

Université du Québec
INRS-ETE

**Utilisation des bactériophages pour la prévention
d'infections bactériennes en aquaculture**

par

Sandra Imbeault

M.Sc. Microbiologie
B.Sc. Microbiologie

Thèse présentée
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Sciences de l'Eau

Jury d'évaluation

Examineur externe	Monsieur Sylvain Moineau Université Laval
Examineur externe	Monsieur Pierre Belhumeur Université de Montréal
Examineur interne	Monsieur Serge Parent Biodôme de Montréal
Examineur interne	Monsieur Michel Lagacé Aquarium du Québec
Directeur de recherche	Monsieur Jean-François Blais INRS-ETE
Co-directeur de recherche	Monsieur Carl Uhland Faculté de Médecine Vétérinaire Université de Montréal

Thèse soutenue le 16 novembre 2004

REMERCIEMENTS

Je remercie Jean-François Blais, mon directeur de thèse pour la confiance qu'il m'a démontrée. Il a su investir en moi et sa générosité m'a accompagnée dans l'atteinte de mes objectifs personnels et éducatifs. Messieurs Serge Parent et Michel Lagacé ont été des acteurs essentiels tout au long de ce périple académique qu'est la réalisation d'une thèse doctorale. L'incontournable Serge pour tout ce qu'il m'a appris sur la vie et les relations avec les autres et Michel, qui à des centaines de kilomètres a toujours démontré support, intérêt et enthousiasme. Merci au Biodôme de Montréal, plus particulièrement à madame Rachel Léger, et à l'Aquarium du Québec pour le soutien matériel et financier. L'INRS-ETE et le Fonds FCAR ont également contribué à faire de ma thèse un exercice rémunéré et moins stressant. Merci au docteur Carl Uhland dont le calme et la pertinence des conseils ont été une source d'inspiration. Je tiens à remercier Jean-Daniel Bourgault et Suzanne Dussault, sans qui le doctorat serait facilement devenu une tour de Babel, merci pour votre lumière et votre amitié. Merci au docteur Ackermann pour avoir eu la patience de m'accompagner dans la découverte du monde des bactériophages. Merci à la Station piscicole Baldwin pour les poissons et les conseils quant aux soins à leur prodiguer.

Tout au long de cette recherche, Béatrice Levasseur et Normand Labbé ont été des compagnons de travail indispensables, des appuis et des sources d'énergie formidables. Il va sans dire qu'un merci tout particulier va à mon fils Georges-Édouard pour sa patience vis-à-vis d'une mère qui n'en avait parfois plus. C'est en te regardant, mon fils, que les obstacles qui m'apparaissaient insurmontables reprenaient une dimension plus juste et redevaient des expériences dont j'ai pu apprendre et profiter. Merci mille fois à mes sœurs Shirley et Cynthia pour avoir supporté mes études universitaires de mère monoparentale en s'occupant de leur neveu comme de vraies mamans.

PRÉFACE

Des événements récents de l'actualité mondiale ont soulevé des questionnements importants concernant l'état de l'industrie de l'élevage des animaux destinés à la consommation humaine. Les retombées économiques et environnementales de certaines pratiques sont devenues catastrophiques et l'urgence d'un meilleur contrôle de l'aspect microbiologique de cette industrie est maintenant criante. Prenant comme exemple la pisciculture, devenue incontournable dans la production de chair de poissons et de fruits de mer, nous présentons cette réflexion qui se veut une contribution à la mise au point de nouvelles technologies visant à résoudre le problème croissant de pollution des plans d'eau naturels par des populations bactériennes résistantes aux antibiotiques utilisés dans l'industrie piscicole. Cette recherche a donné lieu à la rédaction d'articles présentement soumis pour publication :

- **Imbeault S., S. Parent, M. Lagacé, C. Uhland et J.F. Blais (2005)** Bacteriophages for preventing furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* in farmed salmonids. Soumis au *J. Aquat. Anim. Health*.
- **Imbeault S., S. Parent, M. Lagacé, C. Uhland et J.F. Blais (2005)** Resistance to bacteriophage 65 in *Aeromonas salmonicida* -- the causative agent of furunculosis in trout -- when administered as prophylaxis. Soumis au *J. Aquat. Anim. Health*.
- **Imbeault S., S. Parent, M. Lagacé, C. Uhland et J.F. Blais (2005)** Utilisation de bactériophages pour contrôler les populations de *Aeromonas salmonicida* résistantes aux antibiotiques. Soumis au *Can. J. Microbiol.*

RÉSUMÉ

Cette recherche participe aux efforts menés pour la protection d'un environnement sain tout en valorisant les activités économiques du pays. Les travaux dont il est question dans cet ouvrage ouvrent une nouvelle voie de recherche dans le domaine de la pisciculture voire même peut-être, des élevages d'animaux en général. En effet, tout le secteur d'activités d'élevage des animaux est aux prises avec le développement de bactéries résistantes aux antibiotiques au sein des populations animales qui vivent dans le même environnement. Il en découle donc un risque de contamination des plans d'eau naturels avoisinant les stations piscicoles par des souches bactériennes pathogènes résistantes aux antibiotiques ainsi que par des bactéries non pathogènes de la flore indigène portant des plasmides de résistance.

L'objectif de cette recherche était d'évaluer la possibilité d'utiliser des bactériophages, virus bactériens, dans la prévention de l'établissement d'infections bactériennes rencontrées dans les élevages de poissons. Deux modèles ont été utilisés pour supporter cette hypothèse. L'un mettait en relation le bactériophage Aeh1 et l'hydropisie causée par *Aeromonas hydrophila* chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*). L'autre modèle faisait intervenir le bactériophage 65 et la furonculose causée par *Aeromonas salmonicida* chez l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*).

Il a été démontré au cours de cette recherche avec les ombles de fontaine qu'il est possible de retarder le développement d'une infection bactérienne par l'ajout d'un bactériophage dans l'eau d'un aquarium où un poisson et un pathogène sont mis en présence. Il a également été démontré qu'une variété importante de combinaisons de bactériophages différents pourraient être mises au point et utilisées afin de contrer le développement et la propagation de résistances bactériennes à un bactériophage prophylactique. Finalement, les bactériophages de *A. salmonicida* sont efficaces dans une très grande proportion dans la lyse cellulaire des bactéries résistantes aux antibiotiques isolées de poissons d'élevages canadiens présentant des signes cliniques de la furonculose.

Les essais sur la carpe commune ont permis d'observer que la concentration de *A. hydrophila* dans l'eau diminuait en fonction du temps pour augmenter dans le gravier et de constater que les poissons mis dans des aquariums de 70 litres munis de filtres au charbon développaient moins rapidement une infection en absence de gravier au fond des aquariums que lorsque du gravier était ajouté. De

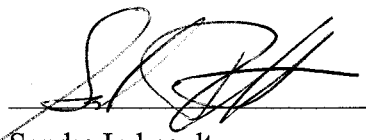
plus, la durée du contact nécessaire avant l'établissement d'une infection a permis d'observer l'évolution de l'état de santé des carpes et de déterminer de cette évolution en fonction du temps qui a pu être utilisée pour les essais sur les ombles de fontaine et qui pourrait éventuellement être utilisée pour plusieurs espèces.

La première partie des essais sur le modèle « omble de fontaine » portait sur les interactions entre *A. salmonicida*, le bactériophage 65 et les ombles de fontaine ont été étudiés dans des aquariums de 70 L maintenus à 9°C. Les populations de *A. salmonicida* (10^8 UFC/mL) ont chuté de six log en 3 jours en présence du bactériophage 65 introduit à l'eau dans un facteur de multiplicité des infections (MOI) de 1. La concentration des bactériophages et des bactéries de l'eau circulante des aquariums était inférieure de 2 à 3 log à celle retrouvée dans l'eau interstitielle au gravier de fond. Le bactériophage 65 a retardé de 10 jours l'apparition de la furunculose chez les ombles de fontaine. Finalement, des cultures du bactériophage 65 de 10^9 UFP/mL ont connu une chute de la population d'un log en 80 jours lorsque conservées à 4 °C en milieu de culture liquide.

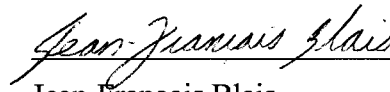
Dans la seconde partie, des mutants de la bactérie étudiée, *A. salmonicida* HER1107, ont été sélectionnés afin de les utiliser comme cible pour 10 bactériophages du Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle de Québec. Dans un premier temps, il a été vérifié si plus d'un bactériophage du Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle pouvait infecter *A. salmonicida* HER1107. Dans un deuxième temps, il a été vérifié si des mutants résistants au bactériophage 65 étaient sensibles à un ou plusieurs bactériophages. Les résultats indiquent que les bactéries résistantes au bactériophage 65 se multiplient selon des temps de génération plus lents que la souche originale et que le taux de réussite lors de repiquages en bouillon de culture TSA était très faible. Plus du quart des mutants isolés semblait retrouver le phénotype de la souche originale dès le premier repiquage en bouillon de culture TSA. Finalement, tous les mutants isolés se sont montrés sensibles à trois bactériophages ou plus du Centre de référence pour virus bactériens. Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de combinaisons de bactériophages pour de prochains essais de traitement préventif à base de bactériophages en aquaculture. Il est également suggéré que les souches bactériennes résistantes aux bactériophages pourraient être moins agressives contre les poissons compte tenu de la viabilité médiocre avec laquelle elles survivent en bouillon de culture.

Dans la troisième partie, il a été vérifié que les bactéries résistantes aux antibiotiques actuellement en usage au Canada peuvent être lysées par les bactériophages. Les résultats indiquent que des souches de *A. salmonicida* résistantes aux antibiotiques sont des cibles efficacement lysées par les 12 bactériophages actuellement disponibles du Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle. Au moins 10 bactériophages ont lysé à des degrés différents chacune des populations bactériennes disponibles.

En conclusion, il serait possible, en travaillant de pair avec les pisciculteurs et les médecins vétérinaires d'envisager sous peu l'utilisation de bactériophages sous forme de combinaisons et mettre au point un protocole de prévention de la furonculose engendrée par *A. salmonicida* et éviter des pertes économiques importantes, tout en luttant contre la propagation des résistances aux antibiotiques dans l'environnement.



Sandra Imbeault
(étudiante)



Jean-François Blais
(directeur de recherche)

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
PRÉFACE	V
RÉSUMÉ	VII
TABLE DES MATIÈRES	XI
Liste des tableaux.....	XV
Liste des figures.....	XVII
Liste des abréviations	XIX
INTRODUCTION.....	1
1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1.1 AQUACULTURE	5
1.1.1 Types d'aquaculture	5
1.1.2 Historique.....	5
1.1.3 Évolution.....	7
1.1.4 Canada.....	7
1.1.5 Maladies infectieuses des poissons.....	8
1.1.6 Prévention par immunisation	10
1.1.7 Résistances bactériennes	10
1.1.8 Antibiothérapies et résistances	12
1.2 ÉTABLISSEMENT D'UNE INFECTION.....	13
1.2.1 Système immunitaire des poissons.....	14
1.2.2 Système immunitaire non-spécifique	14
1.3 CYPRINIDÉS.....	15
1.3.1 <i>Cyprinus carpio</i>	15
1.3.2 Importance en aquaculture.....	16
1.4 SALMONIDÉS.....	16
1.4.1 <i>Salvelinus fontinalis</i>	16
1.4.2 Importance en aquaculture.....	17
1.5 BACTÉRIES.....	17
1.5.1 Flore bactérienne de l'eau.....	17
1.5.2 Flore bactérienne des poissons	18
1.5.3 <i>Aeromonas</i>	19
1.5.4 <i>Aeromonas hydrophila</i>	20
1.5.4.1 Caractéristiques.....	20
1.5.4.2 Potentiel pathogène.....	21
1.5.4.3 Habitat.....	22
1.5.4.4 Aquaculture et <i>Aeromonas hydrophila</i>	23
1.5.5 <i>Aeromonas salmonicida</i>	23
1.5.5.1 Caractéristiques.....	23
1.5.5.2 Potentiel pathogène.....	27
1.5.5.3 Habitat.....	28
1.5.5.4 Aquaculture canadienne et <i>Aeromonas salmonicida</i>	30
1.6 BACTÉRIOPHAGES.....	31

1.6.1	<i>Récepteurs bactériens</i>	32
1.6.1.1	Apparence rugueuse ou lisse	33
1.6.2	<i>Bactériophages dans le contrôle d'infections bactériennes</i>	34
1.6.2.1	Début de l'utilisation des bactériophages	34
1.6.2.2	Exemple de traitement sur un modèle mammifère	35
1.6.3	<i>Bactériophages d'Aeromonas</i>	36
1.7	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	39
1.7.1	<i>Objectifs spécifiques</i>	40
2	MATÉRIEL ET MÉTHODES	41
2.1	BACTÉRIES	41
2.1.1	<i>Aeromonas salmonicida</i>	41
2.1.2	<i>Culture et conservation</i>	44
2.1.2.1	Conditions expérimentales spécifiques à l'espèce bactérienne	44
2.1.2.2	Conservation à long terme	44
2.1.2.3	Conservation à court terme	44
2.1.3	<i>Courbe de croissance</i>	45
2.1.4	<i>Dénombrement bactérien</i>	46
2.1.4.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	46
2.1.4.2	Milieu de culture sélectif pour <i>A. hydrophila</i>	46
2.1.4.2.1	Ampicilline	46
2.1.4.2.2	Bromothymol bleu	47
2.1.4.2.3	Dextrine	47
2.1.4.2.4	Sodium déoxycholate	47
2.1.4.3	<i>Aeromonas salmonicida</i>	47
2.1.5	<i>Tests de confirmation</i>	48
2.1.5.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	48
2.1.5.2	<i>Aeromonas salmonicida</i>	48
2.2	BACTÉRIOPHAGES	49
2.2.1	<i>Phages de Aeromonas hydrophila</i>	49
2.2.2	<i>Phages de Aeromonas salmonicida</i>	49
2.2.3	<i>Amplification et conservation</i>	51
2.2.3.1	Conditions expérimentales dépendant de l'espèce bactérienne cible	51
2.2.3.2	Conservation à long terme	51
2.2.3.3	Conservation à court terme	52
2.2.4	<i>Dénombrement viral</i>	52
2.2.4.1	Titre prévu élevé	52
2.2.4.2	Titre prévu faible	53
2.3	POISSONS	53
2.3.1	<i>Cyprinus carpio</i>	53
2.3.1.1	Taille et provenance des carpes	53
2.3.1.2	Eau des bassins de quarantaine	53
2.3.1.3	Température	54
2.3.1.4	Nourriture	54
2.3.2	<i>Salvelinus fontinalis</i>	54
2.4	ESSAIS EN AQUARIUM AVEC <i>AEROMONAS HYDROPHILA</i> ET <i>CYPRINUS CARPIO</i>	54
2.4.1	<i>Description des aquariums</i>	55

2.4.2	<i>Eau des aquariums expérimentaux</i>	55
2.4.3	<i>Paramètres physico-chimiques</i>	55
2.4.4	<i>Normes de qualité de l'eau</i>	55
2.4.5	<i>Changements d'eau</i>	56
2.4.6	<i>Gravier de fond</i>	56
2.4.7	<i>Localisation des bactéries</i>	57
2.4.8	<i>Salle d'eau</i>	58
2.4.9	<i>Effets des ajouts bactériens sur des poissons</i>	59
2.4.9.1	<i>Mise à l'écart du modèle</i>	59
2.5	ESSAIS EN AQUARIUM AVEC <i>AEROMONAS SALMONICIDA</i> ET <i>SALVELINUS FONTINALISÉ</i>	60
2.5.1	<i>Tests sans poisson</i>	60
2.5.2	<i>Tests avec poissons</i>	61
2.5.3	<i>Contrôle bactérien et titre des bactériophages dans l'eau</i>	62
2.5.4	<i>Contrôle bactériens dans les poissons infectés</i>	62
2.5.5	<i>Conservation du bactériophage 65</i>	62
2.6	COMBINAISONS DE BACTÉRIOPHAGES	62
2.6.1	<i>Microorganismes</i>	63
2.6.2	<i>Sélection des résistants</i>	63
2.6.3	<i>Isolement et confirmation</i>	63
2.6.4	<i>Lyse bactérienne</i>	64
2.7	RÉSISTANCES BACTÉRIENNES AUX ANTIBIOTIQUES	64
2.7.1	<i>Microorganismes</i>	65
2.7.1.1	<i>Antibiogrammes</i>	65
2.7.2	<i>Lyse bactérienne</i>	66
3	UTILISATION DES BACTÉRIOPHAGES EN AQUARIUMS	67
3.1	ESSAIS SANS POISSONS	67
3.2	ESSAIS AVEC POISSONS	72
3.3	CONSERVATION DES BACTÉRIOPHAGES	74
3.4	DISCUSSION	75
3.4.1	<i>Essais sans poisson</i>	75
3.4.2	<i>Essais avec poissons</i>	75
3.4.3	<i>Modèle expérimental</i>	76
3.4.4	<i>Établissement de l'infection en milieu piscicole vs le modèle</i>	77
3.4.5	<i>Présence de <i>A. salmonicida</i> malgré celle du bactériophage 65</i>	78
3.4.6	<i>Potentiel médical</i>	78
3.4.7	<i>Conservation des bactériophages</i>	79
4	COMBINAISONS DE BACTÉRIOPHAGES	81
4.1	ESSAIS DE LYSÉ BACTÉRIENNE	81
4.1.1	<i>En général</i>	81
4.2	ISOLEMENT ET REGROUPEMENT DES RÉSISTANTS	81
4.2.1	<i>Sensibilité au bactériophage initial</i>	84
4.2.2	<i>Croissance lente et peu abondante</i>	84
4.2.3	<i>Mutants numéro 7 et 23a</i>	84
4.3	DISCUSSION	84
4.3.1	<i>Faible taux de survie des mutants</i>	84
4.3.1.1	<i>Mécanismes de résistances</i>	84

4.3.1.2	Avantage en milieu piscicole.....	85
4.3.2	<i>Potentiel pathogène des cellules résistantes</i>	85
4.3.3	<i>Consortiums</i>	86
4.3.3.1	Efficacité.....	86
4.3.3.2	Pathogénicité des souches résistantes.....	86
4.3.3.3	Stratégies en milieu piscicole	86
5	RÉSISTANCES BACTÉRIENNES.....	88
5.1	SENSIBILITÉ GÉNÉRALE DES SOUCHES MICROBIENNES AUX BACTÉRIOPHAGES	88
5.2	SENSIBILITÉ AUX BACTÉRIOPHAGES DES SOUCHES SENSIBLES ET RÉSISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES.....	88
5.3	SENSIBILITÉ SPÉCIFIQUE DES SOUCHES MICROBIENNES AUX BACTÉRIOPHAGES	89
5.4	EFFICACITÉ DES BACTÉRIOPHAGES POUR LA LYSE DES SOUCHES MICROBIENNES.....	90
5.5	DISCUSSION	92
6	DISCUSSION GÉNÉRALE	94
6.1	ANTIBIOTIQUES.....	94
6.2	BACTÉRIOPHAGES.....	95
6.2.1	<i>Bactériophages en milieu piscicole</i>	95
6.2.1.1	Coût.....	96
6.2.1.2	Volumes.....	96
6.2.1.3	Combinaisons	97
6.3	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	98
	BIBLIOGRAPHIE	101

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Identification des souches bactériennes de <i>Aeromonas salmonicida</i> provenant de Centre de référence pour virus bactériens Félix d’Hérelle	42
Tableau 2.2	Identification des souches bactériennes de <i>Aeromonas salmonicida</i> du laboratoire de bactériologie de l’Université de Montréal	43
Tableau 2.3	Identification et origine des bactériophages de <i>Aeromonas salmonicida</i> du Centre de référence pour virus bactériens Félix d’Hérelle	50
Tableau 2.4	Normes de qualité de l’eau.....	56
Tableau 4.1	Profil de lyse bactérienne de <i>Aeromonas salmonicida</i> et des mutants au bactériophage 65. L : Lyse ; Lsv : Lyse semi voilée ; Lm : Lyse avec plages minuscules ($\approx 0,1$ mm diamètre) ; Ln : Lyse avec plages peu nombreuses mais de taille normale (≈ 1 mm de diamètre) ; X : absence de plage de lyse	83
Tableau 5.1	Profil de lyse bactérienne des différentes souches de <i>Aeromonas salmonicida</i> . L : Lyse ; Lf : Lyse faible avec plages minuscules ($\approx 0,1$ mm diamètre) ; Lm : Lyse marbrée avec plages de taille normale (≈ 1 mm de diamètre) entremêlées de zones voilées ; L++ : Lyse complète de la taille de la goutte déposée ; L+++ : Lyse complète de la taille de la goutte déposée sans croissance de cellules résistantes après 48 h ; x : absence de lyse.....	91

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Fresque égyptienne montrant des nobles en train de pêcher dans un étang artificiel (Tirée de Costa-Pierce, 2002).....	7
Figure 1.2	Voies de pénétration des microorganismes dans l'organisme d'un poisson (Tirée de Austin et Austin, 1987).....	9
Figure 1.3	Lésions typiques d'origine bactérienne chez le poisson . (A) ulcère à la base de la nageoire dorsale; (B) hémorragies à la base des nageoires et des branchies. (Tirées de http://www.vet.uga.edu/ivcvm/1999/Anders/Anders.htm).....	20
Figure 1.4	Flagelle et pili, structures cellulaires de <i>Aeromonas hydrophila</i> qui favorisent la colonisation de ses hôtes; observation en microscopie électronique à transmission. (Tirée du site web du Northwest Fisheries Science Center http://research.nwfsc.noaa.gov/research/divisions/reutd/fhm/aero2.cfm).....	21
Figure 1.5	Capsule de cellules de <i>A. salmonicida</i> . (Tirée de : imb-ibm.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/wwwaero.pl?page=home.html&lang=f).....	25
Figure 1.6	Pigment soluble brunâtre de <i>A. salmonicida</i> sur milieu de culture TSA. (Tirée de : imb-ibm.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/wwwaero.pl?page=home.html &lang=f).....	26
Figure 1.7	Photographies prises en microscopie électronique de cellules de <i>Aeromonas salmonicida</i> . (A) cellules d'apparence rugueuse; (B) cellules d'apparence lisse. Le trait mesure 0,5 µm. (Tirées de : Austin et Austin, 1987).....	26
Figure 1.8	Cycles de réplication des bactériophages (Tirée de Ackerman et Dubow, 1987a).....	32
Figure 1.9	Morphologie des bactériophages d' <i>Aeromonas</i> (Ackerman <i>et al.</i> , 1985).....	37
Figure 1.10	Bactériophage 65. Grossissement 297 000 x (Philips EM 300). Acétate d'uranyl 2%. Le trait mesure 100 nm. Courtoisie du Dr Hans-W. Ackermann.....	38
Figure 2.1	Courbe de croissance de <i>A. hydrophila</i> HER 1209 en milieu de culture liquide BHI incubé à 28 °C..	45
Figure 2.2	Concentration de <i>A. hydrophila</i> en fonction du temps dans l'eau circulante (■) et dans l' eau interstitielle (▲) des aquariums	57
Figure 2.3	Schéma représentant la disposition des aquariums expérimentaux de la salle d'eau. (■) bassin contrôle d'eau seulement ; (▲) bassin contrôle du pathogène ; (●) bassin contrôle des bactériophages ; (—) bassin contenant le pathogène et les bactériophages.....	59
Figure 3.1	Concentration de <i>Aeromonas salmonicida</i> HER1107 en fonction du temps en aquariums en l'absence du bactériophage 65: (○) eau circulante; (●) eau interstitielle au gravier; (n=3)	68
Figure 3.2	Concentration du bactériophage 65 en fonction du temps en aquariums en l'absence de <i>A.</i>	

	<i>salmonicida</i> : (○) eau circulante; (●) eau interstitielle au gravier.....	69
Figure 3.3	Influence du bactériophage 65 sur une population de <i>Aeromonas salmonicida</i> en aquariums: (○) bactériophage 65 dans l' eau circulante; (●) bactériophage 65 dans l' eau interstitielle au gravier; (□) <i>Aeromonas salmonicida</i> dans l'eau circulante; (■) <i>Aeromonas salmonicida</i> dans l'eau interstitielle au gravier	71
Figure 3.4	Évolution de l'état de santé d'ombles de fontaine en présence de <i>A. salmonicida</i> (A) <i>A.</i> <i>salmonicida</i> + bactériophage 65 (B). Échelle d'évaluation de l'état de santé : (S1) bonne santé; (S2) perte de brillance et de couleur, perte de l'appétit, diminution des déplacements; (S3) apparition de mucus aux branchies et aux nageoires; (S4) invasion des branchies par le mucus, hémorragies aux nageoires, les poissons sont regroupés et sans mouvement ; (S5)euthanasie ou mort au matin	73

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BAPE	Bureau d'Audience Publique sur l'Environnement
BCDA	Bureau du Commissaire pour le Développement de l'Aquaculture
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i>
CAHI	<i>Canadian Animal Health Institute</i>
CAN	Canadien
CCPA	Conseil Canadien de Protection des Animaux
CNRC	Conseil National de Recherche du Canada
DO	Densité Optique
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FRDC	<i>Food Research and Development Centre</i>
GCAT	Glycérophospholipid :Cholestérol AcylTransférase
IBM	Institut des Biosciences Marines
MnSOD	Manganèse peroxyde Dismutase
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i> (facteur de multiplicité des infections : ratio bactériophages/bactéries)
MPO	Myéloperoxydases
OCAD	<i>Office of the Commissioner for Aquaculture Development</i>
OMPS	<i>Outer Membrane Proteins</i>
RES	<i>Reticulo-Endothelial System</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Rotations Par Minute
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unités Formatrices de Colonies
UFP	Unités Formatrices de Plages de lyse
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USGS	<i>United States Geological Survey</i>

INTRODUCTION

Les plus récentes données disponibles (FAO, 2003) nous indiquent qu'au cours des dix dernières années, la production mondiale de poissons et d'invertébrés aquatiques d'élevages a doublé en poids et en valeur (Naylor *et al.*, 2000). Actuellement, l'industrie aquacole produit entre 25 et 30% du marché mondial de chair de poissons et de fruits de mer destinées à la consommation humaine. Pour l'année 2000, le Canada en produisait plus de 123 000 tonnes, ce qui correspond à 612 millions de dollars (CAN). Les salmonidés (saumon et truite arc-en-ciel) représentent la majeure partie de la production piscicole canadienne (Pêches et Océans Canada, 2002). Cette production était dirigée principalement vers les marchés d'alimentation. Au Québec, l'omble de fontaine (ou truite mouchetée) est un des salmonidés privilégiés par les producteurs. De la production canadienne totale, 900 tonnes par année sont destinées à la pêche sportive au Québec. Les besoins en poissons et fruits de mer s'accroissant au même rythme que la population, les volumes de prises de pêches de poissons sauvages s'amenuisant, le marché international de l'industrie piscicole gagnera en importance avec les années (Botsford *et al.*, 1997; Pauly *et al.*, 1998).

La promiscuité d'individus d'une population animale gardée en milieu clos favorise le développement de populations bactériennes pathogènes. Les impératifs économiques du marché favorisent la maximisation de l'espace d'élevage, ce qui favorise la transmission des agents infectieux. Lorsqu'il s'agit de populations de poissons, les microlésions sont plus fréquentes et se trouvent donc être des voies d'entrées pour les organismes pathogènes. Dans le cas précis des piscicultures, le milieu naturel avoisinant et les poissons qui s'y trouvent seront confrontés à la présence des pathogènes de l'élevage. Ortega *et al.* (1995) ont étudié la flore bactérienne des cours d'eaux et des poissons habitant en amont ou en aval d'installations piscicoles. Ils ont conclu que ces poissons présentaient des concentrations et des fréquences d'isolement de pathogènes plus élevées que lorsque aucune installation piscicole n'est à proximité. L'inverse est également vrai. C'est-à-dire que les élevages peuvent être contaminés par des pathogènes provenant de l'environnement sauvage. La ferme piscicole peut être inoculée par le biais de poissons sauvages qui se joignent aux poissons d'élevage, ou encore, par une fluctuation d'une population bactérienne pathogène présente dans le cours d'eau à proximité (Costa-Pierce, 2002).

Plusieurs problèmes peuvent découler de cet «enrichissement» de pathogènes dont le développement de résistances bactériennes au sein de la flore bactérienne indigène de la pisciculture et de l'environnement naturel. Le lien entre certains échecs thérapeutiques et le développement de résistances bactériennes aux antibiotiques n'est plus à faire. Une des conséquences de cette problématique a été la revitalisation de l'intérêt pour des thérapies dites alternatives. Les bactériophages, virus bactériens, représentent une de ces alternatives potentielles (Slopek *et al.*, 1987; Lederberg, 1996; Alisky *et al.*, 1998; Sulakvelidze *et al.*, 2001). Depuis les années 1980, plusieurs expérimentations sur différents modèles animaux ont permis de démontrer qu'il est possible de traiter une infection dont le pathogène a été identifié avec des bactériophages spécifiques (Berchieri *et al.*, 1991; Soothill, 1994; Merril *et al.*, 1996; Barrow *et al.*, 1998). Nakai et Park (Nakai & Park, 2002 et Park & Nakai, 2003) ont permis de débiter l'exploration du potentiel des bactériophages dans le domaine de la pisciculture.

Il existe bien sûr des solutions qui permettent de diminuer les risques d'infections des poissons d'élevages et des populations sauvages environnantes tels un contrôle serré des paramètres physico-chimiques de l'eau et un entretien adéquat des installations. Ortega *et al.* (1995), révélaient que parmi les facteurs étiologiques les plus importants, on retrouvait les *Aeromonas* mobiles, dont *A. hydrophila*, présents dans plus de 30% des infections dénombrées, immédiatement suivi par *A. salmonicida* répertorié dans 18% des cas. *A. salmonicida* est reconnu pour être le facteur étiologique de la furunculose des salmonidés. *A. hydrophila* a été étudié surtout pour être le facteur étiologique de l'hydropisie des cyprinidés (Bergey *et al.*, 1974). Ces deux bactéries peuvent causer des infections chroniques. La chronicité d'une infection se reconnaît macroscopiquement par la formation d'ulcères sur la peau du poisson (Uhland *et al.*, 2000). La présence d'ulcères rend le poisson impropre à sa commercialisation sur le marché de la consommation humaine. Le producteur peut donc se retrouver avec des poissons invendables. Lorsqu'il s'agit d'un problème aigu, qui cause la mort des individus atteints, un traitement à base d'antibiotiques est prévu. Cependant, l'obligation de mise en quarantaine des populations ayant subi une antibiothérapie peut rapidement devenir dramatique pour un éleveur. L'avenue la plus profitable dans le cas de ces deux maladies, semble donc la prévention, c'est-à-dire le contrôle de la population bactérienne avant l'établissement d'une infection, plutôt que le traitement curatif (Roberts, 1993).

Le premier chapitre de cette thèse comporte une revue bibliographique des diverses connaissances scientifiques reliées aux différents domaines abordés. De fait, la première section de ce chapitre présente un tableau de la situation de la pisciculture et de son évolution dans le temps. La seconde section trace un profil succinct des connaissances disponibles sur les aspects importants concernant les espèces de poissons à l'étude : la carpe commune et l'omble de fontaine. La troisième section s'intéresse aux bactéries *Aeromonas hydrophila* et *Aeromonas salmonicida*. La quatrième section aborde le monde des bactériophages. Ce même chapitre présente les hypothèses ainsi que les objectifs associés à cette recherche. Dans le deuxième chapitre on retrouve la démarche méthodologique utilisée et les résultats qui ont permis d'en arriver à un protocole accepté par le Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA). La justification de la mise à l'écart d'un des modèles précède la poursuite de la description de la démarche expérimentale. Le troisième chapitre est consacré aux essais en aquariums sur l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*). Le quatrième chapitre porte sur les essais de combinaisons de bactériophages. Le cinquième chapitre propose l'utilisation de bactériophages contre les bactéries résistantes aux antibiotiques. Une discussion générale suit le tout afin de synthétiser les idées véhiculées au long de la thèse. Enfin, les conclusions et les recommandations de l'auteur font suite. Un relevé bibliographique des documents cités vient compléter cet ouvrage.

1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La revue bibliographique a été divisée en quatre sections distinctes portant sur chacun des aspects de cette recherche. La première section de ce chapitre présente la pisciculture et son évolution dans le temps. La seconde section traite des poissons mais plus particulièrement de la carpe commune et de l'omble de fontaine. La troisième section s'intéresse aux bactéries étudiées soit *Aeromonas hydrophila* et *Aeromonas salmonicida*. Finalement, la quatrième section de ce premier chapitre amène des précisions sur le monde des bactériophages.

1.1 Aquaculture

1.1.1 Types d'aquaculture

Selon les auteurs on trouve différentes subdivisions de l'aquaculture. La définition la plus complète et la moins restrictive semble celle de Coche (1982) qui divise l'aquaculture en trois types : intensive, semi-intensive et extensive.

- L'aquaculture intensive est celle dont l'apport de nourriture provenant de l'extérieur du milieu naturel est supérieur à 20% et constitué majoritairement de protéines;
- L'aquaculture semi-intensive est le type pour lequel un apport alimentaire supplémentaire faible en protéines est utilisé. Les produits donnés aux animaux de l'élevage peuvent être des plantes locales et/ou des sous-produits de l'agriculture;
- L'aquaculture extensive est celle où aucune nourriture de l'extérieur du milieu naturel n'est ajoutée. Seuls l'aménagement et l'ensemencement sont de nature humaine.

1.1.2 Historique

Au tout début, les hommes ont cherché à améliorer la qualité de vie de poissons sauvages afin de maximiser la quantité de poissons qui pourrait être pêchée d'un plan d'eau naturel. Des stratégies variées comme l'exclusion des prédateurs d'une espèce prisée ou l'amélioration de l'irrigation naturelle ont été ce que l'on nomme la proto-aquaculture (Harris, 1996). Les archéologues ont retracé des preuves de l'existence d'une proto-aquaculture dans plusieurs sociétés anciennes et ce,

réparties sur tout le globe (Beveridge et Little, 2002). Par exemple, on peut voir à la Figure 1.1, une fresque égyptienne qui daterait de plus de 4000 ans qui représente un couple de nobles égyptiens s'adonnant à la pêche. La pêche à la perche était une activité pratiquée par toutes les classes de la société égyptienne mais les plus riches, comme ceux représentés sur la fresque, possédaient leur étang privé. Cette activité était valorisée surtout pour le symbolisme spirituel de la mort et de la renaissance. C'est en effet l'aspect spirituel qui était à l'origine de l'intérêt de ce peuple pour le poisson qu'ils considéraient comme un animal sacré (Chimits, 1957). Le peuple chinois est un autre exemple de ceux qui, depuis plusieurs milliers d'années, ont introduit le poisson dans le cycle de leur agriculture. La présence des terres marécageuses et l'association agriculture/aquaculture ont favorisé la prédominance de la chair de poisson dans la diète de ce peuple (Little et Edwards, 1997). L'Angleterre médiévale a également eu recours aux étangs de poissons ensemencés par l'homme. Les débuts de la pisciculture se sont produits pour certains dans le but de subvenir aux besoins en nourriture, alors que pour certains autres l'objectif premier était d'ornementer les jardins de leurs domaines (Currie, 1991). En Amérique, plusieurs peuples dont les Aztèques pratiquaient une forme d'agriculture/aquaculture sur des terres artificiellement devenues marécageuses. L'ajout de branchages aux abords de plans d'eau créait des plateformes sur lesquelles on procédait à la culture entre autres, du maïs et de la tomate. Ces constructions permettaient l'irrigation du jardin ainsi aménagé et de la boue prélevée du cours d'eau, riche en matière organique servait de support aux racines et de fertilisant. C'est avec le temps et le hasard que ces installations ont mené au développement de l'aquaculture (Armillas, 1971).

Il s'agit donc d'une activité qui prend de plus en plus d'importance au niveau économique mais qui existe depuis longtemps. Plusieurs exemples nous permettent d'observer que l'humain, confronté à des environnements apparaissant hostiles aux premiers abords, a su développer des habitudes de vie et une conceptualisation de leurs relations avec leur environnement permettant le développement d'un écosystème au sein duquel l'homme est partie intégrante mais aussi membre indispensable à son bon fonctionnement. Des peuples comme ceux habitant Hawaïi, qui ont su mettre à profit la géographie de leur pays et maximiser la production de chair de poissons et des fruits de mer pour subvenir aux besoins des populations et où la mariculture (aquaculture dans l'océan) est florissante, est une de ces manifestations (Costa-Pierce, 2002).

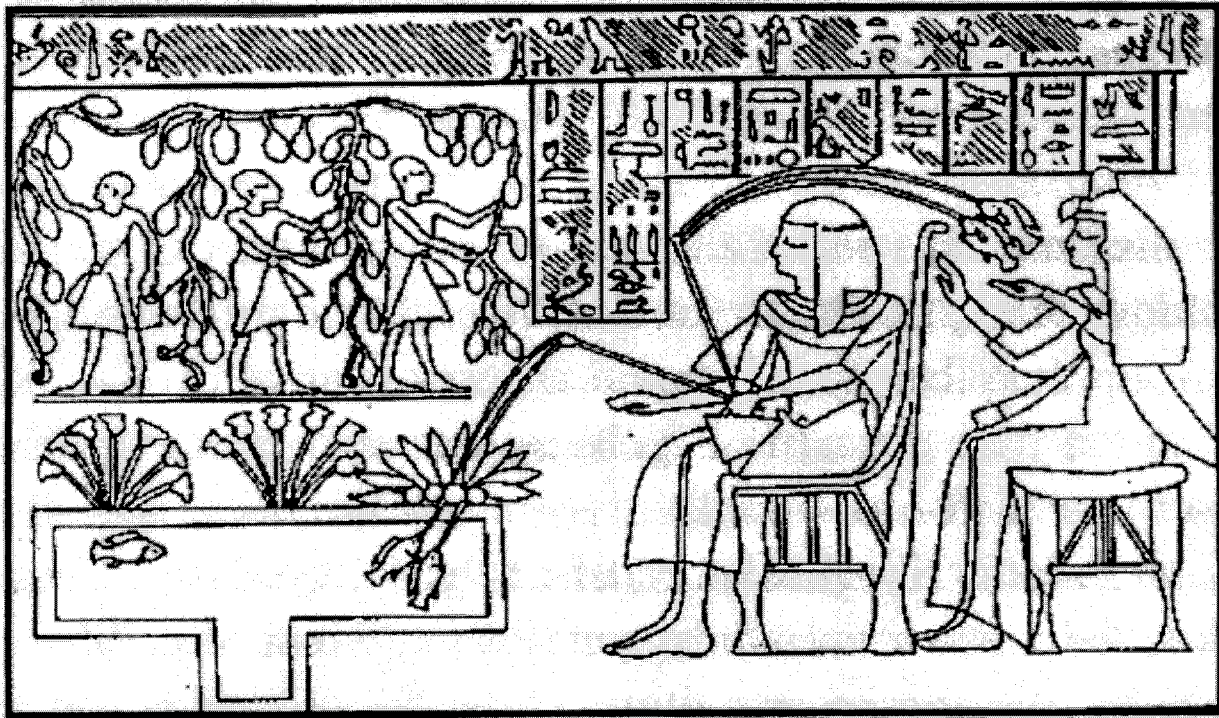


Figure 1.1 Fresque égyptienne montrant des nobles en train de pêcher dans un étang artificiel (Tirée de Costa-Pierce, 2002)

1.1.3 Évolution

L'aquaculture croît plus rapidement que tous les autres secteurs de production de chair animale. Le taux de croissance de l'aquaculture au niveau mondial en 2000 était de 11 à 12% (Leveque et Huet, 2003). Selon le dernier rapport de la FAO (2003) : La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2002, en 2001, la contribution de l'aquaculture s'est encore accrue passant à 29 pour cent de la production pondérale totale.

1.1.4 Canada

L'abondance des poissons le long des côtes de notre pays, qui n'était encore qu'une terre inconnue, serait la cause des premiers débarquements de voyageurs en Amérique du Nord. Les Vikings, au XI^e siècle, seraient les premiers à être venus pêcher le long des côtes gaspésiennes. Nombreux sont

les peuples qui les ont imités par la suite et les premières colonies à s'installer sur la péninsule gaspésienne y étaient dans le but de profiter de ce qui allait devenir l'industrie québécoise de la pêche telle qu'on la connaît aujourd'hui (Direction régionale de la Gaspésie, 2001). Aujourd'hui, le territoire gaspésien compte 18 entreprises piscicoles. La Gaspésie est en effet un terrain propice au développement de l'aquaculture. Les nombreuses baies et anses permettent l'élevage de certains crustacés mais à l'intérieur des terres existent un potentiel aquifère qui rendrait possible l'élevage de l'omble chevalier et de l'omble de fontaine (Direction régionale de la Gaspésie, 2001).

Le développement de l'aquaculture au Canada, plus spécifiquement au Québec, a vu le jour avec le besoin de produire de jeunes poissons pour la pêche sportive. La culture des salmonidés, le saumon atlantique et l'omble de fontaine, visait la reconstitution des populations déficientes de certains plans d'eau et rivières. Encore aujourd'hui, une large part du marché des piscicultures est dirigée vers la pêche sportive. La production destinée à la table des consommateurs est plus récente mais tend à augmenter d'année en année. La production annuelle québécoise (une centaine d'entreprises) de poissons et fruits de mer est actuellement de plus de 2000 tonnes. Les marchés visés sont, à parts égales, celui de l'ensemencement et celui de la consommation. La valeur à la ferme des entreprises piscicoles québécoises est estimée à plus de 10 millions de dollars. Afin de diversifier la production, des élevages expérimentaux de l'omble chevalier, du doré et de la perchaude sont présentement à l'étude (Pêches et Océans Canada, 2002).

1.1.5 Maladies infectieuses des poissons

La multiplicité des manipulations et la promiscuité des poissons dans le but de rencontrer des impératifs économiques, font que les pathologies sont choses courantes. Mais dans le cas de populations particulièrement sensibles comme l'omble de fontaine, tout stress imposé par l'homme (la capture, le triage, le stockage ou le transport) ou découlant de la variation de certains paramètres physico-chimiques de l'environnement (la température, le pH, la concentration d'oxygène dissous) augmentent les risques de développement d'infections (De Kinkelin et Hattenberger, 1986). Les voies par lesquelles les microorganismes peuvent pénétrer sont variées et multiples. La Figure 1.2 démontre bien cette réalité. La capture des individus malades afin de les traiter représente une source de stress supplémentaire d'une part et d'autre part, les poissons qui démontrent des symptômes sont souvent déjà atteints gravement par la maladie, ce qui explique que la prévention

est privilégiée (De Kinkelin et Hattenberger, 1986). Une étude menée sur une période de 4 ans dans les rivières et les industries piscicoles du nord-est de l'Espagne par Ortega *et al.* (1995), révèle que parmi les facteurs étiologiques importants, les *Aeromonas* mobiles, dont *A. hydrophila*, viennent en tête de liste avec plus de 30% des infections dénombrées, suivi par *A. salmonicida* (18%) et *Renibacterium salmoninarum* (14%). Il est à noter que les infections sont plus nombreuses chez les espèces indigènes lorsque des aquaculteurs ont des industries à proximité des cours d'eau naturels (McAllister 1988 ; Ortega *et al.*, 1995).

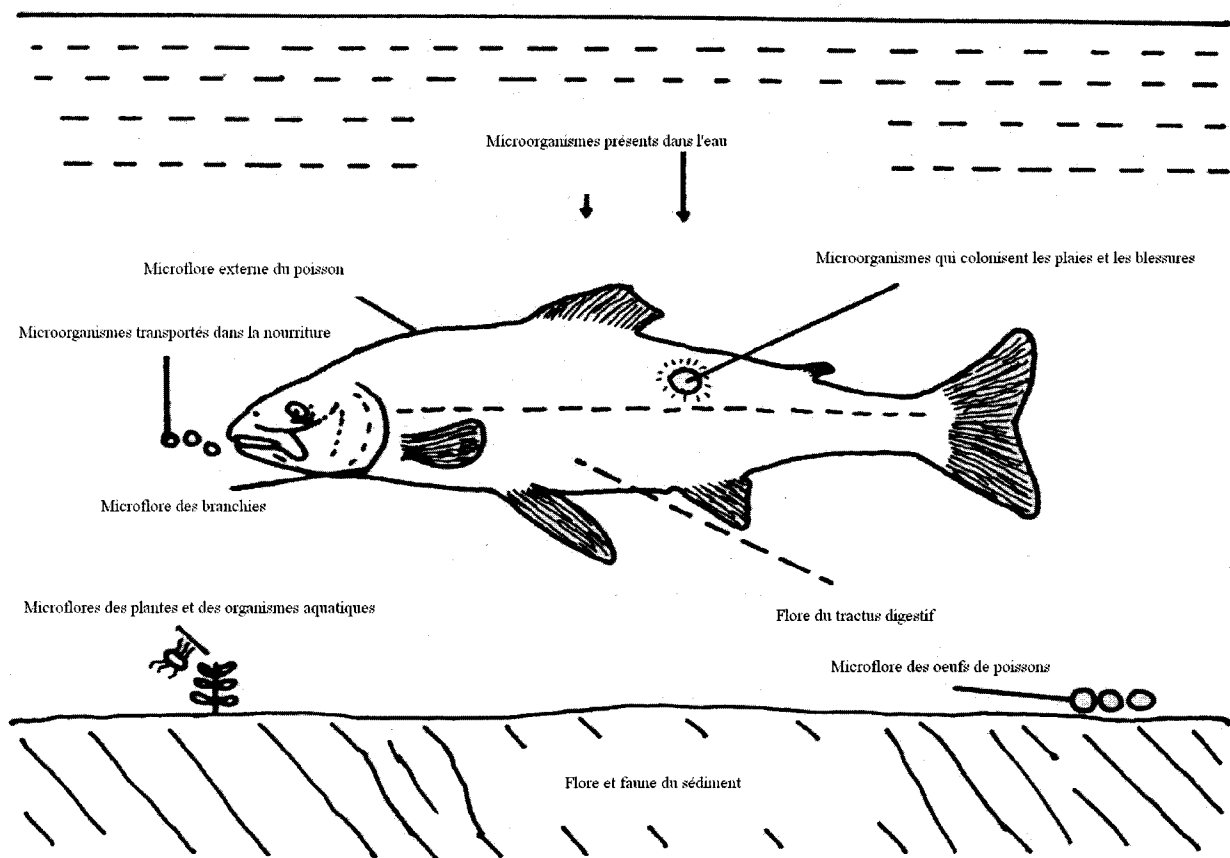


Figure 1.2 Voies de pénétration des microorganismes dans l'organisme d'un poisson (Tirée de Austin et Austin, 1987)

1.1.6 Prévention par immunisation

L'immunisation des poissons à diverses infections bactériennes ou virales est un champ de recherche très actif. Les gènes mêmes, responsables de l'immunité acquise chez les poissons sont présentement étudiés (Tsoi *et al.*, 2004). Au Canada, on immunise les poissons contre les *Aeromonas* par injection dans la cavité abdominale. Encore une fois, afin de minimiser les stress imposés aux poissons, l'immunisation orale pourrait être une technique utilisée dans l'avenir car les résultats sont intéressants (jusqu'à 90% d'amélioration du taux de survie sauf que les injections doivent être répétées à chaque printemps) mais on ne procède pas encore à l'immunisation à grande échelle. Des essais sont actuellement en cours afin d'évaluer le potentiel de l'immunisation orale. Les poissons que l'on souhaite immuniser, le sont par ingestion de leur moule dans laquelle ont été ajoutés des hydrolysats bactériens ou viraux (Lamers et Van Muiswinkel, 1986 ; Azad *et al.*, 1999 ; Ellis, 1999 ; Corbeil *et al.*, 2000). Les principaux désavantages sont qu'un faible pourcentage des poissons développent des anticorps et que la production des immunoglobulines est limitée (Lamers et Van Muiswinkel, 1986). De plus, les diverses souches d'une même espèce bactérienne peuvent avoir gardé leur potentiel pathogène malgré l'immunisation, les immunoglobulines étant dirigées vers des cryptitopes très spécifiques à une structure moléculaire précise. Des réactions croisées avec *Aeromonas hydrophila* et *Aeromonas sobria* ont été observées par Guz *et al.* (2004) alors que quatre protéines de *A. salmonicida* avaient été utilisées comme antigènes dans une expérimentation utilisant la truite arc-en-ciel comme modèle animal. Des quatre antigènes, ayant une masse moléculaire de 68,3, 33,9, 21,5, et 12,7 kDa, les réactions croisées ont été remarquées pour les deux antigènes de 68,3 et 21,5 kDa. Il faut donc rappeler ici que pour des infections telle la furonculose, l'immunité non spécifique est très importante voire peut-être la plus importante.

1.1.7 Résistances bactériennes

Un des problèmes rencontrés par les vétérinaires amenés à traiter les élevages de poissons est la présence, dans la ferme, d'une souche bactérienne résistante aux antibiotiques. Ce fait est d'autant plus problématique que seulement quatre antibiotiques sont autorisés au Canada dans ce secteur d'activité : le florfénicol, l'oxytétracycline, le sulfadiméthoxine-ormétoprime et le sulfadiazine-triméthoprim (CAHI, 2001).

Des résistances pour ces antibiotiques sont régulièrement répertoriées dans les laboratoires d'ichtyopathologie par exemple, le cas de sulfadiméthoxine-ormetoprim, commercialisé sous le nom de Romet-30. Il s'agit d'un sulfonamide agissant dans le sentier métabolique de l'acide folique impliqué dans la synthèse de l'ADN des procaryotes. Les premières souches de *A. salmonicida* résistantes à un sulfonamide ont été isolées à la fin des années 1950. La cause de cette résistance (enzyme qui détruit l'antibiotique porté sur un plasmide, modification de la cible de l'antibiotique) n'a pas alors été identifiée mais dans la seconde moitié des années 1990, des pisciculteurs notaient l'inefficacité du Romet-30 dans le traitement de la furonculose (USGS, 1997).

En ce qui concerne les résistances bactériennes et la pisciculture, une étude de Hayashi *et al.* (1982) a permis de constater que plusieurs plasmides possédant des gènes codant pour des mécanismes de résistance à divers antibiotiques sont retrouvés parmi la flore de poissons issus de fermes d'élevage au Japon. En effet, à partir d'isolats obtenus de carpes d'élevage, parmi les 177 bactéries portant un plasmide de résistance à un antibiotique, 70 provenaient d'un génome de *Aeromonas hydrophila* (40%). Les plasmides de résistance retrouvés procuraient une insensibilité contre les antibiotiques suivants : tétracycline, chloramphénicol, streptomycine, le groupe des aminobenzylpénicillines¹, sulfanilamide et kanamycine. Le même type de résultat a été observé chez la truite. De toutes les souches isolées parmi la flore intestinale de truites arc-en-ciel 7,73% étaient résistantes à l'oxytétracycline, 1,4% au chloramphénicol, 0,18% à la streptomycine, 78,7% aux aminobenzylpénicillines¹, 40,8% à la sulfanilamide et 3,03% à la kanamycine. Les pourcentages de résistances aux mêmes antibiotiques pour des bactéries isolées de l'eau des bassins où ont été prélevés les poissons sont 1,4 %, 2,77 %, 1,2 %, 15,6 %, 5,53 % et 4,43 % respectivement.

Dans la même étude, il a été remarqué que, sur 150 souches d'*Aeromonas hydrophila* isolées de l'eau ou d'organes internes de poissons de pisciculture, 42 seulement étaient sensibles à l'un ou l'autre des antibiotiques nommés précédemment (28%). Il existe donc une problématique réelle quant à l'utilisation d'antibiotiques traditionnels dans le traitement d'infections bactériennes en pisciculture. Le phénomène semble grandissant, car au début des années 1970, *A. hydrophila* n'était

¹ Les aminobenzylpénicillines regroupent l'ampicilline, l'amoxicilline, la bacampicilline, l'hétacilline, la pivampicilline et la talampicilline (CAHI, 2001)

résistant qu'en faibles proportions au chloramphénicol, à la tétracycline et aux sulfonamides (Aoki et Egusa, 1971). Il est important de noter que la pisciculture est une activité économique plus intensive en Asie qu'en Amérique du Nord et si des résistances aux antimicrobiens nommés précédemment ne sont pas retrouvées de ce côté-ci du globe l'exemple de nos prédécesseurs est fertile en leçons à retenir. Mieux vaudrait peut-être de prévenir que de tenter de guérir.

1.1.8 Antibiothérapies et résistances

Au Québec, afin d'éviter de favoriser l'avènement de résistances bactériennes chez les populations bactériennes indigènes des installations piscicoles et par le fait même des pathogènes bactériens qui s'y trouvent, les traitements médicamenteux sont donnés lorsqu'une infection bactérienne est déclarée et confirmée par le vétérinaire. Le fermier incorpore les antibiotiques à la moulée si demandé par le médecin. Il existe cependant des pratiques qui favorisent le développement de résistances bactériennes aux antibiotiques : 1) l'abus des médicaments, où l'on administre sur une période courte et répétitive l'antibiotique traitant (par exemple, il est recommandé de traiter pour 10 jours mais on voit des cas où l'éleveur administre le médicament durant 5 jours seulement car la mortalité a diminué et qu'il espère ainsi sauver un montant d'argent), 2) l'utilisation d'un antibiotique uniquement, même quand d'autres choix sont disponibles 3) le traitement de la maladie sans mesure pour enrayer la cause (par exemple, l'eau trop chaude, trop de poissons dans les bassins ou tout autre stress causé par une mauvaise gestion comme l'achat de poissons connus comme porteurs de maladies, etc). Il existe aussi des cas où divers antibiotiques peuvent être introduits dans les bassins par le biais de moulée dite «top-dressing» avant même l'apparition de maladies. C'est-à-dire que l'on ajoute des antibiotiques dans la moulée que l'on donne aux alevins afin d'améliorer le rendement de l'élevage (moins de mortalité et croissance accrue des individus). L'utilisation des antibiotiques pour la prévention des maladies (sauf dans les rares circonstances) et la promotion de croissance chez les poissons ne sont pas pratiques courantes, au Canada à tout le moins. Une partie de la raison est qu'au Québec, les élevages sont petits et le volume de moulée médicamenteuse n'est pas très intéressant pour les manufacturiers.

1.2 Établissement d'une infection

La Figure 1.2 illustre les entrées par lesquelles les bactéries (pour ne nommer qu'elles) peuvent pénétrer dans un poisson. Une lésion, quelle soit petite ou grande, représente une porte d'entrée pour les bactéries. Les branchies sont également des ouvertures colonisables lorsque cet environnement est propice au développement de la bactérie qui y pénètre. Lorsqu'un poisson est confronté à un pathogène, l'état physiologique du poisson, sa génétique, la nature du pathogène et l'environnement immédiat sont les principaux facteurs qui ont une influence sur la réponse immunitaire de l'individu (Schreck, 1996; Alcorn *et al.*, 2002). Toutes situations où un stress est imposé aux poissons engendrent une cascade d'événements qui sont communiqués aux systèmes nerveux et endocrinien. Il s'ensuit une prédisposition de l'animal au développement d'une maladie (Schreck, 1996). Par exemple, lorsque la production d'hormones telle la cortisol est stimulée, il y a un impact sur la mobilisation de l'énergie et le métabolisme, la balance hydrominérale et d'autres fonctions physiologiques majeures qui influencent la résistance du poisson à la maladie (Schreck et Li, 1991). S'ensuivent des ajustements énergétiquement exigeants comme l'osmorégulation. En effet une telle monopolisation de l'énergie peut mener à l'établissement d'une infection parce que l'efficacité du système immunitaire, également très énergivore, dépend de l'énergie disponible.

Les facteurs environnementaux ont une grande influence non seulement sur la réponse du système immunitaire des poissons mais aussi sur le développement des pathogènes. Une élévation de la température chez les poissons d'eau froide favorisera grandement des agents pathogènes tels *A. salmonicida* et *A. hydrophila* (Ortega *et al.*, 1995). La période de reproduction des cyprinidés est au printemps alors que pour les salmonidés la frai se produit à l'automne. Ces périodes sont donc des événements qui peuvent favoriser l'établissement d'infection parce que l'énergie des poissons est mise à profit pour la fonction reproductrice, primordiale pour la survie de l'espèce. Le printemps et le début de l'été sont donc des périodes où les poissons d'eau froide sont plus souvent malades. (De Kinkelin et Hattenberger, 1986; Jeney et Jeney, 1995; Schreck, 1996). De plus, une hausse de température ne favorisant rarement qu'un seul microorganisme pathogène à la fois, l'établissement d'une infection virale, bactérienne ou parasitaire peut être favorisée par la présence d'un autre agent pathogène (Stoskopf, 1993). Un entretien soutenu de la ferme et une prévention adéquate dans le domaine des infections par le contrôle des populations bactériennes sont donc primordiales.

1.2.1 Système immunitaire des poissons

Il existe deux types de réponses humorales: non-spécifique et spécifique. Le système immunitaire non-spécifique comprend les surfaces telles la peau et les intestins (barrière protectrice), les facteurs sanguins et les globules blancs. Le système immunitaire spécifique comprend les structures impliquées dans le mécanisme menant à la reconnaissance d'un antigène.

1.2.2 Système immunitaire non-spécifique

On retrouve à la surface du poisson une épaisse couche mucoïde riche en glycoprotéines, sécrétée par des cellules épithéliales. Cette substance appelée mucus, représente la première barrière efficace contre les organismes envahisseurs. Sa production est favorisée par des conditions environnementales adéquates (température, taux d'oxygène, pH...) (Austin et Austin, 1987). Bien entendu une population microbienne pathogène dont la concentration est anormalement élevée augmente les risques qu'une bactérie traverse la barrière et que s'ensuive le développement d'une infection (Schreck, 1996).

La réponse non-spécifique comprend des facteurs inhibiteurs de croissance (transferrine et antiprotéases), des lysines (lysosymes), des peptides bactéricides mais surtout le système du complément. La synthèse de la transferrine a lieu essentiellement dans les hépatocytes, les macrophages des organes lymphoïdes et accessoirement les lymphocytes. Sa demi-vie est de 8 jours. Le taux de synthèse par l'hépatocyte est inversement proportionnel à la quantité de fer présente dans la cellule. Ainsi, une diminution des réserves en fer entraîne une augmentation de la transferrine alors qu'une surcharge la diminue. Le taux de synthèse journalier est de 16 mg/kg. Le système du complément, composé de plusieurs facteurs, est responsable d'activités lytiques, pro-inflammatoires, chimiotactiques et opsoniques qui font le lien avec la réponse phagocytaire non-spécifique. Cette réponse est accomplie en première ligne par les neutrophiles et les macrophages. Les phagocytes contiennent plusieurs enzymes de dégradation qui, lorsque stimulés par la présence d'antigènes bactériens, produisent des composés oxygénés réactifs (ROS), dont les radicaux hydroxyls (Neumann *et al.*, 2001). De plus, les neutrophiles possèdent des myéloperoxydases (MPO) qui génèrent un bactéricide naturel qui tue les bactéries par halogénéation (Ellis, 1999). Une fois encore, la température joue un rôle certain sur l'activité lytique et l'opsonisation du système du complément ainsi que sur les activités des phagocytes (Nikoskelainen *et al.*, 2004).

1.2.3 Système immunitaire spécifique

Les anticorps constituent la réponse humorale spécifique produite par les lymphocytes du poisson. Ils peuvent inhiber l'adhérence et l'invasion des cellules non phagocytaires de l'hôte. Ils peuvent également activer le système du complément qui mène à la destruction de l'antigène. Ils jouent un rôle dans l'activation de l'inflammation qui se traduit par un signal envoyé aux cellules phagocytaires aptes à détruire l'antigène repéré. Le travail des macrophages peut également être favorisé par les lymphocytes T qui produisent des cytokines lorsqu'en présence d'un antigène qui leur est spécifique (Ellis, 1999). Dans une étude menée par Schreck (1996), il a été démontré que les niveaux de leucocytes, de lymphocytes circulants, la production de nouvelles cellules sanguines et par ricochet la production d'immunoglobulines ont tous chuté lorsque différents stress ont été imposés chez différentes espèces de poissons.

1.3 Cyprinidés

Tous les cyprinidés ont une bouche démunie de dents. Leur appareil masticateur est constitué de deux os pharyngiens qui écrasent la nourriture contre une plaque cornée située au plafond de la gorge. Les cyprinidés sont réputés pour être des poissons peu exigeants quant à la qualité de l'eau. Ce sont des poissons très résistants aux infections (Stoskopf, 1993). Il existe cependant des événements qui perturbent la résistance de ces poissons aux pathogènes auxquels ils sont confrontés. Les paramètres physico-chimiques tels la température, la concentration en oxygène dissous ou le pH (de façon plus marquée lorsqu'ils varient brusquement) influencent l'avènement d'une infection.

1.3.1 *Cyprinus carpio*

Il s'agit d'un poisson dont la lèvre supérieure porte 2 barbillons longs et 2 barbillons courts. Leur corps est aplati latéralement, leur bouche est terminale et protractile. La nageoire caudale est échancrée. Les couleurs varient mais la carpe commune a généralement le dos vert brun, les flancs brunâtres avec un éclat cuivré et le ventre blanchâtre (Kanton Bern, 2003). On mentionne une longévité maximale de 40 ans. La carpe est un poisson qui se nourrit au fond des étendues d'eau. Elle se trouve partout dans le bassin des Grands Lacs. Cette espèce est d'origine asiatique et européenne a été délibérément introduite au début des années 1800 à de nombreux endroits de

l'Amérique du Nord. Dans le sud de l'Ontario, on a introduit la carpe pendant les années 1880, dans un étang d'élevage de Cedar Grove, dans le comté de York. On croyait que ce poisson constituerait une excellente ressource complémentaire des réservoirs des moulins et ce, du fait de sa nature prolifique et de sa valeur domestique et économique. À compter de 1880, on a peuplé de carpes divers étangs de tout le sud de l'Ontario et la partie américaine du bassin. Aujourd'hui on préfère garder la carpe à l'intérieur des bassins d'ornementations car ce poisson est reconnu pour être un féroce compétiteur pour la nourriture et a la réputation de dégrader les habitats aquatiques, en déplaçant la végétation (émergée et submergée), tout en remettant les sédiments en suspension (Environnement Canada, 2000).

1.3.2 Importance en aquaculture

Malgré le fait que nous ne puissions avoir de données plus récentes, il est tout de même intéressant de constater que les carpes (carpes communes, carpes de l'Inde et carpes de Chine) étaient, dans les années 1990, les poissons les plus fréquemment produits en aquaculture dans le monde (Jeney et Jeney, 1995). En 1989, on en produisait $6,2 \times 10^6$ tm et la carpe commune (*Cyprinus carpio*) était la plus répandue de toutes les espèces. Le Vietnam, l'Inde et le Bangladesh sont également, depuis des centaines d'années d'importants producteurs de carpes (FAO, 1992).

1.4 Salmonidés

Ce sont des poissons qui demandent des soins particuliers lorsque gardés en captivité et qui sont réputés pour être fragiles aux infections. La furunculose est une source de problèmes pour tous les éleveurs de salmonidés (Stoskopf, 1993). Ce sont des poissons appréciés pour leurs qualités nutritives, leur goût et leur combativité dans la pêche sportive (Envirotel, 2004).

1.4.1 *Salvelinus fontinalis*

L'omble de fontaine est aussi appelé truite mouchetée, truite de mer, truite de ruisseau ou saumon de fontaine. Il s'agit d'un poisson abondant en territoire québécois, surtout dans les régions du Saguenay et de la Côte-Nord. Son corps allongé prend des teintes qui varient selon l'habitat. Le dos des individus d'eau douce peut prendre les teintes de vert olive à brun foncé, parfois presque noir. Les flancs sont pâles et généralement marqués de points rouges cernés de bleu. Les populations d'eau douce recherchent des températures inférieures à 20°C, donc des eaux fraîches bien oxygénés

des ruisseaux, des rivières et des lacs. Lorsque les eaux superficielles du cours qu'il habite deviennent trop chaudes, l'omble de fontaine peut descendre à des profondeurs de 4,6 à 8,2 m, ou encore se déplacer vers d'autres nappes d'eau souvent plus considérables. Ce sont des animaux carnivores à grande bouche munie de 3 rangées de dents. La ponte et l'éclosion des œufs se font dans le gravier et la longévité maximale est d'une dizaine d'années. Les poissons anadromes préfèrent les estuaires et les eaux côtières. Ces dernières ont le dos vert ou bleu et les flancs argentés (Écoroute, 2003).

1.4.2 Importance en aquaculture

Comme mentionné au point 1.1.4 les salmonidés représentent la principale production canadienne et sont présentement majoritairement destinés au marché de la table des consommateurs. Les salmonidés en général prennent de plus en plus de place sur les marchés américains, surtout depuis l'intérêt de l'industrie pour ces poissons (Shotts et Nemetz, 1993). D'après le Bureau du Commissaire pour le Développement de l'Aquaculture (OCAD, 2002), au Canada en 2001, 94 872 tm de saumon d'élevage ont été produites, soit le double de la production de 1996. Alors qu'aux États-Unis selon le Food and Agriculture Organization (FAO, 2003), 1,6 millions tm de saumons étaient produites en 2001.

1.5 Bactéries

1.5.1 Flore bactérienne de l'eau

Les espèces bactériennes et la quantité que l'on trouve dans l'eau et les sédiments reflètent les conditions physico-chimiques de l'environnement aquatique, c'est-à-dire la température, le pH et le degré d'eutrophisation (Austin et Austin, 1987). Les cours d'eaux naturels connaissant une eutrophisation élevée en été sont ceux où l'on dénombre le plus de bactéries alors que les eaux où la matière organique en suspension se fait rare ont les comptes bactériens les moins élevés (Austin et Austin, 1987). En milieu piscicole, la maintenance soutenue des installations est essentielle au contrôle des populations indigènes de l'eau. Les informations quantitatives disponibles sur les flores bactériennes de l'eau ne sont que partielles. Les méthodes actuelles ne permettent de dénombrer qu'une portion de toutes les espèces présentes. En effet, une méthode de dénombrement dont l'incubation se fait en présence d'oxygène ne permettra pas l'observation des espèces anaérobies.

On obtient quand même quelques informations relevant les concentrations bactériennes de cours d'eaux naturels et de bassins piscicoles. Par exemple, Austin et Austin (1985) concluaient que les populations bactériennes retrouvées dans l'eau et les sédiments des bassins réservés à l'élevage des poissons étaient beaucoup plus concentrées que celles retrouvées dans les cours d'eau à proximité. À la lumière de ces résultats, on peut prétendre qu'il existe donc des fermes où l'eau des bassins est retenue de façon adéquate et que la contamination du milieu naturel par les fermes piscicoles pourrait être contrôlée. Une des hypothèses émises dans cette étude est que les bactéries des bassins de la ferme sont retenues par les particules et la matière organique en suspension retrouvées au fond des bassins et dans la couche d'eau immédiatement au-dessus. Ce qui revient encore une fois à dire que l'entretien des installations piscicoles est primordiale.

Geesey et Costerton (1979) ont rapporté que les concentrations bactériennes les plus élevées dans les rivières canadiennes se retrouvaient au printemps et à l'automne. Un minimum était atteint en août, les fortes pluies produisant un lessivage. Toujours au sujet des rivières canadiennes, Bell *et al.* (1980) étaient plus précis en décrivant deux périodes de pointe, soit mai à juin pour la première et août à septembre pour la deuxième.

Les populations bactériennes des bassins des fermes piscicoles reflètent celles normalement trouvées dans l'eau potable à la différence que les concentrations sont plus élevées. Les taxons les plus souvent rencontrés sont : *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Moraxella* et *Pseudomonas* (Holder-Franklin *et al.*, 1981). L'espèce prédominante étant *Aeromonas hydrophila* représentant 22% des populations dénombrées (Allen *et al.*, 1983). Ce qui n'est pas étonnant, les *Aeromonas* mobiles étant dénombrés dans toutes les eaux potables (Hazen *et al.*, 1978).

1.5.2 Flore bactérienne des poissons

On peut dire que les poissons baignent dans un bouillon microbiologique. D'abord, l'adsorption d'une bactérie à la surface d'un poisson est possible. Cette dernière pourrait éventuellement devenir un membre de sa flore mais il faudra que ni un des microorganismes de la flore normale ni une des substances produites par le mucus (section 1.2) n'inhibe la croissance de ce dernier. Bien sûr, les bactéries peuvent s'introduire à l'intérieur d'un poisson par la bouche avec l'eau et d'autres particules telle la nourriture. Certaines seront conservées dans la microflore, d'autres seront inhibées par le système digestif alors que d'autres seront tout simplement expulsées avec les excréments

(Austin et Austin, 1987). Encore une fois, il est bien difficile d'obtenir des nombres représentatifs de toutes les bactéries qui colonisent un poisson, à sa surface comme dans les différents orifices décrits précédemment. Trust (1975) avançait que 10^6 organismes aérobies étaient dénombrés par gramme de tissus de branchies de salmonidés. De leur côté, Yoshimizu *et al.* (1976) observaient une variabilité de la concentration des bactéries hétérotrophes dénombrées dans les intestins de salmonidés avec un maximum en été et un minimum en hiver. La nourriture des poissons étant elle-même porteuse d'une microflore, les sources de colonisation sont aussi variées que les entrées.

En général, les bactéries dénombrées de la flore externe du poisson reflètent les populations de l'eau dont : *Acinetobacter*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes* (Christensen, 1977; Allen *et al.*, 1983). Pour ce qui est de la flore intestinale des poissons d'eau douce, elle est représentative de leur alimentation (Shewan, 1961). Les bactéries isolées de la gorge de poissons incluent : *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* et *Serratia* (Trust et Sparrow, 1974; Nieto *et al.* 1984).

1.5.3 *Aeromonas*

Les deux agents infectieux choisis dans la présente étude font partie du genre *Aeromonas*. Malgré les nombreuses différences entre les deux espèces, les infections qu'elles engendrent causent des lésions macroscopiques similaires chez les individus malades. La Figure 1.3 représente les lésions typiques retrouvées sur un poisson atteint d'une infection bactérienne étudiée dans cette recherche.

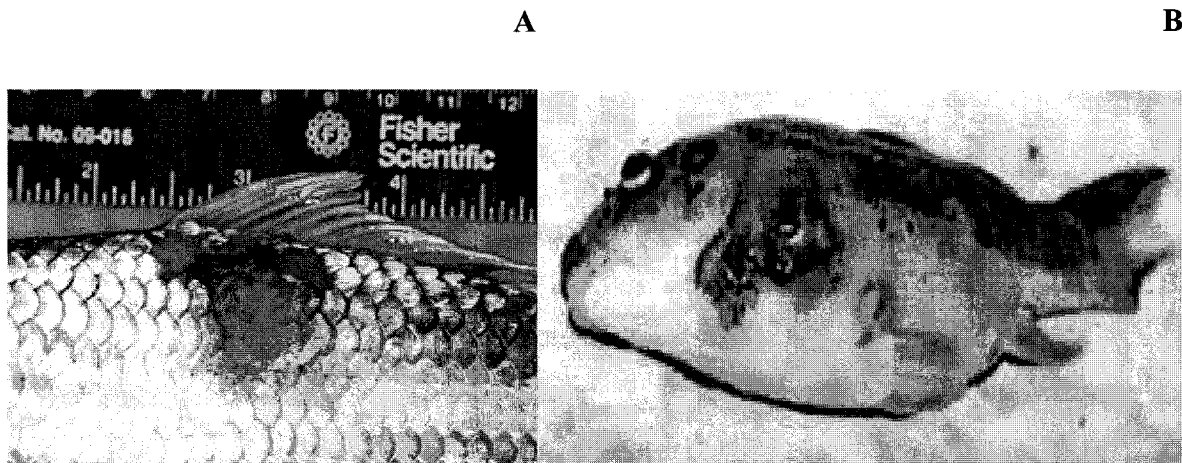


Figure 1.3 Lésions typiques d'origine bactérienne chez le poisson . (A) ulcère à la base de la nageoire dorsale; (B) hémorragies à la base des nageoires et des branchies. (Tirées de <http://www.vet.uga.edu/ivcvm/1999/Anders/Anders.htm>)

1.5.4 *Aeromonas hydrophila*

1.5.4.1 Caractéristiques

A. hydrophila est un bâtonnet à Gram-négatif, anaérobie facultatif, mesurant de 0,5 à 1,0 μm de diamètre et de 1,0 à 3,5 μm de longueur. Un flagelle polaire permet à la bactérie de se déplacer dans un environnement liquide (Figure 1.4). Il s'agit d'une bactérie non capsulée et asporulante qui peut croître dans un bouillon nutritif à 37 °C. Sa température optimale de croissance est 28 °C. Sur un milieu de culture nutritif solide, les colonies sont rondes, bien délimitées et opaques, de couleur blanche. Une zone d'hémolyse est observée lorsque *A. hydrophila* est cultivé sur gélose au sang. Des enzymes telles des gélatinases, élastases, caséinases, désoxyribonucléases ont été isolées à partir de cultures bactériennes de *A. hydrophila* (Nord *et al.*, 1975 ; Boulanger *et al.*, 1977 ; Kanai et Wakabayashi, 1984 ; Lallier *et al.*, 1984). Certaines sont secrétées dans le milieu environnant sous forme soluble, d'autres sont produites lorsque la bactérie entre en contact avec une autre surface cellulaire et finalement certaines sont relarguées lors de la mort de la bactérie. De toute la diversité d'enzymes que semble produire *A. hydrophila*, trois ont été étudiées plus en détail et sont : une

aérollysine, une glycérophospholipide:cholestérol acyltransférase (GCAT) et une protéase sérine (Buckley *et al.*, 1982 ; Howard et Buckley, 1986 ; Rodriguez *et al.*, 1992). Ces enzymes causent des dommages aux structures cellulaires de l'hôte ainsi qu'aux structures de défense immunitaire non-spécifiques du poisson.

Des infections à *A. hydrophila* ont été remarquées chez plusieurs animaux à sang froid dont le poisson et la grenouille mais aussi chez certains mammifères dont l'humain. On dénombre cinq sous-espèces de *A. hydrophila* jusqu'à maintenant (Bergey *et al.*, 1974 ; Ackermann et DuBow, 1987b). Les infections engendrées par *A. hydrophila* sont mixtes, c'est-à-dire que plus d'une espèce bactériennes sont retrouvées dans les organes infectés.

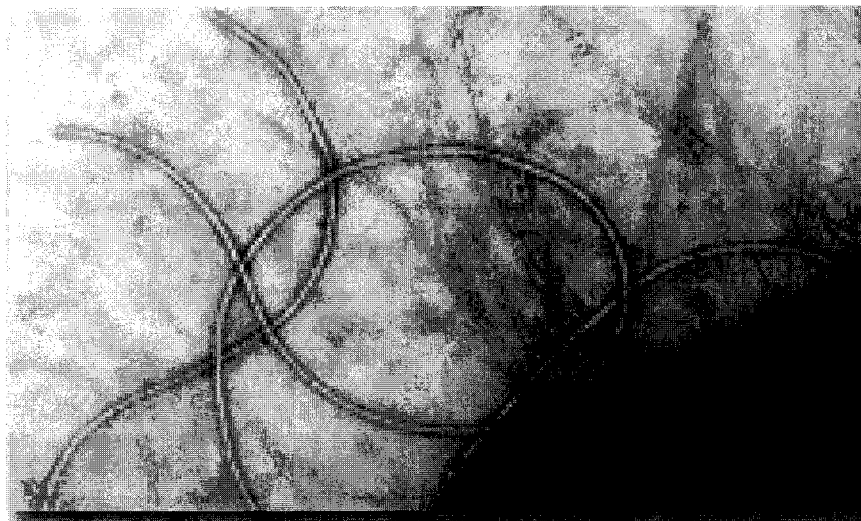


Figure 1.4 Flagelle et pili, structures cellulaires de *Aeromonas hydrophila* qui favorisent la colonisation de ses hôtes; observation en microscopie électronique à transmission. (Tirée du site web du Northwest Fisheries Science Center <http://research.nwfsc.noaa.gov/research/divisions/reutd/fhm/aero2.cfm>)

1.5.4.2 Potentiel pathogène

Appelé aussi *A. formicans* et *A. liquefaciens*, *A. hydrophila* fait partie d'un groupe que l'on nomme *Aeromonas* mobiles (Austin et Austin, 1987). Il s'agit d'une bactérie associée surtout aux infections engendrées à la suite de stress chez les poissons d'eau tiède (Uhland *et al.*, 2000). On remarque chez

les poissons atteints le développement d'hémorragies au niveau de la peau, des yeux et de la base des nageoires. On observe parfois la mort d'individus sans autres manifestations cliniques. L'infection, lorsque non mortelle, peut devenir chronique. La chronicité de l'infection se reconnaît par la formation d'ulcères sur la peau du poisson (Uhland *et al.*, 2000). *A. hydrophila* est un pathogène qui peut profiter de l'établissement d'un autre agent infectieux dans le poisson pour envahir l'animal, par exemple, une infection virale ou parasitaire. Les *Aeromonas* mobiles seraient peut-être également responsables d'une maladie branchiale qui cause des problèmes de transfert d'oxygène. Les poissons montrent dans ces cas des symptômes d'hypoxie qui sont causés par une accumulation de bactéries qui adhèrent aux cellules épithéliales des branchies (Uhland *et al.*, 2000).

1.5.4.3 Habitat

A. hydrophila se retrouve dans tous les pays du monde. Havelaar *et al.* (1990) ont montré qu'à l'intérieur des systèmes de distribution d'eau potable des Pays-Bas, 16 points d'eau échantillonnés sur 20 comptaient des *Aeromonas* au sein de la population bactérienne totale du circuit. *A. hydrophila* était l'espèce rencontrée en plus grand nombre. Il est intéressant de noter qu'il ne semblait pas y avoir de relation entre la présence d'*Aeromonas* mobiles dans un échantillon et la concentration de la matière organique en suspension mais plutôt avec la température et le temps de résidence de l'eau dans les réservoirs d'eau potable. Dans le même ordre d'idée, Payment *et al.* (1991), après avoir échantillonné des systèmes de filtration d'eau potable domestiques dans la région de Montréal, ont conclu que *A. hydrophila*, accompagné de *Bacillus cereus*, *Legionella pneumophila* et *Pseudomonas aeruginosa* sont des pathogènes opportunistes fréquemment retrouvés dans l'eau potable. Il s'agit donc d'un microorganisme ubiquitaire qui a besoin de peu d'éléments nutritifs dans le milieu pour survivre et se multiplier et qui se retrouve inévitablement dans les aquariums et/ou les bassins destinés à l'aquaculture. De plus, une étude effectuée en milieu naturel sur la diversité des populations bactériennes hétérotrophes retrouvées dans un lac eutrophique de petite taille montre que 100% des *Aeromonas* qui y ont été prélevées et étudiées étaient résistants à la pénicilline G et à l'ampicilline (Edwards *et al.* ; 2001). Il s'agit donc d'une bactérie qui se transmet efficacement l'information génétique nécessaire à sa survie et qui s'acclimate avec succès aux stress que lui impose son milieu.

1.5.4.4 Aquaculture et *Aeromonas hydrophila*

Compte tenu de la diversité des conditions et des méthodes employées dans l'industrie de l'aquaculture, plusieurs infections peuvent se développer chez les poissons d'élevage. Fryer et Rohovec (1993) ont dénombré 37 pathogènes bactériens du poisson dont huit sont associés à la carpe, *A. hydrophila* étant un des plus importants de ces huit pathogènes. D'autre part, d'après une étude menée par Jeney et Jeney (1995), *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* et *Flavobacterium columnare* sont les trois principaux pathogènes bactériens de la carpe.

1.5.5 *Aeromonas salmonicida*

1.5.5.1 Caractéristiques

A. salmonicida est un pathogène causant une infection appelée furunculose. Il s'agit d'un pathogène strict. C'est un bâtonnet à Gram négatif non mobile. Sa température optimale de croissance se situe entre 22 et 25 °C. Les colonies sont rondes, blanchâtres et translucides lorsque cultivés sur milieu de culture solide Tryptic Soy Agar (TSA; Soja hydrolysé à l'aide d'une enzyme de la famille des trypticases). La bactérie mesure en moyenne 1 µm par 0,8 µm et est recouverte d'une capsule de polysaccharides (Figure 1.5). Cette capsule lui permet de résister aux macrophages du système immunitaire des poissons. La capsule est accompagnée d'une membrane hydrophobique, appelée membrane-A (couche S par certains auteurs) car constituée d'une couche de protéine-A et de lipopolysaccharides. Elle est un facteur de virulence qui confère à la bactérie plusieurs mécanismes de défense et/ou d'invasion cellulaire: favorisant la pénétration dans l'épiderme des poissons par son caractère hydrophobique, participe à la résistance contre le système du complément du poisson, participe à la défense contre les mécanismes phagocytaires de l'hôte et au mécanisme de prise en charge du fer des cellules de l'hôte (Ellis, 1999; Garduño *et al.*, 2000). Une autre méthode d'acquisition du fer hautement efficace lorsque la cellule bactérienne a pénétré dans un organisme animal est la fixation des complexes sidérophores-fer par des protéines de la membrane externe (OMPS) (Ellis, 1999; Roger *et al.*, 2004). D'ailleurs, Ebanks *et al.* (2004) ont remarqué que lorsque *A. salmonicida* est cultivé dans un milieu pauvre en fer, trois protéines membranaires de plus sont retrouvées dans le profil protéomique de la cellule que lorsqu'on le cultive en milieu riche en fer. D'après ces auteurs, ces protéines ayant une masse de 73, 76 et 85 kDa sont produites *in vivo*, lorsque la bactéries se retrouve dans la cavité péritonéale d'un poisson et donc, le phénotype

représentatif du pathogène tel que retrouvé dans l'hôte est celui où est exprimé les trois protéines en question. *A. salmonicida* est une bactérie anaérobie facultative qui utilise l'azote comme accepteur d'électron et qui peut fermenter les sucres tel le glucose. La production d'un pigment brun soluble (Figure 1.6) lorsque la bactéries est cultivée sur milieux de culture gélosés TSA le rend facilement identifiable en laboratoire. Il est à noter que la présence de phénylalanine et de tyrosine dans le milieu de culture est essentielle à la production du pigment. Une zone d'hémolyse est observable en 48 heures lorsque cultivé sur milieu gélosé au sang de mouton pour la plupart des souches. Plusieurs enzymes sont produites par *A. salmonicida* dont une glycérophospholipide:cholestérol acyltransférase (GCAT), une toxine d'ADP-ribosylation (Burr *et al.*, 2003a) et autres enzymes de destruction des tissus et des érythrocytes. D'autres mécanismes de défense lui sont connus telle la production d'une manganèse peroxyde dismutase (MnSOD) qui lui confère une protection contre le peroxyde d'hydrogène (Ellis, 1999). La production d'une catalase inductible lui a également été trouvée (Ellis, 1999). Les composés préalablement nommés sont autant de moyens par lesquels *A. salmonicida* peut déjouer ou inhiber les défenses spécifiques et non-spécifiques du poisson Les cellules peuvent se présenter en microscopie sous trois aspects : Rugueuses (R ou « rough » tiré de l'anglais), Lisse (S ou « smooth » tiré de l'anglais) ou en phase G (G, vient d'un stade cycle de vie cellulaire où la cellule est en croissance). Comme on peut le constater à la Figure 1.7, les cellules rugueuses sont recouvertes d'une membrane extracellulaire (a) alors que les cellules lisses en sont privées (b).

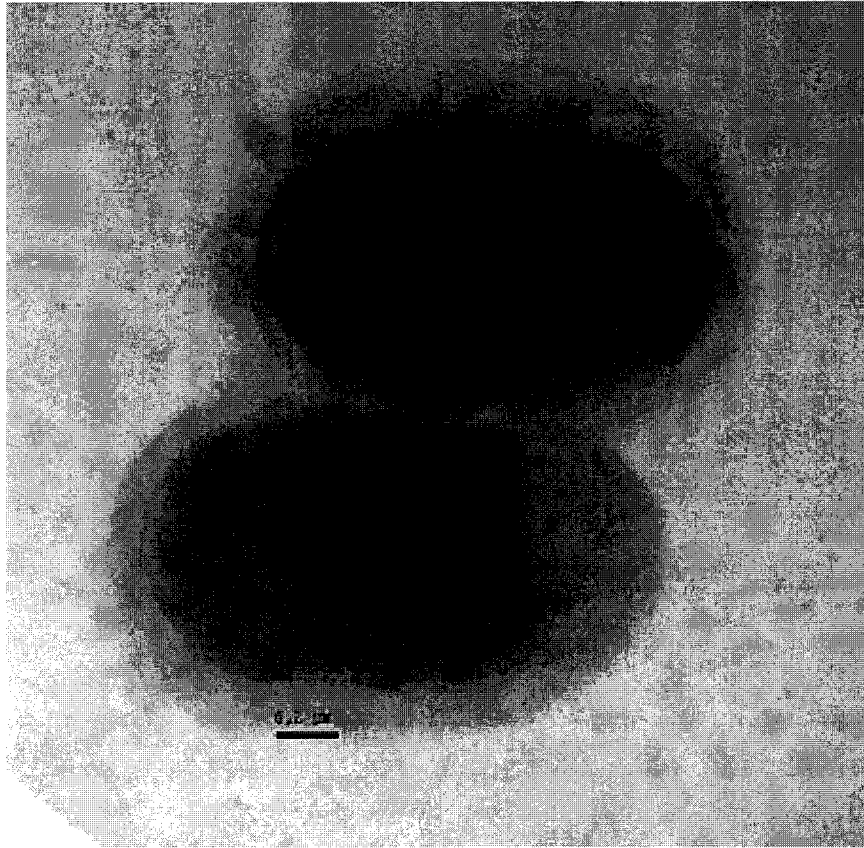


Figure 1.5 Capsule de cellules de *A. salmonicida*. (Tirée de : imb-ibm.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/wwwaero.pl?page=home.html&lang=f)

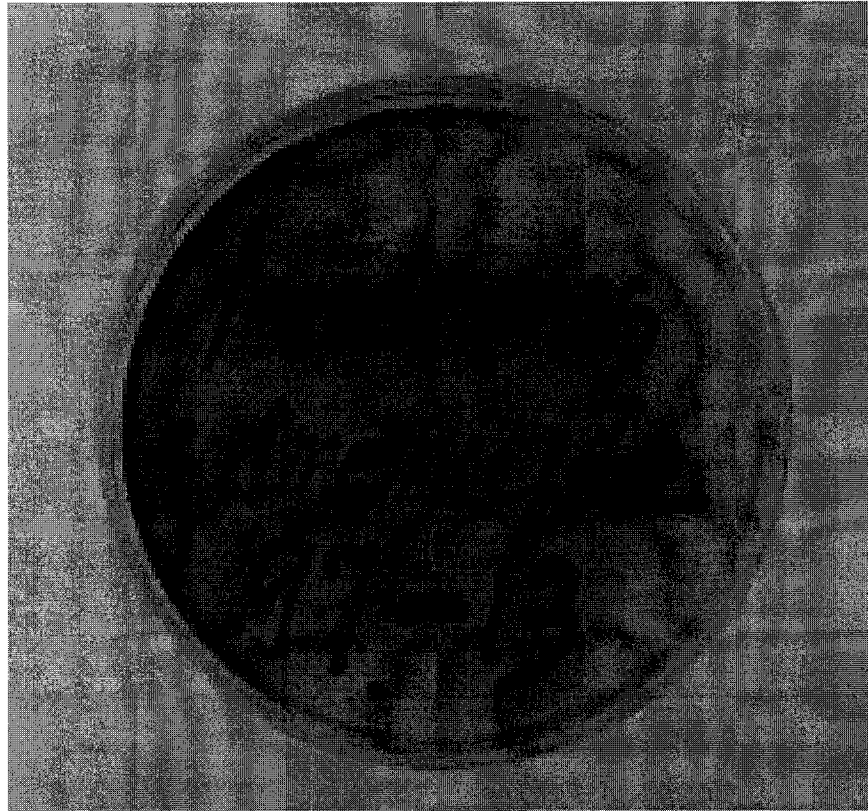


Figure 1.6 Pigment soluble brunâtre de *A. salmonicida* sur milieu de culture TSA. (Tirée de : [imb-ibm.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/wwwaero.pl?page=home.html &lang=f](http://imb-ibm.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/wwwaero.pl?page=home.html&lang=f))

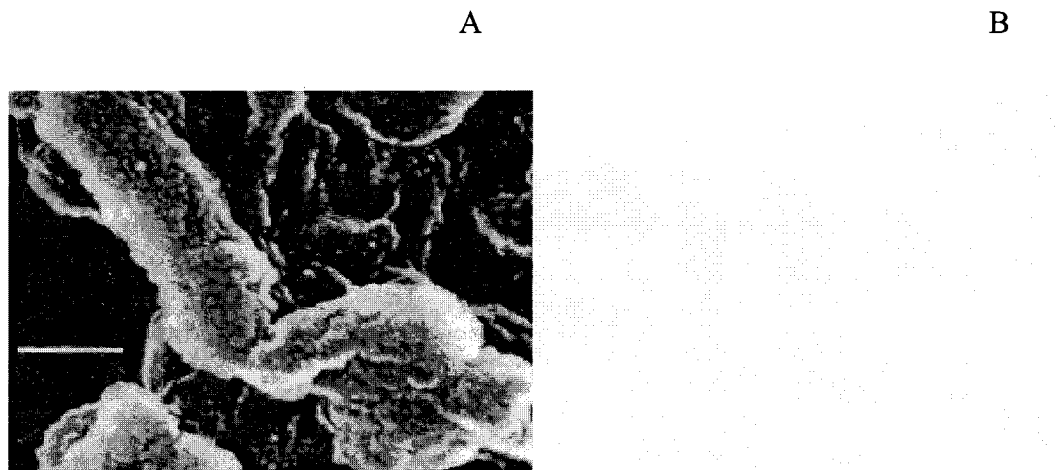


Figure 1.7 Photographies prises en microscopie électronique de cellules de *Aeromonas salmonicida*. (A) cellules d'apparence rugueuse; (B) cellules d'apparence lisse. Le trait mesure 0,5 μm . (Tirées de : Austin et Austin, 1987)

Il existerait cinq catégories de *A. salmonicida*. La première est dite « typique », il s'agit de celle à qui l'on attribue les infections chez les salmonidés et qui possède les caractéristiques nommés précédemment. La seconde engendre également des infections chez les salmonidés mais est atypique (ne produit pas de pigment par exemple). Les autres comprennent les isolats atypiques isolés de poissons d'autres espèces que les salmonidés (Skerman *et al.*, 1980). La classification profitera certainement des analyses des séquences des cellules considérées comme des souches différentes à ce jour. Une étude menée sur des souches de *A. salmonicida* atypiques par Lund *et al.* (2003) démontre que la variabilité de la protéine A (composante de la capsule) est suffisamment grande pour qu'une immunisation faite à partir d'hydrolysats de protéine A provenant de cellules de *A. salmonicida* isolés de 16 espèces de poissons différentes dans 11 pays différents ne soit pas efficace. Les séquences VapA, qui codent pour la protéine A des différentes souches ont été amplifiées et étudiées par la méthode AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Les chercheurs ont remarqué qu'en général la séquence de la protéine était très conservée sauf en ce qui concerne les résidus 90 à 170. Il est intéressant de noter qu'une analyse sérologique, à partir d'anticorps monoclonaux, démontré que l'homologie des séquences n'était pas garante d'une immunisation efficace.

1.5.5.2 Potentiel pathogène

A. salmonicida, à cause de sa répartition à travers le globe, la multiplicité des hôtes qu'il peut infecter et des dégâts qu'il engendre dans les fermes piscicoles, est un des pathogènes des poissons les plus importants et les plus étudiés (Austin et Austin, 1987). Il s'agit d'un pathogène primaire, contrairement à *A. hydrophila* qui est opportuniste. Prélevé d'un élevage de truites brunes, il a été décrit officiellement pour la première fois en Allemagne par Emmerich et Weibel (1894). On le nommait alors « Bacillus der Forellenseuche » ou « Bacille contagieux des truites ». Sa présence a été confirmée en Amérique du Nord en 1902 (Marsh, 1902). Aujourd'hui, il a été identifié dans les élevages du monde entier (FRDC, 1995).

La furunculose est une des principales causes de mortalité des salmonidés d'élevage. Cette maladie systémique peut prendre deux formes : aigue et chronique. La première forme est la plus fréquente, elle se traduit par une septicémie. L'infection peut devenir visible en présence d'hémorragies

cutanées aux nageoires et/ou sur le ventre. Lorsque le foyer d'infection se situe au niveau des organes internes, on pourra voir une perte de la brillance de la couleur des écailles, une perte d'appétit, des signes de léthargie. Lorsque détectée, la forme aiguë engendre des taux de mortalités importants en l'espace de quelques jours car les organes internes, tels les reins, les intestins, le foie sont irréversiblement investis par le pathogène (Austin et Austin, 1987; Uhland *et al.*, 2000). La seconde forme, chronique, est retrouvée chez les individus plus âgés et est caractérisée par l'apparition de lésions sous-cutanées. Elle cause moins de mortalités mais rend le poisson impropre à la commercialisation (Austin et Austin, 1987; Uhland *et al.*, 2000). Cette infection est traitée par antibiothérapie. Comme mentionné précédemment, au Canada, quatre agents antibactériens sont approuvés pour l'aquaculture par le Gouvernement canadien: le florfenicol, le sulfadiméthoxine-ormetoprim, sulfadiazine-triméthoprim et l'oxytétracycline (CAHI, 2001).

Dans une population hétérogène, *A. salmonicida* est difficile à isoler. La proximité des autres colonies cultivées sur milieu de culture solide, inhibe parfois la production du pigment soluble qui est un des principaux éléments d'identification en laboratoire (McCarthy, 1978). Même dans des bassins où se trouvent des poissons atteints de furonculose, on éprouve des difficultés à l'isoler (McCarthy, 1980; Austin et Austin, 1987). Dans les faits, il s'est également avéré que la bactérie recherchée démontrant une croissance plus lente que d'autres bactéries des populations retrouvées dans les aquariums, il fut difficile d'isoler *A. salmonicida* des échantillons prélevés lors des essais en aquariums.

1.5.5.3 Habitat

L'agent étiologique de la furonculose est retrouvé dans les environnements aquatiques qui abritent des poissons. Dans une étude menée par Michel et Dubois-Darnaudpeys (1980) on a constaté que le pouvoir pathogène de deux souches de *A. salmonicida* après six mois d'enfouissement dans de la vase (à températures variées) n'avait pas diminué. Au sixième mois, la virulence des souches observées a commencé à diminuer jusqu'à complètement devenir avirulentes à neuf mois.

Il existe plusieurs hypothèses quant aux agents vecteurs de la bactérie dans un poisson. Les trois grandes voies sont : un poisson porteur, l'équipement et le matériel d'entretien, et finalement l'eau (McCarthy, 1978). Un équilibre se crée entre certains individus et la bactérie sans trop que l'on puisse identifier pourquoi ceux-ci plus que ceux-là. Il s'agit d'un genre d'immunité quoique

plusieurs poissons succombent lorsque la bactérie leur est injectée (McCarty, 1978). Les poissons porteurs sont en apparence sains et peuvent parvenir dans un élevage lors de l'acquisition d'une population par un éleveur ou peuvent être présents sur place depuis plusieurs années lorsque les bassins ne sont jamais vidés. On retrouve alors la bactérie dans les fèces de ces poissons (McCarty, 1978). Lorsqu'il est question du matériel et des équipements, ce sont davantage les filets qui sont pointés du doigt. En effet, on note que les mêmes filets sont parfois utilisés par certains fermiers pour sortir les individus morts et pour en introduire d'autres dans les bassins. Des essais ont été effectués afin de vérifier l'efficacité de produits désinfectant utilisés communément tels : l'hypochlorite (1%), l'acriflavine (1 : 4000) et le Teepol (détergent dérivé du pétrole fabriqué par la pétrolière Shell) dans 1% d'hydroxyde de sodium. Les résultats ont démontré que le Teepol et l'acriflavine étaient des désinfectant efficaces lorsqu'utilisés tel que décrits par le fabricant. Par contre *A. salmonicida* était toujours présents après 6 jours sur les filets désinfectés à l'aide d'hypochlorite (McCarty, 1978). Les microlésions causées par la capture et le transport de poissons dans un filet facilitent l'établissement de la furunculose chez des individus sains. Un filet contaminé peut donc devenir une voie d'entrée pour le développement d'une épidémie dans la population. L'eau comme source ou transporteur de l'agent infectieux semble une évidence. Cependant, comme décrit précédemment *A. salmonicida* est difficile à isoler de populations hétérogènes et il est à souhaiter que de nouvelles méthodes d'identification soient mises au point. L'eau est contaminée principalement par les fèces des poissons porteurs, les cadavres et les parcelles de chairs de poissons morts de furunculose. Des concentrations de *A. salmonicida* de 10^8 UFC/mL ont été mesurées par Austin et Austin (1987) dans des tissus de poissons morts. Des essais effectués par les mêmes auteurs ont montré que de l'eau des poissons auxquels *A. salmonicida* avaient été injecté, on n'avait été capable d'identifier la bactérie que 4 jours après la mort des premiers poissons (10^3 UFC/mL dans l'eau et 10^8 UFC/mL dans la chair des poissons). Il semblerait également que la densité de poissons retrouvés dans les bassins où *A. salmonicida* est présent influence l'établissement de l'infection. En effet, à concentrations égales de *A. salmonicida* dans des bassins, Ogut et Reno (2004) ont remarqué qu'après 33 jours d'exposition, de jeunes saumons demeuraient en parfaite santé si la densité de poisson était faible (inférieure ou égale à 0,32 g de poissons par litres d'eau). À l'inverse, dans les bassins expérimentaux où la densité de poisson était plus forte (0,61 g poissons par litres d'eau et plus), l'état de santé des poissons se dégradait proportionnellement à l'accroissement de la densité de poissons. Une association de *A. salmonicida*

avec des lamproies (*Petromyzon marinus* : petits vertébrés aquatiques qui se fixent à l'épiderme des poissons par succion) a également été décrite par El Morabit *et al.*, (2004) comme une source d'infection à la furunculose chez les poissons sauvages et dans les fermes piscicoles.

Il est intéressant de noter que la bactérie est capable de survivre et de conserver son pouvoir pathogène dans l'eau salée où le NaCl est présent à une concentration de 2,2 g/L (McCarthy, 1978). Dans le même ordre d'idée, *A. salmonicida* a été isolé de poissons d'eau salée démontrant des signes de la furunculose (Austin et Austin, 1987).

1.5.5.4 Aquaculture canadienne et *Aeromonas salmonicida*

La furunculose est une infection particulièrement difficile à traiter et l'Institut des Biosciences Marines (IBM), situé à Halifax, évaluait à 5 millions de dollars, les pertes annuelles au Canada causées par *A. salmonicida* (CNRC, 2000). Du côté de la recherche, le Conseil National de Recherche du Canada (CNRC) annonçait dans un communiqué en juin 2000 (CNRC, 2000) l'ouverture officielle du laboratoire le plus sophistiqué dans le domaine de la recherche sur la génomique au Canada. Cet investissement de 1,5 millions de dollars a vu le jour à l'IBM. Ce groupe de chercheurs travaille, entre autres, à un projet nommé « *Aeromonas* » à l'intérieur duquel *A. salmonicida* est un des principaux sujets. On y séquence actuellement le génome complet de la bactérie. La souche sur laquelle cette équipe travaille n'est pas celle qui a été utilisée dans cette recherche. Comme décrit dans la section concernant le matériel, le choix de la souche bactérienne qui a servi à engendrer une infection chez un modèle animal fut basé sur le potentiel antigène de la bactérie mais aussi, et surtout, sur la présence au Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle, d'un et préférentiellement plusieurs, bactériophages permettant une lyse complète sur un tapis bactérien. Il aurait cependant été intéressant de pouvoir comparer certaines séquences des différents variants obtenus lors des mutations imposée par la présence des bactériophages et les séquences du CNRC.

1.6 Bactériophages

Découverts dans le premier quart du vingtième siècle, à la fois par Twort et par d'Hérelle (Ackermann et DuBow, 1987a), les bactériophages sont des virus qui s'attaquent spécifiquement aux bactéries. Les bactéries à l'intérieur desquelles un bactériophage peut se multiplier sont porteuses de la molécule réceptrice qui permet l'adsorption des phages sur leur surface. On retrouve ces virus partout mais on les a isolé surtout jusqu'à maintenant d'échantillons prélevés d'étendues d'eau, d'égouts et de sols (Popoff, 1971). Plusieurs études ont montré que le tractus digestif des mammifères était un habitat des bactériophages (Ando *et al.*, 1979 ; Osawa *et al.*, 1981).

Les bactériophages les plus étudiés sont les coliphages (bactériophages spécifiques aux coliformes) à cause du potentiel qu'ils représentent comme indicateur de pollution fécale dans les eaux potables ou dans les viandes d'abattage, tels le bœuf ou le poulet (Reali *et al.*, 1991 ; Calvo *et al.*, 1998 ; Hsu *et al.*, 2001 ; Kator et Rhodes, 2001). Les bactériophages ont également permis d'élucider des mystères de la génétique ou servent d'outils dans les manipulations de clonage bactérien (Hahn *et al.*, 1991; Kokjohn, 1991).

Le cycle de réplication des bactériophages peut être virulent ou tempéré (Figure 1.8). Le cycle des bactériophages virulents commence par l'adsorption et la pénétration dans la cellule cible. Il est suivi de la réplication du génome et se termine par l'assemblage et la lyse de la cellule bactérienne. Les bactériophages tempérés peuvent intégrer leur génome à celui de la bactérie pour demeurer latents jusqu'à l'induction de la réplication. Cette induction peut être obtenue *in vitro* par l'exposition aux rayons ultraviolets ou à la mitomycine c (Ackermann et DuBow, 1987a). La capacité de multiplication des bactériophages, comme des bactéries, dépend de la température d'incubation, du milieu de culture dans lequel sont cultivées les cellules bactériennes, de la souche bactérienne cible, de l'état des cellules réceptrices et du bactériophage lui-même. Par exemple, une étude menée sur le coliphage T4, en présence de *Escherichia coli* dans un milieu de culture riche, à la température de la pièce, permet de produire en 30 minutes de 100 à 200 bactériophages par cellule infectée (Abedon, 1994).

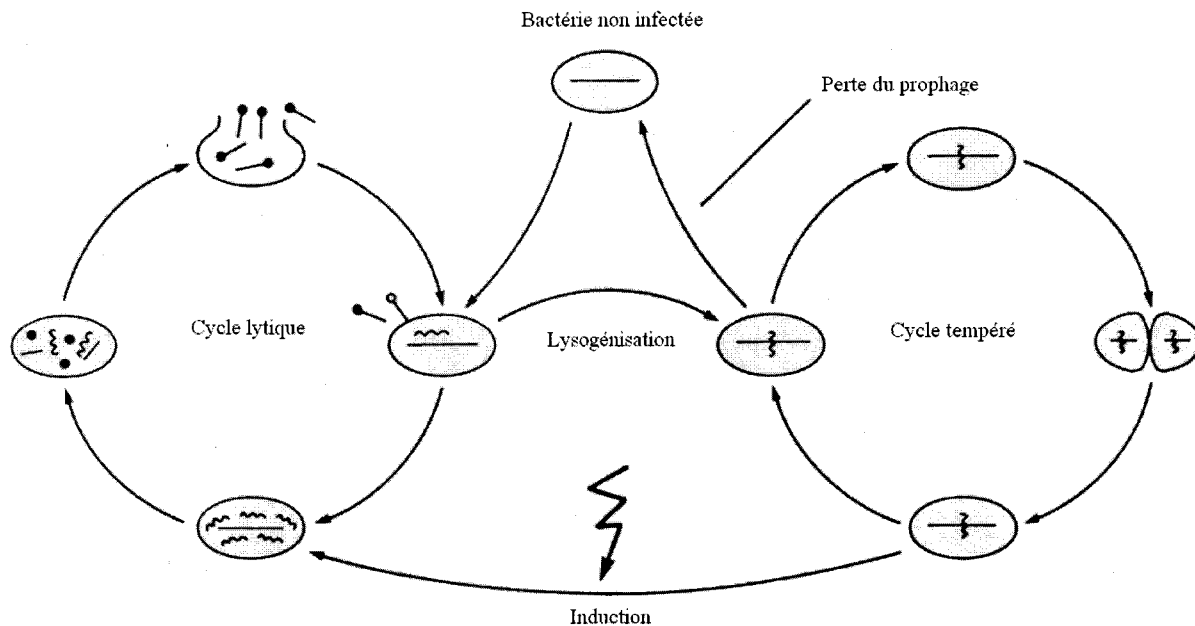


Figure 1.8 Cycles de réplication des bactériophages (Tirée de Ackerman et Dubow, 1987a)

1.6.1 Récepteurs bactériens

Des études menées sur les bactériophages des *Aeromonas* ont été effectuées (Ackermann *et al.*, 1985; Merino *et al.*, 1996; Ackermann et Krisch, 1997; Merino *et al.*, 2001). On y retrouve une classification revisitée des bactériophages connus basée surtout sur la morphologie mais pas d'information sur les récepteurs bactériens que les bactériophages utilisent pour adsorber à la cellule. Dans quelques études (Rodgers *et al.*, 1981; Aguilar *et al.*, 1997), il est démontré que la couche de lipopolysaccharides (LPS) joue un rôle important dans cette première étape du cycle d'infection virale et pourrait même être la molécule qui procure la spécificité bactérie/bactériophage. Le LPS chez les bactéries, consiste en un lipide A auquel sont accrochés une partie centrale (appelée noyau) suivi d'un antigène O. La structure lipidique est rattachée à la membrane de la cellule bactérienne et est composée de glucosamine, de phosphoéthanolamine et d'acides gras spéciaux (conférant le caractère lipidique). Il s'agit de la partie la moins variable du LPS, on la dit responsable du choc septique chez l'hôte qui accueille le pathogène qui la porte. La partie centrale est pour sa part constituée de 10 à 15 unités glucidiques en C7 et C8 qu'on ne

rencontre à toute fin pratique que dans le monde bactérien. Ce qui permet un diagnostic lorsque identifiés. Et finalement, la structure qui donne la spécificité du LPS de chaque souche : l'antigène O. Cette structure conduit à l'identification des sérotypes découlant de la nature des carbohydrates de l'antigène O. Il s'agit d'unités répétées de 3 à 5 glucides formant une chaîne polysaccharidique flottante (Kabir *et al.*, 1978; Pelmont, 1993). Les cellules rugueuses auraient un antigène O écourté, voire absent. Dans l'article de Rodgers *et al.* (1981) il est démontré que les bactériophages qui peuvent engendrer une infection chez des cellules de *A. salmonicida* rugueuses ne sont pas nécessairement aptes à engendrer d'infection sur les cellules lisses. Il y aurait donc un travail à effectuer du côté des connaissances sur les récepteurs bactériens qu'utilisent les bactériophages et sur la nature même du LPS des différentes souches de *A. salmonicida*.

1.6.1.1 Apparence rugueuse ou lisse

Plusieurs isolats recueillis, cultivés en milieu de culture liquide présentent une surface d'apparence rugueuse lorsqu'observés en microscopie. Les bactéries dites rugueuses présentent une anomalie dans la formation de la capsule. Cette anomalie rendrait la bactérie plus vulnérable face aux mécanismes de destruction cellulaire non spécifique du système immunitaire du poisson (Garduño *et al.*, 2000).

Les molécules de la capsule sont présentement à l'étude dans le projet *Aeromonas* du CNRC situé à Halifax, afin de cibler et d'identifier laquelle est responsable du contrôle de l'invasion cellulaire qui est favorisée par la couche S. Comme par exemple, un des mécanismes de colonisation de l'hôte qu'utilise *A. salmonicida* consiste en l'invasion des macrophages du poisson après y avoir adhéré. Il serait donc intéressant de savoir quelle structure est spécifiquement responsable de la fixation. Cette même couche, appelée aussi la couche hydrophobique A, composée de polysaccharides et de la protéine-A, est impliquée dans l'agrégation des bactéries aux cellules épithéliales du poisson et dans la fixation des composées ferriques (Ellis, 1999 ; Garduño *et al.*, 2000).

Quant à savoir si les cellules rugueuses sont plus ou moins virulentes, les opinions divergent. Anderson (1972) a conclu lors d'une de ces études que les souches lisses étaient plus pathogènes que les souches rugueuses alors que Rodgers *et al.* (1981) ont affirmé le contraire. Ce qui demeure une certitude est que les deux types sont présents *in vivo* et que des phages différents peuvent être dirigés spécifiquement vers chacun des deux types (Rodgers *et al.*, 1981).

1.6.2 Bactériophages dans le contrôle d'infections bactériennes

1.6.2.1 Début de l'utilisation des bactériophages

L'idée d'utiliser des bactériophages comme agents antibactériens n'est pas nouvelle (Summers, 1993; Shroyer, 1996). En Europe de l'Est, on traite depuis plus de soixante-dix ans, des infections bactériennes chez des patients atteints d'infections diverses telles des gastro-entérites ou des pneumonies (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Des méthodes désuètes et l'avènement de la pénicilline ont contribué à faire diminuer la popularité de la phagothérapie. En 1959, l'Organisation Mondiale de la Santé mettait un terme à la recherche nord-américaine sur le sujet en décrétant qu'avec les résultats obtenus avec les traitements à base de tétracycline, rien ne justifiait de poursuivre la recherche sur les bactériophages comme agents antibactériens dans la thérapie humaine (Barrow et Soothill, 1997). Depuis quelques décennies, l'intérêt pour les bactériophages comme agents antibactériens a connu une recrudescence en Amérique et en Asie. Plusieurs expériences ont mis à jour le potentiel des phages lorsque les préparations et analyses préalables aux traitements étaient adéquats (Smith et Huggins, 1983 ; Slopek *et al.*, 1987; Smith et Huggins, 1983; Smith *et al.*, 1987; Abdul-Hassan, 1990; Berchieri *et al.*, 1991 ; Soothill, 1992 ; Soothill, 1994 ; Merrill *et al.*, 1996 ; Wagner et Waldor, 2002) . Cependant, comme plusieurs questions demeuraient sans réponse, la communauté scientifique nord-américaine a été prudente et a attendu des preuves tangibles (i) de l'efficacité des bactériophages et (ii) de la sécurité quant à l'utilisation des bactériophages.

Une des questions les plus importantes sur la possibilité d'utiliser des phages dans le contrôle de populations bactériennes est l'apport potentiel par des phages d'une séquence permettant la transmission et la production de facteurs de virulence dans la population de cellules dont on voulait justement diminuer la pathogénicité. Il s'avère que les bactériophages sont effectivement pourvus de gènes codant pour des toxines ou certains facteurs de régulation de la production de toxines présentes dans le génome bactérien (Wagner et Waldor, 2002). On remarque que les phages ont différents impacts sur les populations bactériennes avec lesquelles ils sont exposés. Dans l'ouvrage cité précédemment, Wagner et Waldor (2002) on nous informe de quatre mécanismes observés : l'augmentation de la production de facteurs de virulence parce que encodés dans le génome du phage, la régulation de la production de facteurs de virulence chez les bactéries, l'altération de la pathogénicité bactérienne et la transmission de séquences influant potentiellement l'évolution d'une

populatiuon bactérienne (inter-espèces voire inter-genre). Il est à noter que certaines études ont démontré qu'une population bactérienne pouvait voir augmenté son pouvoir de résistance au système immunitaire de l'organisme infecté (Farrant *et al.*, 1997; Kaneko *et al.*, 1997) ainsi qu'aux antibiotiques (Ubakata *et al.*, 1975; Firth et Skurray, 2000) par la production de facteurs divers.

Des essais à travers le monde ont également été effectués sur divers pathogènes du poisson et leurs bactériophages (Wu et Chao, 1984 ; Hsu *et al.*, 2000 ; Park *et al.*, 2000). Par exemple, une étude menée par Hsu *et al.* (2000), démontre que l'utilisation de bactériophages, en bouillon de culture et à température optimale de croissance de la bactérie, permettait de diminuer la population bactérienne d'*Edwardsiella tarda* de 5 log en une heure à un MOI (ratio bactériophages/bactéries) de 115, de 4 log en 3 heures à un MOI de 11,5 et de 4 log en 4 heures avec un MOI de 1,15. Le MOI est donc un paramètre qui influence le temps nécessaire à la chute de la population bactérienne. Les bactériophages avaient été isolés de l'eau de bassins de pisciculture. La faiblesse de ces expérimentations dans leur capacité à nous informer sur l'effet de bactériophages en pisciculture réside dans le fait qu'elles ont été effectuées seulement en milieu de culture à température contrôlée et constante au laboratoire et non dans l'eau en présence de poissons.

1.6.2.2 Exemple de traitement sur un modèle mammifère

Dans une étude de Merrill *et al.* (1996), des souris auxquelles avait été inoculées une souche pathogène de *Escherichia coli*, ont présenté des symptômes d'infection après quelques jours seulement pour finalement succomber des suites d'une septicémie. Merrill *et al.* ont démontré que les souris ayant reçu des injections de bactériophages, connaissaient des symptômes moins sévères et donc pouvaient surmonter la maladie avec le temps alors que celles qui en avaient été privées d'injections de bactériophages avaient toutes été retrouvées mortes. La cause de cette réussite provenant d'une étape de sélection des bactériophages. Une série de passages successifs dans la circulation sanguine de souris avait permis de sélectionner et recueillir des bactériophages que le système réticulo-endothélial (RES) des souris laissait libres dans la circulation sanguine. Le système immunitaire des organismes soumis à la présence des bactériophages les reconnaissait comme des antigènes. Des anticorps étaient alors produits contre les bactériophages injectés et ces derniers étaient éliminés de la circulation sanguine en quelques heures. Une mutation au sein d'une protéine de la capsid était à l'origine de la non reconnaissance des virus par le RES des souris. Ce qui est

intéressant ici, c'est que l'utilisation de bactériophages comme traitement nécessiterait un suivi mais des stratégies relevant de la microbiologie étaient déjà concluantes il y a 10 ans de cela.

1.6.3 Bactériophages d'*Aeromonas*

En 1965, le premier phage d'*Aeromonas* était examiné en microscopie électronique (Ackermann et DuBow, 1987b). Les bactériophages d'*Aeromonas* ont surtout été utilisés dans l'industrie des pêches, pour l'identification des pathogènes. Les phages isolés et caractérisés à partir de bactéries faisant partie du genre *Aeromonas*, sont tous des phages caudés, c'est-à-dire portant une queue. Presque tous sont de la famille des *Myoviridae*. Ces bactériophages possèdent une queue contractile. Une gaine autour de la queue du phage se contracte après l'attachement du phage afin de permettre la pénétration du génome du virus à l'intérieur de la bactérie. Un seul phage de la liste actuelle est membre de la famille des *Podoviridae*, c'est-à-dire des virus dont la queue courte et non-contractile. La Figure 1.9 permet de comparer la diversité des morphologies des phages d'*Aeromonas* identifiés et répertoriés jusqu'à maintenant (Ackermann et DuBow, 1987b). La Figure 1.10 représente le bactériophage 65, principal bactériophage de cette étude. Dans une étude menée par Ackermann *et al.* (1985), on constatait que certains des bactériophages isolés à partir de cultures de *A. salmonicida* étaient actifs contre des souches de *A. hydrophila*.

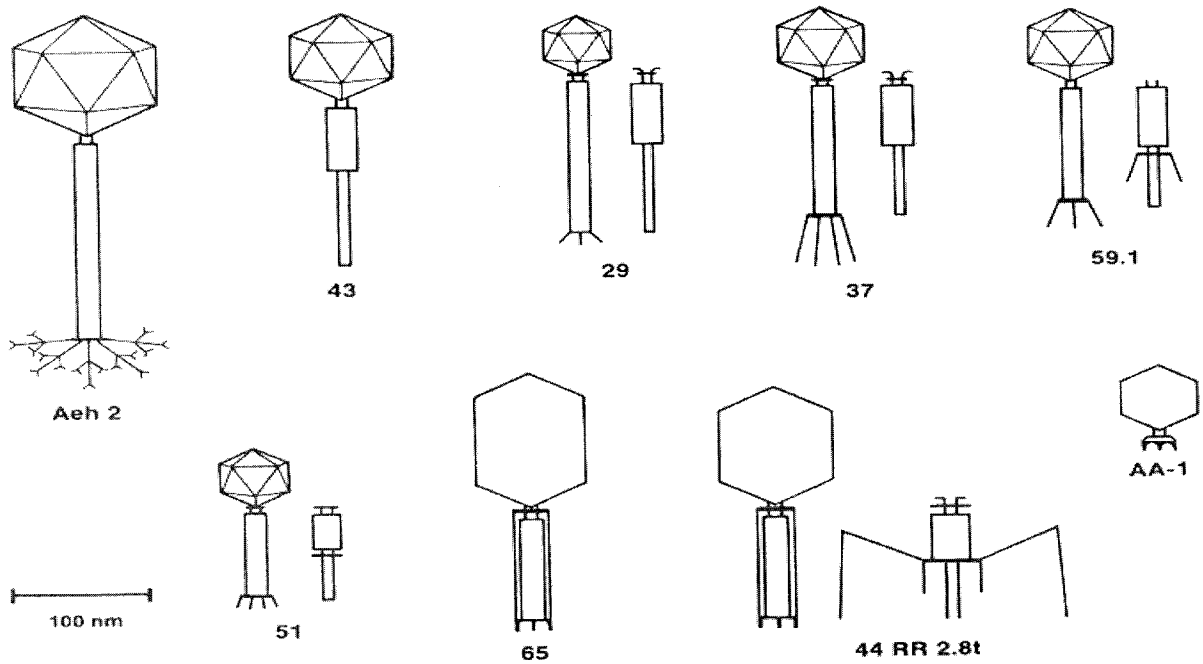


Figure 1.9 Morphologie des bactériophages d'*Aeromonas* (Ackerman *et al.*, 1985)



Figure 1.10 Bactériophage 65. Grossissement 297 000 x (Philips EM 300). Acétate d'uranyl 2%. Le trait mesure 100 nm. Courtoisie du Dr Hans-W. Ackermann

1.7 Hypothèse et objectifs de recherche

Comme mentionné précédemment, les poissons qui démontrent des symptômes de la furonculose sont souvent atteints gravement. Les capturer afin de les isoler ou de les traiter représente un stress supplémentaire et diminue les chances de guérison du poisson. D'après une étude de Fattal *et al.* (1988), il serait envisageable de traiter des poissons à l'aide de bactériophages en utilisant leur nourriture comme support viral et par le fait même favoriser la pénétration des bactériophages. Cependant, comme les poissons malades mangent généralement moins que les poissons sains, les chances de succès d'un traitement conçu sur cette base, pour des poissons atteints de maladies telle la furonculose, semblent faibles.

L'intérêt de la prophylaxie prend donc tout son sens ici. À ce point de l'investigation théorique, il semble que l'immunisation soit la solution idéale quoique pas encore efficace (voir section 1.5.5.1). Cependant, Lamers et Van Muiswinkel (1986) ont montré que la réponse humorale spécifique des poissons serait davantage efficace à court terme.

À la lumière des connaissances sur le système immunitaire des poissons et les expériences de Carl Merrill *et al.* (1996), il apparaît clairement qu'une méthode par laquelle les bactériophages devraient pénétrer l'organisme d'un poisson infecté augmenterait considérablement les risques d'engendrer une réponse immunitaire de la part des poissons contre les bactériophages. De plus, si la périodicité des infections contre lesquelles l'immunisation fournissait une protection devait être connue, pourquoi attendre que le pathogène pénètre à l'intérieur du système du poisson pour qu'une action ait lieu? Il semble donc tout indiqué de consacrer des énergies du côté des événements préliminaires à l'établissement de l'infection. C'est-à-dire faire chuter les populations bactériennes alors qu'elles sont à l'extérieur du poisson plutôt que d'attendre qu'elles soient à l'intérieur de la circulation sanguine pour réagir. Ce qui pourrait être évité par l'utilisation de bactériophages. L'utilisation de bactériophages comme agent préventif pour lutter contre les épidémies de furonculose représente la voie de recherche suivie dans la présente étude. Cette approche se distingue de celle explorée dans d'autres laboratoires, soit l'utilisation des bactériophages en mode curatif (Park et Nakai, 2003).

Le but de cette étude a été de démontrer, avec des paramètres se rapprochant le plus possible des conditions d'élevage, que l'on peut envisager prévenir l'établissement d'infections bactériennes à

l'aide de bactériophages. L'action préventive doit être dirigée vers un pathogène en particulier car les bactériophages n'ont pour cible que l'espèce bactérienne présentant à sa surface la structure moléculaire réceptrice nécessaire à la fixation. Deux modèles ont été étudiés : *Aeromonas hydrophila* chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*) en présence du bactériophage Aeh1 (HER 209) et *Aeromonas salmonicida* chez des ombles de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) en présence du bactériophage 65 (HER 110) .

1.7.1 Objectifs spécifiques

La mise au point des expérimentations qui sont décrites dans les chapitres qui suivent a été réalisée de façon chronologique selon les résultats obtenus des essais les plus récents. En effet, les organismes mis en cause et la nature des installations nécessaires et la philosophie même de cette recherche ne trouvaient de similitudes dans la littérature disponibles que de façon partielle. Voici donc les quatre objectifs spécifiques à chacune des étapes qui ont mené à la complétion de cette thèse dont le but final était de créer une ouverture dans un champ de recherche qui n'est pas encore développé au Canada :

1. Déterminer les conditions expérimentales permettant de procéder à des essais sur un modèle animal, de façon à minimiser le nombre d'animaux sacrifiés;
2. Évaluer l'impact de l'ajout d'un bactériophage dans une population d'ombles de fontaine alors que *Aeromonas salmonicida* est présent, le MOI étant de 1;
3. Vérifier la possibilité de contrer le développement de bactéries résistantes à un bactériophage ajouté dans une population de *Aeromonas salmonicida* par l'utilisation d'une combinaison de plusieurs bactériophages;
4. Connaître la sensibilité de souches de *Aeromonas salmonicida*, résistantes aux antibiotiques actuellement en usage au Canada, pour les bactériophages disponibles au Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le but des essais du présent chapitre a été de déterminer les conditions expérimentales permettant de procéder à des essais sur un modèle animal, de façon à minimiser le nombre d'animaux sacrifiés et à répondre aux exigences du Conseil Canadien de Protection des Animaux. Ces travaux ont permis de constater que la carpe est un animal trop résistant pour être utilisé dans le cadre des essais qui nous intéressent. La mise au point des conditions expérimentales a été élaborée à l'aide d'une partie des résultats obtenus grâce aux essais effectués à l'aide de *A. hydrophila*, des bactériophages spécifiques à cette bactérie et de carpillons. Certaines des manipulations qui seront décrites ci-après ont été reprises lors des expérimentations des chapitres 3, 4 et 5. De même, l'identification des virus, bactéries et poissons se trouvera dans les différents tableaux de cette portion de la thèse. Le lecteur pourra donc se référer au chapitre 2 durant la prise de connaissance des autres chapitres de l'ouvrage.

2.1 Bactéries

Les bactéries *A. salmonicida* et *A. hydrophila* ont été utilisées au cours de ces travaux de recherche. Ces bactéries provenaient du Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle de l'Université Laval à Québec. La souche bactérienne la plus utilisée durant ces travaux, *A. salmonicida* HER 1107, a été isolée d'un omble chevalier repêché du fleuve Saint-Laurent alors qu'il présentait des signes cliniques de la furonculose et qu'il avait vraisemblablement succombé à cette infection. Les différentes souches de *A. salmonicida* qui ont été utilisées durant les essais ont été répertoriées aux Tableaux 1 et 2. Une seule souche de *A. hydrophila* a été utilisée, soit HER 1209.

2.1.1 *Aeromonas salmonicida*

Les informations concernant les bactéries ayant servi lors de l'amplification des différents bactériophages sont présentées au Tableau 2.1. La principale bactérie utilisée lors de ces essais, soit HER 1107, s'y trouve également répertoriée. Le Tableau 2.2 pour sa part, regroupe les informations concernant les souches de *A. salmonicida* qui ont servi lors des essais décrits au chapitre 5. Ce tableau démontre bien que plusieurs souches sont résistantes aux antibiotiques utilisés au Canada en pisciculture. La numérotation UMx des souches a été établie dans le but de préserver la

confidentialité des éleveurs qui ont envoyé des échantillons pour identification à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal.

Tableau 2.1 Identification des souches bactériennes de *Aeromonas salmonicida* provenant de Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle

Numéro de souche HER	Référence	Origine
1084	Popoff et Vieu (1970)	Eaux usées, France
1085	Popoff et Vieu (1970)	Eau de ferme piscicole, France
1098	Paterson (1968)	Bassin d'élevage de truite, Canada
1098	Paterson (1968)	Bassin d'élevage de truite, Canada
1098	Paterson (1968)	Boues d'étang, Canada
1108	Popoff et Vieu (1970)	Eau de ferme piscicole, France
1084	Popoff et Vieu (1970)	Eau de ferme piscicole, France
1104	Popoff et Vieu (1970)	Eau de lac, France
1107	Popoff et Vieu (1970)	Spontané de <i>A. salmonicida</i> HER 1041
1108	Popoff et Vieu (1970)	Bassin d'élevage de truite, France
1084	Popoff et Vieu (1970)	Eau de lac, France
1110	Popoff et Vieu (1970)	Eau de rivière, France

Tableau 2.2 Identification des souches bactériennes de *Aeromonas salmonicida* du laboratoire de bactériologie de l'Université de Montréal

Souche Bactérienne UM	Antibiogramme *		
	Florfénicol	Oxytétracycline	Sulfadiméthoxine- ormetoprim
UM 1	L	L	S
UM 2	R	L	S
UM 3	S	S	S
UM 4	R	L	R
UM 5	S	R	R
UM 6	R	R	S
UM 7	S	S	S
UM 8	S	R	R
UM 9	L	L	R
UM 10	S	S	S
UM 11	S	S	S
UM 12	S	R	R
UM 13	S	S	S
UM 14	S	R	S
UM 15	S	S	S
UM 16	S	S	S
UM 17	S	S	S
UM 18	R	L	S
UM 19	R	R	S
UM 20	S	S	S
UM 21	S	S	S

* L : Limite, R : Résistance, S : Sensible.

2.1.2 Culture et conservation

2.1.2.1 Conditions expérimentales spécifiques à l'espèce bactérienne

A. hydrophila HER 1209 a été cultivé en milieu de culture infusion cœur-cerveau (BHI, Difco) incubé à 28 °C. Les milieux utilisés étaient sous forme liquide ou solide. Les milieux de culture solides étaient obtenus par ajout de 15 g d'agar par litre de bouillon BHI.

Toutes les souches de *A. salmonicida* ont été cultivées dans un milieu de culture liquide infusion cœur-cerveau (BHI, Difco) incubé à température de la pièce (22 +/-1 °C). Les milieux utilisés étaient sous forme liquide ou solide. Les milieux de culture solides étaient obtenus par ajout de 15 g d'agar par litre de bouillon BHI.

A. salmonicida a également été cultivé en milieu de culture de protéines soja hydrolysées à la trypticase (TSA, Difco) où 15 g d'agar ajoutés à un litre de bouillon de culture permettait d'obtenir des milieux de culture solides (TSB). Ce milieu incubé à la température de la pièce permet d'observer la production d'un pigment brun/rougeâtre par *A. salmonicida*.

2.1.2.2 Conservation à long terme

Les souches d'*Aeromonas* ont été cultivées individuellement dans 500 mL de milieu de culture BHI et incubées à température de la pièce (22 +/-1 °C), durant 24 h. Des volumes de 0,7 mL ont été prélevés et déposés dans des microtubes à fermetures stériles. Un volume de 0,3 mL de glycérol stérile a été ajouté à chacun des tubes et les suspensions bactériennes ont été placées à -80 °C après homogénéisation. Cette méthode, conseillée par Ackermann dans ce cas précis, peut aussi se voir ajouter un lavage des cellules (avant l'ajout de glycérol), afin de minimiser la quantité de résidus et des divers débris cellulaires présents dans le milieu de culture. Différents enzymes produits par les cellules pourraient endommager l'échantillon que l'on souhaite préserver.

2.1.2.3 Conservation à court terme

Les souches bactériennes ont été conservées au réfrigérateur sur milieu de culture solide lorsque certains essais nécessitaient des manipulations qui s'étalaient sur plus d'une journée. Un inoculum était alors prélevé d'une culture en bouillon à l'aide d'un fil à boucle et était strié sur BHI solide.

2.1.3 Courbe de croissance

La courbe de croissance de la souche *A. hydrophila* HER 1209 a été tracée afin de déterminer où se situaient chacune des phases de croissance de la bactérie dans un milieu de culture BHI liquide à 28 °C. La raison étant qu'il est essentiel de procéder à l'inoculation des bactéries en présence de poissons avant que la culture n'ait atteint la phase de mort cellulaire donc s'assurer d'ajouter des cellules capables de se multiplier.

Une goutte d'une culture de *A. hydrophila* HER 1209 en milieu de culture liquide BHI de 24 h a été inoculée dans des tubes de 16 mm vissés contenant 5 mL de milieu de culture liquide BHI stérile. La densité optique (D.O.: 600 nm) des cultures a été lue à des intervalles de 30 min durant 20 h. Une courbe mettant en relation la densité optique (600 nm) de la culture bactérienne en fonction du temps (en heures) a été tracée à la Figure 2.1. La figure qui suit est une représentation ponctuel (un essai parmi plusieurs autres), il n'y a donc pas d'écart-type sur cette courbe. Le but étant d'obtenir des cellules en bonne condition, il ne s'agissait que d'une évaluation du temps d'incubation versus les volumes désirés et les heures de laboratoires disponibles. Donc en 24 heures, dans 500 mL, à 28 °C, nous obtenions une culture dont la concentration de cellules viables pouvait varier de 10^5 à 10^7 ufc/mL. C'est d'ailleurs pourquoi nous avons estimé qu'il pouvait être adéquat de retrouver cette figure dans cette section, destinée aux matériels et méthodes.

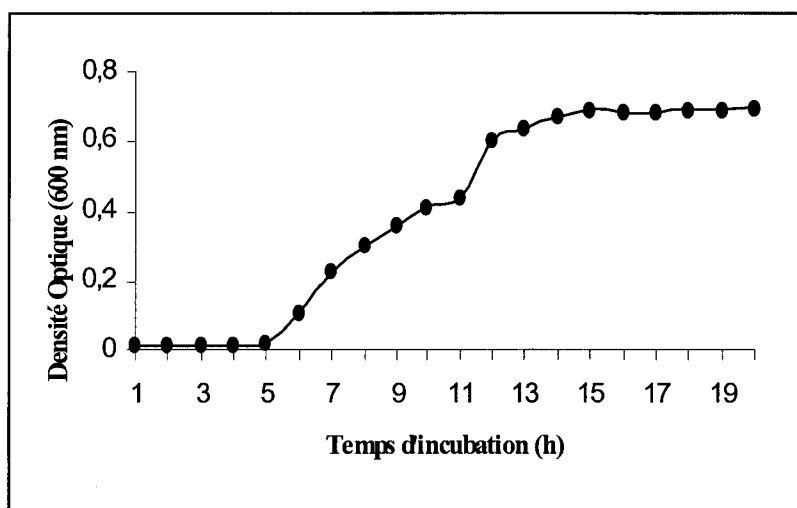


Figure 2.1 Courbe de croissance de *A. hydrophila* HER 1209 en milieu de culture liquide BHI incubé à 28 °C

Par la suite, les inoculations ont été effectuées à partir de cultures cellulaires ayant atteint une D.O. (600 nm) de 0,5 à 0,6 de façon à maximiser le nombre de cellules viables ajoutées.

2.1.4 Dénombrement bactérien

Afin de suivre l'évolution des populations bactériennes, des prélèvements journaliers de 10 mL d'eau de chacun des aquariums ont été effectués. Des dilutions d'une série décimale de 10^{-1} à 10^{-10} faites à partir d'un échantillon ont été déposées. Les dilutions ont été effectuées dans un tampon phosphate 50 mM à pH 7,2 (8,76 g K_2HPO_4 , 6,05 g KH_2PO_4 et 1,70 g NaCl dans 1 litre d'eau distillée). Des volumes d'un millilitre (en duplicata) ont été déposés sur des milieux de culture sélectifs pour chacun des *Aeromonas* de cette recherche, incubés à la température correspondant à l'espèce dénombrée durant 24 h.

2.1.4.1 *Aeromonas hydrophila*

Tel que recommandé par l'USEPA (2000), le milieu de culture sélectif gélose-ampicilline a été utilisé pour *A. hydrophila*. Les milieux ont été préparés au laboratoire tel que décrit ci-après. Les échantillons desquels *A. hydrophila* devait être isolé ont été incubés à 28 °C durant 48 h. Le dénombrement des colonies de couleur jaune et d'un diamètre supérieur à 0,5 mm ont permis de connaître la quantité de *Aeromonas* probable présente sur le milieu de culture. La période de conservation de ces milieux était de 14 jours à 4°C.

2.1.4.2 Milieu de culture sélectif pour *A. hydrophila*

La composition d'un litre de milieu de culture était la suivante : 5,0 g tryptose, 10,0 g dextrine, 2,0 g extraits de levure, 3,0 g NaCl, 2,0 g KCl, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,1 g $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$, 0,08 g bromothymol bleu, 15 g agar et 10 mg Ampicilline, 100 mg Sodium déoxycholate (Fisher Canada).

2.1.4.2.1 Ampicilline

L'ampicilline est un antibiotique qui empêche la croissance des coliformes et autres entérobactéries souvent retrouvées dans le même milieu que *A. hydrophila*. Il existerait des souches de *A. hydrophila* non résistantes à l'ampicilline mais elles seraient rares (Imzilin *et al.*, 1997). L'ampicilline n'empêche pas la croissance de *Pseudomonas fluorescens* (Palumbo *et al.*, 1985).

2.1.4.2.2 *Bromothymol bleu*

Le bromothymol bleu est un indicateur de pH, le plus sensible dans la fourchette comprenant les pH de 6,0 à 7,6. Il améliore le pouvoir de différenciation et permet une meilleure discrimination en permettant de visualiser l'utilisation des carbohydrates présents dans le milieu de culture, donc la fermentation de la dextrine dans le cas présent (USEPA, 2000; Imzilin *et al.*, 1997; McCoy et Pilcher, 1974).

2.1.4.2.3 *Dextrine*

La dextrine est la source de carbohydrate fermentescible du milieu de culture. Lorsque fermenté, le pH diminue. En association avec le sodium déoxycholate, elle permet une meilleure différenciation des bactéries par la production d'un pigment de couleur jaune des colonies de *A. hydrophila* sur le milieu de culture (USEPA, 2000).

2.1.4.2.4 *Sodium déoxycholate*

Le sodium déoxycholate sert à accentuer la coloration jaune des colonies capables de fermenter la dextrine (Imzilin *et al.*, 1997). Il inhibe également la croissance des bactéries à Gram-positif (Shotts et Rimler, 1973).

2.1.4.3 *Aeromonas salmonicida*

Le milieu de culture sélectif qui a été utilisé pour *A. salmonicida* était constitué de 0,02% de colorant Bleu de Coomassie ajouté avant autoclavage au milieu de culture BHI avec agar (communication personnelle avec Sandra Sperker du CNRC du projet *Aeromonas*). Le dénombrement des colonies de couleur bleue, apparaissant après 48 h à température de la pièce ont permis de connaître la quantité de *A. salmonicida* probable sur le milieu de culture. La couleur bleue signifiait la présence de la couche A, non pas qu'elle soit spécifique à *A. salmonicida* mais qui nous donne une indication sur la présence d'une capsule.

2.1.5 Tests de confirmation

Comme il s'agit d'échantillons hétérogènes, des tests de confirmation ont été utilisés afin de connaître les concentrations de chacune des bactéries recherchées. Des aquariums contrôles, des blancs, c'est-à-dire auxquels aucune bactérie n'a été ajoutée mais seulement du milieu de culture, ont permis de soustraire les quantités de *A. hydrophila* de la flore indigène de l'eau.

2.1.5.1 *Aeromonas hydrophila*

Un test de présence/absence de la cytochrome oxydase a permis de confirmer la présence de *A. hydrophila* recherché. Ce test consistait à mettre en contact 25% des colonies isolées et dénombrées et une solution aqueuse de N,N,N,N-tétraméthyl-p-phénylènediamine (1%) sur une surface cartonnée (USEPA, 2000). Une coloration violacée indiquait la présence de l'enzyme cytochrome oxydase. Lorsque le test était positif, un second test de confirmation consistait à inoculer la colonie dans un bouillon « purple broth » (Difco) afin de déterminer la fermentation du tréhalose. Le passage de la couleur du milieu de culture de pourpre à jaune indiquait une fermentation du tréhalose. Finalement afin de confirmer la présence de HER1209, le bactériophage Aeh2 a été déposé sur un tapis bactérien de la souche isolée. La présence de plage de lyse confirmait la présence de *A. hydrophila*.

2.1.5.2 *Aeromonas salmonicida*

La confirmation de la présence de *A. salmonicida* a été évaluée de façon préliminaire par coloration Gram, observation en microscopie et par l'observation de la production d'un pigment brun/rougeâtre par *A. salmonicida* sur milieu de culture TSA après 3 à 7 jours d'incubation à la température de la pièce. L'apparition d'une zone d'hémolyse sur milieu de culture gélose au sang de mouton a également été vérifiée. Finalement afin de confirmer la présence de HER 1107, le bactériophage HER 110 a été déposé sur un tapis bactérien de la souche isolée. La présence de plage de lyse confirmait la présence de *A. salmonicida*.

2.2 Bactériophages

Au total 14 bactériophages du Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle, de l'Université Laval à Québec ont été utilisés dans le projet (conservé maintenant au Laboratoire de Sylvain Moineau du Groupe de Recherche en Écologie Buccale).

2.2.1 Phages de *Aeromonas hydrophila*

Deux bactériophages d'*Aeromonas hydrophila*, les phages Aeh1 (HER 209) et Aeh2 (HER 210), ont été utilisés (Chow et Rouf, 1983). Aeh1 est un bactériophage classé parmi ceux du groupe 65 de la Figure 1.9. Il est donc morphologiquement semblable aux phages de la famille T (représentants les plus étudiés des bactériophages qui ont pour cible la bactérie *Escherichia coli*). Il est décrit dans Chow et Rouf (1983), comme ayant une tête de 134 nm de longueur et de 89 nm de diamètre. Il possède une queue de 123 nm de longueur et de 22 nm de diamètre. Sa base de 30 nm de diamètre porte plusieurs spicules. Aeh1 infecte les souches A3, C1, GL1 d'*A. hydrophila* isolées respectivement des plaies cutanées d'une grenouille, d'un poulet non cuit et d'un alligator. Ce phage peut être amplifié au laboratoire à partir de la souche *A. hydrophila* HER 1209.

Aeh2 est le seul représentant de ce morphotype (Figure 1.9). Il est décrit dans Chow et Rouf (1983), comme ayant une tête isométrique. Une longueur de 134 nm de diamètre est mesurée entre ses sommets opposés. Il possède une queue de 212 nm de longueur et de 28 nm de diamètre à laquelle sont attachés des spicules ramifiés. Ce bactériophage peut être amplifié à partir de *A. hydrophila* HER 1209.

2.2.2 Phages de *Aeromonas salmonicida*

Au total, douze bactériophages de *A. salmonicida* ont servi dans cette recherche. La Figure 1.10 représente le bactériophage 65. La Figure 1.9 permet de visualiser schématiquement la majorité des bactériophages identifiés au Tableau 2.3.

Les bactériophages ont été dégelés doucement sur de la glace lors des essais afin de minimiser les bris possibles causés par un dégel trop rapide.

Tableau 2.3 Identification et origine des bactériophages de *Aeromonas salmonicida* du Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle

Numéro de phage	Nom	Numéro de souche	Genre	Espèce	Morphotype	Référence	Origine
HER 84	3	1084		37	A1	Popoff et Vieu (1970)	Eaux usées, France
HER 85	25	1085	Similaire à T4	25	A2	Popoff et Vieu (1970)	Eau de ferme piscicole, France
HER 98	44RR2.8t	1098	Similaire à T4	40RR2.8t	A2	Paterson (1968)	Bassin d'élevage de truite, Canada
HER 99	Asp37	1098		37	A1	Paterson (1968)	Bassin d'élevage de truite, Canada
HER 100	59.1	1098		59.1	A1	Paterson (1968)	Boues d'étang, Canada
HER 104	29	1108		29	A1	Popoff et Vieu (1970)	Eau de ferme piscicole, France
HER 105	31	1084	Similaire à T4	31	A2	Popoff et Vieu (1970)	Eau de ferme piscicole, France
HER 106	32	1104		37	A1	Popoff et Vieu (1970)	Eau de lac, France
HER 107	43	1107	Similaire à P1	43	A1	Popoff et Vieu (1970)	Spontané de <i>A. salmonicida</i> HER 1041
HER 108	51	1108		51	A1	Popoff et Vieu (1970)	Bassin d'élevage de truite, France
HER 109	56	1084		51	A1	Popoff et Vieu (1970)	Eau de lac, France
HER 110	65	1110	Similaire à T4	65	A2	Popoff et Vieu (1970)	Eau de rivière, France

2.2.3 Amplification et conservation

L'amplification est l'étape par laquelle on obtient des solutions dont le titre en bactériophages est élevé. La souche bactérienne hôte du bactériophage à amplifier a été inoculée dans un milieu de culture liquide. Les cultures ont été incubées (température de la pièce) avec agitation légère durant 5 h ou jusqu'à l'obtention d'une densité optique avoisinant 0,5 (600nm). Un volume de 100 µL d'une solution de bactériophages 10^9 UFP/mL a alors été ajouté à la culture qui a été remise à l'incubation durant 20 h. Le milieu de culture a été centrifugé à 4500 rpm puis filtré en deux étapes : sur un filtre Millipore 0,45 µm dans un premier temps, puis en second lieu sur un filtre Millipore de 0,22 µm (Bedford, MA). La seconde filtration a servi à éliminer des croissances cellulaires retrouvées dans les milieux de culture, conservés au froid, après 2 à 3 semaines. Le filtrat obtenu était la solution concentrée de bactériophages recherchée.

Chow et Rouf (1983) proposent d'ajouter 10^{-3} M de $MgCl_2$ ou du NaCl au milieu de culture afin de favoriser l'adsorption des virus aux cellules bactériennes. Dans les essais de cette recherche cette étape a été extraite du protocole car aucune différence n'a été observée en laboratoire entre la présence ou l'absence d'un de ces sels.

2.2.3.1 Conditions expérimentales dépendant de l'espèce bactérienne cible

Les bactériophages ayant pour cible *A. hydrophila* ont été cultivés dans un milieu de culture liquide infusion cœur-cerveau (BHI, Difco) où la souche bactérienne avait été inoculée et incubée à 28 °C. Les bactériophages ayant pour cible *A. salmonicida* ont été cultivés dans un milieu de culture liquide infusion cœur-cerveau (BHI, Difco) où la souche bactérienne avait été inoculée et incubée à température de la pièce (22 +/-1 °C).

2.2.3.2 Conservation à long terme

Après amplification, des volumes de 0,5 mL des concentrés de bactériophages ont été prélevés et déposés dans des microtubes à fermoirs stériles. Un volume de 0,5 mL de glycérol stérile a été ajouté à chacun des tubes et la suspension virale a été placée à -80°C.

2.2.3.3 *Conservation à court terme*

Les bactériophages ont été conservés dans les bouillons filtrés à 4°C pour leur utilisation le lendemain.

2.2.4 **Dénombrement viral**

Les méthodes de dénombrement des bactériophages sont utilisées dans le but de connaître l'ordre de grandeur des titres des échantillons. Le procédé n'est pas le même lorsque le titre prévu est faible (10^0 à 10^3 UFP/mL) que lorsqu'il est élevé (10^4 à 10^{15} UFP/mL). Dans le cas où il y a très peu de bactériophages présents, plusieurs étapes sont nécessaires et comme la méthode implique que les bactériophages et les bactéries soient ajoutés dans un milieu à 45°C, la précision des résultats était déficiente. Trop de cellules bactériennes et même de bactériophages ont probablement été affectées par cette température car les titres obtenus de cette méthode étaient souvent fluctueux. Donc, les essais doivent être effectués en répliqués afin d'obtenir une moyenne. Noter ici, que la valeur de 10^{15} UFP/mL n'est que théorique, cette valeur n'a jamais été obtenue mais les dilutions ont été effectuées pour vérification.

2.2.4.1 *Titre prévu élevé*

On obtient le titre des phages, dans le cas d'un titre élevé, en déposant des dilutions des échantillons de bactériophages sur un tapis bactérien. Les boîtes de Pétri ont été préalablement divisés en une douzaine d'espaces égaux numérotés. Le tapis bactérien a été obtenu à l'aide d'un volume de 3 mL d'une culture liquide de 6 h de la bactérie hôte, étalé sur un milieu de culture solide BHI puis aspiré à l'aide d'une pipette Pasteur. Les milieux de culture ont ensuite été laissés couvercles ouverts à l'intérieur d'un champ stérile, obtenu par une flamme allumée, afin de laisser sécher légèrement le surplus de bouillon. Dans chaque espace, 10 μ L de chacune des dilutions d'une série décimale faites à partir d'un échantillon ont été déposés. Les dilutions ont été effectuées dans un tampon phosphate 50 mM à pH 7,2. Les milieux de culture ont été incubés à la température correspondant à la souche bactérienne et les décomptes ont été effectués après 24 h. Le titre de bactériophage a été calculé selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre de plages de lyse}}{\text{Volume déposé } (\mu\text{L})} \times \text{Facteur de dilution} = \frac{\text{unités formatrices de plages (UFP)}}{\text{mL}} \times 1000$$

2.2.4.2 Titre prévu faible

Dans le cas d'un titre faible, il est préférable d'utiliser la méthode « top agar ». Cette méthode consiste à emprisonner les phages et les bactéries dans un faible volume de milieu gélosé avant leur incubation. Le « top » étant constitué de 3 mL de milieu de culture liquide auquel a été ajouté 1% d'agar, le tout maintenu à 45°C (pour éviter que l'agar ne se solidifie) jusqu'à utilisation. Les plages de lyse sont plus facilement visibles ainsi.

Des volumes de 5 et 50 µL de chacun des échantillons de bactériophages et 50 µL d'une culture en bouillon de la bactérie réceptrice ont donc été ajoutés au « top » précédemment décrit . Le tout a été homogénéisé et a rapidement été étalé sur un milieu BHI solide. Les milieux sur lesquels les bactériophages et les bactéries ont été ajoutés ont préalablement été asséchés à l'incubateur durant 30 min. à 28 °C. Les milieux de culture ont ensuite été incubés 24 h à la température correspondant à l'espèce bactérienne utilisée.

2.3 Poissons

2.3.1 *Cyprinus carpio*

Les carpes ont été gardées en bassins de quarantaine selon les indications qui suivent.

2.3.1.1 Taille et provenance des carpes

Les carpes ont été capturés dans le Bassin Japonais du Jardin Botanique de Montréal. Il s'agit de carpillons de carpes Koï éclos au printemps 2001 qui devaient être sacrifiés avant l'arrivée de l'hiver dans le but d'éviter la surpopulation du bassin. À leur arrivée en octobre 2001, les carpes pesaient en moyenne 4 g et mesuraient 6,5 cm de longueur.

2.3.1.2 Eau des bassins de quarantaine

Deux bassins d'une capacité de 500 L chacun, alimentés en circuit ouvert avec de l'eau de la ville de Montréal, ont servi à garder deux groupes d'environ 500 carpes dans des volumes approximatifs de 300 litres d'eau. Comme l'alimentation était en circuit ouvert, l'accumulation des déchets était minimale et l'entretien des bassins était limité au balayage du fond, afin de recueillir les particules solides qui n'auraient pas été entraînées par l'eau rejetée continuellement par le système. Le débit de

l'eau variait de 10 à 14 L par minute. Les balayages ont eu lieu une fois par semaine. L'eau a été déchlorée par passage sur filtre au charbon activé.

2.3.1.3 Température

La température de l'eau alimentant les bassins de quarantaine fluctuait en fonction de la température extérieure. La température de l'eau des bassins des carpes étaient à 22 +/-1 °C en octobre et elle a atteint 4°C au mois de janvier.

2.3.1.4 Nourriture

De la moulée pour la truite d'élevage a été donnée aux carpes en raison de 18 g le matin et 18 g le soir dans chacun des bassins. Ce qui représente environ 1,5% de la masse totale de carpes dans les bassins. Il s'agit d'une alimentation minimale nécessaire à la survie tout en permettant d'éviter le cannibalisme (Environnement Canada, 1992). Étant maintenues à l'eau froide et nourries minimalement, les carpes ont peu grandi durant la période de quarantaine.

2.3.2 *Salvelinus fontinalis*

Les ombles de fontaine ont été fournis par la Station piscicole gouvernementale Baldwin (Coaticook, Québec ; Lot : B-Banville-02-97). La taille moyenne des individus était de 11 cm et le poids moyen de 15 g. Il s'agit de poissons dont la ponte a eu lieu en novembre 2001, parvenus au stade fretin lors des essais. Ces poissons ont été observés lors des essais du chapitre 3. Ils ont été amenés au laboratoire la veille du début des essais.

2.4 Essais en aquarium avec *Aeromonas hydrophila* et *Cyprinus carpio*

Avant de tenter des essais avec les carpillons, des tests ont été effectués afin d'optimiser les paramètres pour que les essais correspondent aux exigences du Comité d'éthique animale de l'Université de Montréal dont l'une d'entre elle était que la période d'essai soit raisonnable afin d'éviter la période durant laquelle les animaux étaient soumis au traitement invasif. Nous ne voulions donc pas que les essais excèdent une durée de 60 jours. Une formation théorique a d'ailleurs été exigée, suivie et réussie.

2.4.1 Description des aquariums

La capacité des aquariums expérimentaux utilisés était de 72 L (60 cm de longueur x 30 cm de largeur x 40 cm de hauteur). Un volume de 70 L d'eau a été ajouté dans chacun des aquariums.

2.4.2 Eau des aquariums expérimentaux

L'eau utilisée était la même que celle des bassins de quarantaine. Chacun des aquariums possédait une unité de filtration motorisée d'une capacité de filtration atteignant 757 L par heure (Hagen). Chaque filtre était muni d'une éponge servant à retenir la matière organique, d'une cartouche de charbon activé utile à l'enlèvement du chlore résiduel et d'une cartouche AMMO-RID™ servant à neutraliser l'ammoniaque. Les filtres ont été activés deux semaines avant l'ajout des poissons. L'activation a consisté à ajouter une source d'ammoniaque (NH₄Cl 6% : 50 µL pendant 7 jours et 15 µL les jours suivants jusqu'à l'ajout des poissons) et de matière organique (poudre de tryptone au soja (Laboratoires Quélab, Montréal, Canada) contenant peptone de caséine, peptone papaïnique de soja, phosphate bipotassique, glucose et chlorure de sodium ; 300 mg ajoutés une seule fois) afin de favoriser la colonisation du filtre par les bactéries indigènes de l'eau qui assurent, entre autres, le processus de nitrification.

2.4.3 Paramètres physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques qui ont été suivis durant toute l'expérimentation sont : le pH, la concentration en azote (sous forme de nitrates et d'ammoniaque) et la température. Des ensembles d'analyses (test kits) prêts à utiliser achetés chez Hagen (Montréal, Canada) ont servi pour cette partie de l'expérimentation. L'intérêt était de s'assurer que les seuils nécessaires au bien-être minimal des poissons étaient respectés pour chacun des paramètres.

2.4.4 Normes de qualité de l'eau

Les normes de qualité de l'eau des aquariums des carpes qui ont été observées sont présentées au Tableau 2.4 (Stoskopf, 1993):

Tableau 2.4 Normes de qualité de l'eau

Paramètres	Concentrations limites et unités de mesures
pH	7,0 à 8,5
ammoniaque	< 0,01 mg/L N-NH ₃ total
nitrites	< 0,01 mg/L N-NO ₂
température	2 à 30°C
salinité	0 à 3 g/L
nitrites	ne s'applique pas

2.4.5 Changements d'eau

La fréquence et les volumes des changements d'eau sont fonction de la durée de l'expérimentation et de la production de déchets des carpes. Les changements d'eau (25% du volume total) ont été effectués au besoin et reproduits chaque fois sur tous les aquariums lorsque l'un d'entre eux contenait une eau trouble ou lorsque l'un des paramètres physico-chimique n'était pas respecté.

2.4.6 Gravier de fond

Afin de favoriser le développement des bactéries dans les aquariums, un gravier de granit tapissait le fond, à raison de 1 cm d'épaisseur par aquarium. L'accumulation de déchets fournissait une source de nutriments pour *A. hydrophila* et le gravier, un support pour leur croissance. En l'absence de gravier les concentrations bactériennes dans l'eau dépassait difficilement 10⁴ UFC/mL sans que la qualité de l'eau en soit affectée. Cette concentration minimale requise avait été établie à partir d'une étude sur les populations de bactériophages et de bactéries plus précisément sur les concentrations minimales bactériennes nécessaires à l'établissement d'une multiplication virale en milieu liquide (Wiggins et Alexander, 1985). En effet, afin de pouvoir observer éventuellement une variation au sein de la population bactérienne et de la population de bactériophages, on suggérait qu'au moins 10⁴ UFC/mL devaient être présentes dans le milieu. De plus, comme la carpe est un poisson réputé pour sa résistance, le seuil minimal établi avant les essais avec des poissons avait été de 10⁶ UFC/mL.

2.4.7 Localisation des bactéries

Des dénombrements bactériens ont été effectués à partir d'échantillons d'eau. Deux types d'échantillons ont été analysés : d'eau interstitielle et d'eau circulante. L'eau interstitielle est l'eau prélevée dans le gravier, entre les cailloux et qui se trouve en contact avec la matière organique enfouie sous le gravier. L'eau circulante est l'eau qui se situe au-dessus du gravier et qui est filtrée en continu. Une pipette stérile de 10 mL, dont l'extrémité était enfoncée dans le gravier servait à prélever les échantillons. Afin d'éviter le biais qui aurait pu être causé par l'expulsion d'eau et d'air à partir de l'intérieur de la pipette lors du contact de cette dernière avec le fond de l'aquarium, les prélèvements ont été effectués 5 à 10 cm à côté du point de rencontre. Dans le but de maintenir la qualité de l'eau malgré l'ajout de bactéries, desensemencements de *A. hydrophila* ont été effectués après avoir été resuspendus dans du tampon phosphate 50 mM (pH 7,2) après centrifugation. Les concentrations bactériennes ainsi obtenues, dans l'eau et dans le gravier, étaient inférieures aux limites souhaitées dans les délais requis. *A. hydrophila* a donc été ajouté avec son milieu de culture dans les aquariums ce qui avait le désavantage de souiller l'eau mais l'avantage de maintenir la population bactérienne de *A. hydrophila* assez élevée pour espérer engendrer l'établissement d'une infection. La Figure 2.2 démontre bien que les cellules bactériennes sont retrouvées davantage dans l'eau interstitielle au gravier de fond au fur et à mesure que le temps de l'expérimentation avance.

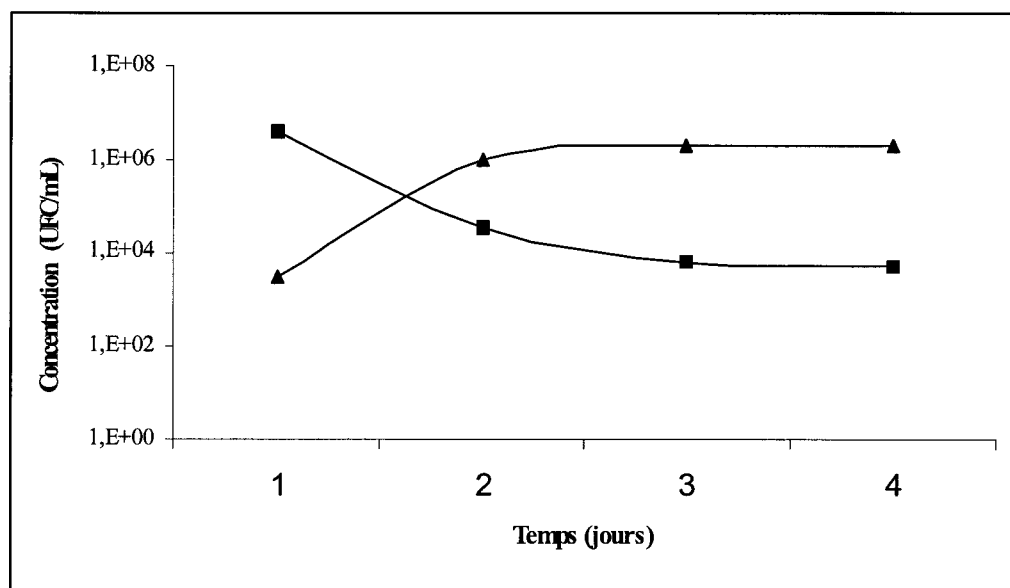


Figure 2.2 Concentration de *A. hydrophila* en fonction du temps dans l'eau circulante (■) et dans l'eau interstitielle (▲) des aquariums

2.4.8 Salle d'eau

Douze aquariums expérimentaux ont été placés de manière à minimiser les erreurs pouvant découler de la logique qui aurait été utilisée pour les disposer. Le statisticien Stéphane Daigle, du Jardin Botanique de Montréal nous donc aidé à définir la disposition du matériel de la salle d'eau, pièce fermée où seule la manipulatrice avait accès. La pièce a été maintenue à 22 +/-1 °C durant toute la durée de l'expérimentation. Les appareils consommant de l'électricité ont été branchés sur une prise de sécurité du Biodôme de Montréal. Ce qui revient à dire qu'en cas de panne de courant le fonctionnement des filtres et des lampes aurait été assuré. Tous les aquariums ont été déposés sur la même table et ont été éclairés par trois rampes d'éclairage identiques. La disposition des aquariums était aléatoire à l'intérieur de chaque bloc (Figure 2.3). La méthode qui a servi à déterminer l'ordre des aquariums a été une pige au hasard afin de s'assurer qu'aucune logique n'interfère dans les essais. Les manipulations ont été effectuées sur chacun des bloc dans un ordre différent d'une journée à l'autre. Chaque aquarium a été séparé de l'aquarium voisin par un panneau pour prévenir la contamination par des éclaboussures lors de l'ouverture des aquariums pour les manipulations (idée de Stéphane Daigle). Afin de procurer un éclairage qui ressemble le plus possible à l'éclairage naturel du soleil (Environnement Canada, 1992), des tubes fluorescents à large spectre (Vitalite^{MC}) ont été installés au dessus des aquariums. Une minuterie a permis de procurer un éclairage régulier de 11 h, soit 6 h à 17 h. Les aquariums ont été supportés par des tables. Sur chaque table ont été déposés quatre aquariums qui formaient des blocs expérimentaux. Chaque bloc expérimental comprenait tous les types d'aquariums nécessaires à l'expérimentation (trois contrôles et un essai). Le contenu prévu de chacun des aquariums a été choisi de façon aléatoire, par un tirage au sort et a été indiqué sur le schéma selon les symboles définis dans la légende de la Figure 2.3. Le nombre de poissons ajouté ne devait pas être inférieur à 30 afin de demeurer statistiquement viable. Une analyse statistique étant à prévoir, il fallait tenir compte de ce facteur. Cependant, comme les résultats ont été de l'ordre du tout ou rien (0 ou 100 % de survie) les tests statistiques n'ont pas été nécessaires pour l'analyse subséquente.

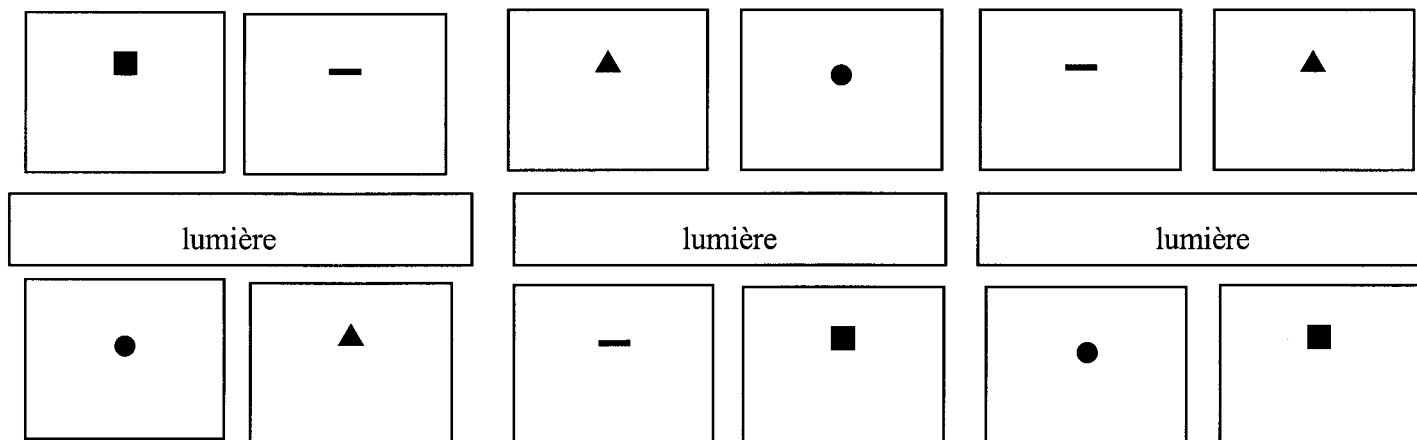


Figure 2.3 Schéma représentant la disposition des aquariums expérimentaux de la salle d'eau. (■) bassin contrôle d'eau seulement ; (▲) bassin contrôle du pathogène ; (●) bassin contrôle des bactériophages ; (—) bassin contenant le pathogène et les bactériophages

2.4.9 Effets des ajouts bactériens sur des poissons

Des essais préliminaires ont été effectués afin de connaître l'effet de la concentration minimale de 10^6 UFC/mL sur l'organisme des carpillons. Trois aquariums ont été observés : un aquarium contrôle contenant 30 poissons dans 70 L d'eau et deux aquariums contenant 20 poissons dans 40 L d'eau où 10^6 UFC/mL de *A. hydrophila* HER 1209 avaient été ajoutés deux jours avant l'ajout des poissons. Chacun des groupes de poissons a été soumis à un choc thermique de 10°C pendant une heure. Le choc a été effectué par le passage d'un bassin d'eau maintenue à 13°C à l'eau des aquariums à $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.4.9.1 Mise à l'écart du modèle

Soixante jours après le début de cet essai, alors que des ajouts supplémentaires de *A. hydrophila* amenant la concentration des bactéries dans l'eau à 10^9 UFC/mL au jour 25, trois individus seulement étaient morts. Après 30 jours, les populations bactériennes étaient devenues tellement

denses qu'il était devenu presque impossible d'obtenir des comptes fiables (faux positifs et colonies de moisissures envahissant les boîtes de Pétri et couvrant les colonies bactériennes). La qualité de l'eau était un problème difficile à contrôler et les observations extrêmement difficiles à effectuer compte tenu de l'apparence embrouillée de l'eau des poissons. Dès que l'eau était changée pour améliorer la qualité de vie des poissons ces derniers guérissaient en quelques jours. Cet essai a été répété une fois et les effets observés étaient semblables. Ce modèle ne pouvait donc pas correspondre à la recherche souhaitée car l'impact de l'ensemencement de bactériophages dans l'eau était trop difficile à observer.

2.5 Essais en aquarium avec *Aeromonas salmonicida* et *Salvelinus fontinalis*

Les douze aquariums de 70 L munis de filtres au charbon (757 L/h) ont été installés dans une chambre froide à 9°C. Le fond de chacun des aquariums a été couvert de gravier tel que décrit au point 2.4.6. Les aquariums étaient éclairés durant une période de 8 h par jour. Il s'agit ici d'une amélioration au protocole. Il a été jugé que 8 h d'ensoleillement était une période plus représentative de la réalité des poissons au mois de décembre, comparativement aux 11 h retrouvées dans le cas des essais effectués avec les carpes, au mois de juin et juillet. L'ammoniaque, les nitrates et le pH ont été suivis chaque semaine. Les poissons ont été nourris selon la même logique que les carpes l'ont été (voir ci-haut).

La littérature indiquant clairement que l'omble de fontaine était très sensible à *A. salmonicida* (McCarthy, 1978), lors de l'étape de mise au point, aucun test préliminaire n'a été effectué avec ce poisson. Ceci a permis de minimiser le nombre d'individus sacrifiés.

2.5.1 Tests sans poisson

Trois tests de 21 jours ont été effectués dans des aquariums sans poisson afin d'observer la réponse de *A. salmonicida* HER 110 et du bactériophage 65 aux installations. Dans le premier test, 500 mL d'une culture de 24 h de *A. salmonicida* (10^8 UFC/mL) ont été ajoutés à chaque aquarium aux jours 1 et 2. Pour le second test, 50 mL d'une culture du bactériophage 65 (10^9 - 10^{10} UFP/mL) ont été ajoutés à chaque aquarium au jour 4, c'est-à-dire au moment où une stabilité de la concentration bactérienne semblait être atteinte dans les aquariums. Pour le troisième test, bactéries et bactériophages ont été ajoutés dans les aquariums. Les microorganismes ont été ajoutés selon un

facteur de multiplicité (MOI) de 1. Ce test a été prolongé jusqu'au jour 60 où 500 mL d'une culture de 24 h de *A. salmonicida* (10^8 UFC/mL) ont été ajoutés et le titre du bactériophage a été suivi à nouveau pendant 4 jours.

2.5.2 Tests avec poissons

Afin de demeurer statistiquement valable tout en minimisant le nombre de poissons sacrifiés, tel qu'exigé par le Conseil Canadien de la Protection des Animaux, au total 12 aquariums, chacun contenant 35 ombles de fontaine ont été utilisés dans les essais avec poissons. Avant chaque test, la nitrification a été activée par un ajout journalier de 1,1 mL de NH_4Cl 6% par aquarium pendant sept jours. La flore bactérienne naturelle était donc présente dans les aquariums durant les tests, qui ont duré 45 jours au total.

Aux jours 1 et 4, 200 mL d'une culture de 24 h de *A. salmonicida* (10^8 UFC/mL) ont été ajoutés aux trois aquariums expérimentaux ainsi qu'aux trois aquariums contrôles et un volume équivalent de milieu de culture stérile a été ajouté aux six aquariums où *A. salmonicida* devait être absent. Au jour 5, les bactériophages ont été ajoutés selon un MOI de 1, ce qui représente 50 mL du bactériophage 65 culture (10^9 - 10^{10} UFP/mL) dans les aquariums expérimentaux et dans les trois aquariums contrôles, un volume équivalent de milieu de culture stérile a été ajouté aux six aquariums où le bactériophage 65 devait être absent. Les trois autres aquariums ont servi de blanc (sans *A. salmonicida* ni bactériophage 65 mais avec des volumes de milieu de culture stérile).

L'état de santé des ombles de fontaine a été évalué selon l'échelle suivante: (S1) bonne santé; (S2) perte de brillance et de couleur, perte de l'appétit, diminution des déplacements; (S3) apparition de mucus sur les branchies et les nageoires; (S4) invasion des branchies par le mucus, hémorragies aux nageoires, les poissons sont regroupés et sans mouvement ; (S5) euthanasie ou mort au matin.

L'évolution de l'état de santé des poissons a été suivie sur une période de 30 jours et, selon les conseils du Conseil Canadien pour la Protection des Animaux, les poissons démontrant des pertes d'équilibre ont été euthanasiés à l'aide de MS-222 (1:5000) tamponné à pH 7,2. Des changements d'eau de 5 L ont été effectués aux jours 11 et 14 dans tous les aquariums pour le maintien de la qualité de l'eau. L'eau a été conservée pour vérifier l'effet d'un ajout bactérien après 60 jours.

2.5.3 Contrôle bactérien et titre des bactériophages dans l'eau

Des échantillons de 5 mL ont été prélevés de l'eau circulante et de l'eau interstitielle au gravier de chaque aquarium. Les contrôles bactériens ont été effectués à partir de dilutions de 10^0 à 10^{-9} étalées par volumes de 20 μ L sur des milieux de culture solide BHI-Bleu de Coomassie. Les titres de bactériophages, ont été effectués à partir de dilutions de 10^0 à 10^{-12} . Les milieux de culture ont été incubés à la température de la pièce durant 24 à 48 h. La limite de détection a été estimée à 2×10^2 UFP/mL et 5×10^1 UFC/mL respectivement pour les bactériophages et les bactéries. Pour tous les échantillons, les réplicats au nombre de 2, ne variaient pas de plus d'une unité log.

2.5.4 Contrôle bactériens dans les poissons infectés

Quatre poissons au stade S5 mais non retrouvés morts au matin, ont été contrôlés dans chaque aquarium pour *A. salmonicida*. Ils ont été euthanasiés à l'aide du MS-222 et trempés dans l'alcool pendant 25 sec. Les organes internes ont été prélevés à l'aide d'un scalpel, déposés dans un bol stérile et mélangés à 10 mL de tampon phosphate 50 mM, pH 7,2 durant 30 min. Le surnageant a été déposé sur milieux de culture BHI-Bleu de Coomassie et incubés à la température de la pièce durant 36 h. Les colonies de la taille de 2 à 5 mm ont été isolées et cultivées 24 h en bouillon de culture BHI. Elles ont ensuite été étalées sur milieu de culture BHI-agar 1% où les bactériophages 65 et HER 107 ont été déposés. L'identification de *A. salmonicida* a été effectuée telle que décrit au point 2.1.5.2.

2.5.5 Conservation du bactériophage 65

Les bactériophages ont été conservées pendant 80 jours dans du bouillon BHI filtré en deux étapes. Les solutions stock ont été conservées dans des bouteilles stériles d'un litre. Deux bouteilles (10^9 UFP/mL) ont été conservées à température de la pièce et deux autres (10^6 UFP/mL) ont été conservées à 4°C. Les décomptes ont été effectués comme décrit précédemment.

2.6 Combinaisons de bactériophages

Le développement de résistances bactériennes au bactériophage qui pourrait être utilisé dans un traitement préventif pourrait éventuellement devenir une problématique. En effet, la présence d'un bactériophage dans une population bactérienne représente une pression sélective au sens évolutif du

terme. Afin de mettre en évidence la possibilité d'utiliser des combinaisons de différents bactériophages pour lyser des cellules présentant une résistance à un bactériophage, des bactéries sélectionnées pour s'être multipliées malgré la présence du bactériophage 65 ont été mises en contact avec 10 bactériophages du Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle.

2.6.1 Microorganismes

La souche bactérienne utilisée était *A. salmonicida* HER1107 obtenue du Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle (Tableau 2.1). Cette souche a été utilisée afin de sélectionner des mutants résistants au bactériophage 65 (Tableau 2.3, codifié HER 110).

Au total, 10 bactériophages (Tableau 2.3) obtenus du Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle ont été utilisés pour les essais de lyse bactérienne : HER 84, HER 85, HER 98, HER 99, HER 100, HER 104, HER 105, HER 106, HER 109 et HER 110. Chacun des bactériophages a été amplifié à l'aide de la souche de *A. salmonicida* correspondante retrouvée dans la colonne « numéro de souche » du Tableau 2.3, 24 h avant les essais.

2.6.2 Sélection des résistants

Dans un premier temps, des colonies isolées de *A. salmonicida* HER1107 ont été obtenues à partir d'une suspension striée sur milieu de culture gélosé Tryptic Soy Agar (TSA, Difco). Une colonie isolée a été prélevée et déposée dans 10 mL de bouillon Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) afin de s'assurer de la pureté de la souche. La suspension a été agitée 15 sec. à l'aide d'un agitateur. Un volume de 3 mL de la suspension a été étalée sur trois milieux de culture TSA. Le surplus du bouillon a été aspiré à la pipette Pasteur. Les Pétris ont été laissés dans un champ stérile à la température ambiante durant 15 à 30 min., couvercle mi-clos, afin d'assécher légèrement la surface. Finalement, trois gouttes d'une suspension du bactériophage 65, dont le titre était de 10^8 UFP/mL, ont été déposées sur chacun des tapis bactériens. Les milieux ont été incubés à température de la pièce pendant 96 h au total, des prélèvements de colonies résistantes ont été effectués aux temps 48, 72 et 96 h sur chacun des milieux gélosés.

2.6.3 Isolement et confirmation

Les colonies isolées ont été déposées dans 10 mL de bouillon de culture TSB et les tubes ont été

incubés à la température de la pièce pour une durée de 24 h. Ces étapes ont été répétées aux temps 48, 72 et 96 h, comme décrit précédemment, dans le but de récupérer le maximum de colonies résistantes. Les cultures en bouillon ainsi obtenues ont ensuite été numérotées puis striées (méthode de striation en trois étapes) sur milieux de culture solide TSA, afin d'isoler une colonie mutante et obtenir une culture finale en bouillon TSB pure. Cette étape supplémentaire a servi à purifier la culture, c'est-à-dire de s'assurer de l'absence du bactériophage 65 qui aurait pu être repiqué avec la colonie isolée lors du repiquage initial. Les cultures purifiées ont été contrôlées par les tests décrits précédemment.

Afin de vérifier la viabilité des souches, ces dernières ont été repiquées cinq fois. Chaque jour, un prélèvement de 10 gouttes de la culture de 24 h du jour précédent était déposé dans 10 mL de bouillon de culture liquide TSB et incubé à la température de la pièce pendant 24 h.

2.6.4 Lyse bactérienne

Dans un premier temps, un milieu gélosé TSA a été séparé en douze espaces numérotés, en prévision d'y déposer une goutte d'une suspension de chacun des bactériophages à l'étude. Un tapis bactérien composé d'un mutant résistant au bactériophage 65 a été produit à partir de cinq gouttes de suspension qui ont été inoculées dans 10 mL de bouillon TSB. La suspension a été homogénéisée à l'aide d'un agitateur. Un volume de 3 mL de la suspension a été étalé sur un milieu de culture TSA préalablement préparé et le surplus du bouillon a été aspiré à la pipette Pasteur. Dans chaque espace, une goutte de suspension d'un des 10 bactériophages (10^8 à 10^9 UFP/mL) a été déposée. Les milieux de culture ont été incubés à la température de la pièce et les observations ont été notées aux temps 24 et 48 h. Ces essais ont été répétés en triplicata pour chaque colonie résistante isolée.

2.7 Résistances bactériennes aux antibiotiques

La présente étude visait à étudier la sensibilité de diverses souches de *A. salmonicida* à différents bactériophages. Au total, les 23 souches de *A. salmonicida* retrouvées au Tableau 2.2, résistantes à aucun, un, deux ou trois antibiotiques, ont été soumises aux 12 bactériophages répertoriés au Tableau 2.3.

2.7.1 Microorganismes

Les 12 bactériophages ont été amplifiés selon la méthode décrite au point 2.2.3. Le titre des solutions obtenues étaient de 10^8 à 10^9 UFP/mL.

Au total, 21 souches bactériennes ont été utilisées et cultivées dans 10 mL de bouillon de culture Tryptic Soy Broth (TSB Difco) et les tubes ont été incubés à la température de la pièce pour une durée de 24 h. Les souches numérotées 4 et 9 étaient les souches présentant des résistances (limites ou complètes) aux trois antibiotiques. Les souches numérotées 3, 7, 10, 11, 13, 15, 16, 17, 20 et 21 étaient des souches contrôles, c'est-à-dire ne présentant aucune résistance aux antibiotiques utilisées en aquaculture mais provenant du milieu piscicole.

2.7.1.1 Antibiogrammes

Une suspension bactérienne de chaque souche a été préparée dans une solution saline stérile 0,9% à partir d'une culture de 24 h de *A. salmonicida* cultivée sur gélose sang (Columbia + 5% sang mouton), à une densité optique finale de 0,5 McFarland au néphélomètre. Un décompte de cellules viables a été effectué préalablement afin de s'assurer que la valeur de 0,5 McFarland mesurée au néphélomètre contenait 1×10^8 UFC/mL. Un tampon stérile de prélèvement a été utilisé afin d'étendre la suspension sur le milieu de culture (Mueller-Hinton, en boîtes de Pétri de 9 cm). Les disques contenant les antibiotiques ont été placés sur le tapis bactérien à l'aide de pinces stériles à raison de trois disques par boîte de Pétri. Le florfénicol (30 µg), l'oxytétracycline (30 µg) et le sulfadiméthoxine (23,8 µg)-ormetoprim (1,2 µg) ont été testés sur chacune des souches du Tableau 2.2.

Les boîtes de Pétri ont été incubés à 22 ± 1 °C pendant 24 h en présence d'oxygène. Les zones d'inhibition de croissance bactérienne ont été mesurées après 24h. L'interprétation de la taille des zones d'inhibition a été effectuée tel que recommandé par Alderman et Smith (2001).

2.7.2 Lyse bactérienne

Dans un premier temps, un milieu gélosé TSA a été séparé en douze espaces numérotés, en prévision d'y déposer une goutte d'une suspension de chacun des bactériophages à l'étude. Un tapis bactérien de chacune des souches du Tableau 2.2 a été produit à partir de 3 mL des bouillons de culture TSB étalés sur un milieu de culture Tryptic Soy Agar (TSA Difco) préalablement identifié. Les boîtes de Pétri ont été laissés dans un champ stérile à la température ambiante durant 15 à 30 min., couvercle mi-clos. Dans chaque espace, une goutte de suspension d'un des 10 bactériophages a été déposée. Les milieux de culture ont été incubés à la température de la pièce et les observations ont été notées aux temps 24 et 48 h. Ces essais ont été répétés en triplicata.

3 UTILISATION DES BACTERIOPHAGES EN AQUARIUMS

Ce chapitre contient les résultats et discussions concernant deux types d'essais avec *A. salmonicida*. En premier lieu on retrouve les essais en milieu exempt de poisson. Au cours de ces essais, l'effet de l'ajout du bactériophage 65 a été testé sur une population de *A. salmonicida* HER 1107. En second lieu, on retrouve les essais en présence d'ombles de fontaine. Au cours de ces essais, l'effet de l'ajout du même bactériophage a été testé sur des poissons mis en présence de *A. salmonicida*.

3.1 Essais sans poissons

La concentration de *A. salmonicida* a varié en fonction du temps dans l'eau circulante comme dans l'eau interstitielle au gravier (Figure 3.1). Dans l'eau circulante, la concentration bactérienne a augmenté de deux unités log (10^7 UFC/mL à 10^9 UFC/mL) jusqu'au jour 5, atteignant un plateau jusqu'au jour 8. Elle a finalement chuté progressivement en dessous du seuil de détection jusqu'au jour 16. Dans l'eau interstitielle au gravier, la concentration de *A. salmonicida* a augmenté de quatre unités log (10^7 UFC/mL à 10^{11} UFC/mL) entre les jours 4 et 11 et est demeurée constante jusqu'au jour 15. Une augmentation de la flore bactérienne dans les aquariums a rendu les décomptes de *A. salmonicida* difficiles à effectuer au-delà du jour 15.

Le titre du bactériophage 65 dans les aquariums n'a pas augmenté lorsque ce dernier a été ajouté seul (Figure 3.2). Le titre a chuté sous le seuil de détection après le 11^e jour dans l'eau circulante, mais est demeuré constant à 500 UFP/mL dans l'eau interstitielle jusqu'au dernier jour du test, c'est-à-dire au 21^e jour.

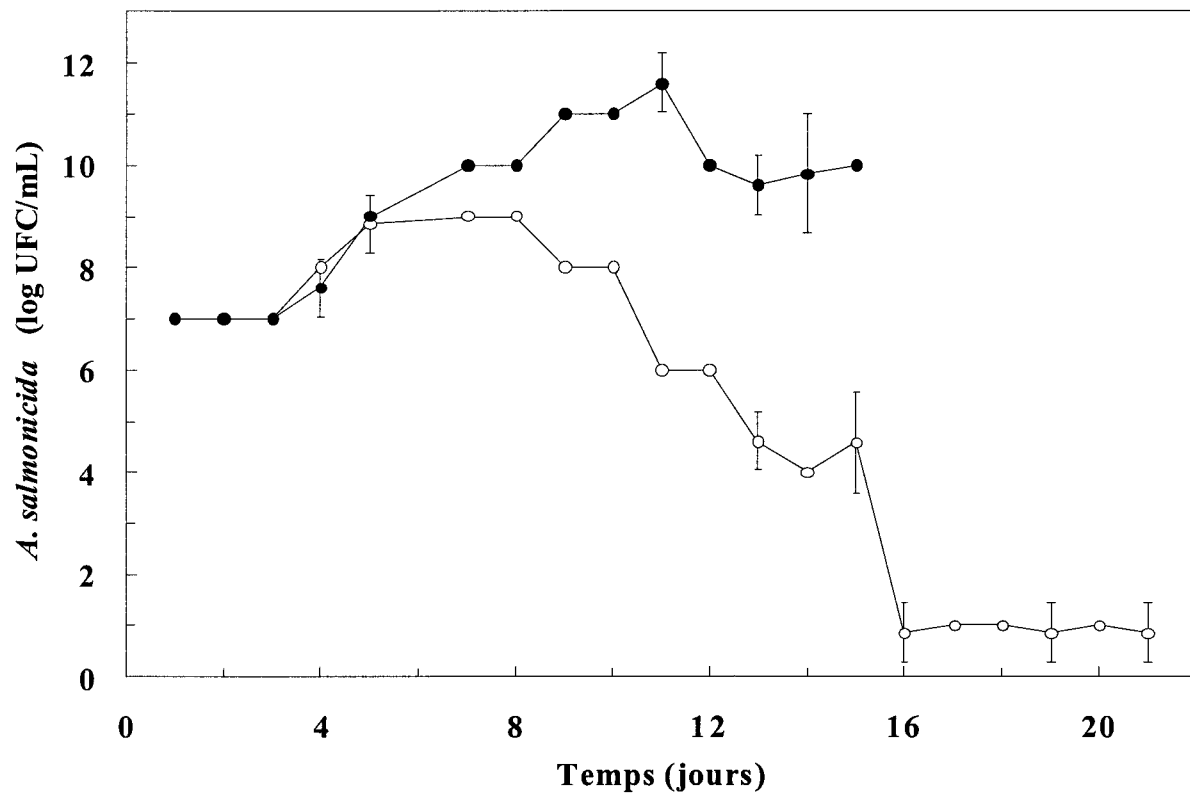


Figure 3.1 Concentration de *Aeromonas salmonicida* HER1107 en fonction du temps en aquariums en l'absence du bactériophage 65: (○) eau circulante; (●) eau interstitielle au gravier; (n=3)

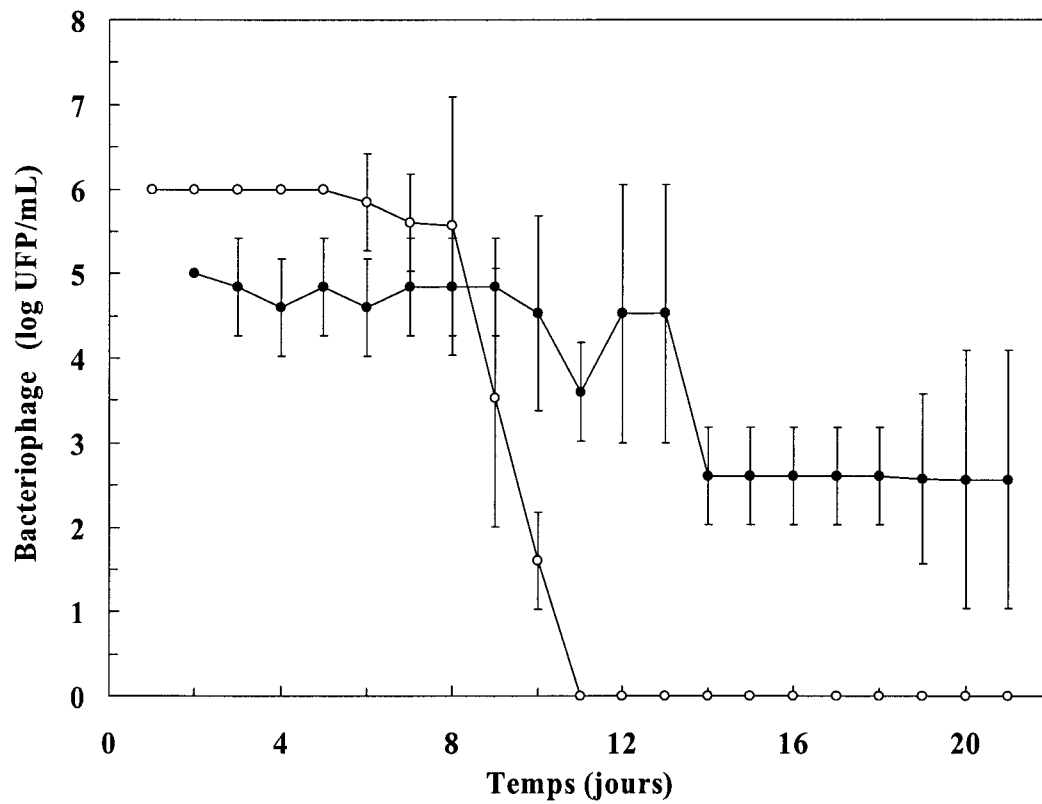


Figure 3.2 Concentration du bactériophage 65 en fonction du temps en aquariums en l'absence de *A. salmonicida*: (○) eau circulante; (●) eau interstitielle au gravier

Dans l'eau circulante et dans l'eau interstitielle au gravier des aquariums où des bactériophages et des bactéries ont été ajoutés, le titre de bactériophages a augmenté jusqu'à devenir stable aussi longtemps que la concentration de *A. salmonicida* n'a pas diminué (Figure 3.3). Le titre des bactériophages était plus élevé dans l'eau interstitielle au gravier (10^{12} UFP/mL) que dans l'eau circulante (10^9 UFP/mL). De si grandes concentrations, de part et d'autre, sont probablement dues à la présence d'agglomérations de biofilm bactérien dans les échantillons analysés. La concentration de *A. salmonicida* dans l'eau interstitielle au gravier a diminué de trois unités log (10^8 to 10^5 UFC/mL) 24 h après l'ajout de bactériophages et de deux unités log supplémentaires le jour suivant (10^5 à 10^3 UFC/mL). Au jour 9, une concentration de 10^3 UFC/mL de *A. salmonicida* a été détectée dans l'eau circulante et de 10^2 UFC/mL dans l'eau interstitielle au gravier. Un ajout de *A. salmonicida* au jour 60, dans les aquariums préservés à cette fin mais d'où les poissons avaient été enlevés (voir section 2.5.1), a eu comme effet mesurable après 48 h une augmentation du titre de bactériophages de non détectable à 10^6 UFP/mL dans l'eau interstitielle au gravier de tous les aquariums.

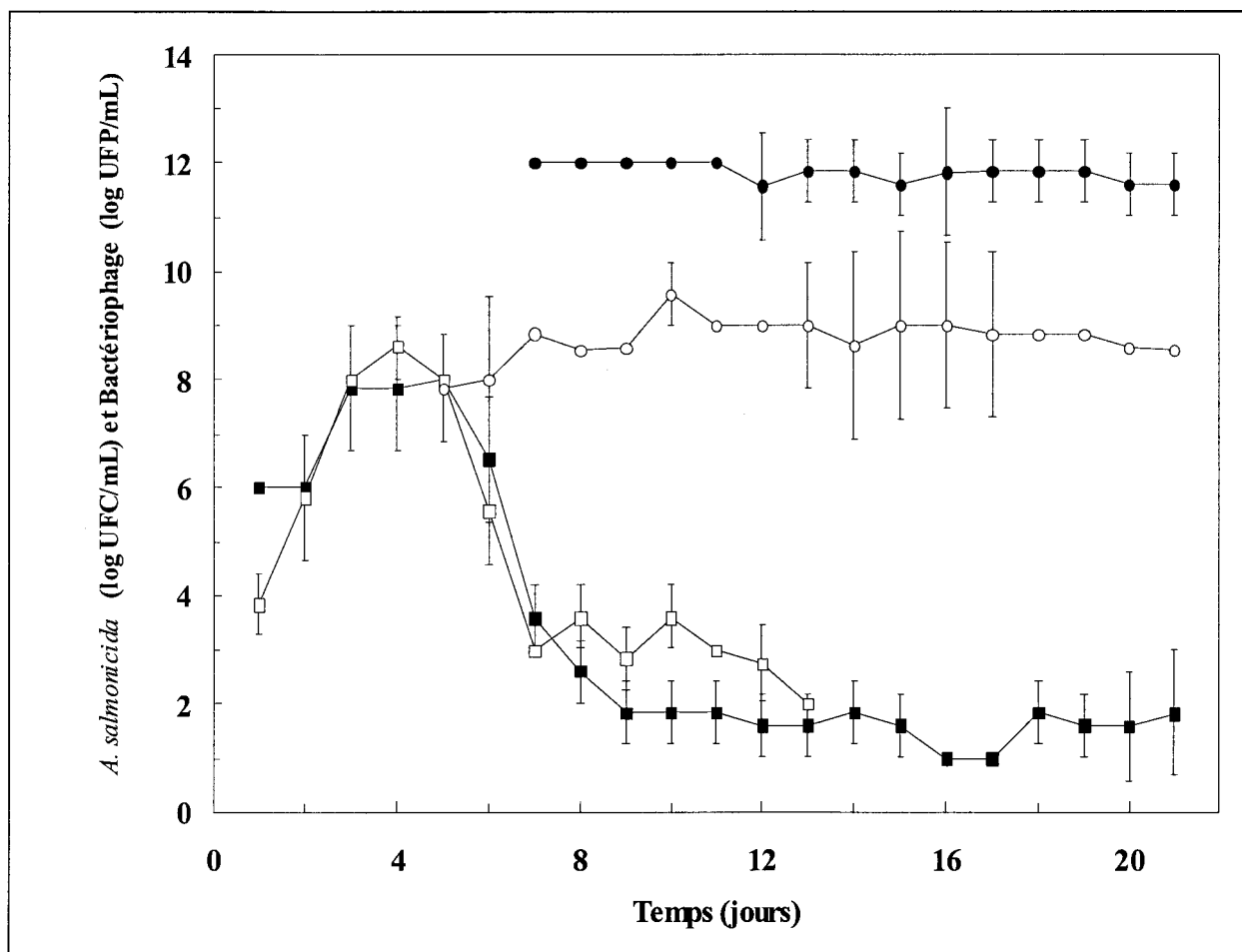


Figure 3.3 Influence du bactériophage 65 sur une population de *Aeromonas salmonicida* en aquariums: (○) bactériophage 65 dans l'eau circulante; (●) bactériophage 65 dans l'eau interstitielle au gravier; (□) *Aeromonas salmonicida* dans l'eau circulante; (■) *Aeromonas salmonicida* dans l'eau interstitielle au gravier

3.2 Essais avec poissons

Tous les poissons provenant des aquariums servant de blancs et ceux où seulement des bactériophages ont été ajoutés sont demeurés sains pour toute la durée du test (status S1). Les poissons exposés à *A. salmonicida* mais pas au bactériophage 65 ont subi une détérioration rapide et sévère de leur état de santé (Figure 3.4a). Au jour 20, tous les poissons étaient gravement malades (S4) et, au jour 45, tous les poissons étaient morts ou avaient été euthanasiés. *A. salmonicida* a été trouvé dans les organes internes des poissons malades mais pas dans ceux des poissons sains. Comparativement, les ombles de fontaine exposés à *A. salmonicida* et au bactériophage 65 sont demeurés en bonne santé (S1) plus longtemps (Figure 3.4b). Ils ont été atteints gravement (S4) après 35 jours. Seulement 10% des poissons étaient morts ou avaient été euthanasiés à la fin du test.

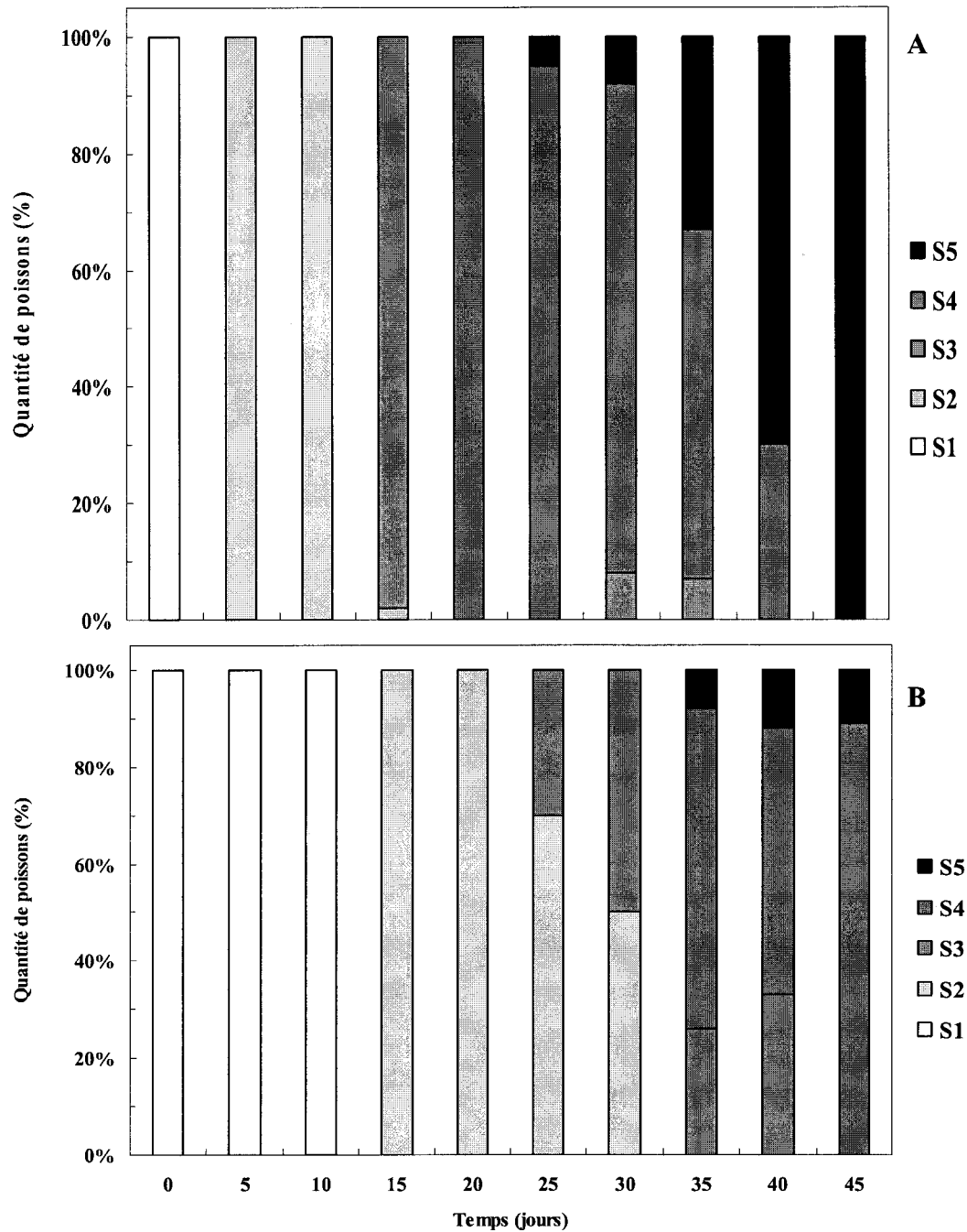


Figure 3.4 Évolution de l'état de santé d'ombles de fontaine en présence de *A. salmonicida* (A) *A. salmonicida* + bactériophage 65 (B). Échelle d'évaluation de l'état de santé : (S1) bonne santé; (S2) perte de brillance et de couleur, perte de l'appétit, diminution des déplacements; (S3) apparition de mucus aux branchies et aux nageoires; (S4) invasion des branchies par le mucus, hémorragies aux nageoires, les poissons sont regroupés et sans mouvement ; (S5) euthanasie ou mort au matin

3.3 Conservation des bactériophages

Les cultures de bactériophages conservées à 4 °C sont demeurées stables plus de 60 jours. Les titres ont chuté d'une unité log, 10^6 à 10^5 UFP/mL, entre les jours 62 et 80 (Figure 3.5). Il y a eu une chute de neuf unités log en moins de 30 jours dans les bouteilles conservées à 21°C. La limite de détection a été atteinte après un peu plus de 20 jours.

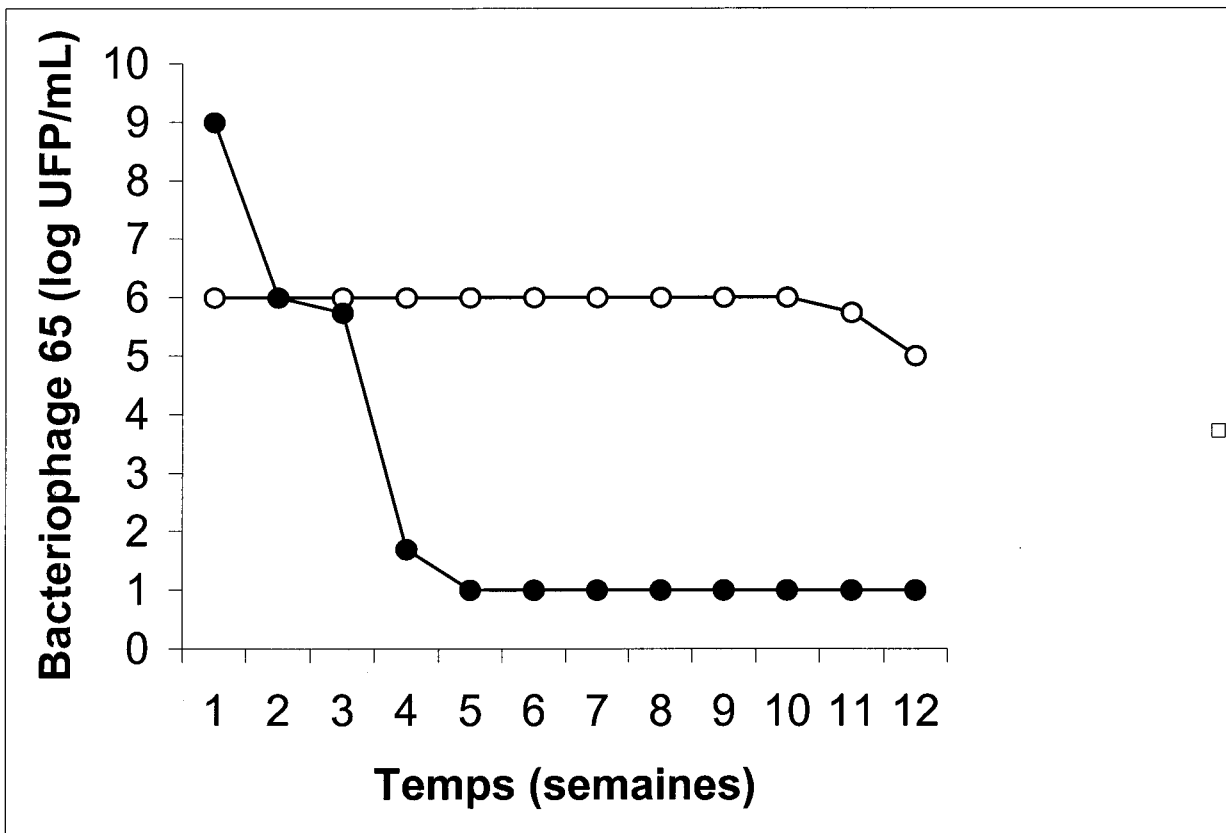


Figure 3.5 Titre du bactériophage 65 à 4 °C (○) et à 21 °C (●)

3.4 Discussion

3.4.1 Essais sans poisson

Le bactériophage 65 permet d'observer une chute de la population bactérienne de *A. salmonicida* HER 1107. Comme observé à la Figure 3.3, le bactériophage n'a été détecté dans l'eau interstitielle au gravier qu'après 7 jours, soit au troisième jour de prélèvement après l'inoculation du bactériophage. Il se peut que les concentrations de bactériophages aient été trop faibles et que ces derniers aient été répartis ponctuellement plutôt qu'uniformément dans le gravier avant ce jour. Les bactériophages ont probablement commencé à s'accrocher aux bactéries qui se trouvaient à la surface du gravier mais avant qu'il soit possible d'en récolter avec la méthode de prélèvement utilisée, il a fallu quelque temps.

Les écarts-types de certains points sont plus grands que d'autres. La raison est que ces graphiques ont été tracés à partir de la moyenne des concentrations de 3 aquariums et non pas de la moyenne des échantillons prélevés de chacun des aquariums. Il est donc normal que dépendamment du circuit de filtration (colmatage des pochettes contenant les éléments de filtration) et de l'équilibre qui s'installe dans chaque aquarium que les concentrations varient légèrement. Il est possible de constater que le profil général demeure le même dans tous les aquariums.

3.4.2 Essais avec poissons

A. salmonicida HER 1107 a induit la furunculose engendrant la mort des ombles de fontaine dans un délai raisonnable, permettant de mener à bien les essais. Les souches de *A. salmonicida* ayant des facteurs de virulence pouvant varier d'une souche à l'autre (Schubert, 1974; Tajima *et al.*, 1983; Shieh, 1985) les essais auraient pu être compromis par l'utilisation d'une souche faiblement virulente. Un type de facteurs de virulence importants chez des microorganismes qui dégradent les tissus de l'hôte comme *A. salmonicida* est les protéases. Les protéases peuvent varier en concentration et légèrement dans leur structure selon la souche. Comme étudié chez *Porphyromonas gingivalis*, pathogène du parodonte chez l'humain reconnu pour ses pouvoirs de dégradation tissulaire, les protéases retrouvées d'une souche bactérienne à l'autre peuvent varier légèrement. Les mécanismes par lesquelles les cellules bactériennes exportent les enzymes protéolytiques peuvent également en faire des souches virulentes ou avirulentes (Slots et Rams,

1993; Potempa *et al.*, 1995; Porphyromonas Gingivalis Genome Project, 2002). Les protéases, diversifiées et importantes chez *A. salmonicida*, sont des molécules impliquées dans chacune des étapes de pathogénicité : l'adhérence, la croissance bactérienne, la perturbation des mécanismes de l'hôte et la dégradation tissulaire. Le choix d'une souche isolée d'un salmonidé qui présentait des signes de la furunculose permettait donc d'éviter de choisir une souche de *A. salmonicida* qui se serait avérée avirulente.

Les 5 jours durant lesquels un meilleur état de santé a été observé chez les poissons des aquariums où le bactériophage 65 avait été ajouté, indiquent que la chute de la population bactérienne imposée par la présence du bactériophage peut avoir un effet sur la santé des poissons. Cependant, sans des correctifs nécessaires apportés à la qualité de l'eau et à l'entretien du matériel l'établissement de l'infection ne peut être évité. Il serait important en milieu piscicole d'établir des chartes selon lesquelles l'ajout de bactériophages à l'eau et un entretien soutenu devraient être effectués à des périodes précises (hausse de température, arrivage de poissons).

3.4.3 Modèle expérimental

La durée des essais pourrait sembler longue si l'on compare aux travaux de Thornton *et al.* (1994) qui se sont déroulés sur une période d'un peu plus d'une semaine, mais compte tenu des paramètres que nous nous sommes imposés pour respecter la représentativité de la qualité de l'habitat, le taux d'infection mortelle de 100% de la population nous indique que le modèle est efficace. Ces faits nous indiquent que nos essais sont représentatifs du milieu piscicole par la qualité de l'eau, la circulation de l'eau et la densité de poissons dans les aquariums expérimentaux. La charge bactérienne évaluée était de 10^6 UFC/mL mais comme inscrit dans la discussion, les agglomérations de biofilms bactériens ont probablement faussés à la hausse cette donnée.

Les poissons en contact avec ce pathogène sont habituellement atteints de façon rapide et sévère. Les signes d'infection surgissent surtout quand la température s'élève au-dessus de 12 °C. Il a été observé par Alcorn *et al.* (2002) que le système immunitaire du saumon, salmonidé vivant en eau froide comme l'omble de fontaine, est immunitairement affaibli lorsque gardé à la température 12 °C comparativement à la température de 8 °C. Donc l'établissement d'une infection par *A. salmonicida* serait favorisée par des températures plus élevées que celles de ces essais. Ce qui peut être une raison de la période de temps nécessaire à la réalisation des présents travaux. Les ombles de

fontaine étant des poissons plutôt fragiles il nous avait été déconseillé par les gens de la Station piscicole de Baldwin de procéder à un choc thermique. Le choc a été effectué par le passage d'un bassin d'eau maintenue à 22 +/-1 °C à l'eau des aquariums à 9 °C sur les poissons avant le début des essais pour les sensibiliser, les fragiliser et maximiser les chances de réussite de l'établissement de l'infection. Cette étape supplémentaire aurait pu, selon les conseils de ces pisciculteurs, avoir pour effet d'engendrer la mort de la majorité des poissons en une seule nuit.

Il a été observé que *A. salmonicida* tend à coloniser davantage le fond des aquariums plutôt que de demeurer en suspension dans l'eau circulante. Cette tendance semble augmenter la période de temps nécessaire à l'observation de sa pathogénicité sur les ombles de fontaine. Ce fait explique pourquoi l'inoculation des bactéries a eu lieu sur quatre jours avant qu'on ajoute les poissons. *A. salmonicida* colonise préférentiellement les surfaces et parois des aquariums (filtre et gravier) et forme un biofilm ce qui le rend plus difficile à dénombrer plus le temps avance dans les essais. Austin et Austin (1987) rapportent d'ailleurs dans leur ouvrage que *A. salmonicida* semble difficile à isoler d'une population hétérogène.

3.4.4 Établissement de l'infection en milieu piscicole vs le modèle

L'établissement de la furunculose en milieu piscicole serait favorisée par deux événements principaux. Premièrement, selon les études effectuées par Michel et Dubois-Darnaudpeys (1980), la furunculose serait initiée par un poisson porteur plutôt que par la présence de *A. salmonicida* dans les sédiments, cette dernière étant présente toute l'année Dubois-Darnaudpeys (1977). Dans l'éventualité de l'extrapolation de cette recherche, les essais pourraient inclure préférentiellement une étape d'injection de la bactérie dans un poisson-porteur. Cependant, dans le cas qui nous intéresse, la chute de population bactérienne et la croissance de la population virale faisaient partie des observations que nous souhaitions effectuées et que nous n'aurions pu obtenir si nous avions procédé autrement. Deuxièmement, la furunculose serait favorisée par des conditions d'élevage non conformes (par exemple la densité et la propreté) sont souvent directement reliées à la problématique. Les populations bactériennes sont favorisées par un accroissement de la matière organique présente dans le milieu et par une température environnante à la hausse (Austin et Austin, 1987). Dans le cas présent, le protocole expérimental autorisé nécessitait que la qualité de l'eau et la température soient favorables au poisson.

3.4.5 Présence de *A. salmonicida* malgré celle du bactériophage 65

Le bactériophage utilisé dans cette étude a un cycle d'infection lytique (Ackermann et DuBow, 1987b). Trois hypothèses peuvent expliquer la présence de *A. salmonicida* 20 jours après l'inoculation malgré la présence du bactériophage. Elles suggèrent de nouvelles avenues de recherche. La première hypothèse est que *A. salmonicida* développe avec le temps une résistance au bactériophage. Si c'est le cas, l'addition d'un second bactériophage, choisi pour sa spécificité pour un récepteur différent à la surface de la membrane cellulaire, pourrait faire chuter la population toujours présente dans les aquariums. De plus, récemment Park et Nakai (2003) ont démontré que le bactériophage PPpW3 associé au bactériophage PPpW4 permettait d'obtenir une protection accrue lorsqu'ajoutés ensemble dans la nourriture de *Plecoglossus altivelis* infectés par *Pseudomonas plecoglossicida* en opposition à une administration séparée de ces mêmes bactériophages. La seconde hypothèse était que la concentration bactérienne à ce moment des essais représente un équilibre naturel bactérie/bactériophage (Wiggins et Alexander, 1985). Si tel est le cas, l'addition d'un second bactériophage ne pourrait avoir d'effet sur la population de *A. salmonicida*. La troisième hypothèse, suggérée par Costerton et Stewart (2001), propose que *A. salmonicida* serait protégé des bactériophages dans le biofilm des parois des aquariums. *A. salmonicida* produit en effet une capsule et des exopolysaccharides qui favorisent grandement le développement du biofilm (Ellis, 1999). Des cellules bactériennes passeraient donc d'un état statique (biofilm) à un état libre (dans l'eau) et la concentration obtenue refléterait cet équilibre entre ces deux états. Schrag et Mittler (1996) ont déjà démontré le rôle de ces « refuges spatiaux » dans l'établissement d'un équilibre des populations bactériennes et virale dans des essais avec *Escherichia coli* et le bactériophage T1X.

3.4.6 Potentiel médical

Comme cité précédemment, il a été observé que 100% des ombles de fontaine mis en présence de la bactérie *A. salmonicida* HER 1107 étaient sérieusement atteints de furonculose après 20 jours de contact constant avec la bactérie et la majorité des poissons ont été retrouvés moribonds suite aux lésions causées par l'invasions du pathogène. Par contre, les poissons exposés à *A. salmonicida* HER 1107 et au bactériophage 65 montraient uniquement des signes d'infection après 25 à 27 jours. Cette différence de cinq à sept jours entre l'état de santé S2 et S3 (figure 3.4), S3 étant un stade pour

lequel il est plus difficile d'agir comme pisciculteur, permet de croire que la chute de population bactérienne causée par la présence des bactériophages procurerait un temps de réaction aux pisciculteurs et ce, afin d'amener les modifications aux systèmes de maintenance des poissons et éviter les traitements à base d'antibiotiques. De même, la période d'adaptation aux changements climatiques pourrait être traversée avec moins de heurts par les poissons confrontés à la présence de *A. salmonicida* à l'aide de la présence d'un bactériophage, tel le bactériophage 65. Les pisciculteurs auraient intérêts à utiliser les bactériophages dans les 3 circonstances suivantes : au printemps, lors de manipulations des poissons et dès l'apparition de signes cliniques. Lorsque les techniques d'analyses microbiologiques permettront d'isoler avec plus d'efficacité la présence de *A. salmonicida* dans une population hétérogène, le pisciculteur pourra se fier à une élévation de la concentration du pathogène dans l'eau de ses installations piscicoles.

3.4.7 Conservation des bactériophages

L'observation des cultures de bactériophages maintenues à 4 °C et 21 °C indique que les bactériophages devraient être inoculés à répétition afin de maximiser les résultats dans les bassins lorsque utilisés quand les températures extérieures se réchauffent (au printemps et en été). Comme déjà observé par Wu et Chao (1984), les températures ont une influence sur la viabilité des bactériophages. Lorsque la température à laquelle les bactériophages sont conservés augmente, ces derniers peuvent perdre de leur capacité à se multiplier en présence de la bactérie réceptrice. Dans la même étude, Wu et Chao constatent que les rayons ultraviolets ont également un effet inhibiteur de la capacité des bactériophages à se multiplier. Cependant, il existe des phages qui sont stables à l'intérieur d'un éventail de températures plus vaste. En connaissant les besoins spécifiques, d'un élevage, il serait possible de sélectionner les virus maximisant leur rendement alors que les températures varient. Encore une fois, l'analyse de Wu et Chao indique que des inoculations pourraient être nécessaires mais aussi que le soleil pourrait jouer le rôle de décontaminant naturel du milieu, c'est-à-dire qu'il pourrait inhiber les bactériophages tôt après la chute des populations bactériennes. Cependant, la profondeur à laquelle les rayons solaires sont efficaces dans une décontamination de bactériophages dont on ne veut plus est limitée par la profondeur à laquelle ces derniers peuvent se rendre.

Les titres de bactériophages obtenus démontrent que des solutions de bactériophages pourraient être

préparées et transportées à la ferme dans une glacière par le médecin vétérinaire responsable. Ce, en respectant le temps nécessaire pour les déplacements qu'imposent la pratique de la médecine vétérinaire en milieu piscicole à l'intérieur du Québec. La longévité des solutions permettrait une plus grande liberté au vétérinaire, c'est-à-dire que lorsque ce dernier est obligé de se déplacer dans des fermes éloignées l'une de l'autre il pourrait éviter de revenir au laboratoire entre chaque visite. La lyophilisation des bactériophages pourrait permettre au médecin vétérinaire de garder en sa possession des virus qu'il pourrait utiliser pour traiter un élevage mais cette fois encore il s'agirait de mettre au point une méthode maximisant le contact des virus avec les bactéries pathogènes (réhydratation dans l'eau clair avant l'ajout dans le bassin, dépôt du lyophilysat directement à l'entrée d'eau du bassin nécessitant un traitement...).

4 COMBINAISONS DE BACTÉRIOPHAGES

Le but de ce chapitre était d'explorer une solution afin d'éviter le problème potentiel de développement de résistances bactériennes au bactériophage utilisé en milieu piscicole. En effet, la présence d'un bactériophage dans une population bactérienne représente une pression sélective. Par conséquent, les bactéries aptes à se multiplier malgré la présence d'un bactériophage s'en trouvent favorisées et peuvent devenir majoritaires dans l'environnement en question. Dans un premier temps, la viabilité de souches se multipliant malgré la présence du bactériophage 65 a été évaluée en observant leur capacité de supporter des repiquages successifs en bouillon de culture. La production de pigment, la taille des colonies, leur aspect (lisse ou rugueuse) et la vitesse de croissance en bouillon de culture de chacune des souches a permis de former des groupes types. Dans un deuxième temps, dix bactériophages du Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle de l'Université Laval ont été testés sur chacun des mutants. Les profils de lyse bactérienne (en fonction du bactériophage déposé) ainsi obtenus ont servi de critère supplémentaire de regroupement des mutants sélectionnés.

4.1 Essais de lyse bactérienne

4.1.1 En général

La bactérie *A. salmonicida* HER1107 a démontré une sensibilité aux 10 bactériophages du Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle. La différence la plus marquée entre les plages de lyse observées a été une lyse voilée avec le bactériophage HER 100. C'est-à-dire qu'une couche de bactéries recouvrait la plage de lyse après 24 h d'incubation, la plus faible des manifestations de lyse observées. Ce bactériophage aurait donc avantage à se retrouver dans un mélange de bactériophages car les bactéries semblent se multiplier assez facilement en sa présence.

4.2 Isolement et regroupement des résistants

Au total, 45 colonies de *A. salmonicida* résistantes au phage 65 ont été prélevées. De ce nombre, 23 colonies ont été repiquées et isolées avec succès. Les 22 autres colonies n'ont pas montré de croissance après le premier repiquage du milieu gélosé TSA au bouillon de culture TSB. Des 23 colonies isolées avec succès, 7 n'ont pas survécu aux rondes de repiquages. Sur la base des

observations faites à partir de la croissance des 16 autres colonies en milieux de culture liquide et solide et le profil de lyse bactérienne (Tableau 4.1), les mutants ont été regroupés en six groupes.

Dans le groupe 1, on retrouve les bactéries qui présentaient les mêmes caractéristiques que la souche originale : croissance abondante en 24 h, distribuée dans tout le bouillon et sensible aux 10 bactériophages (les bactéries numérotées 1, 2, 4, 10, 12 et 14 au Tableau 4.1).

Le groupe 2 est caractérisé par une croissance tapissant le fond du tube. Lorsque striées sur milieu TSB solide, les colonies ont présenté une apparence rugueuse et étaient de petite taille. Ce groupe a été sensible à sept bactériophages, soient les bactériophages HER 84, HER 85, HER 98, HER 99, HER 100, HER 105 et HER 106, (les bactéries numérotées 11, 18 et 19).

Le groupe 3 a montré une croissance lente et floconneuse concentrée au fond du tube. Les colonies ont présenté une apparence rugueuse et ont produit peu ou pas de pigment sur milieu TSA. Ce groupe a été sensible à trois bactériophages, soient les HER 99, HER 104 et HER 106 (les bactéries numérotées 6, 20, 21 et 22).

Le groupe 4, le numéro 16 du Tableau 4.1, a présenté une croissance particulièrement lente (48 h requises avant de pouvoir observer une croissance) et non abondante. L'absence du pigment sur milieu de culture solide a été dénotée. De plus, les colonies ont été d'apparence rugueuse et de très petite taille. Cette bactérie a été sensible à cinq bactériophages : HER 84, HER 85, HER 98, HER 99 et HER 104.

Le groupe 5, comprenait le numéro 7 du Tableau 4.1, a présenté une croissance en voile, concentrée au fond du tube, peu abondante et lente (48 h avant de pouvoir observer une croissance). Le profil de lyse bactérienne a démontré une sensibilité à trois bactériophages : HER 99, HER 109 et HER 110.

Finalement, le groupe 6 comprenait l'isolat numéro 23, lequel est devenu 23a et 23b. En effet, les réplicats de l'isolat 23a se sont différenciés en deux groupes distincts. Ces deux mutants ont démontré une croissance peu abondante au fond du tube et des colonies d'apparence rugueuse. La souche 23a a été sensible à cinq bactériophages : HER 84, HER 98, HER 99, HER109 et HER 110. D'autre part, la souche 23b a été sensible à trois bactériophages : HER 99, HER 106 et HER 109.

Tableau 4.1 Profil de lyse bactérienne de *Aeromonas salmonicida* et des mutants au bactériophage 65. L : Lyse ; Lsv : Lyse semi voilée ; Lm : Lyse avec plages minuscules ($\approx 0,1$ mm diamètre) ; Ln : Lyse avec plages peu nombreuses mais de taille normale (≈ 1 mm de diamètre) ; X : absence de plage de lyse

Bactéries		Bactériophages									
Gr.		HER 84	HER 85	HER 98	HER 99	HER 100	HER 104	HER 105	HER 106	HER 109	HER 110*
	C	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
1	1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	4	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	10	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	12	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	14	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
2	11	L	L	L	L	Ln	x	Lm+	L	x	x
	18	L	Lm++	L	L	Ln+7	x	Lm++	L	x	x
	19	L	Lm++	L	L	Ln+	x	Lm++	L	x	x
3	6	x	x	x	L	x	L	x	Lsv++	x	x
	20	x	x	x	L	x	L	x	Lsv++	x	x
	21	x	x	x	L	x	L	x	Lsv++	x	x
	22	x	x	x	L	x	L	x	Lsv++	x	x
4	16	L	L	L	L	x	L	x	x	x	x
5	7	x	x	x	L	x	x	x	x	L	L
6	23a	L	x	L	L	x	x	x	x	L	L
	23b	x	x	x	L	x	x	x	L	L	x

* : bactériophage HER 110 est une autre appellation du bactériophage 65

4.2.1 Sensibilité au bactériophage initial

L'observation du Tableau 4.1 révèle que 8 mutants sur 17 étaient toujours sensibles, après repiquage, au bactériophage 65 (HER 110) et ce, dans trois groupes. Il s'agit des mutants des groupes 1 et 5 et de l'isolat 23a du groupe 6.

4.2.2 Croissance lente et peu abondante

Les groupes comportant des mutants n'ayant pas retrouvé le phénotype de la bactérie originale, ont montré une croissance bactérienne de type rugueuse, mis à part l'isolat numéro 7 qui a quand même proliféré très lentement. Ces groupes ont montré une croissance bactérienne plus lente et moins abondante que la souche originale et ont difficilement survécu à plus de cinq repiquages successifs en bouillon de culture TSB.

4.2.3 Mutants numéro 7 et 23a

En ce qui concerne les mutants numéro 7 et 23a, l'élément de discussion apporté par ces deux profils de lyse cellulaire est la présence chez *A. salmonicida* HER1107 de plus d'une molécule d'adhésion différente. Malgré le fait que les isolats 7 et 23a aient retrouvé tous les deux une sensibilité au bactériophage 65, deux bactériophages de plus parmi les 10 disponibles peuvent se multiplier à partir de l'isolat numéro 23a qu'à partir de l'isolat numéro 7.

4.3 Discussion

En bout de ligne, 17 mutants de *A. salmonicida* HER 1107 résistants au bactériophage 65 ont été sélectionnés, cultivés et observés. Les résultats ont permis de formuler des hypothèses et de soulever d'autres questions sur la possibilité d'utiliser des consortiums ou des combinaisons de bactériophages comme moyen de prévention de la furonculose chez les salmonidés.

4.3.1 Faible taux de survie des mutants

4.3.1.1 Mécanismes de résistances

On retrouve dans la littérature 5 mécanismes naturels par lesquels les bactéries peuvent démontrer une résistance aux bactériophages de leur milieu : la modification/mutation du récepteur,

l'inhibition de l'injection de l'ADN du bactériophage dans la cellule, l'acquisition d'immunité par la présence d'un bactériophage homologue dans la cellule, la destruction de l'ADN du bactériophage par des endonucléases de restriction bactériennes et l'avortement de l'infection (l'absence de reconnaissance du promoteur de la séquence du bactériophage par les ARN polymérase de la bactérie, par exemple) (Ackermann et Dubow, 1987a). Il est indiqué systèmes naturels car plusieurs mécanismes de résistances ont été mis au point par différents laboratoires afin de prémunir certains ferments bactériens contre des bactériophages. Dans le cas présent, la modification/mutation du récepteur semble la plus probable des hypothèses. L'acquisition de ce mécanisme de résistance ponctuelle impliquant une molécule essentielle à la survie de la cellule expliquerait alors l'incapacité de certains isolats à se multiplier dans un bouillon de culture TSB après repiquage. Par exemple, la perte du récepteur auquel le bactériophage se fixait pour pouvoir s'adsorber à la cellule pourrait être impliqué dans le transport de nutriment ou dans le maintien de l'intégrité de la cellule (la pression osmotique s'il s'agit d'une molécule de structure) (Middelboe, 2000). La plus plausible des hypothèse est celle d'une mutation ponctuelle sur le gène codant pour le récepteur du phage, lors des repiquage il y aurait eu réversion et retour à la sensibilité au phage.

4.3.1.2 Avantage en milieu piscicole

La perte de plusieurs mutants lors des repiquages subséquents à leur apparition sur milieu gélosé, alors que le milieu de culture où les peptides et autres éléments nutritifs bactériens étaient facilement disponibles, suggère que les cellules pourraient éprouver des difficultés à compétitionner dans un milieu comme l'eau des bassins d'aquaculture. Encore plus, si l'on considère que le traitement préventif dont il est question ici impliquerait une surveillance accrue de la qualité de l'eau dans les jours suivants un ajout de bactériophages. Il faut également prendre en considération qu'une eau filtrée et bien oxygénée est moins riche en matières organiques que le bouillon nutritif TSB. Nous avons donc toutes les raisons de croire que les bactéries résistantes éprouvent des difficultés à se multiplier en pisciculture.

4.3.2 Potentiel pathogène des cellules résistantes

Une nouvelle hypothèse de travail surgit donc à cette étape quant au potentiel pathogène des bactéries résistantes chez les poissons sains dans une eau contenant une faible concentration de matière organique. Il a été observé que 8 mutants sur 17 ont démontré une sensibilité au

bactériophage 65. Ce phénomène est en partie expliqué par un retour au phénotype initial en absence de la pression sélective (bactériophage 65), c'est-à-dire lors des repiquages en bouillon de culture TSB en ce qui concerne les mutants du groupe 1. Il peut s'agir de cellules possédant à leur surface la molécule d'adhésion au phage mais en quantité insuffisante pour engendrer une infection efficace de la part des virus. Plusieurs virus sont nécessaires à la réussite d'une infection menant à la production d'une plage de lyse. La preuve en a été faite par Hsu *et al.* (2000) qui démontrent clairement que plus le MOI est élevé plus la population bactérienne ciblée chutera rapidement.

4.3.3 Consortiums

4.3.3.1 Efficacité

Park *et al.* (2000) ont utilisé des bactériophages dans le but de contrôler *Pseudomonas plecoglossicida* chez le *Plecoglossus altivelis*, un petit poisson d'eau douce du Japon. Leurs essais différaient de ceux présentés ici, parce que les bactériophages ont été introduits dans les poissons par ingestion de nourriture. Dans leur plus récente étude, Park et Nakai (2003) ont démontré qu'un mélange des bactériophages PPpW3 et PPpW4 permettait d'obtenir une protection accrue lorsqu'ajoutés ensemble dans la nourriture de *Plecoglossus altivelis* plutôt que séparément.

4.3.3.2 Pathogénicité des souches résistantes

Dans les essais de Park et Nakaï (2003), des cellules de *P. plecoglossicida* résistantes aux bactériophages mis en leur présence ont été inoculées à *Plecoglossus altivelis* et se sont avérées moins pathogènes que la souche originale ($LD_{50} > 10^4$ UFC/poisson pour les bactéries résistantes vs $LD_{50} > 10^{1,2}$ UFC/poisson pour la souche originale). Wu et Chao (1984) démontraient de leur côté que la pathogénicité de *Vibrio anguillarum* était presque totalement éliminée après 4 heures en présence du bactériophages AS10 à un MOI de 1. Les travaux de Smith *et al.* (1987) portant sur l'utilisation de la phagothérapie dans le but de traiter des infections chez le veau, montrent que les souches d'*Escherichia coli* résistantes aux bactériophages utilisés et prélevées après traitement se sont avérées peu virulentes et faciles à contrôler.

4.3.3.3 Stratégies en milieu piscicole

La première stratégie est d'être en mesure d'identifier et isoler rapidement la souche et de

déterminer si elle est sensible aux phages disponibles. Compte tenu des multiples possibilités de mélanges de bactériophages, il n'a pas été possible dans le cadre de cette étude de définir une combinaison idéale de bactériophages pour contrer la prolifération de *A. salmonicida*. Toutefois, il serait sans doute possible d'établir des mélanges spécifiques, lesquels pourraient être fournis à chaque éleveur de salmonidés et ce, afin de prévenir les épidémies de furonculose. En effet, la souche d'origine présente dans les bassins d'un éleveur en particulier dévoilerait très probablement un profil de lyse cellulaire qui lui est propre et donc l'utilisation de bactériophages différents pourrait maximiser les résultats d'une ferme à l'autre. De manière générale, l'utilisation d'une combinaison de bactériophages distincts chaque année aiderait sans doute à prévenir le développement de souches bactériennes résistantes. Une étude approfondie des fluctuations des populations bactériennes au printemps et à l'automne permettrait d'établir une stratégie adéquate de traitement préventif. La production d'ombles de fontaine, particulièrement fragile aux infections bactériennes et virales (Université de Montréal, 2003) semble donc un sujet d'étude important. De même, des mélanges à la carte pourraient être mis au point pour chaque ferme, afin de répondre aux besoins spécifiques de la population à protéger lors de captures dans le but de déplacer des poissons d'un bassin à un autre dans la ferme, ou d'une ferme à une autre, lors de vente entre pisciculteurs. L'utilisation d'un MOI plus élevé pourrait aussi être une avenue à explorer pour augmenter la rapidité de la chute de la population bactérienne ciblée (Hsu *et al.*, 2000). Leur étude démontrait que le MOI est un paramètre qui influence le temps nécessaire à la chute de la population bactérienne et dans le cas d'une ferme piscicole chaque jour gagné peut faire une différence énorme. Encore une fois, les techniques de laboratoire d'isolement et de dénombrement de *A. salmonicida* seront nécessaires afin de pouvoir adapter les concentrations de bactériophages à ajouter dans les bassins.

5 RÉSISTANCES BACTÉRIENNES

La furonculose causée par la bactérie *Aeromonas salmonicida* représente une des principales causes de mortalité chez les salmonidés d'élevage. L'antibiothérapie constitue l'approche la plus largement répandue pour contrer les effets néfastes de cette maladie. Cependant, le développement de bactéries résistantes aux antibiotiques représente un problème de plus en plus préoccupant. Afin de vérifier si les bactériophages pourraient être efficaces dans une population bactérienne dont une partie possède des résistances aux antibiotiques utilisés en milieu piscicole, la sensibilité de 23 souches de *A. salmonicida* résistantes à aucun, un, deux ou trois antibiotiques, a été évaluée. Pour ce faire, 12 bactériophages ont été utilisés.

5.1 Sensibilité générale des souches microbiennes aux bactériophages

Les résultats des tests de sensibilité des 21 souches bactériennes de *A. salmonicida* vis-à-vis les 12 bactériophages sont présentés au Tableau 5.1. Les résultats montrent, de manière générale, que les souches microbiennes de *A. salmonicida* sont particulièrement sensibles aux bactériophages testés. Ainsi, un total de 13 souches sur 19 souches bactériennes ont été lysées par les 12 bactériophages, alors que les souches les plus résistantes (UM 1, UM 3 et UM 10) ont tout de même été lysées par 7 ou 8 bactériophages. Les 19 souches de *A. salmonicida* utilisées dans cette étude ont montré une moyenne de sensibilité aux bactériophages de $92,5 \pm 13,6\%$ (moyenne de lyse de 11,1/12 phages). Les bactériophages HER98, HER104, HER105, HER108 et HER109 ont lysé toutes les souches mises en leur présence.

5.2 Sensibilité aux bactériophages des souches sensibles et résistantes aux antibiotiques

Les souches contrôles (UM 3, UM 7, UM 10, UM 11, UM 13, UM 15, UM 16, UM 17, UM 20 et UM 21) sensibles à tous les antibiotiques, n'ont pas démontré une sensibilité significativement différente aux bactériophages que les souches résistantes. Ainsi, 6 des 10 souches contrôles ont été lysées par tous les bactériophages, alors que 7 des 9 souches résistantes aux antibiotiques ont été lysées par les 12 phages étudiés. D'autre part, les 10 souches contrôles présentent une moyenne de sensibilité aux bactériophages de $90,8 \pm 15,4\%$ (moyenne de lyse de 10,9/12 phages), alors que les 9

souches résistantes aux antibiotiques ont une sensibilité moyenne aux bactériophages de $94,4 \pm 11,8\%$ (moyenne de lyse de 11,3/12 phages).

Il faut souligner que les souches bactériennes présentant la meilleure résistance aux antibiotiques, soit les souches UM 4, UM 5, UM 6, UM 9 et UM 12, sont sensibles à tous les bactériophages, alors que la souche UM 19 qui est également en mesure de résister à la florfénicol et à l'oxytétracycline, est lysée par 10 bactériophages sur les 12 phages testés.

5.3 Sensibilité spécifique des souches microbiennes aux bactériophages

Dans un premier temps, il faut noter que les souches bactériennes UM 2 et UM 18 du Tableau 2.2 n'ont pu être soumises au test de sensibilité aux bactériophages. En effet, il a été impossible d'obtenir un tapis bactérien à partir de ces cellules. Ces deux souches présentaient un antibiogramme identique, soit une résistance au florfénicol, une sensibilité limite à l'oxytétracycline et une sensibilité au sulfadiméthoxine-ormetoprim. La souche UM 2 a été prélevée d'une truite (omble de fontaine) dans une pisciculture située dans les Laurentides (Québec, Canada), alors que la souche UM 18 provient d'un saumon d'une province des Maritimes (Canada).

La souche UM 4, présentant une sensibilité limite à l'oxytétracycline et une résistance au florfénicol et au sulfadiméthoxine-ormetoprim, a été lysée par les 12 bactériophages étudiés. De même, la souche UM 9, présentant une sensibilité limite au florfénicol et à l'oxytétracycline et une résistance au sulfadiméthoxine-ormetoprim a aussi été lysée par les 12 bactériophages.

Les souches UM 5, UM 8 et UM 12 sensibles au florfénicol et résistantes à l'oxytétracycline et au sulfadiméthoxine-ormetoprim ont également été lysées par tous les bactériophages. Les souches UM 5 et UM 12 présentent le même profil de lyse cellulaire et ont été plus faiblement touchées par les bactériophages HER 85, HER 100 et HER 106. Malgré ces similitudes, ces deux souches ont été isolées d'élevages différents. La souche UM 8 a été plus faiblement touchée par le bactériophage HER 100 mais une zone de lyse complète a été produite à partir du bactériophage HER 109.

Les souches UM 6 et UM 19 sensibles au sulfadiméthoxine-ormetoprim, résistantes au florfénicol et à l'oxytétracycline ont présenté des profils de lyse bactérienne complètement différents. La souche UM 6 a été lysée par tous les bactériophages mais a été plus faiblement touchée par les bactériophages HER 85 et HER 106. La souche UM 19 a été lysée par 10 bactériophages sur 12,

mais une zone de lyse complète a été produite à partir des bactériophages HER 107, HER 108, HER 109 et HER 110.

La souche UM 1, ne présentant aucune résistance proprement dite mais une sensibilité limitée au florfenicol et à l'oxytétracycline, a été lysée par 8 bactériophages sur 12. Une zone de lyse complète a cependant été produite à partir du bactériophage HER 108.

La souche UM 14, résistante à l'oxytétracycline seulement, a été lysée par tous les bactériophages. Une lyse plus faible a toutefois été produite avec le bactériophage HER 104.

5.4 Efficacité des bactériophages pour la lyse des souches microbiennes

Les résultats présentés au Tableau 5.1 permettent également d'apprécier l'efficacité de chaque bactériophage pour la lyse de 19 souches de *A. salmonicida* obtenues de l'Université de Montréal. De manière générale, les bactériophages possèdent une excellente efficacité de lyse bactérienne. Ainsi, les 12 bactériophages ont montré une moyenne d'efficacité de $93,0 \pm 8,5\%$, soit la lyse de 17,7 souches sur les 19 souches bactériennes testées.

Au total, cinq bactériophages (HER 98, HER 104, HER 105, HER 108 et HER 109) ont même été capables de lyser toutes les souches bactériennes. D'autre part, les bactériophages HER 84, HER 85 et HER 110 ont lysé 18 souches sur un total de 19 souches testées. La souche d'*A. salmonicida* qui leur était insensible était d'ailleurs différente pour chacun d'eux.

De bons résultats ont également été obtenus avec les bactériophages HER 99, HER 107 et HER 106 avec 16 et 17 souches lysées. Le bactériophage le moins performant, soit HER 100, a quant même été en mesure de lyser un total de 14 souches.

Tableau 5.1 Profil de lyse bactérienne des différentes souches de *Aeromonas salmonicida*. L : Lyse ; Lf : Lyse faible avec plages minuscules ($\approx 0,1$ mm diamètre) ; Lm : Lyse marbrée avec plages de taille normale (≈ 1 mm de diamètre) entremêlées de zones voilées ; L++ : Lyse complète de la taille de la goutte déposée ; L+++ : Lyse complète de la taille de la goutte déposée sans croissance de cellules résistantes après 48 h ; x : absence de lyse

Souche bactérienne	Bactériophage											
	HER 84	HER 85	HER 98	HER 99	HER 100	HER 104	HER 105	HER 106	HER 107	HER 108	HER 109	HER 110
UM 1	L	L	L	x	x	L	L	x	x	L++	L	L
UM 2	Ne s'applique pas											
UM 3*	L	x	L	x	x	L	L	x	x	L	L	L
UM 4	L	L	L	L	L	L	L++	L	L	L	L	L+++
UM 5	L	Lm	L	L	Lf	L	L	Lm	L	L	L	L
UM 6	L	Lm	L	L	L	L	L	Lf	L	L	L	L
UM 7*	L	L	L	L	Lf	L	L	L	L	L	L+++	L
UM 8	L	L	L	L	Lf	L	L	L	L	L	L+++	L
UM 9	Lf	L	L	Lf	L	Lm	L	L	L	L	L	L
UM 10*	x	L	L	Lf	x	L	Lf	x	x	Lf	L	L
UM 11*	L	L	L	Lf	L	L	L	L	L	L	L	L
UM 12	L	Lm	L	L	Lf	L	L	Lm	L	L	L	L
UM 13*	Lf	L	L	Lf	x	L	Lf	L	L	L	L	L
UM 14	L	L	L	L	L	Lm	L	L	L	L	L	L
UM 15*	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
UM 16*	Lmf	L	L	L	Lf	L	Lf	L	L	L	L	L
UM 17*	Lf	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	x
UM 18	Ne s'applique pas											
UM 19	L	L	L	x	x	L	L	L	L++	L++	L++	L++
UM 20*	L	Lm	L	L	L	L	L+++	Lf	L	L+++	L	L
UM 21*	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

* Souches sans résistance aux trois antibiotiques.

5.5 Discussion

Cette recherche a permis de montrer qu'il n'y a pas de lien direct entre la multiplicité des résistances à un antibiotique et sa sensibilité aux bactériophages. Ainsi, les souches ne présentant aucune résistance aux trois antibiotiques utilisés dans l'industrie piscicole canadienne sont aussi sensibles que les souches résistantes à un ou plusieurs antibiotiques.

Il ne semble pas y avoir de lien non plus entre la viabilité des cellules et le nombre d'antibiotiques auxquels la bactérie résiste. Preuve étant faite par la difficulté rencontrée dans l'obtention d'un tapis bactérien à partir des souches UM 2 et UM 18, résistantes au florfénicol, sensibles limite à l'oxytétracycline et sensibles au sulfadiméthoxine-ormetoprim, alors que les souches UM 4 et UM 9 présentaient une sensibilité limite et deux résistances ont été facilement multipliées. Le lien à faire dans ce cas est dans la nature même de la mutation par laquelle la cellule résiste à un antibiotique, donc la structure cellulaire touchée par cette mutation. Les souches UM 2 et UM 18 sont probablement peu viables en milieu aquicole alors que les souches UM 4 et UM 9, qui se multiplient aisément malgré la multiplicité des résistances représentent parfaitement les souches bactériennes que l'on cherche à éliminer dans des bassins d'élevage. Il faudrait toutefois vérifier si le potentiel pathogène, la production d'un facteur de virulence ou d'une protéine impliquée dans la sécrétion d'un facteur de virulence essentiel au pathogène dans l'établissement d'une infection dans l'hôte (Burr *et al.*, 2003b), a été affecté dans le processus d'acquisition des résistances aux antibiotiques.

Les bactéries résistantes aux antibiotiques qu'il a été possible de multiplier de façon à obtenir un tapis bactérien ont toutes été susceptibles à au moins 8 bactériophages sur 12.

Des essais effectués par Park *et al.* (2000) visaient à utiliser des bactériophages dans le but de contrôler la bactérie *Pseudomonas plecoglossicida* chez le poisson *Plecoglossus altivelis*. Ces chercheurs ont obtenu des souches bactériennes de *P. plecoglossicida* résistantes au bactériophage. Cependant, ces souches se sont avérées moins pathogènes lorsque mises en présence du poisson étudié ($LD_{50} > 10^4$ UFC/poisson pour les bactéries résistantes vs $LD_{50} > 10^{1.2}$ UFC/poisson pour la souche originale). Dans une étude, Park et Nakai (2003) ont démontré qu'un mélange des bactériophages PPpW3 et PPpW4 permettait d'obtenir une protection accrue, lorsqu'ajoutés

ensemble dans la nourriture de *Plecoglossus altivelis* infecté artificiellement par *P. plecoglossicida*, comparativement à ce qui a été observé lorsque chacun des phages était administré séparément.

Des combinaisons de bactériophages adaptées aux conditions de chaque pisciculture pourraient être mises au point, la flore présente variant de l'une à l'autre. Les mélanges pourraient également être modifiés à chaque année afin de diminuer le risque de formation de souches bactériennes résistantes et pour permettre les transferts sans contamination de poissons d'une pisciculture à une autre. De plus, la furunculose étant engendrée principalement au printemps et à l'été (Ortega *et al.*, 1995), une surveillance accrue dans ces périodes avec utilisation de bactériophages pourrait permettre d'éviter l'utilisation d'antibiotiques traditionnels.

De même, des bactériophages pourraient être ajoutés à l'eau de transport des poissons vendus entre pisciculteurs et, ainsi, éviter les contaminations dues aux échanges d'eau (les poissons porteurs le demeureraient cependant). Une étude menée par Dubois-Darnaudepeys (1977), démontrait la présence durant toute l'année de bactériophages spécifiques à *A. salmonicida* dans les sédiments d'une rivière où vivent des salmonidés sauvages. Cette étude confirmait aussi la présence continue du pathogène malgré le caractère épisodique des infections. Il est fort à parier que même en l'absence de poissons porteurs dans un lot vendu et acheminé au nouvel acquéreur, que *A. salmonicida* puisse être dans l'eau de transport. Cette étude de Dubois-Darnaudepeys donne, de plus, une preuve que l'utilisation de bactériophages comme agent préventif ne représenterait pas l'apport d'un nouveau microorganisme au sein ni de la pisciculture ni de l'environnement naturel.

6 DISCUSSION GÉNÉRALE

La pisciculture représente une source importante de protéines animales dans l'alimentation de l'humain. La production québécoise en poissons d'élevage actuelle ne comble que 30% des besoins du marché interne. Cependant, dans le rapport de la commission sur la gestion de l'eau (BAPE, 2000) on nous informe que la production québécoise aurait doublé depuis 10 ans. Certains estiment donc qu'il existe de la place pour l'expansion de cette industrie et le Ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation du Québec voudrait voir la production doubler d'ici les cinq prochaines années.

Compte tenu que 30% de l'eau souterraine pompée au Québec serait utilisée par les activités piscicoles et que les informations sur les impacts environnementaux réels des rejets des piscicultures sont déficientes, alors que controversées, l'importance et l'intérêt de développer la recherche dans ce domaine est incontournable.

Il existe un débat entre les gens qui voient la pisciculture comme un élevage rempli d'espoir et d'avenir et ceux qui la voit comme une menace. Les sujets litigieux sont entre autres : la qualité de vie des poissons (milieu accueillant la pisciculture et les soins procurés), la génétique et la reproduction des espèces, la qualité du produit final ainsi que les normes et contrôles de transport, de transformation et d'étiquetage (Leveque et Huet, 2003). Voici quelques nuances et pistes de lectures pour les gens intéressés.

6.1 Antibiotiques

Tout le secteur d'activités d'élevage des animaux est aux prises avec le développement de bactéries résistantes aux antibiotiques. Un des problèmes rencontrés par les vétérinaires amenés à traiter les élevages de poissons est la présence, dans la ferme, d'une souche bactérienne résistante aux antibiotiques. Ce fait est d'autant plus problématique que seulement quatre antibiotiques sont autorisés au Canada dans ce secteur d'activité: le florfenicol, le sulfadiméthoxine-ormetoprim, sulfadiazine-triméthoprim et l'oxytétracycline (CAHI, 2001). Des résistances pour ces antibiotiques sont régulièrement répertoriées dans les laboratoires d'ichtyopathologie. Le transfert de plasmides de résistance aux bactéries de l'environnement sauvage est une problématique que le public souhaite voir résolu avant de donner leur accord à l'expansion de ce secteur d'activité agricole

(BAPE, 2000). Notre hypothèse voulait que des bactériophages pourraient être utiles pour la prévention des infections chez les poissons d'élevage. En plus de vérifier qu'il est possible de retarder le développement d'une infection à *Aeromonas salmonicida* chez l'omble de fontaine, le modèle utilisé, a permis de démontrer le potentiel que pourrait représenter les bactériophages dans la lutte à la propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques déjà présentes en milieu piscicole.

6.2 Bactériophages

Les bactériophages sont très abondants dans la nature. Partout où se trouve une population bactérienne, un bactériophage est susceptible d'être présent. Par exemple, des bactériophages ont été retrouvés dans les usines de transformation de produits laitiers qui utilisent des ferments dans la production des yogourts ou des fromages (Svensson et Chritiansson, 1991).

Les environnements aquatiques ont particulièrement été explorés par les chercheurs qui s'intéressent aux bactériophages. La diversité ainsi que l'abondance des bactériophages observés indiquent qu'il s'agit de microorganismes qui, en plus d'être ubiquitaires, ont un impact certain sur les populations microbiennes de leur environnement (Bergh *et al.*, 1989 ; Middelboe, 2000).

6.2.1 Bactériophages en milieu piscicole

La promiscuité des individus dans les cages d'élevage favorise le développement de lésions et la transmission de parasites qui endommagent les cellules épithéliales et la couche mucoïde des poissons (pou du poisson par exemple). Les pathogènes, tel *A. salmonicida*, bénéficient donc de conditions favorables pour coloniser des individus sains. Les bactériophages ont un impact sur les populations bactériennes et les poissons possèdent des défenses immunitaires pour contrer les invasions bactériennes. Il s'agit donc de trouver comment favoriser ces défenses immunitaires des poissons d'une part, et de l'autre, faire chuter les populations pathogènes au moment opportun. Les bactériophages utilisés en mode préventif semblent tout indiqués. Agissant à l'extérieur du poisson, dans l'eau des cages et bassins d'élevage, leur impact sur le système de défense du poisson est minimal voire nul. La chute des populations pathogènes a ainsi été démontrée dans cette étude, mais aussi par d'autres chercheurs dont Nakai et Park (2002).

D'après nos résultats et ceux obtenus par Park et Nakai (2003), des espoirs sont permis quant à la possibilité d'utiliser des mélanges (appelés combinaisons) de bactériophages afin d'augmenter

l'impact de l'ajout de bactériophages sur une population bactérienne pathogène et de minimiser le développement de souches résistantes au sein d'un environnement où sont gardés des animaux. Des essais comme ceux décrits dans cet ouvrage auraient cependant dû être précédés par une vérification de la présence/absence de phage dans le génome de la bactérie utilisée.

Les souches de *A. salmonicida* résistantes aux antibiotiques utilisées dans l'industrie piscicole canadienne sont sensibles aux bactériophages disponibles au Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle. Il est donc possible d'aller plus avant dans les essais en milieu piscicole afin d'explorer l'avenue de l'utilisation des bactériophages dans la prévention de la furunculose chez les salmonidés d'élevage.

6.2.1.1 Coût

Un des avantages non négligeables des bactériophages sur les antibiotiques naturels, mis à part le fait que la mise en quarantaine pourrait être évitée est le faible coût de production. Un laboratoire muni de centrifugeuses, de réfrigérateur, de congélateurs et d'incubateur n'aurait comme dépense que les milieux de culture et la stérilisation des équipements. La dépense majeure revient en fait au technicien qui devrait s'assurer de maintenir les souches bactériennes et les bactériophages viables.

6.2.1.2 Volumes

Les titres de bactériophages qu'il est possible d'atteindre lorsque l'on utilise des méthodes simples et peu dispendieuses telles celles décrites dans cet ouvrage sont de l'ordre de 10^{10} UFP/mL. Ce titre pourrait sans doute être augmenté avec quelques recherches techniques comme par exemple des centrifugations sur gradients de chlorure de césium qui permettent d'atteindre des concentrations plus élevées (10^{13} UFP/mL). Le titre de bactériophages moyen atteint au cours de ces travaux étant 10^9 UFP/mL, les volumes nécessaires à l'obtention d'un MOI minimal de 1 sont donc de 1 litre par 1 000 litres d'eau où *A. salmonicida* serait déjà à 10^6 UFC/mL. Il va sans dire qu'en milieu piscicole un MOI plus élevé serait à favoriser afin d'observer une chute de population plus rapide tel que démontré par Hsu *et al.* (2000). Compte tenu de toutes les difficultés énumérées dans Austin et Austin (1987) lors des tentatives de décomptes de *A. salmonicida* dans une population hétérogène il est hasardeux d'avancer une concentration bactériennes atteinte lors d'épidémie cependant, comme le MOI représente le ratio virus/bactérie, il s'agit d'augmenter la quantité de virus pour augmenter

l'impact de ces derniers sur les populations bactériennes présentes.

En général, la taille des bassins varie selon l'âge des poissons. Il s'agit de volumes allant de 500 à 1 000 litres d'eau pour les alevins, de 5 000 à 10 000 litres pour les fretins et de 15 000 à 30 000 litres pour les autres (production). Donc pour obtenir un MOI de 10 dans un bassin de saumons adultes alors que *A. salmonicida* atteindrait 10^6 UFC/mL il faudrait ajouter 300 L de milieu de culture contenant 10^9 UFP/mL de chacun des bactériophages de la combinaison souhaitée. Un titre plus élevé, comme par exemple 10^{11} UFP/mL, permettrait de réduire ce volume à 3 L, ce qui est devenu pratique et facile à transporter dans une glacière.

6.2.1.3 Combinaisons

Les combinaisons pourraient être mises au point au laboratoire à partir des souches de *A. salmonicida* isolées des piscicultures et répertoriées au Laboratoire de bactériologie de l'Université de Montréal. Des essais de lyses bactériennes comme ceux effectués dans cet ouvrage pourraient permettre d'évaluer lesquels des bactériophages permettrait une chute de la population de *A. salmonicida* le plus rapidement possible. Des évaluations concernant les mutants produits à partir des bactériophages individuellement utilisés pourraient également être effectués à l'avance et permettre l'élaboration de combinaisons très efficaces.

De nouveaux bactériophages pourraient être isolés des différentes piscicultures canadiennes et servir à augmenter les effectifs et la diversité des bactériophages du Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle.

6.3 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Un poisson en santé, soumis à des stress représentatifs de ce qu'il rencontre dans son milieu naturel, qui ne serait pas nourri à l'excès et vivant dans un habitat où les concentrations de pathogènes saisonniers sont contrôlés à la baisse par des bactériophages aux moments opportuns devrait être capable de se défendre lui-même contre les éventuels envahisseurs tout en laissant son système immunitaire évoluer. Secondée par une vaccination et une manutention soignée et représentative de l'environnement naturel, l'utilisation de bactériophages semble une voie d'avenir pour améliorer et valoriser l'aquaculture.

Les poissons qui démontrent des symptômes sont souvent atteints gravement. Les capturer et les traiter diminuent les chances de réussite d'un traitement curatif compte tenu du stress supplémentaire imposé au poisson. Ils sont donc traités par bain ou par des médicaments introduits dans la moulée. Dans le cas d'une infection engendrée par un microorganisme qui dégrade les tissus de l'hôte, qui déjoue le système immunitaire et peut apparaître sous forme chronique il serait nettement avantageux de prévenir l'établissement, l'infection par la chute des populations bactériennes de *A. salmonicida* plutôt que d'attendre que l'infection soit initiée. Afin d'appuyer notre hypothèse, il serait intéressant de vérifier si l'activité protéolytique de *A. salmonicida* pourrait favoriser l'établissement d'autres pathogènes bactériens. C'est-à-dire que d'autres bactéries pourraient profiter de la productions de peptides variés et favoriser l'acquisition du fer lors de co-infections avec *A. hydrophila* par exemple.

Les bactériophages devraient être utilisés comme agents de prévention dans la lutte contre les infections en milieu piscicole. Par exemple, pour éviter l'introduction d'un pathogène par un nouvel arrivage de poissons stressés dans un établissement piscicole, des bactériophages pourraient être ajoutés à l'eau des poissons lors du transport. Si *A. salmonicida* se trouve dans l'eau de transport, les poissons stressés ont plus de chance de devenir des porteurs, ainsi l'ajout de bactériophages pourrait augmenter les chances du poisson de résister à l'envahissement par le pathogène mais, encore une fois, les poissons qui sont déjà porteurs le demeurent. De plus, cette technique augmente nos chances de contrer l'arrivage de *A. salmonicida* avec l'eau de transport.

L'utilisation de combinaisons de bactériophages serait une solution intéressante à valider lors d'essais à grande échelle pour le traitement préventif de la furonculose chez les salmonidés. Avec les bonnes combinaisons, il serait même possible d'éliminer les souches bactériennes déjà présentes qui portent des résistances aux antibiotiques.

Des études de caractérisation pour chacun des bactériophages utilisés telles que : l'évaluation du nombre de phages relargués par cellule de *Aeromonas* infectées, des études de variation des conditions de croissance, la durée de leur cycle lytique permettraient une meilleure évaluation du potentiel des bactériophages dans l'industrie piscicole. De plus, la vérification de la présence/absence de phages lysogène dans les cellules bactériennes que l'on cherche à contrer serait incontournable dans des recherches ultérieures.

L'eau est un véhicule naturel des bactériophages. En mettant au point des combinaisons de bactériophages représentatives des besoins de chaque pisciculteur et en variant les cibles visées au sein d'une même population bactérienne, les risques de développement de résistances se trouveraient grandement diminués. Un historique des cas d'infections en collaboration avec le Laboratoire de l'Université de Montréal représenterait un outil non négligeable dans le développement de cette technique.

L'utilité des bactériophages ne se limite pas aux saumons. Certains bactériophages maintiennent leur intégrité structurale et leur capacité de réplication dans des eaux dont les températures se situent entre 5 et 37 °C ce qui pourrait convenir à une grande variété d'espèces de poissons. La recherche dans ce domaine en est à ses premiers balbutiements. Il reste maintenant à valoriser ce potentiel.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdul-Hassan, H.S., El-Tahan, A., Massoud, B. et Gomaa, R. 1990. Bacteriophage therapy of *Pseudomonas* burn wound sepsis. *Ann. Med. Burn Club*. 3: 262-264.
- Abedon, S.T. 1994. Lysis and interaction between free phages and infected cells. Molecular biology of bactériophage T4. Dans: *Molecular biology of bacteriophage T4*. American Society for Microbiology. Washington, DC. É.U. pp. 396-405.
- Ackermann, H.-W., Dauguet, C., Paterson, W.D., Popoff, M., Rouf, M.A. et Vieu, J.-F. 1985. *Aeromonas* bacteriophages: reexamination and classification. *Ann. Inst. Pasteur Virol*. 136: 175-199.
- Ackermann, H.-W. et DuBow, M.S. 1987a. Phage multiplication. Dans : *Viruses of procaryotes, Volume I, General properties of bacteriophages*. Boca Raton, Floride, É.U. pp. 49-86.
- Ackermann, H.-W. et DuBow, M.S. 1987b. *Aeromonas* phages. Dans : *Viruses of procaryotes, Volume II, Natural groups of bacteriophages*. Boca Raton, Floride, É.U. pp. 64-69.
- Ackermann, H. W. et Krisch, H.M. 1997. A Catalogue of T4-Type Bacteriophages. *Arch. of Virol*. 142: 2329-2345.
- Aguilar, A., Merino, S., Rubers, X. et Tomas, J.M. 1997. Influence of Osmolarity on Lipopolysaccharides and Virulence of *Aeromonas Hydrophila* Serotype O:34 Strains Grown at 37 Degrees C. *Infect. Immun*. 65: 1245-1250.
- Alcorn, S.W., Murray, A.L. et Pascho, R.J. 2002. Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish Shellfish Immunol*. 12: 303-334.
- Alderman, D. J. et Smith, P. 2001. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*. 196: 211-243.

- Alisky, J., Iczkowski, K., Rapoport, A., et Troitsky, N. 1998. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J. Infect.* 36: 5-15.
- Allen, D.A., Austin, B. et Colwell, R.R. 1983. Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with freshwater fishery. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2043-2062.
- Anderson, E.S. 1972. Virulence and persistence of rough and smooth forms of *Aeromonas salmonicida* inoculated into Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Board Can.* 29: 204-206.
- Ando, A., Furuse, K. et Watanabe, I. 1979. Propagation of ribonucleic acid coliphages in gnotobiotic mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1157-1165.
- Aoki, T. et Egusa, S. 1971. Drug sensitivity of *Aeromonas liquefaciens* isolated from freshwater fishes. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 37: 176-185.
- Armillas, P. 1971. Gardens on swamps. *Science.* 174: 653-661.
- Austin, B. et Austin, D.A. 1985. Microbial quality of water in intensive fish rearing. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 2075-2265.
- Austin, B. et Austin, D.A. 1987. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. Chichester, UK: Ellis Horwood / New York, É.U. 364 p.
- Azad, I.S., Shankar, K.M., Mohan, C.V. et Kalita, B. 1999. Biofilm vaccine of *Aeromonas hydrophila*- standardization of dose and duration for oral vaccination of carps. *Fish Shellfish Immunol.* 9: 519-528.
- BAPE. 2000. L'aquiculture. Dans : *L'eau, ressource à protéger, à partir et à mettre en valeur- Tome II. Rapport de la commission sur la gestion de l'eau au Québec.* Bureau d'audiences publiques sur l'environnement. pp. 16-17. <http://www.bape.gouv.qc.ca> (visité en mai 2004)
- Barrow, P., Lovell, M. et Berchieri, A. Jr. 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5: 294-298.

- Barrow, P.A. et Soothill, J.S. 1997. Bacteriophage therapy and prophylaxis : rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol.* 5: 268-271.
- Bell, C.R., Holder-Franklin, M.A. et Franklin, M. 1980. Heterotrophic bacteria in two Canadian rivers. 1. Seasonal variations in the predominant bacterial populations. *Water Res.* 14: 449-460.
- Berchieri, A. Jr., Lovell, M.A. et Barrow, P.A. 1991. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. *Res. Microbiol.* 142: 541-549.
- Bergey, D.H., Gibbons, N.E. et Buchanan, R.E. 1974. *Aeromonas*. Dans : *Bergey's manual of determinative bacteriology : 8th ed.* Williams & Wilkins, Baltimore, USA. pp. 345-548.
- Bergh, Ø., Børsheim, K.Y., Bratbak, G. et Heldal, M. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature.* 340: 467-468.
- Beveridge, M.C.M. et Little, D.C. 2002. The history of aquaculture in traditional societies. Dans: *Ecological aquaculture; The evolution of the blue revolution.* Blackwell Science Ltd. UK. pp. 3-29.
- Botsford, L.W., Castilla, J.C. et Peerson, C.H. 1997. The management of fisheries and marine ecosystems. *Science.* 277: 500-515.
- Boulanger, Y., Lallier, R. et Cousineau, G. 1977. Isolation of enterotoxigenic *Aeromonas* from fish. *Can. J. Microbiol.* 23: 1161-1164.
- Buckley, J.T., Halasa, L.N. et MacIntyre, S. 1982. Purification and partial characterization of a bacterial phospholipid-cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 257: 3320-3325.
- Burr, S.E., Stuber, K. et Frey, J. 2003a. The ADP-ribosylating toxin, HexT, from *Aeromonas salmonicida subsp salmonicida* is translocated via a type III secretion pathway. *J. Bact.* 185: 6583-6591.
- Burr, S.E., Wahli, T., Segner, H., Pugovkin, D. et Frey, J. 2003b. Association of Type III secretion genes with virulence of *Aeromonas salmonicida subsp salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.* 57: 167-

171.

- CAHI. 2001. *Compendium of veterinary products*, 7e edition. Canadian Animal Health Institute.
- Calvo, C., Gómez, M.A. et González-López, J. 1998. Fecal coliform-related bacterial and coliphage populations in five lakes of southeastern Spain. *Microbiol. Res.* 153: 283-288.
- Chimits, P. 1957. Tilapia in ancient Egypt. *FAO Fish. Bull.* 10: 211-215.
- Chow, M.S. et Rouf, M.A. 1983. Isolation and partial characterization of two *Aeromonas hydrophila* bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1670-1676.
- Christensen, P.J. 1977. The history, biology and taxonomy of Cytophaga group. *Can. J. Microbiol.* 23: 1599-1653.
- Coche, A.G. 1982. Cage culture of Tilapias. Dans: *Biology and culture of Tilapias*. Éditions R.S.V. Pullin & RR.H. Lowe-McConnell. ICLARM, Manila, Philippines. pp. 205-246.
- Conseil National de Recherche du Canada. 2000. New state-of-the-art facility contributes to jobs, economy, and biotechnology in Atlantic Canada. http://www.nrc.ca/corporate/english/media/news/seqimb00_ehtml (visité en avril 2004)
- Corbeil, S., Kurath, G. et LaPatra, S.E. 2000. Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus : efficacy of various routes of immunisation. *Fish Shellfish Immunol.* 10: 711-723.
- Costa-Pierce, B.A. 2002. The *Ahuapua'a* aquaculture ecosystems in Hawaii. Dans: *Ecological aquaculture; The evolution of the blue revolution*. Blackwell Science Ltd. UK. pp. 30-43.
- Costerton, B. et Stewart, P. 2001. Les biofilms. *Pour la Science.* 287: 48-53.
- Currie, C.K. 1991. The early history of the carp and its economic significance in England. *Agric. Hist Rev.* 11: 97-107.
- De Kinkelin, P. et Hattenberger, A.M. 1986. Les dominantes pathologiques chez la carpe et les Cyprinidés d'élevage. Dans : *Aquaculture of Cyprinids*. INRA, Paris. pp. 413-426.

- Direction régionale de la Gaspésie. 2001. Portrait sommaire de l'industrie de la pêche en Gaspésie. http://www.agr.gouv.qc.ca/pac/drg/drg_portrait.htm (visité en janvier 2005)
- Dubois-Darnaudpeys, A. 1977. Epidemiologie de la furunculose des salmonides. III. Ecologie de *Aeromonas salmonicida* proposition d'un modèle épidémiologique. *Bull. Fr. Pisc.* 50: 21-32.
- Ebanks, R.O., Dacanay, A., Goguen, M., Pinto, D.M. et Ross, N.W. 2004. Differential proteomic analysis of *Aeromonas salmonicida* outer membrane proteins in response to low iron and *in vivo* growth conditions. *Proteomics.* 4: 1074-1085.
- Écoroute. 2003. L'omble de fontaine. <http://ecoroute.uqcn.qc.ca/envir/faune/omble.htm> (visité en mai 2004)
- Edwards, M.L., Lilley, A.K., Timms-Wilson, T.H., Thompson, I.P. et Cooper, I. 2001. Characterisation of the culturable heterotrophic bacterial community in a small eutrophic lake (Priest Pot). *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 295-04.
- Ellis, A.E. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 9: 291-308.
- El Morabit, A., Garcia-Marquez, S. et Santos, Y. 2004. Is sea-lamprey a potentiel source of infection with *Aeromonas salmonicida* for wild and farmed fish? *E.A.F.P.* 24: 100-103.
- Emmerich, R. et Weibel, E. 1894. Ueber eine durch Bakterien erzeugte Seuche unter den Forellen. *Arch. Hyg. Bakteriol.* 21: 1-21.
- Environnement Canada. 1992. Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule. *Série de la Protection de l'environnement.* Rapport SPE 1/RM/22.
- Environnement Canada. 2000. Fiches d'information sur les Grands Lacs. http://www.on.ec.gc.ca/wildlife/factsheets/fs_carp-f.html (visité en janvier 2005)
- Envirotel. 2004. Problématique du saumon de l'Atlantique. <http://www.envirotel.ca/ichtyos/problematique.htm#1> (visité en octobre 2004)
- FAO. 1992. <http://www.fao.org/DOCREP/006/w3840e/W3840e01.htm> (visité en octobre 2004)

- FAO. 2003. <http://www.fao.org/french/newsroom/news/2003/14203-fr.html> (visité en novembre 2004)
- Fattal, B., Dotan, A., Tchorsh, Y., Parpari, L. et Shuval, H.I. 1988. Penetration of E. coli and F2 bacteriophage into fish tissues. *Schriftenr. Ver. Wasser Boden Lufthyg.* 78: 27-38.
- Farrant, J.L., Sansone, A., Canvin, J.R., Pallen, M.J., Langford, P.R., Wallis, G.D. et Kroll, J.S. 1997. Bacterial copper- and zincofactored superoxide dismutase contributes to the pathogenesis of systemic salmonellosis. *Mol. Microbiol.* 25: 785-796.
- Firth, N. et Skurray, R.A. 2000. Genetics: accessory elements and genetic exchange. Dans: *Gram-positive pathogens*. Édité par: V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy et J. I. Rood. ASM Press. Washington, D.C. pp. 326-338.
- FRDC. 1995. Diagnosis and identification of *Aeromonas salmonicida* and detection of latent infections in carrier fish. <http://www.frdc.com.au/pub/reports/files/95-060.htm> (visité en avril 2005)
- Fryer, J.L. et Rohovec, J.S. 1993. Bacterial diseases of fish. Dans : *Pathology of marine and estuarine organisms*. Édité par: J.A. Couch et J.W. Fournie. Boca Raton. Florida. pp. 53-83.
- Garduño, R.A., Moore, A.R., Olivier, G., Lizama, A.L., Garduño, E. et Kay, W.W. 2000. Host cell invasion and intracellular residence by *Aeromonas salmonicida* : Role of S-layer. *Can. J. Microbiol.* 46: 660-668.
- Geesey, G.G. et Costerton, J.W. 1979. Microbiology of northern river; bacterial distribution and relationship to suspended sediment and organic carbon. *Can. J. Microbiol.* 25: 1058-1062.
- Guz, L., Lee, K.J., Dabrowski, K. et Verlhac, V. 2004. Characterizing the immune response of rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* ssp *salmonicida* antigen. *Med. Vet.* 60: 374-378.
- Hahn, D.R., McHenney, M.A. et Baltz, R.H. 1991. Properties of the streptomycete temperate bacteriophage FP43. *J. Bacteriol.* 173: 3770-3775.
- Harris, F. 1996. Intensification of agriculture in semi-arid areas: lessons from the Kano Close-Settled

- zone, Nigeria. Gatekeeper series 59. *International Institute for Environment and Development*. Londres. UK.
- Havelaar, A.H., Versteegh, J.P.M. et During, M. 1990. The presence of *Aeromonas* in drinking water supplies in the Netherlands. *Zbl. Hyg.* 190: 236-256.
- Hayashi, F., Araki, Y., Harada, K., Inoue, M. et Mitsuhashi, S. 1982. Epidemiological studies of drug resistant strains in cultured fish and water. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48: 1121-1127.
- Hazen, T.C., Fliermanns, C.B., Hirsh, R.F. et Esch, G.W. 1978. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 731-738.
- Holder-Franklin, M.A., Thorpe, A. et Cormier, C. 1981. Comparison of numerical taxonomy and DNA-DNA hybridization in diurnal studies of river bacteria. *Can. J. Microbiol.* 27: 1165-1184.
- Howard, S.P. et Buckley, J.T. 1986. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the structural gene for the haemolytic toxin aerolysin from *Aeromonas hydrophila*. *Mol. Gen. Genet.* 204: 289-295.
- Hsu, C.-H., Lo, C.-Y., Liu, J.-K. et Lin, C.-S. 2000. Control of the Eel (*Anguilla japonica*) pathogens, *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda*, by bacteriophages. *J. Fish. Soc. Taiwan.* 27: 21-31.
- Hsu, F.-C., Carol, Y.-S. et Sobsey, M.D. 2001. Enteric bacteriophages as potential fecal indicators in ground beef and poultry meat. *J. Food Prot.* 65: 93-99.
- Imzilen, B., Lafdal, O.M.Y., Barakate, M., Hassani, L., Ouhdouch, Y., Boussald, A. et Jana, M. 1997. Pril-ampicillin-dextrin-ethanol agar for the isolation and quantification of *Aeromonas* spp. From polluted environmental waters. *J. Appl. Microbiol.* 82: 557-568.
- Jeney, Z. et Jeney, G. 1995. Recent achievements in studies on diseases of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture.* 129: 397-420.
- Kabir, S., Rosenstreich, D.L. et Mergenhagen, S.E. 1978. Bacterial endotoxins and cell membranes.

- Dans : *Bacterial toxins and cells membranes*. Édité par: J. Jeljaszewicz & T. Wadström. New York, É.U. pp. 59-87.
- Kanai, K. et Wakabayashi, H. 1984. Purification and some properties of protease from *Aeromonas hydrophila*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 50: 1367-1374.
- Kaneko, J., Kimorra, Y., Tomita, T. et Kamio, Y. 1997. Panton-valentine leukocidin genes in a phage-like particle isolated from mitomycin C-treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC 49775). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 1960-1962.
- Kanton Bern. 2003. Espèces de poissons. La biologie de la carpe. http://www.be.ch/cgibin/frameset.exe?http://www.vol.be.ch/lanat/fischerei/angelfischerei/franzoesisch/karpfen_f.htm (visité en avril 2004)
- Kator, H. et Rhodes, M. 2001. Elimination of fecal coliforms and F-specific RNA coliphage from oysters (*Crassostrea virginica*) relaid in floating containers. *J. Food Prot.* 64: 796-801.
- Kokjohn, T.A. 1991. Transduction: mechanism and potential for gene transfer in the environment. Dans: *Gene transfer in the environment*. Édité par: S.B. Levy et R.V. Miller. McGraw-Hill. New-York, É.U. pp.73-93.
- Lallier, R., Bernard, F. et Lalonde, G. 1984. Difference in the extracellular products of two strains of *Aeromonas hydrophila* virulent and weakly virulent for fish. *Can. J. Microbiol.* 30: 900-904.
- Lamers, C.H.J. et Van Muiswinkel, W.B. 1986. Natural and acquired agglutinins to *Aeromonas hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 619-624.
- Lederberg, J. 1996. Smaller fleas ad infinitum: Therapeutic bacteriophage redux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 3167-3168.
- Leveque, J.M. et Huet, G. 2003. Écoprospective. Voir autrement : Pour ou contre la pisciculture. <http://www.econovateur.com/rubriques/anticiper/voir0203.shtml> (visité en octobre 2004)
- Little, D.C. et Edwards, P. 1997. Contrasting strategies for inland fish and livestock production in

- Asia. Dans: *Recent advances in animal nutrition in Australia*. Éditions J.L. Corbett, M. Choct, J.V. Nolan & J.B. Rowe. Armadale, Australie. pp.77-85.
- Lund, V., Espiend, S. et Mikkelsen, H. 2003. Vaccine efficacy in spotted wolffish *Anarhichas minor*: relationship to molecular variation in A-Layer protein of atypical *Aeromonas salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.* 56: 31-42.
- Marsh, M.C. 1902. *Bacterium truttae*, a new bacterium pathogenic to trout. *Science*. 16: 706.
- McAllister, P.E. 1988. Infecciones viricas de peces cultivados. Dans : *Patologia en acuicultura*. M. Prensa Editor. Madrid, Spain. pp. 37-158.
- McCarthy, D.H. 1978. A study of the taxonomic status of some bacteria currently assigned to the genus *Aeromonas*. Thèse de Doctorat. Council of National Academic Awards, U.K.
- McCarthy, D.H. 1980. Some ecological aspects of the bacterial fish pathogen: *Aeromonas salmonicida*. Dans: *Aquatic microbiology*. Édité par: F.A. Skinner et J.M. Shewan. Academic Press. Londres, Angleterre. pp. 299-324.
- McCoy, R.H. et Pilcher, K.S. 1974. Peptone beef extract glycogen agar, a selective and differential *Aeromonas* medium. *J. Fish. Res. Board. Can.* 81: 1553-1555.
- Merino, S., Rubires, X., Aguilar, A. et Tomas, J.M. 1996. The O:34-antigen lipopolysaccharide as an adhesin in *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Letters*. 139: 97-101.
- Merino, S., Gavin, R., Luis Izquierdo, M.A., Maguire, M.E. et Tomas, J.M. 2001. The MgtE Mg²⁺ transport protein is involved in *Aeromonas hydrophila* adherence. *FEMS Microbiol. Letters* 198: 189-195.
- Merril, C.R., Biswas, B., Carlton, R., Jensen, N.C., Creed, G.J., Zullo, S. et Adhya, S. 1996. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 3188-3192.
- Michel, C. et Dubois-Darnaudpeys, A. 1980. Persistence of the virulence of *Aeromonas salmonicida* stains kept in river sediments. *Ann. Rech. Vét.* 11: 375-380.
- Middelboe, M. 2000. Bacterial growth rate and marine virus-host dynamics. *Microbial Ecology*. 40:

114-124.

- Nakai, T. et Park, S.C. 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res. Microbiol.* 153: 13-18.
- Naylor, R.L., Goldberg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H. et Troell, M. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature.* 405: 1017-1024.
- Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J. et Belosevic, M. 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 807-827.
- Nikoskelainen, S., Bylund, G. et Lilius, E.-M. 2004. Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 28: 581-592.
- Nieto, T.P., Toranzo, A.E. et Barja, J.L. 1984. Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the north-west of Spain. *Aquaculture.* 42: 193-206.
- Nord, C.J., Sjoberg, L., Wadstrom, T. et Wretling, B. 1975. Characterization of three *Aeromonas* and nine *Pseudomonas* species by extracellular enzymes and hemolysins. *Med. Microbiol. Immunol.* 161: 79-87.
- Northwest Fisheries Science Center. Fish Health / Microbiology Team. <http://research.nwfsc.noaa.gov/research/divisions/reutd/fhm/aero2.cfm> (visité en avril 2005)
- OCAD. 2002. Market Outlook in the International Fish & Seafood Sector; Canadian Perspective. Rapport produit par H.M. Johnson et associés. http://ocad-bcda.gc.ca/Study%20%20-%20PDF%20Mkt%20Outlook%20-%20Cdn%20Context_English.PDF (visité en avril 2005)
- Ogut, H. et Reno, P. 2004. Prevalence of furunculosis in Chinook salmon depends on density of the host exposed by cohabitation. *N. Amer. J. Aquaculture.* 66: 191-197.
- Ortega, C., Múzquiz, J.L., Docando, J., Planas, E., Alonso, J.L. et Simón, M.C. 1995. Ecopathology in

- aquaculture : risk factors in infectious disease outbreak. *Vet. Res.* 26: 57-62.
- Osawa, S., Furuse, K. et Watanabe, I. 1981. Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 164-168.
- Palumbo, S.A., Maxino, F., Williams, A.C., Buchanan, R.L. et Thayer, D.W. 1985. Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1027-1030.
- Park, S.C. et Nakai, T. 2003. Bacteriophage control of *Pseudomonas plecoglossicida* infection in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.* 53: 33-39.
- Park, S.C., Shimamura, I., Fukunaga, M., Mori, K.-I. et Nakai, T. 2000. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1416-1422.
- Paterson, W. D. 1968. Some bacteriophages specific for *Aeromonas salmonicida*. M.Sc. Thesis, Université de Guelph. Ontario. Canada.
- Pauly, D., Christensen, V., Dalsgaard, J., Froese, R. et Torres, Jr, F. 1998. Fishing down marine food webs. *Science.* 279: 860-863.
- Payment, P., Franco, E., Richardson, L. et Siemiatycki, J. 1991. Gastrointestinal health effects associated with the consumption of drinking water produced by the point-of-use domestic reverse-osmosis filtration units. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 945-948.
- Pêches et Océans Canada. 2002. Aquaculture. http://www.dfo-mpo.gc.ca/communic/statistics/aqua/aqua02_f.htm (visité en octobre 2004)
- Pelmont, J. 1993. Bactéries et environnement- Adaptations physiologiques. Presses Universitaires de Grenoble. France. 900 p.
- Popoff, M. 1971. Étude sur les *Aeromonas salmonicida*. II.- Caractérisation des bactériophages actifs sur les « *Aeromonas salmonicida* » et lysotypie. *Ann. Rech. Vét.* 2: 33-45.
- Popoff, M. et Vieu, J.F. 1970. Bactériophages et lysotypie d'*Aeromonas salmonicida*. *C. R. Acad. Sci.*

Natl. 270: 2219-2222.

Porphyromonas Gingivalis Genome Project. 2002. <http://www.pgingivalis.org/pathogenesis.htm>
(visité en mai 2004)

Potempa, J., Pike, R. et Travis, J. 1995. The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either arg-gingipain and lys-gingipain. *Infect. Immun.* 63: 1176-1182.

Reali, D., Rosati, S., Pinto, B. et Iavarone, M.R. 1991. Preliminary investigation of suitable bacteria strains for the detection of bacteriophages in environmental polluted surface water. *Zbl. Hyg.* 192: 248-257.

Roberts, R.J. 1993. Motile aeromonad septicemia. Dans *Bacterial disease of fish*. Blackwell Scientific Publications, Édité par: V. Inglis, R.J. Roberts and N.R. Bromage. Oxford, UK. pp. 143-156.

Rodgers, C.J., Pringle, J.H., McCarthy, D.H. et Austin, B. 1981. Quantitative and qualitative studies of *Aeromonas salmonicida* bacteriophage. *J. Gen. Microbiol.* 125: 335-345.

Rodriguez, L.A., Ellis, A.E. et Nieto, T.P. 1992. Purification and characterization of an extracellular metalloprotease, serine protease and hemolysin of *Aeromonas hydrophila* strain B₃₂: all are lethal for fish. *Microb. Pathogen.* 13: 17-24.

Roger, O.E., Dacanay, A., Goguen, M., Pinto, D.M. et Ross, N.W. 2004. Differential proteomic analysis of *Aeromonas salmonicida* outer membrane proteins in response to low iron and in vivo growth conditions. *Proteomics.* 4: 1074-1085.

Schrag, S.J. et Mittler, J.E. 1996. Host-parasite coexistence: role of spatial refuges in stabilizing bacteria-phage interactions. *Am. Nat.* 148: 348-377.

Schreck, C.B. et Li, H.W. 1991. Performance capacity of fish: stress and water quality. Dans: *Aquaculture and water quality. Advances in World Aquaculture* 3. Édité par: D.E. Brune et J.R. Tomasso. World Aquaculture

Society. Baton Rouge, Louisianne. É.U. pp. 21-29.

Schreck, C.B. 1996. Immunomodulation: endogenous factors. Dans: *The fish immune system: organism, pathogen, and environment*. Academic Press. Édité par: G. Iwama & T. Nakanishi. pp. 311-319.

Schubert, R.H.W. 1974. *Aeromonas*. Dans: *Bergey's manual of determinative bacteriology: 8th edition*. Édité par: Williams & Wilkins, Baltimore, É.U. pp. 345-548.

Shewan, J.M. 1961. The microbiology of sea-water fish. Dans: *Fish as food. Vol. I*. Édité par: G. Borgstrom, New York, É.U. pp. 487-560.

Shieh, H.S. 1985. Correlation between cell virulence and protease toxicity of *Aeromonas salmonicida* isolates. *Microbios Letters*. 28: 69-72.

Shotts, E.B. et Nemetz, T.G. 1993. Selected bacterial diseases of salmonids. Dans: *Fish Medecine*. Édité par :W.B. Saunders. Toronto, Canada. pp. 364-373.

Shotts, E.B. et Rimler, R. 1973. Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Microbiol.* 26: 550-553.

Shrayer, D. 1996. Felix d'Herelle in Russia. *Bull. Inst. Pasteur*. 94: 91-96.

Skerman, V.B.D., McGowan, V. et Sneath, P.H.A. 1980. Approved lists of bacterial names. *International J. Syst. Bacteriol.* 30: 225-420.

Slopek, S., Weber-Dabrowska, B., Daçbrowski, M. et Kucharewicz-Krukowska, A. 1987. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. *Arch. Immunol. Exp. Therapy (Warsz)*. 35: 569-583.

Slots, J. et Rams, T.E. 1993. Pathogenicity. Dans : *Biology of the species Porphyromonas gingivalis*. Boca Raton, Floride, É.U. pp. 127-138.

Smith, H.W. et Huggins, M.B. 1983. Effectiveness of phages in treating experimental *E. coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2659-2675.

- Smith, H.W., Huggins, M.B. et Shaw, K.M. 1987. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhea in calves by means of bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1111-1126.
- Soothill, J.S. 1992. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *J. Med. Microbiol.* 37: 258-261.
- Soothill, J.S. 1994. Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by *Pseudomonas aeruginosa*. *Burns.* 20: 209-211.
- Stoskopf, M.K. 1993. *Fish Medicine*. Philadelphie: W.B. Saunders. 882 p. ISBN 0-7216-2629-7
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. et Morris, J.G. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents Chemotherm.* 45: 649-659.
- Summers, W.C. 1993. Cholera and plague in India : the bacteriophage inquiry of 1927-1936. *J. History Med. Allied Sc.* 48: 275-301.
- Svensson, U. et Chritiansson, A. 1991. *Practical phage control*. FIL/IDF, Bulletin 263.
- Tajima, K., Takahashi, T., Ezura, Y. et Kimura, T. 1983. Studies on the virulent factors produced by *Aeromonas salmonicida*, a causative agent of furunculosis in *Salmonidae*. I. Purification of the extracellular protease of *Aeromonas salmonicida* Ar-4. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. Hokodate Japon.* 34: 104-110.
- Thornton, J.C., Garduno, R.A. et Kay, W.W. 1994. The development of a live vaccines for furunculosis lacking the A-layer and O-antigen of *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish. Dis.* 17: 195-204.
- Trust, T.J. 1975. Bacteria associated with de gills of salmonids fishes in freshwater. *J. Appl. Bacteriol.* 38: 225-233.
- Trust, T.J. et Sparrow, R.A.H. 1974. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fish. *Can. J. Microbiol.* 20: 1219-1228.
- Tsoi, S.C.M., Ewart, K.V., Penny, S., Melville, K., Liebscher, R.S., Brown, L.L. et Douglas, S.E.

2004. Identification of immune-relevant genes from Atlantic salmon using suppression subtractive hybridization. *Marine Biotech.* 6: 199-214.
- Ubakata, K., Konno, M. et Fujii, R. 1975. Transduction of drug resistance to tetracycline, chloramphenicol, macrolides, lincomycin and clindamycin with phages induced from *Streptococcus pyogenes*. *J. Antibiot.* 28: 681-688.
- Uhland, F.C., Mikaelien, I. et Martineau, D. 2000. Maladies reliées aux *Aeromonas* mobiles et aux *Pseudomonas* : les maladies bactériennes ulcératives. Dans : *Maladies des poissons d'eau douce du Québec; Guide de diagnostic*. Presses de l'Université de Montréal. Montréal, Canada. pp. 334-335.
- Université de Montréal. 2003. Rapport des activités du laboratoire d'ichtyopathologie du 31 mars 2002- 31 mars 2003. http://www.medvet.umontreal.ca/pathologie_microbiologie/ichtyopathologie/rapport_02_03a.htm (visité en janvier 2005)
- USEnvironmental Protection Agency. 2000. Method 1605 : *Aeromonas* in finished water by membrane filtration. Dans : *Environmental Protection Agency's (EPA's) data gathering and monitoring programs under the Safe Drinking Water Act*. Washington D.C. É.U. 30 pages.
- USGS. 1997. Antimicrobial resistance in *Aeromonas salmonicida*. <http://biology.usgs.gov/news/97-009.htm> (visité en octobre 2004)
- Wagner, P.L. et Waldor, M.K. . 2002. Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect. Immun.* 70 : 3985-3993.
- Wiggins, B.A. et Alexander, M. 1985. Minimum bacterial density for bacteriophage replication : implication for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl Environ. Microbiol.* 49: 19-23.
- Wu, J.-L. et Chao, W.-J. 1984. The epizootic of milkfish vibriosis and its biological control by bacteriophage AS10. *COA fisheries series.* 1: 34-46.
- Yoshimizu, M., Kamiyama, K., Kimura, T. et Sakai, M. 1976. Studies on the intestinal microflora of

salmonids. IV. The intestinal microflora of freshwater salmon. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 42: 1281-1290.

Zhong, Y. et Power, G. 1997. Fisheries in China : progress, problems, and prospects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 224-238.