible pour l'agent pathogène de se répliquer ou d'infecter l'hôte. L'inactivation peut être faite par différents processus chimiques ou physiques. Par exemple, le formaldéhyde est couramment utilisé comme processus chimique pour inactiver les microorganismes (Gudding et al., 2014; Tlaxca et al., 2015). Toutefois, ces procédés peuvent compromettre les propriétés immunogènes du

microorganisme en altérant des antigènes présents à la surface (Loghothetis and Austin, 1996). Ainsi, l'efficacité du vaccin peut diminuer considérablement par la destruction ou la modification des antigènes sensibles aux procédés d'inactivation (Bader et al., 1997). De plus, puisque les bactéries sont mortes, elles ne peuvent pas se répliquer une fois à l'intérieur de l'hôte ou interagir de quelconques façons avec ce dernier. Pour contrer ce problème qui diminue l'efficacité du vaccin, plusieurs ajoutent des adjuvants (Di Pasquale et al., 2015). Une fois ajouté au vaccin, l'adjuvant va aider à amplifier la réponse du système immunitaire et offrir une meilleure protection contre l'agent pathogène (Guy, 2007). Or, la présence d'un adjuvant ne garantit pas toujours l'efficacité d'un vaccin (Tafalla et al., 2013). Un autre désavantage pour ce type de vaccin est qu'il est peu efficace contre les agents pathogènes intracellulaires. En effet, les vaccins à partir de bactéries mortes stimulent peu l'immunité cellulaire qui est très importante lors d'une infection d'un agent pathogène intracellulaire (Seder and Hill, 2000; Tafalla et al., 2013; Thune et al., 1997). Il est justement important de noter qu'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* est connu pour être un agent pathogène intracellulaire facultatif (Austin and Austin, 2016).

En ce qui concerne les vaccins vivants, ils sont produits à partir de l'agent pathogène dont la virulence est atténuée. L'atténuation du microorganisme pathogène peut se faire par différentes méthodes chimiques, physiques ou génétiques, qui va résulter par la perte de virulence tout en maintenant le microorganisme vivant (Shoemaker et al., 2009). Le principal avantage de ces vaccins est qu'ils stimulent davantage le système immunitaire comparativement aux vaccins inactivés (Marsden et al., 1996). Plus précisément, l'agent pathogène atténué peut toujours entrer à l'intérieur de l'hôte et se répliquer. Ce qui permet une réponse immunitaire plus efficace pour ce type de vaccin (Levine and Sztein, 2004; Seder and Hill, 2000). Ainsi l'infection engendrée par le microorganisme atténué sera très similaire à une infection retrouvée *in vivo*, sans toutefois létal pour le poisson (Pore et al., 2009). Cependant, considérant le fait que l'agent pathogène soit encore capable de se répliquer à l'intérieur de l'hôte et dans l'environnement, il peut avoir des inquiétudes sur la sécurité du vaccin (Frey, 2007). Dans certains cas, le microorganisme atténué peut retrouver sa virulence et exercer des effets négatifs sur les poissons (Hopkins and Olson, 1997; Zeman et al., 1993). Un autre élément important à considérer est la possibilité d'observer des transferts génétiques. La transmission horizontale de gènes peut avoir lieu grâce aux phages et à des

éléments d'ADN mobiles. Ainsi la présence de différents gènes de résistances aux antibiotiques présents à l'intérieur de la bactérie doit être vérifiée afin de minimiser les risques de transferts dans l'environnement (Curtiss, 2002; Lafrentz et al., 2011).

Dans un contexte d'aquaculture, la voie d'administration est un facteur important à envisager. Puisque le vaccin doit être donné à un grand nombre de poissons qui peuvent être de petite taille, la route d'administration peut être différente dépendamment de la situation et du type de vaccin (Plant and Lapatra, 2011). À ce jour, il existe 3 méthodes fréquemment utilisées pour la vaccination en pisciculture : l'injection, l'immersion et la voie orale. L'injection a comme avantage d'être efficace comparativement aux deux autres méthodes (Evensen, 2016; Munang'andu et al., 2015). Par contre, elle demande beaucoup de ressources et de temps pour les pisciculteurs. De plus, la route d'administration par injection impose un grand stress chez les poissons. Il est également possible d'observer certaines lésions à l'endroit où les poissons ont été vaccinés (Midtlyng et al., 1996). Pour les poissons de petite taille, l'injection peut s'avérer problématique, il est ainsi préférable d'utiliser l'immersion ou la voie orale comme alternative (Bogwald and Dalmo, 2019; Evensen, 2016).

La vaccination par immersion consiste à immerger les poissons dans une solution vaccinale. Malgré le fait que cette méthode est moins efficace que l'injection, différents paramètres ont été étudiés afin d'augmenter l'efficacité. Par exemple, la durée d'immersion des poissons, la concentration de la solution et le stress font partie des nombreux facteurs qui peuvent influencer l'efficacité du vaccin. Un temps d'immersion plus long augmente l'efficacité du vaccin et apporte une meilleure protection à long terme (Moore et al., 1998; Ototake et al., 1998; Ototake et al., 1999). En plus d'avoir comme avantage de vacciner les poissons à une grande échelle, la vaccination par immersion peut se faire chez des poissons de plus petites tailles. (Brudeseth et al., 2013; Johnson et al., 1982). Tout comme l'injection, il est possible d'utiliser des bactéries mortes ou des bactéries atténuées comme formulation du vaccin. Cependant le taux d'efficacité est meilleur avec les bactéries vivantes atténuées (Evensen, 2016). Le principal désavantage est qu'il faut une grande quantité de solutions vaccinales pour être efficace (Evensen, 2016; Plant and Lapatra, 2011).

Malgré le fait que la vaccination par immersion est beaucoup moins stressante que l'injection, c'est probablement la voie orale qui impose le moins de stress entre les trois approches. Les

poissons vont ingérer les bactéries ou les antigènes via la nourriture. Par contre, en raison de l'acide gastrique dans l'estomac et des différentes enzymes dans l'intestin, il est possible que le vaccin soit dégradé ou digéré avant d'offrir une protection immunitaire (Johnson and Amend, 1983; Villumsen et al., 2014). De plus, il est difficile de connaître la quantité d'antigènes ou de bactéries exactes qui ont été ingérées par les poissons. Ainsi, la protection immunitaire des poissons peut être compromise (Anderson and Nelson, 1974). Certaines avancées ont été faites pour les vaccins oraux pour augmenter leur efficacité. Par exemple, il existe différentes méthodes de protection pour permettre au vaccin de résister aux environnements hostiles du poisson (Mutoloki et al., 2015). Il est également possible d'utiliser la voie orale en combinaison avec une autre méthode d'administration (injection ou immersion). Par contre, il n'existe pas de vaccin oral qui puisse apporter une protection adéquate contre cet agent pathogène intracellulaire (Bogwald and Dalmo, 2019; Evensen, 2016).

Tel que décrit auparavant, l'utilisation de souches atténuées comme vaccin pourrait être une alternative intéressante à l'utilisation des antibiotiques. Les prochaines étapes du projet incluent des expérimentations chez les poissons afin de tester le potentiel vaccinal des souches réarrangées. Un premier test à prévoir est la sélection de la souche d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* qui va être utilisée pour causer une infection chez les poissons. Pour ce faire, différentes souches potentiellement virulentes qui détiennent le SSTT et la couche de surface A vont être exposées aux poissons par deux méthodes d'administration, soit l'injection ou la balnéation. Une fois que la souche pathogène sera sélectionnée, il pourra être possible d'exposer les poissons à une souche vaccinale. Un premier aperçu de l'efficacité du vaccin pourra être observé avec une comparaison du taux de mortalité. Par la suite, différents marqueurs cellulaires pourront être utilisés pour évaluer la stimulation du système immunitaire (Origi et al., 2017). Un autre aspect important à évaluer est l'efficacité du vaccin contre différentes souches d'*A. salmonicida*. Selon les différentes régions piscicoles du Québec, il existe une variabilité génétique à l'intérieur des souches qui pourrait influencer l'efficacité du vaccin. C'est pourquoi l'objectif est de créer un vaccin qui confère une protection contre un large spectre de souches d'*A. salmonicida*.

## Conclusion

Pour conclure, l'hypothèse de ce mémoire était que différentes souches possédaient des éléments génomiques qui expliquent leurs capacités à perdre le SSTT. Pour répondre à cette hypothèse, le premier objectif était d'identifier les souches sensibles à la perte du SSTT et les souches réfractaires à partir d'un stress thermique. Au total, 33 souches ont été identifiées comme étant capables de perdre leur SSTT parmi les 69 souches analysées. Ce projet a également permis de confirmer qu'une souche réfractaire ne semble pas être capable de perdre son SSTT, malgré l'augmentation du nombre de colonies testées. Contrairement aux 30 colonies typiquement testées par souche, il y a eu environ 1 000 colonies de la souche 01-B516 d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida* qui ont été analysées par PCR. Puisqu'aucune colonie n'a perdu les gènes codant pour le SSTT, cela suggère que l'instabilité du SSTT pourrait être liée à différents éléments génomiques chez les souches sensibles et ne pas être un simple événement lié au hasard. Le deuxième objectif a été de réaliser une analyse génomique entre les différentes souches afin d'identifier des éléments génomiques communs. Ce qui ressort de cette analyse est la présence d'un nouveau prophage qui proviendrait de la famille des *Inoviridae* à l'intérieur des souches sensibles d'*A. salmonicida* ssp. *salmonicida*. En effet, on retrouve le prophage principalement chez les souches avec un *AsaGEI1a* et les souches sans *AsaGEI* qui proviennent de l'extérieur du Québec. C'est à l'intérieur de ces groupes que la majorité des souches sensibles sont présentes. Par contre, le nouveau prophage ne semble pas être un élément qui est obligatoire pour entraîner le réarrangement du SSTT. En effet, certaines souches sans le prophage sont capables de perdre leur SSTT suggérant que d'autres éléments génomiques pourraient être impliqués ou avoir un rôle équivalent au prophage nouvellement identifié. Une caractérisation plus approfondie du nouveau prophage et des autres éléments génétiques doit être entreprise pour mieux comprendre leur rôle potentiel dans la perte du SSTT.

Malgré les nouvelles connaissances qu'amène ce projet sur l'instabilité du SSTT, il reste encore beaucoup de travail à effectuer pour mener au développement d'un vaccin qui prévient la furonculose chez les salmonidés. Plus précisément, divers tests chez le poisson doivent être faits afin de bien répondre aux demandes des pisciculteurs du Québec. Par exemple, la



comparaison entre les méthodes d'administration ou la comparaison entre les souches vaccinales font partie des nombreux points à évaluer.

## Bibliographie

- Adams, A., A. Bundy, K. Thompson, and M.T. Horne. 1988. The association between virulence and cell surface characteristics of *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*. 69:1-14.
- Anderson, D.P., and J.R. Nelson. 1974. Comparison of protection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) inoculated with and fed Hagerman redmouth bacterins. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 31:214-216.
- Anderson, W.F., D.H. Ohlendorf, Y. Takeda, and B.W. Matthews. 1981. Structure of the cro repressor from bacteriophage lambda and its interaction with DNA. *Nature*. 290:754-758.
- Aravind, L., V. Anantharaman, S. Balaji, M.M. Babu, and L.M. Iyer. 2005. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiology Reviews*. 29:231-262.
- Attere, S.A., A.T. Vincent, M.V. Trudel, R. Chanut, and S.J. Charette. 2015. Diversity and homogeneity among small plasmids of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* linked with geographical origin. *Frontier in Microbiology*. 6:1274.
- Austin, B., and D.A. Austin. 2016. *Aeromonadaceae* representative (*Aeromonas salmonicida*). In *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. Springer International Publishing, Cham. 215-321.
- Bader, J.A., P.H. Klesius, and S. Vinitnantharat. 1997. Comparison of whole-cell antigens of pressure- and formalin-killed *Flexibacter columnaris* from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *American journal of veterinary research*. 58:985-988.
- Barton, B.A., and G.K. Iwama. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*. 1:3-26.
- Beaz-Hidalgo, R., A. Alperi, N. Bujan, J.L. Romalde, and M.J. Figueras. 2010. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology*. 33:149-153.
- Belland, R.J., and T.J. Trust. 1985. Synthesis, export, and assembly of *Aeromonas salmonicida* A-layer analyzed by transposon mutagenesis. *Journal of Bacteriology*. 163:877-881.
- Belland, R.J., and T.J. Trust. 1989. *Aeromonas salmonicida* plasmids: plasmid-directed synthesis of proteins in vitro and in *Escherichia coli* minicells. *Microbiology*. 135:513-524.
- Bogwald, J., and R.A. Dalmo. 2019. Review on immersion vaccines for fish: an update 2019. *Microorganisms*. 7:627.
- Boyd, J., J. Williams, B. Curtis, C. Kozera, R. Singh, and M. Reith. 2003. Three small, cryptic plasmids from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449. *Plasmid*. 50:131-144.
- Braun, M., K. Stuber, Y. Schlatter, T. Wahli, P. Kuhnert, and J. Frey. 2002. Characterization of an ADP-ribosyltransferase toxin (AexT) from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Journal of Bacteriology*. 184:1851-1858.

- Brogden, K.A., F.C. Minion, N. Cornick, T.B. Stanton, Q. Zhang, L.K. Nolan, and M.J. Wannemuehler. 2007. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. ASM Press, Washington, D.C.
- Brudeseth, B.E., R. Wiulsirod, B.N. Fredriksen, K. Lindmo, K.E. Lokling, M. Bordevik, N. Steine, A. Klevan, and K. Gravningen. 2013. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish & Shellfish Immunology*. 35:1759-1768.
- Burr, S.E., and J. Frey. 2007. Analysis of type III effector genes in typical and atypical *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*. 30:711-714.
- Burr, S.E., D. Pugovkin, T. Wahli, H. Segner, and J. Frey. 2005. Attenuated virulence of an *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model. *Microbiology*. 151:2111-2118.
- Burr, S.E., K. Stuber, T. Wahli, and J. Frey. 2002. Evidence for a type III secretion system in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Journal of Bacteriology*. 184:5966-5970.
- Charette, S.J., F. Brochu, B. Boyle, G. Filion, K.H. Tanaka, and N. Derome. 2012. Draft genome sequence of the virulent strain 01-B526 of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Bacteriology*. 194:722-723.
- Chart, H., D.H. Shaw, E.E. Ishiguro, and T.J. Trust. 1984. Structural and immunochemical homogeneity of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*. 158:16-22.
- Chu, S., S. Cavaignac, J. Feutrier, B.M. Phipps, M. Kostrzynska, W.W. Kay, and T.J. Trust. 1991. Structure of the tetragonal surface virulence array protein and gene of *Aeromonas salmonicida*. *J. Biol. Chem.* 266:15258-15265.
- Chu, S., B. Noonan, S. Cavaignac, and T.J. Trust. 1995. Endogenous mutagenesis by an insertion sequence element identifies *Aeromonas salmonicida* AbcA as an ATP-binding cassette transport protein required for biogenesis of smooth lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:5754-5758.
- Chu, S., and T.J. Trust. 1993. An *Aeromonas salmonicida* gene which influences a-protein expression in *Escherichia coli* encodes a protein containing an ATP-binding cassette and maps beside the surface array protein gene. *Journal of Bacteriology*. 175:3105-3114.
- Cipriano, R.C., and B. Austin. 2011. Furunculosis and other aeromonad diseases. *In* Fish diseases and disorders. Volume 3: viral, bacterial and fungal infections. CABI : Wallingford. 424-483.
- Cipriano, R.C., and G.L. Bullock. 2001. Furunculosis and other diseases caused by *Aeromonas salmonicida*. National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, W. Va.
- Coleman, G., and P.W. Whitby. 1993. A comparison of the amino acid sequence of the serine protease of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* with those of other subtilisin-type enzymes relative to their substrate-binding sites. *Journal of General Microbiology*. 139:245-249.
- Collins, C.M., and D.M. Gutman. 1992. Insertional inactivation of an *Escherichia coli* urease gene by IS3411. *Journal of Bacteriology*. 174:883-888.
- Curtiss, R., 3rd. 2002. Bacterial infectious disease control by vaccine development. *Journal of Clinical Investigation*. 110:1061-1066.

- Dacanay, A., L. Knickle, K.S. Solanky, J.M. Boyd, J.A. Walter, L.L. Brown, S.C. Johnson, and M. Reith. 2006. Contribution of the type III secretion system (TTSS) to virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Microbiology*. 152:1847-1856.
- Daher, R.K., G. Filion, S.G. Tan, S. Dallaire-Dufresne, V.E. Paquet, and S.J. Charette. 2011. Alteration of virulence factors and rearrangement of pAsa5 plasmid caused by the growth of *Aeromonas salmonicida* in stressful conditions. *Veterinary Microbiology*. 152:353-360.
- Dallaire-Dufresne, S., X. Barbeau, D. Sarty, K.H. Tanaka, A.M. Denoncourt, P. Lagüe, M.E. Reith, and S.J. Charette. 2013. *Aeromonas salmonicida* Ati2 is an effector protein of the type three secretion system. *Microbiology*. 159:1937-1945.
- Dallaire-Dufresne, S., J.G. Emond-Rheault, S.A. Attere, K.H. Tanaka, M.V. Trudel, M. Frenette, and S.J. Charette. 2014a. Optimization of a plasmid electroporation protocol for *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Journal of Microbiological Methods*. 98:44-49.
- Dallaire-Dufresne, S., K.H. Tanaka, M.V. Trudel, A. Lafaille, and S.J. Charette. 2014b. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary Microbiology*. 169:1-7.
- Derome, N., J. Gauthier, S. Boutin, and M. Llewellyn. 2016. Bacterial opportunistic pathogens of fish. In *The Rasputin Effect: When Commensals and Symbionts Become Parasitic*. C.J. Hurst, editor. Springer International Publishing, Cham. 81-108.
- Di Pasquale, A., S. Preiss, F. Tavares Da Silva, and N. Garcon. 2015. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines*. 3:320-343.
- Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, and J. Hacker. 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*. 2:414-424.
- Doig, P., L. Emody, and T.J. Trust. 1992. Binding of laminin and fibronectin by the trypsin-resistant major structural domain of the crystalline virulence surface array protein of *Aeromonas salmonicida*. *J. Biol. Chem.* 267:43-49.
- Duff, B. 1942. The oral immunization of trout against bacterium *salmonicida*. *Journal of Immunology*. 44:87-94.
- Ellis, A.E. 1991. An appraisal of the extracellular toxins of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*. 14:265-277.
- Ellis, A.E., T.S. Hastings, and A.L.S. Munro. 1981. The role of *Aeromonas salmonicida* extracellular products in the pathology of furunculosis. *Journal of Fish Diseases*. 4:41-51.
- Emond-Rheault, J.G., A.T. Vincent, M.V. Trudel, F. Brochu, B. Boyle, K.H. Tanaka, S.A. Attere, E. Jubinville, T.P. Loch, A.D. Winters, M. Faisal, M. Frenette, N. Derome, and S.J. Charette. 2015a. Variants of a genomic island in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* link isolates with their geographical origins. *Veterinary Microbiology*. 175:68-76.
- Emond-Rheault, J.G., A.T. Vincent, M.V. Trudel, J. Frey, M. Frenette, and S.J. Charette. 2015b. AsaGEI2b: a new variant of a genomic island identified in the *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* JF3224 strain isolated from a wild fish in Switzerland. *FEMS Microbiology Letters*. 362:fnv093.
- Evensen, Ø. 2016. Development of fish vaccines: focusing on methods. In *Fish Vaccines*. A. Adams, editor. Springer Basel, Basel. 53-74.

- FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. *In* The State of World Fisheries and Aquaculture, Rome, Italy. 244.
- Fehr, D., S.E. Burr, M. Gibert, J. d'Alayer, J. Frey, and M.R. Popoff. 2007. *Aeromonas* exoenzyme T of *Aeromonas salmonicida* is a bifunctional protein that targets the host cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 282:28843-28852.
- Fehr, D., C. Casanova, A. Liverman, H. Blazkova, K. Orth, D. Dobbelaere, J. Frey, and S.E. Burr. 2006. AopP, a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida*, inhibits the NF-kappaB signalling pathway. *Microbiology.* 152:2809-2818.
- Fernandez-Bravo, A., and M.J. Figueras. 2020. An update on the genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. *Microorganisms.* 8.
- Frey, J. 2007. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine.* 25:5598-5605.
- Frey, J., and F.C. Origgi. 2016. Type III secretion system of *Aeromonas salmonicida* undermining the host's immune response. *Frontiers in Marine Science.* 3:1-8.
- Froquet, R., N. Cherix, S.E. Burr, J. Frey, S. Vilches, J.M. Tomas, and P. Cosson. 2007. Alternative host model to evaluate *Aeromonas* virulence. *Applied and Environmental Microbiology.* 73:5657-5659.
- Fyfe, L.A., A. Finley, G. Coleman, and A.L.S. Munro. 1986. A study of the pathological effect of isolated *Aeromonas salmonicida* extracellular protease on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases.* 9:403-409.
- Galán, J.E., and A. Collmer. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science.* 284:1322-1328.
- Garduño, R.A., J.C. Thornton, and W.W. Kay. 1993. *Aeromonas salmonicida* grown in vivo. *Infection and Immunity.* 61:3854-3862.
- Grindley, N.D., K.L. Whiteson, and P.A. Rice. 2006. Mechanisms of site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry.* 75:567-605.
- Groff, J.M., and S.E. Lapatra. 2000. Infectious diseases impacting the commercial culture of salmonids. *Journal of Applied Aquaculture.* 10:17-90.
- Gudding, R., A. Lillehaug, and Ø. Evensen. 2014. Fish vaccination. Wiley Blackwell, Chichester, West Sussex, UK ;.
- Gustafson, C., S. Chu, and T. Trust. 1994. Mutagenesis of the paracrystalline surface protein array of *Aeromonas salmonicida* by endogenous insertion elements. *Journal of Molecular Biology.* 237:452-463.
- Guy, B. 2007. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews Microbiology.* 5:396-397.
- Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Mühldorfer, and H. Tschäpe. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular microbiology.* 23:1089-1097.
- Hacker, J., and J.B. Kaper. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology.* 54:641-679.
- Hackett, J.L., W.H. Lynch, W.D. Paterson, and D.H. Coombs. 1984. Extracellular protease, extracellular haemolysin, and virulence in *Aeromonas salmonicida*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 41:1354-1360.
- Hopkins, B.A., and L.D. Olson. 1997. Comparison of live avirulent PM-1 and CU fowl cholera vaccines in turkeys. *Avian Diseases.* 41:317-325.

- Hussain, I., C. Mackie, D. Cox, R. Alderson, and T.H. Birkbeck. 2000. Suppression of the humoral immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. by the 64kDa serine protease of *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology*. 10:359-373.
- Ishiguro, E.E., W.W. Kay, T. Ainsworth, J.B. Chamberlain, R.A. Austen, J.T. Buckley, and T.J. Trust. 1981. Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature. *Journal of Bacteriology*. 148:333-340.
- Janda, J.M., and S.L. Abbott. 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 23:35-73.
- Johnson, K.A., and D.F. Amend. 1983. Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral and anal intubation of salmonids. *Journal of Fish Diseases*. 6:473-476.
- Johnson, K.A., J.K. Flynn, and D.F. Amend. 1982. Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins. *Journal of Fish Diseases*. 5:197-205.
- Johnson, R.C. 2015. Site-specific DNA inversion by serine recombinases. *Microbiology Spectrum*. 3:1-36.
- Johnson, R.C., and M.I. Simon. 1985. Hin-mediated site-specific recombination requires two 26 bp recombination sites and a 60 bp recombinational enhancer. *Cell*. 41:781-791.
- Juhas, M., J.R. van der Meer, M. Gaillard, R.M. Harding, D.W. Hood, and D.W. Crook. 2009. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*. 33:376-393.
- Kay, W.W., J.T. Buckley, E.E. Ishiguro, B.M. Phipps, J.P. Monette, and T.J. Trust. 1981. Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Bacteriology*. 147:1077-1084.
- King, A.M.Q., M.J. Adams, E.B. Carstens, and E.J. Lefkowitz. 2011. Family - Inoviridae. In *Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier, Oxford. 375-383.
- Koval, S.F., and R.G.E. Murray. 1984. The isolation of surface array proteins from bacteria. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 62:1181-1189.
- Kulinska, A., M. Czeredys, F. Hayes, and G. Jagura-Burdzy. 2008. Genomic and functional characterization of the modular broad-host-range RA3 plasmid, the archetype of the IncU group. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:4119-4132.
- Lafaille, A. 2019. Rapport des activités en Ichtyopathologie. Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, Service de diagnostic en Ichtyopathologie.
- Lafrentz, B.R., T.J. Welch, C.A. Shoemaker, J.D. Drennan, and P.H. Klesius. 2011. Modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine, AQUAVAC-ESC, lacks multidrug resistance plasmids. *Journal of Aquatic Animal Health*. 23:195-199.
- Lee, K.K., and A.E. Ellis. 1989. The quantitative relationship of lethality between extracellular protease and extracellular haemolysin of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *FEMS Microbiology Letters*. 61:127-132.
- Lee, K.K., and A.E. Ellis. 1990. Glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytotoxin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *Journal of Bacteriology*. 172:5382-5393.
- Levine, M.M., and M.B. Sztein. 2004. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nature Immunology*. 5:460-464.

- Loghothetis, P.N., and B. Austin. 1996. Antibody responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to live *Aeromonas hydrophila* as assessed by various antigen preparations. *Fish & Shellfish Immunology*. 6:455-464.
- Long, M., T.K. Nielsen, J.J. Leisner, L.H. Hansen, Z.X. Shen, Q.Q. Zhang, and A. Li. 2016. *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* strains isolated from Chinese freshwater fish contain a novel genomic island and possible regional-specific mobile genetic elements profiles. *FEMS Microbiology Letters*. 363.
- Mahillon, J., and M. Chandler. 1998. Insertion sequences. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:725-774.
- MAPAQ. 2018. La furunculose : défis et importance de la prévention - Bulletin zoosanitaire.
- MAPAQ. 2019a. Étude sur le marché de l'ensemencement de plans d'eau au Québec.
- MAPAQ. 2019b. Portrait-diagnostic sectoriel sur l'aquaculture en eau douce au Québec.
- MAPAQ. 2020. Produits de traitement utilisés en pisciculture.
- Marsden, M.J., L.M. Vaughan, T.J. Foster, and C.J. Secombes. 1996. A live (delta aroA) *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis preferentially stimulates T-cell responses relative to B-cell responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Infection and immunity*. 64:3863-3869.
- Martin-Carnahan, A., and S.W. Joseph. 2015. *Aeromonas*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1-44.
- Massicotte, M.A., A.T. Vincent, A. Schneider, V.E. Paquet, M. Frenette, and S.J. Charette. 2019. One *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolate with a pAsa5 variant bearing antibiotic resistance and a pRAS3 variant making a link with a swine pathogen. *Science of the Total Environment*. 690:313-320.
- Matthews, B.W., D.H. Ohlendorf, W.F. Anderson, and Y. Takeda. 1982. Structure of the DNA-binding region of lac repressor inferred from its homology with cro repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79:1428-1432.
- McIntosh, D., M. Cunningham, B. Ji, F.A. Fekete, E.M. Parry, S.E. Clark, Z.B. Zalinger, I.C. Gilg, G.R. Danner, K.A. Johnson, M. Beattie, and R. Ritchie. 2008. Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61:1221-1228.
- Midtlyng, P.J., L.J. Reitan, and L. Speilberg. 1996. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology*. 6:335-350.
- Moore, J.D., M. Ototake, and T. Nakanishi. 1998. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: The effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill. *Fish & Shellfish Immunology*. 8:393-408.
- Morin, R. 2010. L'utilisation des antibiotiques pour combattre la furunculose chez l'omble de fontaine génère de l'antibiorésistance chez *Aeromonas salmonicida*. *L'Aquicole*. 15:6.
- Mouw, K.W., S.J. Rowland, M.M. Gajjar, M.R. Boocock, W.M. Stark, and P.A. Rice. 2008. Architecture of a serine recombinase-DNA regulatory complex. *Molecular Cell*. 30:145-155.
- Munang'andu, H.M., S. Mutoloki, and O. Evensen. 2015. An overview of challenges limiting the design of protective mucosal vaccines for finfish. *Front. Immunol.* 6:542.

- Munita, J.M., C.A. Arias, I.T. Kudva, and Q. Zhang. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*. 4.
- Munn, C.B., E.E. Ishiguro, W.W. Kay, and T.J. Trust. 1982. Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*. *Infection and Immunity*. 36:1069-1075.
- Mutoloki, S., H.M. Munang'andu, and O. Evensen. 2015. Oral vaccination of fish - antigen preparations, uptake, and immune induction. *Front. Immunol.* 6:519.
- Noonan, B., and T.J. Trust. 1995. Molecular analysis of an A-protein secretion mutant of *Aeromonas salmonicida* reveals a surface layer-specific protein secretion pathway. *Journal of Molecular Biology*. 248:316-327.
- Origgi, F.C., O. Benedicenti, H. Segner, U. Sattler, T. Wahli, and J. Frey. 2017. *Aeromonas salmonicida* type III secretion system-effector-mediated immune suppression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*. 60:334-345.
- Osuna, R., D. Lienau, K.T. Hughes, and R.C. Johnson. 1995. Sequence, regulation, and functions of fis in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 177:2021-2032.
- Ototake, M., J.D. Moore, and T. Nakanishi. 1998. The effectiveness of prolonged exposure on soluble antigen uptake during immersion immunization of fish. *Fish Pathology*. 33:91.
- Ototake, M., J.D. Moore, and T. Nakanishi. 1999. Prolonged immersion improves the effectiveness of dilute vibrio vaccine for rainbow trout. *Fish Pathology*. 34:151.
- Paquet, V.E., A.T. Vincent, S. Moineau, and S.J. Charette. 2019. Beyond the A-layer: adsorption of lipopolysaccharides and characterization of bacteriophage-insensitive mutants of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Molecular microbiology*. 112:667-677.
- Partridge, S.R., S.M. Kwong, N. Firth, and S.O. Jensen. 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 31.
- Pavan, M.E., S.L. Abbott, J. Zorzópulos, and J.M. Janda. 2000. *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* subsp. nov., a new pectinase-positive subspecies isolated from a heavily polluted river. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1119-1124.
- Phillippy, A.M., M.C. Schatz, and M. Pop. 2008. Genome assembly forensics: finding the elusive mis-assembly. *Genome Biology*. 9:R55.
- Plant, K.P., and S.E. Lapatra. 2011. Advances in fish vaccine delivery. *Developmental and comparative immunology*. 35:1256-1262.
- Pore, D., P. Chowdhury, N. Mahata, A. Pal, S. Yamasaki, D. Mahalanabis, and M.K. Chakrabarti. 2009. Purification and characterization of an immunogenic outer membrane protein of *Shigella flexneri* 2a. *Vaccine*. 27:5855-5864.
- Price, N.C., R.M. Banks, C.M. Campbell, D. Duncan, and L. Stevens. 1990. The specificity of the major (70 kDa) protease secreted by *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*. 13:49-58.
- Price, N.C., L. Stevens, D. Duncan, and M. Snodgrass. 1989. Proteases secreted by strains of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*. 12:223-232.
- Reith, M.E., R.K. Singh, B. Curtis, J.M. Boyd, A. Bouevitch, J. Kimball, J. Munholland, C. Murphy, D. Sarty, J. Williams, J.H. Nash, S.C. Johnson, and L.L. Brown. 2008. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics*. 9:427.
- Rice, S.A., C.H. Tan, P.J. Mikkelsen, V. Kung, J. Woo, M. Tay, A. Hauser, D. McDougald, J.S. Webb, and S. Kjelleberg. 2009. The biofilm life cycle and virulence of



- Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *The ISME Journal*. 3:271-282.
- Rouleau, F.D., A.T. Vincent, and S.J. Charette. 2018. Genomic and phenotypic characterization of an atypical *Aeromonas salmonicida* strain isolated from a lumpfish and producing unusual granular structures. *Journal of Fish Diseases*. 41:673-681.
- Ruane, N.M., E.C. Carballo, and J. Komen. 2002. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). *Aquaculture Research*. 33:777-784.
- Sakai, D.K. 1985a. Loss of virulence in a protease-deficient mutant of *Aeromonas salmonicida*. *Infection and immunity*. 48:146-152.
- Sakai, D.K. 1985b. Significance of extracellular protease for growth of a heterotrophic bacterium, *Aeromonas salmonicida*. *Applied and Environmental Microbiology*. 50:1031-1037.
- Salte, R., K. Norberg, J.A. Arnesen, O.R. ØDegaard, and G. Eggset. 1992. Serine protease and glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase of *Aeromonas salmonicida* work in concert in thrombus formation; *in vitro* the process is counteracted by plasma antithrombin and  $\alpha$ 2-macroglobulin. *Journal of Fish Diseases*. 15:215-227.
- Sauer, R.T., R.R. Yocum, R.F. Doolittle, M. Lewis, and C.O. Pabo. 1982. Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure. *Nature*. 298:447-451.
- Seder, R.A., and A.V.S. Hill. 2000. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature*. 406:793-798.
- Shoemaker, C.A., P.H. Klesius, J.J. Evans, and C.R. Arias. 2009. Use of modified live vaccines in aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*. 40:573-585.
- Siguiet, P., E. Gourbeyre, and M. Chandler. 2014. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiology Reviews*. 38:865-891.
- Snieszko, S.F. 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes\*. *Journal of Fish Biology*. 6:197-208.
- Snyder, L., J.E. Peters, T.M. Henkin, and C. Wendy. 2013. Molecular genetics of bacteria. ASM Press, Washington, DC.
- Stuber, K., S.E. Burr, M. Braun, T. Wahli, and J. Frey. 2003. Type III secretion genes in *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* are located on a large thermolabile virulence plasmid. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:3854-3856.
- Sulakvelidze, A., Z. Alavidze, and J.G. Morris, Jr. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemotherapy*. 45:649-659.
- Tafalla, C., J. Børgwald, and R.A. Dalmo. 2013. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish & Shellfish Immunology*. 35:1740-1750.
- Tanaka, K.H., S. Dallaire-Dufresne, R.K. Daher, M. Frenette, and S.J. Charette. 2012. An insertion sequence-dependent plasmid rearrangement in *Aeromonas salmonicida* causes the loss of the type three secretion system. *PLoS One*. 7:e33725.
- Tanaka, K.H., M. Frenette, and S.J. Charette. 2013. IS-mediated loss of virulence by *Aeromonas salmonicida*. *Mobile Genetic Elements*. 3.
- Tanaka, K.H., A.T. Vincent, J.G. Emond-Rheault, M. Adamczuk, M. Frenette, and S.J. Charette. 2017. Plasmid composition in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*

- 01-B526 unravels unsuspected type three secretion system loss patterns. *BMC Genomics*. 18:528.
- Thune, R.L., L.A. Collins, and M.P. Penta. 1997. A comparison of immersion, immersion/oral combination and injection methods for the vaccination of channel catfish *Ictalurus punctatus* against *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 28:193-201.
- Titball, R.W., A. Bell, and C.B. Munn. 1985. Role of caseinase from *Aeromonas salmonicida* in activation of hemolysin. *Infection and Immunity*. 49:756.
- Tlaxca, J.L., S. Ellis, and R.L. Remmele. 2015. Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: Potential and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 93:56-78.
- Toranzo, A.E., J.L. Barja, R.R. Colwell, and F.M. Hetrick. 1983. Characterization of plasmids in bacterial fish pathogen. *Infection and immunity*. 39:184-192.
- Trudel, M.V., K.H. Tanaka, G. Filion, R.K. Daher, M. Frenette, and S.J. Charette. 2013. Insertion sequence AS5 (ISAS5) is involved in the genomic plasticity of *Aeromonas salmonicida*. *Mobile Genetic Elements*. 3:e25640.
- Trudel, M.V., A.T. Vincent, S.A. Attere, M. Labbe, N. Derome, A.I. Culley, and S.J. Charette. 2016. Diversity of antibiotic-resistance genes in Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: dominance of pSN254b and discovery of pAsa8. *Scientific Reports*. 6:35617.
- Trust, T.J. 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish. *Annual Review of Microbiology*. 40:479-502.
- Trust, T.J., W.W. Kay, and E.E. Ishiguro. 1983. Cell surface hydrophobicity and macrophage association of *Aeromonas salmonicida*. *Current Microbiology*. 9:315-318.
- Udey, L.R., and J.L. Fryer. 1978. Immunization of fish with bacterins of *Aeromonas salmonicida*. *Marine Fisheries Review*. 40:12-17.
- van Dijk, E.L., Y. Jaszczyszyn, D. Naquin, and C. Thermes. 2018. The third revolution in sequencing technology. *Trends in Genetics*. 34:666-681.
- Vandecraen, J., M. Chandler, A. Aertsen, and R. Van Houdt. 2017. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Critical Reviews in Microbiology*. 43:709-730.
- Vanden Bergh, P., and J. Frey. 2014. *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in the light of its type-three secretion system. *Microbial Biotechnology*. 7:381-400.
- Vanden Bergh, P., M. Heller, S. Braga-Lagache, and J. Frey. 2013. The *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* exoproteome: determination of the complete repertoire of Type-Three Secretion System effectors and identification of other virulence factors. *Proteome Science*. 11:42.
- Villumsen, K.R., L. Neumann, M. Ohtani, H.K. Strom, and M.K. Raida. 2014. Oral and anal vaccination confers full protection against enteric redmouth disease (ERM) in rainbow trout. *PLoS One*. 9:e93845.
- Vincent, A.T., A. Bernatchez, J. Frey, and S.J. Charette. 2019a. A mesophilic *Aeromonas salmonicida* strain isolated from an unsuspected host, the migratory bird Pied avocet. *Microorganisms*. 7.
- Vincent, A.T., B. Boyle, N. Derome, and S.J. Charette. 2014a. Improvement in the DNA sequencing of genomes bearing long repeated elements. *Journal of Microbiological Methods*. 107:186-188.

- Vincent, A.T., A. Fernandez-Bravo, M. Sanchis, E. Mayayo, M.J. Figueras, and S.J. Charette. 2019b. Investigation of the virulence and genomics of *Aeromonas salmonicida* strains isolated from human patients. *Infection, Genetics and Evolution*. 68:1-9.
- Vincent, A.T., J. Gauthier, N. Derome, and S.J. Charette. 2019c. The rise and fall of antibiotics in aquaculture. *In Microbial Communities in Aquaculture Ecosystems*. N. Derome, editor. Springer International Publishing, Cham. 1-19.
- Vincent, A.T., N. Hosseini, and S.J. Charette. 2020. The *Aeromonas salmonicida* plasmidome: a model of modular evolution and genetic diversity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1488:16-32.
- Vincent, A.T., L. Intertaglia, V. Loyer, V.E. Paquet, E. Adouane, P. Martin, C. Berard, R. Lami, and S.J. Charette. 2021. *AsaGEI2d*: a new variant of a genomic island identified in a group of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolated from France, which bears the pAsa7 plasmid. *FEMS Microbiology Letters*. 368.
- Vincent, A.T., F.D. Rouleau, S. Moineau, and S.J. Charette. 2017. Study of mesophilic *Aeromonas salmonicida* A527 strain sheds light on the species' lifestyles and taxonomic dilemma. *FEMS Microbiology Letters*. 364.
- Vincent, A.T., K.H. Tanaka, M.V. Trudel, M. Frenette, N. Derome, and S.J. Charette. 2015. Draft genome sequences of two *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolates harboring plasmids conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Letters*. 362.
- Vincent, A.T., M.V. Trudel, L. Freschi, V. Nagar, C. Gagne-Thivierge, R.C. Levesque, and S.J. Charette. 2016. Increasing genomic diversity and evidence of constrained lifestyle evolution due to insertion sequences in *Aeromonas salmonicida*. *BMC Genomics*. 17:44.
- Vincent, A.T., M.V. Trudel, V.E. Paquet, B. Boyle, K.H. Tanaka, S. Dallaire-Dufresne, R.K. Daher, M. Frenette, N. Derome, and S.J. Charette. 2014b. Detection of variants of the pRAS3, pAB5S9, and pSN254 plasmids in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: multidrug resistance, interspecies exchanges, and plasmid reshaping. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 58:7367-7374.
- Vipond, R., I.R. Bricknell, E. Durant, T.J. Bowden, A.E. Ellis, M. Smith, and S. MacIntyre. 1998. Defined deletion mutants demonstrate that the major secreted toxins are not essential for the virulence of *Aeromonas salmonicida*. *Infection and Immunity*. 66:1990-1998.
- Webb, J.S., M. Lau, and S. Kjelleberg. 2004. Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of Bacteriology*. 186:8066-8073.
- Whitby, P.W., M. Landon, and G. Coleman. 1992. The cloning and nucleotide sequence of the serine protease gene (*aspA*) of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *FEMS Microbiology Letters*. 78:65-71.
- Yang, W., and T.A. Steitz. 1995. Crystal structure of the site-specific recombinase gamma delta resolvase complexed with a 34 bp cleavage site. *Cell*. 82:193-207.
- Zeman, D., R. Neiger, J. Nietfield, D. Miskimins, M. Libal, D. Johnson, B. Janke, C. Gates, and K. Forbes. 1993. Systemic *Pasteurella haemolytica* infection as a rare sequel to avirulent live *Pasteurella haemolytica* vaccination in cattle. *J Vet Diagn Invest*. 5:555-559.
- Zieg, J., M. Silverman, M. Hilmen, and M. Simon. 1977. Recombinational Switch for Gene Expression. *Science*. 196:170-172.

Zubay, G., D. Schwartz, and J. Beckwith. 1970. Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 66:104-110.