

Faculté des bioingénieurs

Étude de la diversité des espèces de *Campylobacter* dans les fientes de volailles en Wallonie et essais d'isolement de campylophages

Auteur: Célie De Beukelaer
Promoteur: Pr Jacques Mahillon (UCL/ELI/ELIM/MIAE)
Lecteurs: Pr Claude Bragard (UCL/ELI/ELIM)
Dr Louise Hock (LIST)

Année académique 2020-2021
Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du diplôme de
Bioingénieur: sciences agronomiques

REMERCIEMENTS

En préambule de ce mémoire, j'aimerais adresser mes remerciements aux personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail qui marque la fin de cette fabuleuse aventure que sont les études universitaires.

Tout d'abord, je tiens à remercier le Professeur Jacques Mahillon, mon promoteur, pour m'avoir permis de réaliser mon mémoire dans son laboratoire ainsi que pour ses conseils avisés procurés tout au long de l'année.

Je souhaite ensuite remercier Manon Nuytten qui m'a encadrée durant la réalisation de ce mémoire et qui s'est occupée de ce projet inédit, pourtant si éloigné de son sujet de thèse.

Je tiens à remercier particulièrement Carole Michaux, sans qui la finalité de ce mémoire n'aurait pas été la même. Ses conseils et recommandations, aussi bien sur le plan expérimental que lors de la rédaction de ce document, ont été d'une aide précieuse. Je la remercie également pour sa disponibilité et sa bonne humeur qui ont grandement contribué à l'accomplissement de ce travail.

Je remercie également Louise Hock qui a accepté de travailler en collaboration sur ce projet depuis le Luxembourg. Son aide et ses idées ont été nécessaires à la finalisation de ce mémoire.

En outre, je remercie Françoise Decocq, Mr. Krantz et tous les éleveurs de volailles qui ont gentiment accepté que je vienne échantillonner des fientes dans leurs jardins ou exploitations.

Mes remerciements se dirigent maintenant vers les membres du laboratoire MIAE pour l'accueil qui m'a été fait. Leur aide et leurs conseils m'ont été très utiles durant cette année. Je remercie également les autres mémorants, et surtout Élise, pour tous ces bons moments partagés.

Merci au Professeur Claude Bragard et au Docteur Louise Hock d'avoir accepté d'être lecteurs et membres du jury de ce mémoire.

Enfin, mes pensées vont vers ma famille et mes amis les pm qui sont d'un soutien sans faille depuis le début de mes études. Je tiens également à remercier Nico, mes colocataires et le brassi qui m'ont permis de tenir le coup durant cette drôle d'année. Enfin, je remercie Jonathan pour la relecture de ce mémoire ainsi que le soutien et les encouragements prodigués ces 3 dernières années.

Célie

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	acide aminé
ADN	Acide Désoxyribonucléique
API	Appareils et Procédés d'Identification
ARN	Acide Ribonucléique
ARNr	Acide Ribonucléique ribosomique
ATP	Adénosine Triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Bouillon coeur-cerveau)
BIO	Biologique
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Cytosine
CBD	<i>Cell wall Binding Domain</i> (Domaine de liaison à la paroi cellulaire)
CC	<i>Clonal Complex</i> (Complexe clonal)
CFA	<i>CampyFood Agar</i> (Gélose CampyFood)
CPS	<i>Capsular Polysaccharides</i> (Polysaccharides capsulaires)
CDT	<i>Cytolethal distending toxin</i> (Toxine Cytolétale Distendante)
cgMLST	<i>core genome Multilocus Sequence Typing</i>
Cia	<i>Campylobacter invasion antigens</i> (Antigènes d'invasion de <i>Campylobacter</i>)
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> (Unité Formant des Colonies)
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (technique d'immunoabsorption par enzyme liée)
EPT	Eau Peptonée Tamponnée
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Guanine
GBS	<i>Guillain-Barré Syndrome</i> (Syndrome de Guillain-Barré)
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
ISO	<i>International Organisation for Standardisation</i>
LIST	<i>Luxembourg Institute of Science and Technology</i>
LOS	Lipo-oligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharide

mCCDA	<i>modified Charcoal Cefoperazonedeoxycholate Agar</i> (Gélose de charbon modifié au Céfopérazone Désoxycholate)
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
Mb	Méga paires de bases
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate sous forme réduite
NZCYM	<i>NZ Amine, Casamino acids, Yeast extract, MgSO₄</i> (Milieu composé d'hydrolysats de caséine, acides casamino, extrait de levure et magnésium)
O/N	Over Night
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Réaction en chaîne par polymérase)
PEP	Phosphoénol Pyruvate
RAPID	<i>RAPID' Campylobacter</i>
RBP	<i>Receptor Binding Protein</i> (Protéine de liaison au récepteur)
ST	<i>Sequence type</i> (Type de séquence)
spp.	<i>species plurimae</i>
subsp.	<i>subspecies</i>
T3SS	<i>Type III Secretion System</i> (Système de Sécrétion de type III)
TAE	Tris-Acetate EDTA
TSI	<i>Triple Sugar Iron agar</i> (gélose à trois sucres et sel de fer)
TLR5	<i>Toll-like Receptor 5</i> (Récepteur de type Toll-5)
UV	Ultraviolet
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VNC	<i>Viable but Not culturable</i> (Viable mais Non-Cultivable)

TABLE DES MATIÈRES

1	Introduction	1
1.1	Le genre <i>Campylobacter</i>	1
1.1.1	Généralités	1
1.1.2	Métabolisme	4
1.1.3	Mécanismes de survie	5
1.1.4	Facteurs de virulence et de pathogénicité	6
1.1.5	Aspect clinique des infections dues à <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i>	8
1.2	Écologie de <i>Campylobacter</i> spp.	10
1.2.1	<i>Campylobacter</i> spp. chez la volaille	10
1.2.2	<i>Campylobacter</i> spp. chez les animaux domestiques et sauvages . . .	11
1.2.3	<i>Campylobacter</i> spp. dans l'environnement	12
1.3	Contrôle et prévention dans les élevages avicoles	12
1.3.1	Biosécurité	13
1.3.2	Traitement de l'eau	13
1.3.3	Probiotiques	13
1.3.4	Vaccination	14
1.3.5	Bactériophages	14
1.4	Les bactériophages	15
1.4.1	Classification	15
1.4.2	Cycle de vie des phages	16
1.4.3	Applications des phages	18
1.5	Phages de <i>Campylobacter</i> spp.	20
1.6	Dénombrement des <i>Campylobacter</i> spp.	21
1.6.1	CampyFood et RAPID' <i>Campylobacter</i>	21
1.6.2	Test d'agglutination au latex	22
1.6.3	Galleries API Campy [®]	23
2	Objectifs	24
3	Matériel et méthodes	25
3.1	Milieux de culture et tampons	25
3.1.1	RAPID' <i>Campylobacter</i>	25
3.1.2	CampyFood	25
3.1.3	Solution de Ringer 1/4	26
3.1.4	Eau peptonée tamponnée	27
3.1.5	Gélose au sang	27

3.1.6	Triple Sugar Iron (TSI)	28
3.1.7	Bouillon de thioglycolate avec résazurine	29
3.1.8	NZCYM	30
3.1.9	SM Buffer	30
3.1.10	Bouillon cerveau-cœur supplémenté en cations (cBHI)	31
3.2	Échantillons	31
3.3	Isolement de souches de <i>Campylobacter</i> thermotolérantes	33
3.3.1	Ensemencement	33
3.3.2	Isolement	33
3.3.3	Confirmation des colonies présomptives	33
3.3.4	Identification des souches par Galeries API Campy®	34
3.3.5	Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S	36
3.4	<i>Multi-Locus Sequence Typing</i> (MLST)	38
3.5	Isolement des phages de <i>Campylobacter</i> spp.	39
3.5.1	Extraction des phages à partir des échantillons	39
3.5.2	Isolement des phages de <i>Campylobacter</i> spp.	39
3.5.3	Purification des phages de <i>Campylobacter</i> spp.	39
4	Résultats et discussion	41
4.1	Expériences visant à isoler un campylophage	41
4.1.1	Matériel biologique utilisé	43
4.1.2	Protocole mis en place	44
4.1.3	«Halos» visibles	46
4.2	Isolement et identification de souches de <i>Campylobacter</i> thermotolérantes	47
4.2.1	Dénombrement des colonies de <i>Campylobacter</i> thermotolérantes	47
4.2.2	Identification des souches de <i>Campylobacter</i> et diversité	51
4.3	Séquençage MLST	54
4.4	Évaluation de la méthode d'isolement	57
4.4.1	Milieux sélectifs RAPID' <i>Campylobacter</i> et CampyFood	57
4.4.2	Confirmation des colonies présumées	61
4.4.3	Galeries API Campy®	63
5	Conclusion et perspectives	66
	Bibliographie	70
	Annexe	83

1 INTRODUCTION

À ce jour, les bactéries du genre *Campylobacter* spp. font partie des principaux pathogènes d'origine alimentaire aux côtés de *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* et des Norovirus. Elles provoquent la campylobactériose qui est une maladie diarrhéique. Elle représente la zoonose la plus communément reportée au monde, aussi bien dans les pays développés que dans ceux en voie de développement, et ce depuis 2005. En 2019, on dénombre environ 220 000 cas de campylobactériose dans l'Union européenne, c'est-à-dire environ 60 cas sur 100 000 personnes. Ce taux est constant depuis 2014. Les deux espèces *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* sont les plus courantes et causent respectivement 83,1% et 10,8% des infections recensées chez l'humain. Les espèces *Campylobacter lari*, *Campylobacter fetus* et *Campylobacter upsaliensis* sont chacune responsables de 0,1% de ces infections. Bien que le nombre de contaminations soit élevé à travers le monde, le taux de mortalité est de seulement 0,03% (European Food Safety Authority *et al.*, 2021).

1.1. Le genre *Campylobacter*

1.1.1. Généralités

Les bactéries appartenant au genre *Campylobacter* sont Gram négatif, non-sporulantes et possèdent un taux en GC compris généralement entre 29 et 47%. *C. jejuni* et *C. coli* possèdent un génome de taille modeste qui compte environ 1,7 Mb. Celui-ci est relativement petit par rapport à d'autres pathogènes alimentaires tels que *L. monocytogenes* (2,9 Mb) et *Escherichia coli* (4,6 Mb) (García-Sánchez *et al.*, 2018). La majorité des *Campylobacter* sont microaérophiles, ce qui signifie que leur croissance exige une concentration en oxygène moléculaire (O₂) de 10% ainsi qu'une concentration en gaz carbonique (CO₂) de 5% dans le milieu. La croissance de beaucoup d'espèces de *Campylobacter* requiert une température de 37°C. Cependant, les espèces pathogènes à l'humain sont thermotolérantes et se développent jusqu'à la température de 42°C. A l'instar de beaucoup de micro-organismes, leur croissance est inhibée à 4°C. Elles sont sensibles à l'acidité et ne se développent pas dans les milieux aux valeurs de pH trop faibles. Ceci constitue un mécanisme de défense naturel de l'hôte, empêchant l'invasion du pathogène dans son estomac (Garrity *et al.*, 2006 ; Svensson *et al.*, 2008).

Classification

Durant plusieurs siècles, *Campylobacter* a été responsable d'énormément de maladies animales et humaines sans que le corps scientifique ne soupçonne son existence. On apparentait alors les espèces découvertes au genre *Vibrio* car celles-ci présentent le même

aspect et une mobilité similaire. On les appelait alors «vibrions microaérophiles». Il faut attendre 1963 pour que Sebald et Vérons examinent leur comportement non-fermentatif ainsi que leur composition en ADN. Ils proposent alors de regrouper ces vibrions en un nouveau genre : *Campylobacter*. Le mot *Campylobacter* est issu du grec où *kampulos* signifie «incurvé» et *bacter* «bâtonnet» (Dromigny, 2007 ; Garénaux, 2008).

Le genre *Campylobacter* appartient au règne des Eubactéries et à l'embranchement des *Proteobacteria* de la classe ϵ . Il fait également partie de l'ordre des Campylobacterales, qui se compose de trois familles : *Campylobacteraceae*, *Helicobacteraceae* et *Hydrogenimonadaceae*. Avec les genres *Arcobacter* et *Sulfurospirillum*, *Campylobacter* forme la famille des *Campylobacteraceae* (Garritty *et al.*, 2006).

Actuellement, le genre *Campylobacter* comprend 32 espèces et 9 sous-espèces officiellement décrites qui forment un ensemble très hétérogène. On classe ces espèces en cinq groupes phylogénétiques (Fig. 1.1) contenant chacun des organismes pathogènes (Costa & Iraola, 2019). Les espèces les plus communes sont *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. fetus*, *Campylobacter sputorum* biovar *sputorum* ou encore *C. lari* (Dromigny, 2007).

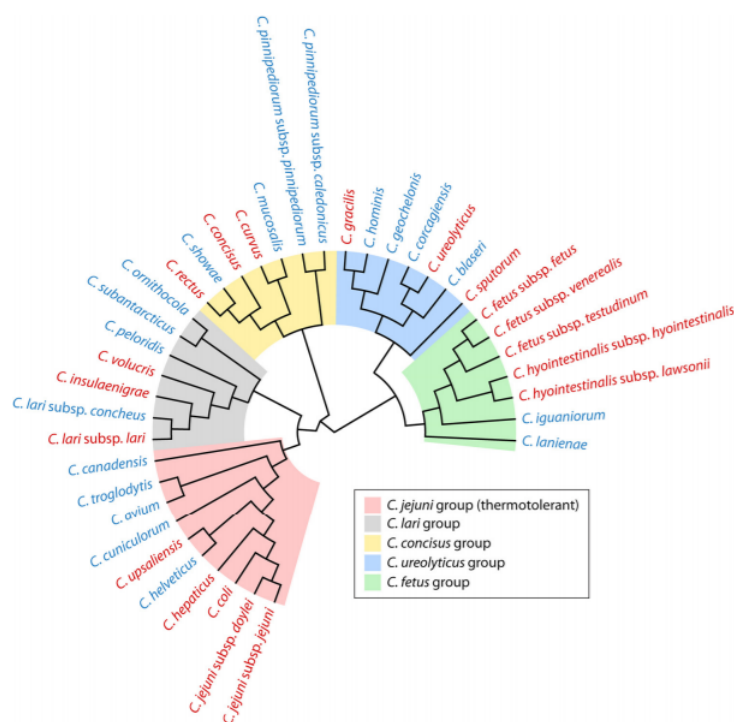


Figure 1.1. Les cinq groupes phylogénétiques du genre *Campylobacter*. Le nom des espèces est coloré en rouge pour les espèces associées à des infections chez l'homme et les animaux, ou en bleu pour les espèces pour lesquelles le lien avec des infections humaines et animales n'est pas documenté, Costa & Iraola (2019).

Morphologie

Les bactéries du genre *Campylobacter* ont la forme de bâtonnets minces et incurvés, en spirale ou en «forme de S», d'un diamètre de 0,2-0,8 μm et d'une longueur de 0,5-

5 μm (Fig. 1.2). Les cellules, sous forme vibroïde, présentent une ou plusieurs spirales et peuvent mesurer jusqu'à 8 μm . Dans les vieilles cultures sur gélose, les cellules peuvent également adopter une forme coccoïde de 0,5 μm de diamètre (Garrity *et al.*, 2006). On a observé que ce changement de morphologie implique une réduction de la «cultivabilité» des cellules mais le maintien de leur viabilité. Ce changement est certainement impliqué dans le phénomène VNC (Viable mais Non Cultivable), état dans lequel les bactéries conservent une activité métabolique mais ne sont pas cultivables par les méthodes conventionnelles disponibles en laboratoire (Svensson *et al.*, 2008).

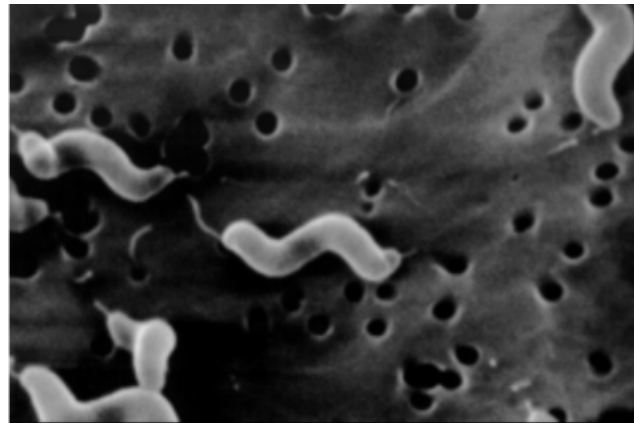


Figure 1.2. Microscopie électronique de *C. jejuni*. Altekruse *et al.* (1999).

La surface cellulaire de *Campylobacter* est constituée des mêmes composants de surface que la plupart des bactéries à Gram négatif, c'est-à-dire une structure bimembranée agencée de l'extérieur vers l'intérieur comme suit : la membrane externe (contenant des lipopolysaccharides - LPS), l'espace périplasmique qui comporte la paroi et la membrane plasmique en contact avec l'intérieur de la cellule. Les polysaccharides capsulaires (CPS) jouent un rôle dans la virulence des souches pathogènes et permettent la différenciation des 47 sérotypes de *Campylobacter* (Guerry *et al.*, 2012). Certaines espèces comme *C. fetus* et *C. rectus* possèdent une *S-layer* qui est une couche (*layer*) cellulaire monomoléculaire de surface composée de protéines ou de glycoprotéines protégeant la cellule et contribuant à sa virulence. Cette structure, notamment présente chez les archées et quelques bactéries, n'a cependant pas été observée chez *C. jejuni* et *C. coli*. L'expression de pili n'a jamais été démontrée bien que certaines souches développent des structures *pili-like* une fois exposées aux sels biliaires (Dromigny, 2007).

La plupart des campylobactéries présentent une mobilité caractéristique en «tire-bouchon». Ce mouvement particulier est permis par un flagelle unique situé à une ou aux deux extrémité(s) de la cellule. Chez les procaryotes, le flagelle est composé d'un filament flagellaire O-glycosylé, d'un crochet et d'un corps basal qui se trouve dans la partie interne à la cellule. Le filament et le crochet forment la partie visible du flagelle tandis que le crochet transmet l'énergie nécessaire au mouvement du filament. Ce crochet mesure 105 nm et le filament présente un diamètre de 20 nm et une longueur de 2

à 3 fois celle de la bactérie. Il permet à *Campylobacter* d'être mobile dans la muqueuse intestinale. Les flagelles de *C. jejuni* sont des antigènes puissants qui contribuent à la diversité antigénique des souches. C'est d'ailleurs l'élément principal de la méthode de typage pour l'espèce (Dromigny, 2007 ; Garénaux, 2008 ; Garrity *et al.*, 2006). De plus, les flagelles ont la capacité de réguler la virulence et de faciliter l'agglutination des cellules dans l'intestin (Guerry, 2007). Les flagelles des *Campylobacter* sont donc indispensables pour la colonisation des cellules épithéliales et pour leur développement dans le tractus digestif.

1.1.2. Métabolisme

Les cellules de *Campylobacter* sont microaérophiles et leur croissance nécessite une concentration en oxygène dans le milieu relativement basse (Garrity *et al.*, 2006). Cependant, certaines espèces telles que *C. fetus* peuvent croître en conditions anaérobiques (Park, 2002). *C. jejuni* et *C. coli* sont quant à eux dépendants à l'oxygène afin d'assurer la synthèse de nucléotides par des ribonucléotides réductases. L'O₂ est également utile comme accepteur d'électrons pour l'une des deux oxydases qui entre en jeu lors de la respiration microaérophile. Cependant, un excès d'oxygène peut rapidement inactiver les enzymes pyruvate oxidoréductase et 2-oxoglutarate oxydoréductase impliquées dans les voies énergétiques des cellules (Burnham & Hendrixson, 2018).

Des analyses *in vivo* et *in vitro* révèlent que *C. jejuni* ne peut cataboliser qu'une petite partie du carbone naturel et possède un anabolisme très coûteux en énergie. Le catabolisme des glucides est très limité pour plusieurs raisons. D'une part, *Campylobacter* ne possède pas de transporteurs spécifiques au glucose et au galactose sur sa membrane. D'autre part, on déplore l'absence de la 6-phosphofructokinase, l'enzyme principale de la glycolyse. Néanmoins, *Campylobacter* possède les enzymes nécessaires à la portion non-oxidative de la voie des pentoses phosphates (Stahl *et al.*, 2012). Cette voie permet la production de Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate sous forme réduite (NADPH), de ribose-5-phosphate utilisé lors de la synthèse des nucléotides et d'érythrose-4-phosphate, précurseur d'acides aminés aromatiques. Il est donc possible que cette espèce puisse métaboliser les pentoses mais il n'existe aucune certitude.

Les cellules utilisent alors des acides aminés (aa) comme source de carbone. *Campylobacter* favorise l'utilisation de la sérine, l'aspartate, l'asparagine, la glutamine, le glutamate et la proline. La sérine, une fois catabolisée, permet de recréer 10 autres aa. Cet aa peut aussi être utilisé tel quel afin de former du pyruvate qui intervient dans la production d'énergie en entrant dans le cycle de Krebs sous forme d'oxaloacétate ou étant converti en acétate via l'acétyl CoA. C'est l'aa le plus utilisé par la bactérie pour la production d'énergie. La transformation de l'acétate en phosphoénol pyruvate (PEP) est également très importante car il permet la néoglucogenèse, voie métabolique permettant la production de saccharides, de LOS, des protéines de glycolisation et de CPS. Le glutamate et

l'aspartate quant à eux sont transformés en 2-oxoglutarate oxydoréductase et en fumarate pour alimenter directement le cycle de Krebs (Burnham & Hendrixson, 2018).

C. jejuni peut également utiliser des acides gras à chaîne courte produits dans l'intestin de leur hôte par elle-même ou par d'autres bactéries présentes. Le butyrate, le propionate, le lactate et l'acétate sont tous présents dans l'intestin mais seul le lactate et l'acétate sont transportés et métabolisés par *C. jejuni* et *C. coli*. L'acétate est alors utilisé dans le cycle de Krebs et le lactate est transformé en pyruvate (Stahl *et al.*, 2012).

Le métal le plus important pour les *Campylobacter* est le fer. En effet, en cas d'apport réduit en fer, la croissance de ces bactéries est fortement réduite. L'utilisation majeure du fer par les cellules est la formation de complexes fer-soufre, éléments clés dans le transport d'électrons, le métabolisme de la sérine et du L-lactate ainsi que celui du cycle de Krebs. Ces complexes sont sensibles aux molécules d'O₂, ce qui explique en partie le caractère microaérophile des *Campylobacter*. Ces bactéries ont également besoin de molybdène et de tungstène pour activer certaines enzymes et en tant que donneur d'électrons, respectivement. Le zinc et le cuivre présentent également une utilité au métabolisme des campylobactéries mais cette dernière n'est pas encore totalement expliquée (*ibid.*).

1.1.3. Mécanismes de survie

État VNC

La majorité des souches de *Campylobacter* ont la particularité d'entrer en état VNC. Ce phénomène apparaît lors des périodes de stress environnemental (e.g. basse température, pH acide, absence de nutriments). Les bactéries entrent alors en état de dormance métabolique : celles-ci survivent mais sont incapables de se reproduire dans le milieu.

La transition vers l'état VNC s'accompagne d'une modification de la forme des cellules qui prennent une forme coccoïdale (Svensson *et al.*, 2008). Lorsque *Campylobacter* est sous forme VNC, le pathogène s'avère être plus résistant aux désinfectants, n'est plus détectable dans les cultures en laboratoire (même si l'on effectue une étape d'enrichissement) et peut survivre dans ces conditions durant 7 mois. De plus, les bactéries sous cette forme continuent d'exprimer des gènes de virulence, ce qui représente un risque d'infection chez l'hôte (Magajna & Schraft, 2015). Une fois le stress levé, les cellules reprennent une activité métabolique normale. C'est en partie à cause de ce phénomène que le contrôle de *Campylobacter* représente une telle difficulté pour la santé publique (Oliver, 2000).

Formation de biofilms

Les biofilms sont définis comme étant un amas de plusieurs bactéries attachées à une surface biotique ou non et enrobées d'une matrice polymérique composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques. La formation de ces biofilms est observée en réponse à des signaux, qu'ils soient environnementaux ou produits par d'autres cellules

bactériennes. Ils offrent une protection contre la dessiccation, les biocides ou encore le système immunitaire de l'hôte. Les espèces *C. jejuni* et *C. coli* ont la capacité de former ces biofilms sur les surfaces d'équipement des usines de transformation alimentaire mais aussi dans le système d'approvisionnement en eau à la ferme. Cela représente une source de contamination constante pour la nourriture et les animaux, contamination qui remonte bien souvent jusqu'à l'humain. Dès lors, on considère les biofilms comme étant abondamment responsables de la persistance et la survie de *Campylobacter* (Svensson *et al.*, 2008 ; Tremblay *et al.*, 2014).

1.1.4. Facteurs de virulence et de pathogénicité

Plusieurs étapes sont nécessaires à la colonisation du tractus digestif par *Campylobacter*. La première étape est le déplacement des bactéries dans la muqueuse intestinale. S'en suit l'adhésion ainsi que l'invasion des cellules épithéliales et enfin la production de toxines.

Mobilité

La migration des bactéries le long de la muqueuse intestinale est nécessaire à *Campylobacter* afin d'échapper aux environnements hostiles et d'atteindre les sites d'adhésion des cellules de l'hôte. Le phénomène de mobilité est assuré à la fois par les flagelles et le chimiotactisme.

Les flagelles sont composés d'un multimère protéique, la flagelline, dont une sous-unité majeure FlaA et une mineure FlaB, codées respectivement par les gènes *flaA* et *flaB* (Leflon-Guibout & Munier, 2016). Chez les membres du genre *Campylobacter*, les flagellines présentent une structure différente de celles des autres bactéries. De ce fait, les récepteurs tels que le TLR-5 (impliqués dans le système immunitaire de l'homme) ne reconnaissent pas le pathogène et aucune réponse immunitaire de la part de l'hôte n'est enclenchée (Garcia-Sánchez *et al.*, 2018).

Le chimiotactisme est un mécanisme permettant le déplacement des bactéries motiles vers un environnement aux conditions favorables grâce aux substances produites par les cellules de l'hôte. Les chimio-attracteurs principaux pour *Campylobacter* sont les mucines et les glycoprotéines, les constituants primaires du mucus. Certains substrats métaboliques comme les sucres, les acides aminés et les acides organiques sont également des chimio-attracteurs. À l'inverse, *C. jejuni* est fortement repoussé par la bile (Bolton, 2015 ; Leflon-Guibout & Munier, 2016).

Adhésion et invasion

La capacité de *C. jejuni* à adhérer aux cellules du tractus gastro-intestinal de l'hôte est assurée par plusieurs protéines de liaison se trouvant à la surface des bactéries, les

adhésines. Ces protéines se lient à la fibronectine qui est une glycoprotéine se trouvant dans la matrice extracellulaire des cellules humaines. L'adhésion de *Campylobacter* aux cellules de l'hôte est médiée par les adhésines CadF, FlpA, JlpA et PEB1 (García-Sánchez *et al.*, 2018 ; Flanagan *et al.*, 2009 ; Pei & Blaser, 1993).

Quant à l'invasion des cellules hôtes, *Campylobacter* utilise des protéines appelées antigènes d'invasion de *Campylobacter* (Cia). Les Cia sont synthétisées par la bactérie en présence de bile et amenées dans le cytosol des cellules hôtes par les flagelles. En effet, les flagelles de *Campylobacter* peuvent adopter un comportement homologue au Système de Sécrétion III (T3SS). Ce système consiste en l'injection de protéines effectrices dans le cytoplasme de la cellule à l'aide d'une nanoseringue moléculaire (Barrero-Tobon & Hendrixson, 2012 ; Dasti *et al.*, 2010).

Production de toxines

Bien que *Campylobacter* sécrète plusieurs toxines différentes, seule la toxine cytolétale distendante (CDT) est identifiée et caractérisée à ce jour. En 2004, Bang *et al.* isolent 117 souches de *C. jejuni* et détectent, entre autres, la présence du gène codant cette toxine dans 88% des souches testées. Ils prouvent que 97,4% d'entre elles produisent cette toxine sur des cellules Vero (lignée cellulaire utilisée pour la culture cellulaire) et 89,7% sur des cellules de colon en culture. Cependant, ces toxines sont produites par d'autres espèces que *C. jejuni* telles que *C. lari*, *C. coli*, *C. fetus* et *C. upsaliensis* (*ibid.*).

Les CDT sont des toxines de type AB ($A = \text{Activity}$, $B = \text{Binding}$), composées de 3 sous-unités «AB₂». La sous-unité CdtB est l'unité active et les CdtA et CdtC servent à se lier à la cellule hôte et à faire entrer l'unité active dans celle-ci. Ces toxines provoquent la distension des cellules eucaryotes et l'interruption du cycle cellulaire menant à la mort de la cellule (Lara-Tejero & Galán, 2002).

Ces toxines ne sont pas spécifiques à *Campylobacter*. On les retrouve d'ailleurs dans plusieurs bactéries à Gram négatif telles que *Escherichia coli* (où les effets ont été décrits pour la première fois), *Shigella* spp., *Helicobacter hepaticus*, *Haemophilus ducreyi* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Lindmark *et al.*, 2009).

Les polysaccharides de surface

Comme énoncé précédemment, la surface de *Campylobacter* comporte plusieurs classes de polysaccharides. Ici, on s'intéresse surtout aux lipo-oligosaccharides (LOS) et aux polysaccharides capsulaires (CPS). Les LOS sont des molécules composées d'un noyau oligosaccharique et d'un lipide A. Ils exercent plusieurs rôles tels que l'évasion immunitaire, l'adhésion et l'invasion des cellules hôtes. L'addition d'acide sialique aux LOS renforce leur pouvoir invasif et réduit l'immunogénicité des souches de *C. jejuni*. De plus, les LOS sialylés sont capables d'imiter l'apparence d'antigènes humains ce qui peut provoquer des maladies auto-immunes chez l'hôte (Revez & Hänninen, 2012 ; Bolton, 2015).

L'ensemble des CPS forment un «manteau» à la surface des cellules de *C. jejuni* et *C. coli*, ce qui augmente leur capacité de survie, d'adhérence et d'évasion immunitaire. La composition des CPS varie énormément d'une souche à l'autre mais ils comportent généralement des heptoses liés grâce à des liaisons O-méthyl phosphoramidate. Cette diversité permet d'identifier les différents sérotypes de l'espèce. En plus d'être un facteur de virulence, ces polysaccharides confèrent aux cellules une protection contre la dessiccation et aident à la formation de biofilms (García-Sánchez *et al.*, 2018 ; Guerry *et al.*, 2012).

Les *Campylobacter* possèdent également des systèmes de N- et d'O-glycosylation. La N-glycosylation entraîne la modification de plus de 60 protéines périplasmiques de la cellule hôte, limitant alors la génération d'anticorps de celle-ci. Cette réaction permet également de protéger la bactérie contre les protéases intestinales sécrétées par l'hôte. Ce phénomène se montre dès lors bien plus intéressant pour la bactérie que les réactions d'O-glycosylation qui n'agissent que sur les sous-unités des flagellines (Bolton, 2015).

1.1.5. Aspect clinique des infections dues à *C. jejuni* et *C. coli*

La campylobactériose

La campylobactériose est une infection intestinale provoquée par *Campylobacter* qui s'étend souvent jusqu'au colon et au rectum. Le symptôme majoritairement observé est une diarrhée aiguë, aqueuse ou sanglante. Celle-ci s'accompagne de fièvre, de migraines, de douleurs abdominales et d'une perte de poids. Les douleurs abdominales s'apparentent généralement à des colites, des lésions ou encore à la dégradation de la muqueuse intestinale. L'apparition des symptômes se produit généralement 24 à 72 heures après l'ingestion d'aliments contaminés et durent jusqu'à 10 jours. En fonction des individus, la dose infectieuse varie entre 360 et 800 Colony Forming Unit (CFU) (Moore *et al.*, 2005 ; Kaakoush *et al.*, 2015).

En plus de l'infection gastro-intestinale, *Campylobacter* peut atteindre le sang et provoquer une infection systémique (Fig. 1.3). Des manifestations cliniques apparaissent alors dans d'autres parties du corps telles que des abcès cérébraux, des méningites, des bactériémies ou des septicémies, des endocardites et des myocardites. Certaines souches peuvent également entraîner des complications au niveau de l'appareil génital (*ibid.*).

Bien que les infections à *Campylobacter* puissent survenir à tout âge, on observe que celles-ci sont plus fréquentes chez les nourrissons de moins de 4 ans et chez les jeunes adultes de 15 à 24 ans (*ibid.*). Cependant, les individus présentant une baisse d'immunité (vieillesse, diabète, cancer, immunosuppression, VIH) encourrent un risque plus important de développer une infection grave qui entraîne des complications. Par ailleurs, le sexe masculin représente également un facteur de risque pour des raisons inconnues. Les personnes voyageant beaucoup à l'étranger sont également plus susceptibles d'attraper la campylobactériose (Moore *et al.*, 2005). Enfin, une hausse des contaminations est observée durant l'été (EFSA *et al.*, 2019).

Complications et séquelles

Suite à une infection à *Campylobacter*, il existe un risque que le patient développe des complications immunologiques qui engendrent alors des séquelles plus ou moins graves. Les principales complications observées sont le développement du syndrome de Guillain-Barré et d'arthrite réactionnelle.

Chez les personnes atteintes du syndrome de Guillain-Barré (GBS), le système immunitaire s'attaque à une partie du système nerveux périphérique. Il s'en suit une faiblesse musculaire et/ou la perte de sensation dans les membres supérieurs et inférieurs. Cette maladie touche 100 000 personnes par an dans les pays développés et est fréquente chez les sujets de sexe masculin ayant l'âge adulte (OMS, 2020 ; Willison *et al.*, 2016). Cette maladie se développe généralement lorsque le patient est déjà atteint d'une infection virale ou bactérienne qui affaiblit son immunité. Scallan Walter *et al.* (2020) estiment que 172 cas de GBS sur 100 000 se déclarent après une infection à *Campylobacter*, ce qui représente environ 41% des cas dans le monde.

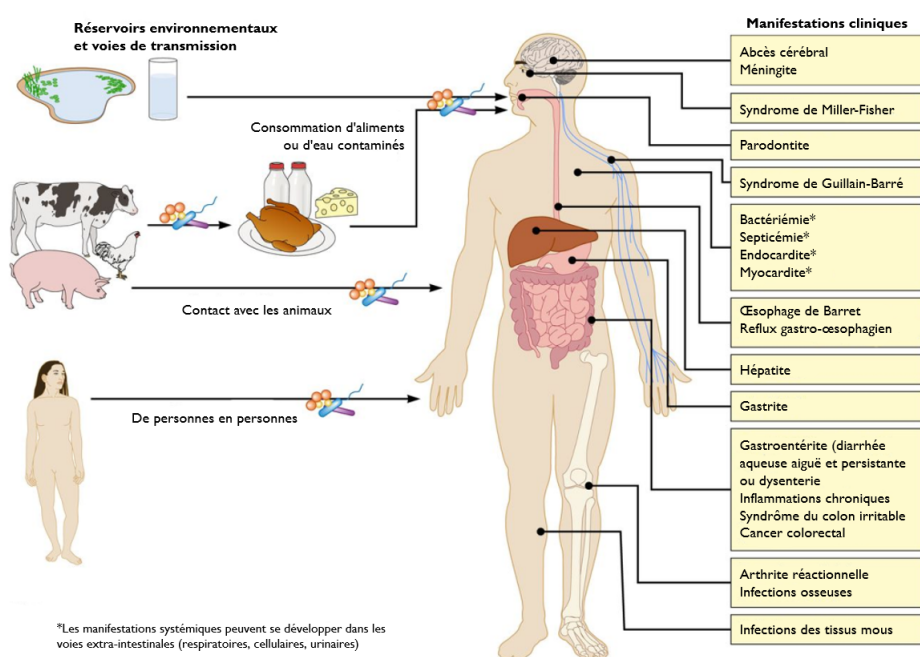


Figure 1.3. Réservoirs environnementaux, voies de transmission de *Campylobacter* et symptômes associés à la campylobactériose, adapté de Kaakoush *et al.* (2015).

L'arthrite réactionnelle est également une maladie auto-immune. Celle-ci se manifeste suite à une infection digestive, uro-génitale ou respiratoire chez un patient prédisposé. En effet, la manifestation de cette maladie dépend de la présence de l'antigène HLA-B27 chez le patient. Le symptôme clinique le plus fréquent est une atteinte périphérique aiguë mono- ou oligo-articulaire, principalement au niveau des grosses articulations des membres inférieurs. Cependant, toutes les articulations peuvent être touchées. Les patients souffrent également de malaises et de fatigue, de cystites, de lésions muco-cutanées,

d'aphtes buccaux, de conjonctivites et d'ulcérations cornéennes (Dudler, 2006). En regroupant différentes études menées, l'incidence de l'arthrite réactionnelle liée à *Campylobacter* varie entre 8 et 16% chez les adultes et entre 0 et 3% chez les enfants (Ajene *et al.*, 2013).

Traitement et résistance aux antibiotiques

La campylobactériose ne nécessite généralement aucun traitement et s'atténue naturellement après une dizaine de jours. Cependant, certains patients présentant des symptômes prolongés ou ayant une immunité affaiblie sont placés sous traitement antibiotique. À cause de leur moindre résistance naturelle face à *Campylobacter*, ce sont les macrolides (azithromycine et érythromycine) et les fluoroquinolones qui sont actuellement utilisés comme antibiotiques sur les humains (Yang *et al.*, 2019). Auparavant, la ciprofloxacine et la tétracycline étaient également utilisées mais leur usage abusif dans les filières vétérinaire et alimentaire a permis à beaucoup de souches de *C. jejuni* et *C. coli* de développer des résistances.

La capacité de *Campylobacter* à développer des résistances aux antibiotiques s'explique de plusieurs manières. D'abord, les bactéries au sein du genre *Campylobacter* possèdent des séquences génomiques très variables menant à une plasticité génomique considérable. Cela favorise l'émergence de souches mutantes résistantes. Ensuite, le fait que *Campylobacter* soit commensale (organisme dont la relation avec un hôte est bénéfique, mais neutre pour l'hôte) à une multitude d'animaux, l'exposition fréquente de celles-ci à des antibiotiques vétérinaires permet l'élaboration de nouveaux mécanismes de résistance. Enfin, l'utilisation abusive d'antibiotiques dans notre population représente une pression sélective supplémentaire aussi bien pour *Campylobacter* que pour tous les autres micro-organismes, pathogènes ou non (Iovine, 2013).

1.2. Écologie de *Campylobacter* spp.

On trouve *Campylobacter* dans de nombreux réservoirs naturels tels que les animaux, l'eau et les sols. Bien que ces bactéries soient ubiquistes, leur prolifération ne se produit qu'à l'intérieur de l'hôte. Par ailleurs, les principales contaminations humaines sont causées par la nourriture et plus précisément par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés (viande, œufs, fromage, lait, fruits/légumes). Les sols, quant à eux, n'ont que très peu d'incidence sur les contaminations humaines (Gölz *et al.*, 2018). Le contact avec les excréments d'animaux représente également un risque de contamination (Epps *et al.*, 2013).

1.2.1. *Campylobacter* spp. chez la volaille

C. jejuni et *C. coli* sont présentes de manière commensale dans le tractus digestif de nombreux animaux. Cependant, le réservoir et vecteur principal de ces bactéries est la volaille (Moore *et al.*, 2005). C'est d'ailleurs l'ingestion de poulet cru ou pas assez cuit qui représente la cause majoritaire de campylobactériose (Nachamkin *et al.*, 2008). Ce constat

a été mis en évidence par Vellinga & Van Loock (2002) qui ont analysé les conséquences de la crise de la dioxine en Belgique durant l'été 1999. Durant cette période, la viande de poulet et les œufs ont été retirés du marché. Cela coïncide avec une réduction des contaminations de *Campylobacter* d'environ 40%.

La concentration en *Campylobacter* dans le caecum des poulets se situe entre 10^5 et 10^9 CFU/g. Dans les exploitations avicoles, la colonisation de la volaille par *Campylobacter* spp. a lieu environ sept jours après l'éclosion. La prévalence des campylobactéries dans les élevages varie énormément (2 à 100%) mais au moment de l'abattage, celle-ci s'élève à 100% dans l'intestin grêle et 91,5% à la surface des carcasses. De manière générale, cette prévalence est moindre chez les poulets de chair (Żbikowska *et al.*, 2020).

Les poulets ne sont pas les seuls porteurs sains de *Campylobacter*. Par exemple, on observe sa présence à une occurrence de 71,6% chez les dindes et 39,2% chez les canards (Jamali *et al.*, 2015) comparé à 26,1% chez les poulets de chair (EFSA *et al.*, 2019). Les deux espèces prédominantes chez les volailles sont *C. jejuni* et *C. coli* avec une prévalence de *C. jejuni* significativement plus élevée (Marotta *et al.*, 2015). Ces animaux peuvent développer des diarrhées suite à une infection prolongée à une espèce de *Campylobacter* mais ce phénomène n'a été que très peu observé dans les élevages (Nafarrate *et al.*, 2021b).

1.2.2. *Campylobacter* spp. chez les animaux domestiques et sauvages

C. jejuni et *C. coli* se retrouvent également dans le microbiome de nombreux animaux domestiques tels que les bovins, les porcs et les moutons mais également dans celui de beaucoup d'animaux sauvages (oiseaux, rongeurs, insectes, *etc.*). Chez les bovins, l'EFSA (2019) estime la prévalence de *C. jejuni* à 3,2% dans dix pays européens. Globalement, *C. jejuni* et *C. coli* colonisent davantage les vaches laitières que les vaches viandeuses. De plus, les veaux portent souvent une charge microbienne plus élevée que les individus adultes. Par ailleurs, les bovins ainsi que les moutons, peuvent être victime de maladies associées aux deux sous-espèces *C. fetus* subsp. *venerealis* et *C. fetus* subsp. *fetus*. Celles-ci provoquent l'infertilité et 10,3 à 25,2% des avortements prématurés des femelles au sein d'un troupeau (Sahin *et al.*, 2017). Chez les porcs, à l'inverse des autres animaux, c'est *C. coli* qui est l'espèce prédominante (Horrocks *et al.*, 2009). On observe une prévalence de *Campylobacter* spp. qui varie entre 38,1 et 69,3% par élevage. Ils représentent une source de contamination non négligeable pour l'être humain (Nafarrate *et al.*, 2021b). Les chiens et les chats sont également connus pour héberger *Campylobacter* spp. dans leur tube digestif. On compte jusqu'à 16 espèces différentes chez ces animaux mais les espèces les plus répandues sont *C. upsaliensis* et *C. helveticus* chez les chiens et les chats, respectivement (Horrocks *et al.*, 2009).

La présence de *Campylobacter* est aussi observée chez les animaux sauvages. Tout comme chez les animaux domestiques, ce sont les oiseaux qui sont les vecteurs sauvages principaux. Waldenström *et al.* (2002), observent que sur 107 espèces d'oiseaux migrateurs,

Campylobacter colonise l'intestin de 21,6% d'entre eux. Hald *et al.* (2015), montrent que le taux d'animaux colonisés par la bactérie varie entre 15,9 et 20% chez les oiseaux que l'on retrouve fréquemment dans les exploitations agricoles. Les espèces majoritairement présentes sont *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*. Ces oiseaux sauvages représentent un vecteur non négligeable dans nos élevages agricoles bien qu'il soit de moindre importance pour l'humain. En outre, les insectes et les rongeurs sont aussi des vecteurs importants de *Campylobacter* avec une prévalence entre 7,1 et 28,9% chez les insectes (en fonction des espèces) et 49,6% chez les rongeurs (Nafarrate *et al.*, 2021b).

1.2.3. *Campylobacter* spp. dans l'environnement

L'eau représente un important vecteur de *Campylobacter*. Bien que cette bactérie soit difficile à cultiver en laboratoire, celle-ci s'adapte remarquablement aux situations de stress rencontrées dans l'environnement. Cette survie dans l'eau est rendue possible par le phénomène VNC, la formation de biofilms et la présence de protozoaires aquatiques qui servent d'hôte à la bactérie. Dès lors, cette eau constitue une source de contamination pour l'homme et de nombreux animaux par contact direct et par ingestion (Gözl *et al.*, 2018).

Les sols sont aussi considérés comme un réservoir et vecteur pour *Campylobacter*, bien que leur incidence soit minime par rapport au réservoir animal. Les excréments et l'eau contaminée s'infiltrant dans le sol permettent aux bactéries de rester omniprésentes dans les endroits où l'on pratique l'élevage extensif (Dromigny, 2007).

Les paramètres climatiques influencent aussi la présence et le développement de *Campylobacter*. Plusieurs études révèlent qu'un pic de contamination de la volaille se produit en été et au début de l'automne. Une explication serait que l'augmentation de la température extérieure permet à énormément d'organisme de se déplacer (mouches, rongeurs) et d'augmenter les chances d'infection des poulets par contact direct ou indirect (Gözl *et al.*, 2018).

1.3. Contrôle et prévention dans les élevages avicoles

En 2011, l'EFSA publie un rapport dans lequel on dénombre en moyenne que 75,8% des carcasses de volailles sont contaminées par *Campylobacter* spp. en Union européenne. La contamination se fait majoritairement de manière horizontale au niveau de la production primaire. Dès lors, c'est à ce stade que la plupart des mesures de contrôle et de prévention sont prises, la contamination verticale étant minime. L'eau, l'air, le contact avec d'autres animaux et la nourriture sont considérés comme les sources de contaminations les plus importantes (Soro *et al.*, 2020). Le risque de contamination croisée des carcasses à l'abattoir est également à prendre en compte, bien que moins de mesures de prévention y sont mises en place (Guirin *et al.*, 2020). Le grand nombre d'éléments à risques tout au long de la production, la capacité de *Campylobacter* spp. à survivre et sa

résistance aux antibiotiques fait de cette problématique un grand enjeu pour les autorités sanitaires (Qijing Zhang & Sahin, 2020).

1.3.1. Biosécurité

La première approche de prévention à la contamination dans les poulaillers est la mise en place et le respect de mesures strictes de biosécurité. De simples gestes d'hygiène tels que le lavage des mains avec un désinfectant adéquat, l'utilisation et la désinfection systématique de vêtements et de bottes spécifiques ainsi que la restriction de l'accès au poulailler à d'autres animaux, éleveurs ou visiteurs peuvent considérablement diminuer la contamination à *Campylobacter* spp. (Soro *et al.*, 2020). Ce constat fut mis en évidence par Georgiev *et al.* (2017) en étudiant l'application de ces mesures sur plus de 2000 lots de poulets de chair au Royaume-Uni. Après 2 ans, ceux-ci ont conclu que l'application de mesures de biosécurité sur une exploitation diminue de 53% à 86% les chances de contamination de l'élevage.

1.3.2. Traitement de l'eau

Comme mentionné précédemment, une des sources principales de contamination des animaux à *Campylobacter* est l'eau de la ferme. Les pathogènes s'y retrouvent sous forme de biofilms, en état VNC mais aussi en tant que parasites chez les protozoaires aquatiques. De plus, si l'eau est en contact avec du fumier, le risque de contamination augmente. Un des facteurs déterminants concernant la réduction des infections des poulets est donc le traitement de l'eau destinée à la consommation des animaux. Celle-ci est traitée par filtration, irradiation aux UV et par chloration (Nastasijevic *et al.*, 2020).

1.3.3. Probiotiques

Depuis une dizaine d'années, il est suggéré que l'utilisation de probiotiques comme additifs alimentaires présente un potentiel de limitation de la colonisation des poulets de chair par *Campylobacter*. Un probiotique est un micro-organisme vivant qui, s'il est supplémenté en bonne quantité, bénéficie à la santé de l'hôte. Il interagit avec le microbiote intestinal de l'hôte et peut, par exemple, augmenter son immunité et la digestibilité des nutriments (Smialek *et al.*, 2018). Plusieurs études démontrent que les poulets nourris avec des régimes contenant *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus salivarius* ou *Lactobacillus crispatus* présentent un nombre réduit en *C. jejuni* entre 1 et 5 log CFU/g (Soro *et al.*, 2020 ; Saint-Cyr *et al.*, 2016). Neal-McKinney *et al.* (2012) attribuent cette réduction principalement à la production d'acide lactique par les probiotiques qui s'attaque aux parois de *C. jejuni*. Une autre raison possible est l'inhibition de l'adhésion et de l'invasion du pathogène. Ce phénomène est observé par Nishiyama *et al.* (2014), suite à l'action de *Lactobacillus gasseri*. Bien que certaines bactéries soient efficaces seules, l'administration de cocktails de bactéries s'avère tout aussi efficace (Smialek *et al.*, 2018).

En plus d'effectuer l'exclusion compétitive, certains probiotiques ont la capacité de produire des bactériocines. Les bactériocines sont des protéines d'origine bactérienne synthétisées par certaines espèces de bactéries pouvant avoir des effets néfastes sur d'autres bactéries. À ce jour, les bactéries qui se sont avérées efficaces concernant la réduction de *C. jejuni in vivo* sont *Paenibacillus polymyxa*, *Enterococcus faecium* et *Lactobacillus salivarius* (Soro *et al.*, 2020).

1.3.4. Vaccination

Depuis près de 20 ans, les recherches pour développer un vaccin contre *Campylobacter* sont en cours. Malheureusement, aucun des vaccins mis au point n'a été assez concluant pour la commercialisation. La commensalité de *Campylobacter* chez la volaille et la grande diversité antigénique entre les différentes souches représentent un défi majeur pour la mise au point d'un vaccin efficace. Plusieurs techniques ont déjà été testées telles que les vaccins inactivés, les vaccins de sous-unités se basant sur les antigènes des flagellines, les CPS et les protéines ou encore l'utilisation de vecteurs vivants. Aujourd'hui, ce sont les vaccins de sous-unités qui semblent les plus prometteurs (Qijing Zhang & Sahin, 2020). Actuellement, deux études se démarquent des autres. D'une part, Neal-McKinney *et al.* (2014) développent un vaccin basé sur les épitopes des protéines FlaA, FlpA et CadF. D'autre part, Nothaft *et al.* (2016) utilisent un N-glycane de *C. jejuni* qu'ils intègrent à *E. coli* et l'administrent aux poussins. Ces deux vaccins ont donné des résultats concluants (une réduction de 2 et 10 log CFU/g, respectivement) ce qui nous laisse entrevoir la possibilité d'utiliser la vaccination comme contrôle contre l'infection à *Campylobacter* dans les élevages de volailles.

1.3.5. Bactériophages

Une autre méthode de lutte envisagée contre *C. jejuni* et *C. coli* est l'utilisation de bactériophages spécifiques à ces deux espèces. Ceux-ci sont déjà utilisés pour le biocontrôle d'autres agents pathogènes tels que *Salmonella* spp. et *L. monocytogenes* (Ushanov *et al.*, 2020).

Plusieurs études ont été menées ces dernières années afin de tester l'efficacité de ces phages pour le biocontrôle de *Campylobacter*. Certains auteurs tels que Wagenaar *et al.* (2005) et El-Shibiny *et al.* (2009) utilisent des phages seuls tandis que Loc-Carrillo *et al.* (2005), Carvalho *et al.* (2010a), et Richards *et al.* (2019), administrent un cocktail de phages aux animaux. Pour toutes ces études confondues, on observe une réduction moyenne de *C. jejuni* et/ou *C. coli* entre 0,5 et 5 log CFU/g. Même si ces résultats ne sont pas considérés comme suffisants pour l'utilisation de ces traitements à grande échelle, ces études ont permis de tirer plusieurs conclusions. D'une part, l'action de phages n'est effective qu'entre 1 et 4 jours, ce qui pourrait en faire une solution à court terme avant l'abattage des animaux. D'autre part, l'utilisation de cocktails de phages présente de

meilleurs résultats que l'utilisation de phages seuls. Plus précisément, le mélange de phages du groupe II et III (voir section 1.5.) permettrait de couvrir un plus large spectre d'hôtes. Cependant, certaines souches de *Campylobacter* pourraient développer naturellement des résistances à ces phages (Soro *et al.*, 2020). En effet, Carvalho *et al.* (2010b) découvrent des souches résistantes chez les individus traités à une fréquence de 13%.

Cette pratique est plutôt mitigée au sein de la communauté scientifique et auprès des autorités sanitaires. Dès lors, il est nécessaire de mener davantage de recherches afin de pouvoir utiliser ce moyen de lutte dans nos élevages avicoles.

1.4. Les bactériophages

Les bactériophages, ou «phages», sont des virus infectant spécifiquement les bactéries ou les archées. Ils sont ubiquistes et présents dans tous les environnements colonisés par leurs hôtes tels que les océans, les eaux douces, la rhizosphère, les plantes et les aliments. Ils sont également présents à l'extérieur et à l'intérieur des cavités corporelles des humains et des animaux (Ackermann & Prangishvili, 2012). Les bactériophages sont considérés comme étant l'entité biologique la plus abondante sur Terre avec une estimation de 10^{31} représentants (Hatfull, 2015). Ils codent pour 2 à 400 gènes et mesurent entre 20 et 200 nm (Ackermann & Prangishvili, 2012).

1.4.1. Classification

La taxonomie des virus et des phages est sous la responsabilité du Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) : l'ICTV classe les phages selon la nature de l'acide nucléique, les propriétés morphologiques et physico-chimiques ainsi que la séquence génomique du virion (Ackermann, 2011).

La majorité des phages recensés (96%) possèdent une queue et font partie de l'ordre des *Caudovirales*, composé de trois familles : les *Siphoviridae* possédant une longue queue non-contractile (57,3%), les *Myoviridae* à queue contractile (24,8%) et les *Podoviridae* à courte queue non-contractile (14,2%) (Fig. 1.4) (Ackermann & Prangishvili, 2012). Les virions de ces familles possèdent un ADN double-brin linéaire et ne sont pas enveloppés. Ils ont une tête icosaédrique qui contient le génome viral, attachée à la queue par une protéine. Cette queue consiste en plusieurs «disques» protéiques empilés et possède généralement des structures d'adsorption terminales telles que des spicules ou des fibres caudales. Elle est donc utilisée par les phages lors de l'adsorption à leur hôte bactérien (Kutter & Sulakvelidze, 2004). Ces phages peuvent effectuer soit le cycle lytique, soit le cycle lysogénique (voir section 1.4.2.).

L'essor du séquençage génomique permet cependant une augmentation impressionnante des données disponibles et remet en question le système de classification actuel des phages. Certains changements significatifs de la taxonomie sont discutés tels que l'abolition de l'ordre des *Caudovirales*, la séparation des *Inoviridae* en deux familles différentes et

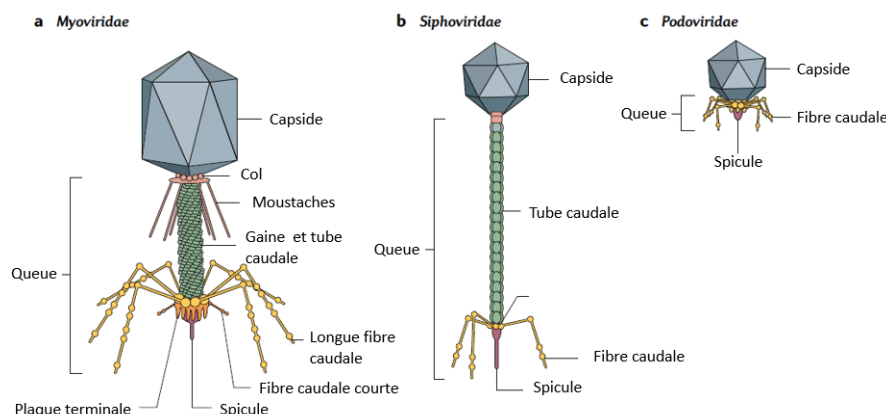


Figure 1.4. Structures représentatives des phages appartenant à l'ordre des *Caudovirales*, adapté de Nobrega *et al.* (2018).

l'avènement de nouvelles familles comme les *Autolykiviridae* et les *Finnlakeviridae* (Turner *et al.*, 2021).

1.4.2. Cycle de vie des phages

Les bactériophages sont des parasites intracellulaires obligatoires qui ne peuvent se répliquer en absence de leur hôte. En effet, celui-ci leur fournit les systèmes de synthèse et les sources d'énergie nécessaires dont ils sont démunis (Hobbs & Abedon, 2016). On distingue deux types de phages différents (Fig. 1.5). D'une part, les phages virulents effectuent un cycle de vie lytique, impliquant la production de nouvelles entités virales et leur libération de la cellule infectée à la fin de leur cycle, après lyse cellulaire. D'autre part, les phages tempérés effectuent un cycle de vie lysogénique où leur matériel génétique s'intègre à celui de la bactérie, ou se comporte comme un plasmide. Il existe alors sous forme de «prophage» et coexiste avec la bactérie durant plusieurs générations (Salmond & Fineran, 2015).

Cycle lytique

La première étape de l'infection par un phage est l'adsorption de celui-ci à son hôte bactérien. L'attachement du phage à la bactérie se fait grâce à la protéine *Receptor-Binding Protein* (RBP) de celui-ci, généralement située à l'extrémité de sa queue. Il utilise les protéines, les polysaccharides, les flagelles ou encore les pilis présents à la surface de son hôte comme récepteur spécifique. Une fois que le phage a reconnu une bactérie sensible, il injecte son matériel génétique, présent dans sa capsid, dans le cytoplasme de la bactérie. Le phage peut alors profiter du métabolisme de la bactérie pour répliquer son matériel génétique et engendrer sa progéniture virale. Les différents éléments composant les virions sont assemblés (Nicastro *et al.*, 2016 ; Kutter & Sulakvelidze, 2004). Le facteur de multiplication varie selon les différents phages mais est généralement compris entre 20 et 50. Durant cette étape d'assemblage, deux protéines agissant de manière complémentaire

s'accumulent dans le cytoplasme : les holines et les endolysines. L'holine, une protéine hydrophobe, s'oligomérisse dans la membrane cytoplasmique de l'hôte, induisant la formation de pores. Une fois ces pores formés, l'endolysine s'attaque aux peptidoglycanes de la paroi cellulaire. Ce mécanisme engendre la lyse de la cellule et la libération des nouveaux virions pouvant infecter de nouvelles bactéries. Le cycle est relativement rapide et se déroule généralement en moins de 30 min (Catalao *et al.*, 2013).

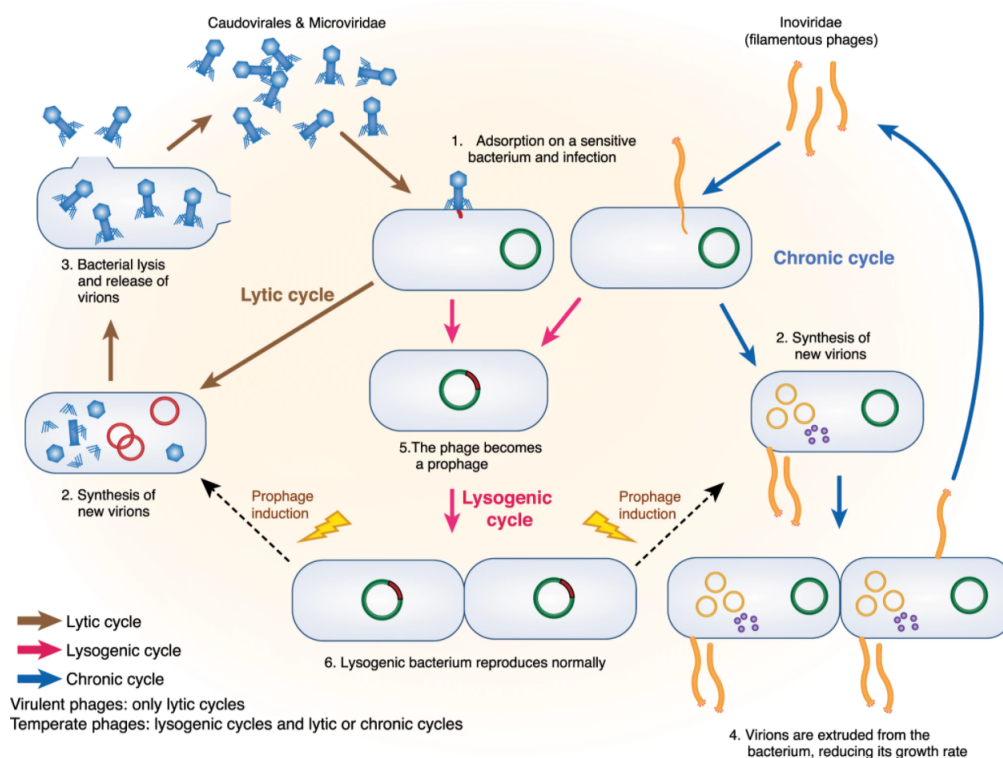


Figure 1.5. Cycles de vie des phages. Les phages virulents effectuent un cycle lytique induisant la lyse de la cellule hôte tandis que les phages tempérés mènent un cycle lysogénique durant lequel ils intègrent leur génome dans le chromosome bactérien ou se comporte comme un plasmide. En réponse à un stimulus extérieur, le phage est excisé du génome et entre dans un cycle lytique. Enfin, les phages filamenteux exécutent un cycle chronique, Sausset *et al.* (2020).

Cycle lysogénique

Contrairement aux phages virulents, les phages tempérés entrent soit dans le cycle lytique soit dans le cycle lysogénique en fonction de la compatibilité génétique, de l'état physiologique de l'hôte (par exemple, l'épuisement des nutriments augmente la lysogénie) et de la densité en phages. Les phages tempérés vont libérer leur matériel génétique qui va soit s'intégrer au chromosome bactérien, soit se comporter comme un plasmide. L'intégration nécessite une intégrase, qui se lie à des segments homologues de l'ADN phagique et bactérien. Ce phénomène entraîne une recombinaison spécifique au site d'attachement du phage (attP) et de la bactérie (attB) (Howard-Varona *et al.*, 2017). Ce prophage peut rester silencieux au sein de la bactérie hôte. Les infections lysogéniques ne sont pas productives car aucun virion structurel n'est produit mais la réplication se produit verticalement,

accompagnant la réplication et la division de l'hôte. Le prophage ne produit que les protéines nécessaires au maintien de la lysogénie, dont notamment un répresseur empêchant l'expression des gènes impliqués dans la réplication virale du phage. Le prophage entre dans un cycle lytique soit de manière spontanée (à une fréquence de 10^{-8} à 10^{-5}), soit en réponse à des facteurs de stress externes (e.g. exposition à des rayons UV, changement dans l'environnement direct de la bactérie ou contact avec des produits chimiques). De nouveaux virions sont alors produits et libérés de la bactérie, ce qui induit généralement la mort de celle-ci par lyse cellulaire (Nicastro *et al.*, 2016).

1.4.3. Applications des phages

Depuis plusieurs années, les bactériophages représentent un agent de biocontrôle prometteur concernant les domaines de la biotechnologie et de la sécurité alimentaire. *A contrario*, l'utilisation thérapeutique de phages chez les humains est aujourd'hui un sujet controversé et peu utilisé : la majorité des essais cliniques menés cette dernière décennie ne rapporte pas de résultats assez concluants sur leur efficacité. Bien qu'il devienne urgent de trouver des alternatives aux antibiotiques suite à la résistance bactérienne à ceux-ci, des données supplémentaires sont nécessaires pour présenter des traitements réglementaires viables en vue d'une utilisation clinique des bactériophages (Furfaro *et al.*, 2018).

Biotechnologie

L'étude des bactériophages a permis la compréhension de nombreux phénomènes en biologie moléculaire ainsi que l'avancée de la biotechnologie, par exemple le *phage display* ou la vaccination par des phages (Clark & March, 2006). Les endolysines présentent également un intérêt pour le biocontrôle et la biodétection de bactéries pathogènes (Chang, 2020).

Les endolysines produites par les bactériophages sont utilisées pour le biocontrôle en s'attaquant aux peptidoglycanes des bactéries lorsqu'elles sont appliquées à l'extérieur. Ce phénomène est rendu possible par un domaine de liaison appelé *Cell wall Binding Domain* (CBD). Le CBD confère une certaine spécificité aux endolysines et permet la biodétection et le biocontrôle (Garcia *et al.*, 2010). Dans le domaine de l'alimentation, H. Zhang *et al.* (2012) isolent l'endolysine LysZ5 du phage FWLLm3 de *L. monocytogenes* qui inhibe spécifiquement la croissance de l'hôte jusqu'à 4 log CFU/ml dans le lait de soja en 3 h à 4°C.

Contrairement aux bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif sont résistantes au traitement externe par endolysine. En effet, celles-ci possèdent une membrane externe sur leur paroi cellulaire empêchant l'interaction entre les endolysines et la couche de peptidoglycanes. Dès lors, l'utilisation d'agents perméabilisants de la membrane externe augmente l'efficacité des endolysines comme agents de biocontrôle pour les pathogènes à Gram négatif. Par exemple, Walmagh *et al.* (2012), découvrent que l'endolysine

OBPgp279 (du phage OBP de *Pseudomonas fluorescens*) possède un pouvoir bactéricide contre des cellules de *Salmonella typhimurium*, lorsqu'elle est utilisée avec de l'EDTA. Parallèlement, Oliveira *et al.* (2014), démontrent que l'endolysine Lys68 issue du phage phi 68 de *Salmonella* spp., une fois associée à l'acide malique ou lactique, permet la diminution de 5 log CFU/ml des bactéries *Salmonella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *E. coli* O157:H7 et *Cronobacter sakazakii*. Cependant, l'utilisation de l'EDTA et d'acides organiques avec les endolysines reste problématique car l'EDTA est un produit nocif pour les cellules humaines et les acides organiques peuvent inactiver l'endolysine dans des conditions de pH acide. Une solution possible à ces problèmes est l'utilisation d'endolysines modifiées appelées artilysines qui ne nécessitent pas l'utilisation d'agents perméabilisant (Chang, 2020). La recherche concernant l'utilisation des endolysines contre les bactéries à Gram négatif comme outil de biocontrôle en est encore aux premiers stades de développement mais les premières données *in vitro* et *in vivo* soutiennent l'hypothèse que ces enzymes représentent des agents antimicrobiens potentiels (Ghose & Euler, 2020).

Sécurité alimentaire

La lutte contre les pathogènes dans les aliments par les phages se fait à tous les stades de la production. On peut définir quatre champs d'applications distincts : la phagothérapie, le biocontrôle et la biopréservation ainsi que la biosanitation (Garcia *et al.*, 2008). Dans ce cadre-ci, il est essentiel d'utiliser des phages strictement lytiques (Garcia-Anaya *et al.*, 2020). En effet, les phages tempérés intègrent leur matériel génétique à celui de la bactérie hôte ou résident en elle sous forme de plasmide. Cela peut altérer la régulation des gènes et mener à des changements phénotypiques de la bactérie tels que la production de nouveaux facteurs de virulence ou la résistance aux antibiotiques. Ces effets étant indésirables lors d'un traitement phagique, l'utilisation de phages tempérés est proscrite (Howard-Varona *et al.*, 2017).

Pour le contrôle des matières premières, aussi bien chez les animaux que les plantes, il a été démontré que la phagothérapie est une alternative aux antibiotiques pour l'avenir. Elle a pour rôle de prévenir ou de réduire la colonisation et les maladies des animaux et des plantes. Plusieurs études démontrent l'efficacité de certains phages ou cocktails de phages pour diminuer la charge bactérienne pour *Salmonella* spp. (Kim *et al.*, 2020), *L. monocytogenes* (Bigot *et al.*, 2011), *E. coli* O157:H7 (Rivas *et al.*, 2010) et *Campylobacter* spp. (Carvalho *et al.*, 2010a) dans le bétail et la volaille. Cependant, la mise en vente de tels produits n'est pas encore d'actualité par manque de compréhension de plusieurs mécanismes biologiques et par l'absence de considération du contexte social et économique autour de cette problématique (Gambino & Brøndsted, 2021). Concernant les plantes, l'agence américaine "Food and Drug Administration" (FDA) a récemment autorisé l'utilisation de cocktails de phages pour soigner certaines espèces. On cite par exemple l'utilisation efficace de bactériophages sur les pommiers pour contrôler les infections dues à l'agent pathogène *Erwinia amylovora* causant la maladie du feu bactérien (Jamal *et al.*,

2019).

Le biocontrôle a pour but la décontamination des carcasses et autres produits crus (fruits et légumes frais, produits laitiers), tandis que la biopréservation est une méthode utilisée pour prolonger la durée de conservation des aliments transformés périssables. Pour ces deux domaines, plusieurs produits à base de phages (par exemple EcoshieldTM pour *E. coli* O157:H7, ListShieldTM pour *L. monocytogenes* et SalmoFreshTM pour *Salmonella* spp.) ont été commercialisés et utilisés avec succès pour la viande et les produits laitiers (Garcia-Anaya *et al.*, 2020). Actuellement, les recherches pour le développement de produits pour le contrôle de *Campylobacter* spp. (point 1.3.5.) et *Staphylococcus aureus* (Bueno *et al.*, 2012) offrent des résultats assez prometteurs.

Enfin, la biosanitation concerne la désinfection des équipements et des surfaces de contact dans la chaîne de production. En effet, la présence d'eau et de nutriments sur les surfaces inertes et produits crus permet le développement d'agents pathogènes et de biofilms bactériens. Afin d'éviter ce phénomène, plusieurs désinfectants phagiques se trouvent sur le marché, notamment contre *L. monocytogenes*. Une récente étude démontre l'efficacité du produit ListexTM (Microes Food Safety) contre les biofilms de *L. monocytogenes*. Il est composé du phage virulent P100 qui permet la diminution de 1,3 à 3,3 log CFU/cm² sur de l'acier inoxydable en appliquant un traitement de 1 à 3 h à 20°C. Cependant, cette méthode nécessite encore un pré-traitement du biofilm ou bien l'ajout de produits chimiques afin de séparer les biofilms des surfaces inertes et donner aux phages l'accès aux bactéries. De plus, la nature multi-espèces des biofilms limite l'efficacité de tels produits (Bhandare & Goodridge, 2021).

1.5. Phages de *Campylobacter* spp.

Actuellement, près de 500 phages de *Campylobacter* spp., dénommés campylophages, ont été isolés et caractérisés (Ushanov *et al.*, 2020 ; Nafarrate *et al.*, 2021b). La majorité d'entre eux sont des phages virulents et appartenant à la famille des *Myoviridae*, bien qu'une petite partie d'entre eux appartiennent à la famille des *Siphoviridae* (Ushanov *et al.*, 2020) (Tableau 1.1).

Tableau 1.1. Classification des phages lytiques de *Campylobacter* spp., adapté de Ushanov *et al.* (2020).

Groupe	Taille du génome	Récepteur spécifique	Classification alternative
I	320-425 kb	Flagelles	-
II	175-183 kb	Flagelles	virus de type CP220
III	131-135 kb	CPS	virus de type CP8

On classe les campylophages en trois groupes différents selon la taille de leur génome. Le groupe I comprend des phages avec un génome de grande taille (320-425 kb). Les

représentants de ce groupe semblent être rares car à ce jour aucun phage du groupe I n'a été séquencé. En raison de leurs différences avec les phages appartenant aux deux autres groupes, il est possible que les méthodes d'isolement actuellement utilisées ne conviennent pas à ce type de phages. Au contraire, les membres du groupe II (175-183 kb) et du groupe III (131-135 kb) ont fréquemment été isolés. Trois phages du groupe II (CP21, CP220 et CPt10) et huit phages du groupe III (CP81, CP30A, NCTC12673, PC14, PC5, vB_CjeM_Los1, CPX et CP8) ont été complètement séquencés. Les membres de ces deux groupes ont un faible taux en GC (26-27%) et produisent peu de progénitures virales lors de l'infection d'une bactérie. Ils possèdent également une résistance à de nombreuses endonucléases de restriction, ce qui explique l'absence de caractérisation de ces phages durant de nombreuses années.

Cependant, de nombreuses différences entre les représentants des deux groupes ont été observées. Les phages du groupe II infectent à la fois les espèces *C. jejuni* et *C. coli* et ciblent principalement les récepteurs flagellaires de leurs hôtes. En revanche, les membres du groupe III infectent uniquement *C. jejuni* et présentent une plus forte activité lytique que ceux des deux autres groupes. Lors de l'adsorption du phage à la bactérie, la plupart des membres du groupe III utilisent les CPS comme récepteurs spécifiques. Récemment, une classification alternative basée sur l'homologie des protéines entre les groupes a vu le jour. Les groupes II et III sont classés dans la sous-famille des *Eucampyvirinae* des *Myoviridae*. On les nomme alors les «virus de type CP220» (groupe II) et les «virus de type CP8» (groupe III) (Jäckel *et al.*, 2019; Ushanov *et al.*, 2020).

1.6. Dénombrement des *Campylobacter* spp.

1.6.1. CampyFood et RAPID' *Campylobacter*

Une méthode couramment utilisée pour le dénombrement des espèces de *Campylobacter* dans les matrices alimentaires est la méthode ISO 10272. Cette dernière préconise l'utilisation d'une gélose de charbon modifiée au Céfopérazone Désoxycholate (mCCDA). L'inconvénient de ce milieu est que, bien qu'il soit sélectif, il ne fournit aucune propriété différentielle, conduisant à une confirmation des colonies fastidieuse. En outre, il est fréquent que les colonies de *Campylobacter* spp. se répandent et forment des nuées sur les géloses mCCDA, rendant le dénombrement difficile et imprécis. Une solution à ce problème est d'introduire l'utilisation de nouveaux milieux sélectifs qui offrent aussi bien des propriétés sélectives que différentielles. Le but de ces géloses est d'augmenter la spécificité de la détection des espèces de *Campylobacter* thermotolérantes (Ahmed *et al.*, 2012). Les firmes Bio-Rad et bioMérieux, entre autres, ont ainsi créé les géloses chromogéniques «RAPID' *Campylobacter*» et «CampyFood», respectivement.

Ugarte-Ruiz *et al.* (2012) et Habib *et al.* (2011) ont comparé les géloses de CampyFood (CFA) au mCCDA. Des géloses de mCCDA et de CFA sontensemencées avec des

échantillons de volaille (peau, fientes et chair). Après une incubation de 48 h à 42°C en microaérobiose, les colonies présomptives de *Campylobacter* observées sont striées sur gélose au sang et incubées pendant 48 h à 37°C en atmosphère microaérophile. Une identification plus poussée par PCR conventionnelle est alors effectuée. Un échantillon est considéré comme positif si au moins une colonie est confirmée par PCR. Les résultats démontrent que l'ensemencement direct sur CFA donne plus de résultats positifs que l'ensemencement direct sur mCCDA, bien que la différence entre les résultats ne soit pas statistiquement significative. Dès lors, l'utilisation de CFA est aussi efficace que le mCCDA mais confère une identification facilitée des colonies de *Campylobacter* spp. thermotolérantes.

Une autre étude de Ahmed *et al.* (2012) a comparé les géloses CFA aux milieux mCCDA, Campylobacter Selective Agar (AES Chemunex) et Brilliance™ CampyCount (Oxoid). Il en ressort que le CFA permet une détection moindre que les autres milieux et n'est pas capable d'inhiber efficacement la croissance de la microflore accompagnatrice de *Campylobacter*. En effet, CFA présente un taux de 13% d'organismes faux-positifs (6% pour le mCCDA) pouvant entraîner une surestimation des colonies lors du dénombrement. Cependant, les auteurs s'accordent pour affirmer que l'utilisation de géloses sélectives et différentielles permet l'amélioration en termes de précision et de temps du dénombrement des *Campylobacter* thermotolérantes.

Seliwiorstow *et al.* (2014) ont comparé les géloses CFA et mCCDA aux géloses RAPID' *Campylobacter* (RAPID) afin d'évaluer la qualité de ces dernières et de déterminer leur sélectivité. Un dispositif expérimental similaire à l'étude précédemment décrite est mis en place. Les auteurs observent qu'au niveau du dénombrement, les trois géloses présentent des résultats similaires mais que les géloses RAPID sont les seules capables d'inhiber la croissance d'autres organismes du microbiome des poulets. Néanmoins, ils observent que, contrairement au milieu CFA, les colonies sur RAPID peuvent s'étaler sur la gélose et rendre le comptage des colonies fastidieux. L'efficacité des géloses RAPID reste toutefois belle et bien démontrée.

1.6.2. Test d'agglutination au latex

Traditionnellement, la confirmation des colonies présumées *Campylobacter* (isolées au préalable sur des milieux sélectifs) comprend l'examen de la morphologie, de la motilité, la réaction de Gram et les tests biochimiques. Ces tests demandent un temps considérable dont on ne dispose pas toujours en microbiologie médicale et alimentaire. Dès lors, plusieurs tests rapides ont été mis au point, dont le test d'agglutination au latex. Les particules de latex de polystyrène contenues dans ce test sont recouvertes d'immunoglobulines de lapins et se retrouvent alors sensibilisées contre les espèces *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*. Lorsque les particules de latex entrent en contact avec une structure possédant les antigènes correspondants (paroi cellulaire ou flagelle), une réaction immunochimique se produit, provoquant l'agglutination des particules de latex, visible à l'oeil nu. Ces tests

sont reportés comme étant fiables par leurs fabricants mais aucune étude officielle récente n'a permis de vérifier leur spécificité et leur précision. Quelques réactions faussement positives ont été cependant observées avec d'autres bactéries à Gram négatif telles que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Acinetobacter calcoaceticus* (Hazeleger & Beumer, 2014).

1.6.3. Galeries API Campy®

Dans le cadre de la sécurité alimentaire, la détection rapide d'agents pathogènes sur les aliments est importante pour la prévention des maladies. L'identification de *Campylobacter* repose sur 11 tests : oxydase, catalase, croissance à 25°C, 37°C et 42°C, uréase, production d'H₂S sur le milieu "Triple Sugar Iron" (TSI), hydrolyse de l'hippurate, réduction des nitrates et sensibilité aux antibiotiques acide nalidixique et céfazoline. Ces procédures de biotypage, bien que simples, demandent beaucoup de temps (jusqu'à cinq jours). Le système de galeries API Campy® (bioMérieux) permet l'identification biochimique rapide des espèces et du genre de *Campylobacter* dans un délai de 24 à 48 h (Dromigny, 2007).

Dans la littérature, l'efficacité de ces galeries est renseignée par quelques études menées il y a une vingtaine d'années. Celles-ci comparent les résultats obtenus lors de l'identification des souches par le système API Campy® et ceux obtenus par des tests biochimiques conventionnels ou par méthodes moléculaires telles que la PCR. Les résultats d'Huysmans *et al.* (1995), Shih (2000) et Martiny *et al.* (2011) montrent une identification précise de l'espèce *C. jejuni* à 92,8%, 96% et 100%, respectivement. L'identification de l'espèce *C. coli*, en revanche, est moins efficace. Rautelin *et al.* (1999), identifient seulement 7 souches de *C. coli* sur les 13 confirmées par des produits PCR. En outre, Martiny *et al.* démontrent un taux d'identification de cette espèce à 55,4% comparé à 74% pour Huysmans *et al.* Les espèces *C. fetus*, *C. lari* et *C. upsaliensis* ne sont quant à elles que très peu identifiées par les galeries API Campy®. Shih (2000) étudie également l'effet d'autres agents pathogènes de référence (29) sur les galeries API Campy®. Toutes ces souches apparaissent négatives et sont identifiées comme étant des «profils inacceptables». Cependant, d'anciennes études évoquent certains résultats faux-positifs (Huysmans *et al.*, 1995).

De manière générale, la communauté scientifique s'accorde à dire que c'est un système d'identification rapide et correcte dans les laboratoires de routine. Cependant, les résultats sont à considérer avec du recul et d'autres tests d'identification (biochimiques ou moléculaires) sont souvent effectués pour assurer une identification exacte des souches.

2 OBJECTIFS

Les maladies d'origine alimentaire représentent un problème majeur de santé publique au niveau mondial. Celles-ci sont causées principalement par des agents pathogènes microscopiques tels que les bactéries, les virus ou les parasites. *Campylobacter* spp. fait partie des quatre causes principales d'intoxication alimentaire dans le monde, particulièrement les deux espèces *C. jejuni* et *C. coli*. Ces bactéries sont responsables de la campylobactériose, une maladie diarrhéique généralement bénigne mais pouvant entraîner de lourdes complications, voire la mort. Dès lors, le contrôle de cette bactérie s'avère primordial. *Campylobacter* spp. est généralement commensale aux animaux, notamment à la volaille qui constitue la principale source d'infection alimentaire pour l'humain. La formation de biofilms et la capacité d'entrer en état VNC permet la survie de *Campylobacter* sur les aliments, dans l'eau et le sol ainsi que sur les installations industrielles des abattoirs et des usines de transformation. Auparavant, le contrôle de *Campylobacter* dans les élevages se faisait grâce à des antibiotiques, entraînant la résistance bactérienne de certains pathotypes. Pour éviter l'émergence de souches résistantes, une nouvelle approche pour la prévention et le biocontrôle de cette bactérie a fait l'objet d'un grand nombre de recherches récentes : l'utilisation de bactériophages. Au vu de leurs nombreux avantages, ces virus infectant spécifiquement les bactéries présentent un intérêt grandissant pour le contrôle des pathogènes, aussi bien dans le domaine de l'agro-alimentaire que dans celui de la santé humaine.

Le premier objectif de ce mémoire est l'isolement et la caractérisation d'un ou plusieurs phages de *C. jejuni* et/ou *C. coli* présentant une activité lytique. Des excréments de volaille provenant d'élevages industriels et d'élevages de particuliers seront traités dans le but d'isoler un phage. La présence d'activité lytique sera évaluée selon la méthode du *spot assay* sur des souches de *Campylobacter* de référence et isolées de l'environnement.

Le second objectif sera d'isoler et d'identifier les souches de *Campylobacter* se trouvant dans les excréments de volaille récoltés, de manière biochimique et moléculaire. L'isolement de souches venant de l'environnement permettra la réalisation du premier objectif mentionné. Parallèlement, l'utilisation de nouvelles méthodes de dénombrement, d'isolement et d'identification des bactéries *Campylobacter* durant ce mémoire permettra l'évaluation de celles-ci. En outre, la présence et la diversité des souches de *Campylobacter* seront évaluées en fonction de leurs origines dans un certain nombre d'élevages avicoles de Wallonie.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1. Milieux de culture et tampons

3.1.1. RAPID' *Campylobacter*

Le milieu RAPID' *Campylobacter* est un milieu sélectif chromogénique (permettant la mise en évidence d'activités enzymatiques par l'apparition d'une coloration spécifique) utilisé pour la détection et le dénombrement des espèces thermotolérantes principales du genre *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*) dans les matrices alimentaires et les échantillons environnementaux. Sa composition est donnée dans le Tableau 3.1. Il est produit par la firme Bio-Rad et sa préparation nécessite l'ajout d'un supplément lyophilisé. Ce supplément doit être réhydraté par 30 mL d'eau distillée stérile. La gélose est obtenue en diluant 20 g de milieu déshydraté dans 370 mL d'eau déminéralisée. Le mélange est autoclavé à 121°C durant 15 min. Après stérilisation, le mélange est refroidi à 47°C et 1 flacon de supplément reconstitué est ajouté aseptiquement avant de couler les boîtes de Pétri. Les boîtes sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière.

Tableau 3.1. Composition de la gélose RAPID' *Campylobacter*

Composants	Concentration (g/L)
Eau déminéralisée	-
Mélange nutritif	28,5
Mélange réducteur	1
NaCl	5
Tampon	1,25
Agents sélectifs	0,082
Mélange chromogénique	0,05
Agar	14

Les éléments nutritifs et les composés réducteurs favorisent la croissance des *Campylobacter* tandis que les agents sélectifs (composition non révélée par la firme) inhibent la croissance d'autres espèces de bactéries, de moisissures et de levures. Les *Campylobacter* thermotolérants apparaissent sur la gélose sous forme de colonies de couleur rouge brique.

3.1.2. CampyFood

Tout comme le milieu précédent, la gélose CampyFood est utilisée pour le dénombrement et l'isolement des espèces de *Campylobacter* thermotolérantes. Ce milieu est produit par bioMérieux et est vendu prêt à l'emploi. Les boîtes sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière. Sa composition est donnée dans le Tableau 3.2.

Tableau 3.2. Composition de la gélose CampyFood

Composants	Quantité
Eau déminéralisée	1 L
Peptone de caséine (bovine)	13 g
Peptone de viande (bovine ou porcine)	5 g
Peptone de cœur (bovine ou porcine)	3 g
Amidon de maïs	1 g
NaCl	5 g
Mélange réducteur	1,4 g
Agar	13,5 g
Indicateur coloré	0,025 g
Sérum (cheval)	20 ml
Mélange d'antibiotiques	20 ml

Le mélange de peptones et du sérum de cheval favorise la croissance des *Campylobacter* et les antibiotiques et antifongiques empêchent les contaminants de croître. Les colonies présumées *Campylobacter* présentent une coloration rouge-bordeaux à rouge-orangé avec parfois des reflets métalliques.

Notons que pour les milieux RAPID'*Campylobacter* et CampyFood, des bactéries autres que *Campylobacter* peuvent également pousser sous forme de colonies rouges.

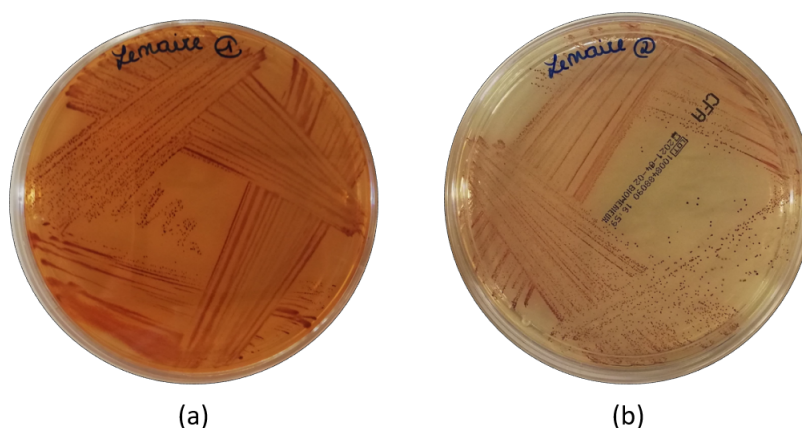


Figure 3.1. Striages de *C. jejuni* sur RAPID'*Campylobacter* (a) et sur CampyFood (b)

3.1.3. Solution de Ringer 1/4

La solution de Ringer 1/4 est une solution physiologique constituée d'un mélange de différents sels (Tableau 3.3) qui permet le maintien de l'équilibre osmotique des bactéries. En microbiologie, ce milieu est utilisé pour la préparation de suspensions d'échantillons et comme diluant dans les techniques de dilutions décimales pour le dénombrement. La

solution de Ringer 1/4 utilisée est à une concentration de 25%. Elle est obtenue par la dissolution d'un comprimé de Sigma-Aldrich dans 500 mL d'eau déminéralisée. La solution est ensuite stérilisée à 121°C pendant 15 min.

Tableau 3.3. Sels composants la solution de Ringer 1/4

Sels	Concentration (g/L)
NaCl	2,25
CaCl ₂	0,12
KCl	0,105
NaHCO ₃	0,05

3.1.4. Eau peptonée tamponnée

L'eau peptonée tamponnée (EPT, Tableau 3.4) est un diluant utilisé pour la préparation des suspensions mères de matrices alimentaires et d'échantillons environnementaux ainsi que pour la revitalisation de micro-organismes ayant subi des traitements sublétaux lors de procédés industriels. Le NaCl permet le maintien de l'équilibre osmotique des bactéries tandis que les phosphates servent de tampon. Le milieu est obtenu en dissolvant 20 g de milieu déshydraté (Bio-Rad) dans 1 L d'eau déminéralisée. Il est ensuite stérilisé 15 min à 121°C.

Tableau 3.4. Composition de l'eau peptonée tamponnée

Composants	Concentration (g/L)
Eau déminéralisée	-
Peptone	10
NaCl	5
Na ₂ HPO ₄	3,56
KH ₂ PO ₄	1,5

3.1.5. Gélose au sang

Le milieu au sang utilisé tout au long de ce mémoire sont les géloses "Columbia avec 5% de sang de cheval" produites par la marque Bio-Rad (Tableau 3.5). C'est un milieu polyvalent possédant une forte valeur nutritive. Il sert à l'isolement et à la culture de micro-organismes exigeants. La croissance des micro-organismes est assurée par la combinaison de deux peptones ainsi que par l'extrait de levure qui fournit les vitamines B nécessaires. La fécule de maïs permet l'absorption de dérivés toxiques présents dans les échantillons. Le sang quant à lui permet de détecter les réactions hémolytiques et fournit l'hème (nécessaire à la croissance de nombreuses espèces pathogènes) et la nicotinamide adénine dinucléotide.

Tableau 3.5. Composition de la gélose Columbia avec 5% de sang de cheval

Composants	Concentration (g/L)
Digestion pancréatique de caséine	12
Digestion peptique de tissu animal	5
Extrait de levure	3,5
Extrait de bœuf	3
Fécule de maïs	1
NaCl	5
Agar	13,5
Sang de cheval défibriné	5%

3.1.6. Triple Sugar Iron (TSI)

Le TSI est un milieu utilisé pour l'identification des entérobactéries à Gram négatif. La différenciation des bactéries se base sur leur capacité à fermenter les différents sucres présents dans le milieu (Tableau 3.6) et la production de gaz et d'acide. Cette dernière est détectée par le rouge de phénol, un indicateur de pH, qui apparaît rouge en milieu basique et jaune en milieu acide. Certaines bactéries réduisent le thiosulfate en H_2S qui réagit alors avec le sel de fer pour donner un précipité noir, le FeS . Ce milieu est obtenu en dissolvant 65 g de milieu déshydraté (Biolife) dans 1 L d'eau déminéralisée. Le tout est autoclavé 15 min à $121^\circ C$ avant d'être coulé dans les boîtes.

Tableau 3.6. Composition du milieu TSI

Composants	Concentration (g/L)
Eau déminéralisée	-
Extrait de viande	3
Extrait de levure	3
Peptone	20
NaCl	5
Lactose	10
Saccharose	10
Glucose	1
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	0,3
Rouge de phénol	0,024
$Na_2S_2O_3$	0,3
Agar	11

3.1.7. Bouillon de thioglycolate avec résazurine

Le bouillon de thioglycolate est un milieu polyvalent, enrichi et différentiel permettant la croissance rapide d'une grande variété de micro-organismes anaérobies stricts ou facultatifs. Il est obtenu en mettant en suspension 29,75 g de milieu déshydraté (Sigma-Aldrich) dans 1 L d'eau déminéralisée. Après homogénéisation complète, le mélange est stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 15 min. Enfin, le milieu est refroidi à 25°C et stocké au frigo. Sa composition est donnée au Tableau 3.7.

Tableau 3.7. Composition du milieu thioglycolate avec résazurine

Composants	Concentration (g/L)
Eau déminéralisée	-
Hydrolysate enzymatique de caséine	15
Extrait de levure	5
Dextrose	5,5
NaCl	2,5
L-Cystine	0,5
$C_2H_3NaO_2S$	0,5
Résazurine	0,001
Agar	0,75

L'hydrolysate enzymatique de caséine constitue la source d'azote tandis que l'extrait de levure représente la source de vitamines pour les bactéries. Le thioglycolate de sodium ($C_2H_3NaO_2S$) et la L-Cystine sont des agents réducteurs qui diminuent le potentiel redox du milieu en éliminant l'oxygène. Cette condition évite la formation de peroxyde qui peut être toxique pour certains organismes. La résazurine est un indicateur d'oxydation incolore qui devient rose lorsqu'elle est oxydée. On peut alors déterminer les besoins en oxygène des micro-organismes et différencier les aérobies obligatoires, les anaérobies obligatoires, les anaérobies facultatifs, les microaérophiles et les organismes aérotolérants. Le dextrose est un substrat supplémentaire favorisant la croissance rapide de nombreux organismes et le NaCl est utilisé pour maintenir l'équilibre osmotique du milieu. Bien que ce milieu ne soit pas nécessairement solide, la présence d'agar est importante car celui-ci retarde la diffusion de l'oxygène et des substances réductrices, ce qui facilite la reconnaissance visuelle de la croissance des bactéries.

Dans le cadre de ce mémoire, le bouillon de thioglycolate avec résazurine est utilisé sous forme liquide et présente 3 usages différents : i) revivification des cellules de *Campylobacter* ayant une croissance difficile, ii) milieu de culture liquide pour l'isolement de phages et iii) conservation des souches de *Campylobacter* à la température de -80°C. Pour ce faire, un mélange de 2/3 de thioglycolate pour 1/3 de glycérol est préparé et ensuite stérilisé 15 min à 121°C. Les souches isolées et identifiées sont alors inoculées dans des tubes de 1 mL de la préparation.

3.1.8. NZCYM

Le NZCYM (Tableau 3.8) est un milieu utilisé pour la propagation des phages. Celui-ci est riche en nutriments et permet la croissance rapide des micro-organismes car ceux-ci n'ont alors pas à synthétiser de précurseurs essentiels. En effet, l'hydrolysate enzymatique de caséine fournit l'azote, les acides aminés et le carbone nécessaire tandis que les apports en vitamines et en oligo-éléments sont assurés par l'extrait de levure. Les ions Na^+ assurent l'équilibre osmotique des cellules et les ions Mg^{2+} sont utilisés lors de réactions enzymatiques. Le NZCYM est obtenu en diluant 22,98 g de milieu déshydraté (Carl Roth) dans 1 L d'eau déminéralisée, le tout est ensuite stérilisé 15 min à 121°C.

Tableau 3.8. Composition du NZCYM dans 1L d'eau déminéralisée

Composants	Concentration (g/L)
Caséine digérée enzymatiquement	10
Extrait de levure	5
NaCl	5
MgSO_4 anhydre	0,98
Agar (si boîtes de Pétri)	12
Agar (si top agar)	6
Vancomycine	0,01

Le milieu NZCYM solide est obtenu en ajoutant 1,2% d'agar au mélange liquide avant de l'autoclaver. Enfin, avant de couler les boîtes de Pétri, de la vancomycine est ajoutée au mélange à une concentration de 10 µg/ml afin d'inhiber la flore accompagnatrice se trouvant dans l'échantillon traité. La préparation des «top agar» utilisés lors de l'isolement et la purification des phages nécessite quant à elle 0,6% d'agar. Cette faible quantité de gélifiant permet une lyse plus efficace des bactéries.

3.1.9. SM Buffer

Le tampon SM Buffer (Tableau 3.9) est un diluant principalement utilisé pour la manipulation de suspensions de phages. Les différents sels et la gélatine qui composent le tampon permettent la stabilité des phages dans la solution. À ce composé sont ajoutés 50 mL de Tris-HCl. Le mélange est ensuite ajusté à un pH de 7,5. Le tout est stérilisé à l'autoclave durant 15 min à 121°C.

Tableau 3.9. Composition du SM Buffer

Composants	Quantité
Eau déminéralisée	1 L
NaCl	5,8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 g
Gélatine	5 mL
Tris-HCl (1M)	50 mL

3.1.10. Bouillon cerveau-cœur supplémenté en cations (cBHI)

Le BHI (Bio-Rad) est un milieu enrichi adapté à la croissance des micro-organismes. En effet, celle-ci est favorisée par la protéose peptone, l'infusion de cervelle de veau et de cœur de bœuf ainsi que le glucose qui apportent les nutriments nécessaires. Ce milieu peut être utilisé pour la culture des bactéries anaérobies, les hémocultures et la culture des bactéries exigeantes. Sa composition est donnée au Tableau 3.10 ci-dessous.

Tableau 3.10. Composition cBHI

Composants	Concentration (g/L)
Eau déminéralisée	-
Protéose peptone	10
Infusion de cervelle de veau	2,5
Infusion de cœur de bœuf	5
NaCl	5
Na ₂ HPO ₄	2,5
Glucose	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,46
CaCl ₂	0,11

Pour l'isolement et la multiplication de phages, 2 mM de MgSO₄ et 0,2 mM de CaCl₂ sont ajoutés. En effet, ces ions favorisent l'adsorption des phages sur les bactéries hôtes.

3.2. Échantillons

Durant ce mémoire, les échantillons serviront d'une part à isoler des phages de *C. jejuni* et *C. coli* et d'autre part à comprendre la prévalence des espèces de *Campylobacter* thermotolérantes dans un certain nombre d'élevages de volailles wallons. Les analyses et manipulations menées au cours de cette année ont été réalisées à partir de fientes de poulets provenant d'un total de 43 élevages wallons (Tableau 3.11). Les échantillons ont été prélevés dans des élevages traditionnels de poulets de chair, de poules pondeuses, d'élevages biologiques (BIO) de poules pondeuses et poulets de chair, de poules d'ornement ainsi que chez des particuliers. D'autres campagnes d'échantillonnage ont également été

mis en place chez des éleveurs de canards. Certains élevages comprenant plusieurs bâtiments, un total de 54 échantillons ont été analysés. De manière générale, les fientes ont été prélevées chez des individus d'âge différents.

Tableau 3.11. Échantillonnage de fientes et types d'élevages. Les échantillons notés d'une étoile (*) sont ceux pour lesquels l'isolement de *Campylobacter* a été effectué tandis que les échantillons notés d'un losange (◊) ont été traités dans le but d'isoler des phages.

Numéro	Nom de l'élevage	Lieu	Type d'élevage
1	Particulier 1 *◊	Ottignies	Poules
2	Ferme de Baudecet *	Gembloux	Poulets de chair
3	Ferme des Noyers *	Corroy-le-Grand	Poules pondeuses BIO
4	La poule aux oeufs bleus *◊	Blanmont	Poules d'ornement
5	"Chez Éric" *	Nodebais	Poules pondeuses BIO
6	Ferme des Noyers *	Corroy-le-Grand	Poules pondeuses BIO
7	La poule aux oeufs bleus *◊	Blanmont	Poules d'ornement
8	Éleveur anonyme 01 *◊	Natoye	Poulets de chair
9	Éleveur anonyme 02 *◊	Ciney	Poulets de chair
10	Éleveur anonyme 03 *◊	Ciney	Poulets de chair
11	Éleveur anonyme 04 *◊	Havelange	Poulets de chair
12	Éleveur anonyme 05 *	Saint-André	Poulets de chair
13	Éleveur anonyme 06 *	Saint-André	Poulets de chair
14	Éleveur anonyme 07 *	Bilstain	Poulets de chair
15	Éleveur anonyme 08 *◊	Spy	Poulets de chair
16	Éleveur anonyme 09 *	Henri-Chapelle	Poulets de chair
17	Éleveur anonyme 10 *◊	Beauraing	Poulets de chair
18	Éleveur anonyme 11 *	Castillon	Poulets de chair
19	Éleveur anonyme 12 *	Thuillies	Poulets de chair
20	Éleveur anonyme 13 *	Rance	Poulets de chair
21	Éleveur anonyme 14 *	Froid-Chapelle	Poulets de chair
22	Éleveur anonyme 15 *	Mesnil Saint-Blaise	Poulets de chair
23	Éleveur anonyme 16 *	Haut Fays	Poulets de chair
24	Éleveur anonyme 17 *	Onhay	Poulets de chair
25	Éleveur anonyme 18 *	Mirwart	Poulets de chair
26	Éleveur anonyme 19 *	Waimés	Poulets de chair
27	Éleveur anonyme 20 *	Nandrin	Poulets de chair
28	Éleveur anonyme 21 *	La Roche-en-Ardenne	Poulets de chair
29	Éleveur anonyme 22 *	Hevillers	Poulets de chair
30	Éleveur anonyme 23 *	Somme-Leuze	Poulets de chair
31	Éleveur anonyme 24 *	Bertrix	Poulets de chair
32	Éleveur anonyme 25 *	Bertrix	Poulets de chair
33	Ferme de la Sauvenière *	Florennes	Canards

34	Particulier 2 *	Ottignies	Canards
35	Ferme *	Nivelles	Poulets de chair BIO
36	Ferme des longs-prés *	Walcourt	Poules pondeuses BIO
37	Verger de la Molinee *	Anhée	Poules pondeuses BIO
38	Ferme *	Havelange	Poulets de chair BIO
39	Ferme *	Lathuy	Poulets de chair BIO
40	Particulier 3 ◇	Ottignies	Poules
41	Particulier 4 ◇	Ottignies	Poules
42	Particulier 5 ◇	Ottignies	Poules
43	Particulier 6 ◇	Ottignies	Poules

3.3. Isolement de souches de *Campylobacter* thermotolérantes

L'isolement des souches de *Campylobacter* thermotolérantes (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) est réalisé selon les méthodes de dénombrement alternatives RAPID' *Campylobacter* et CampyFood. Ces deux méthodes sont validées respectivement par les normes ISO 16140 et Microval (2009LR28).

3.3.1. Ensemencement

Au préalable, 25 g d'échantillon sont dilués dans 225 mL d'EPT et homogénéisés au stomacher pour former la suspension-mère de dilution 10^{-1} . À partir de celle-ci, six dilutions successives au 1/10 sont réalisées avec 1 mL dans 9 mL de Ringer 1/4. Le tout est homogénéisé au vortex et 1 mL de suspension-mère est étalée sur trois boîtes de gélose RAPID' *Campylobacter* et CampyFood. Ensuite, 100 µl des dilutions successives sont étalées sur 1 boîte de chaque gélose à l'aide de râpeaux stériles. Le tout est incubé 48 h à 41,5°C en microaérobiose. L'atmosphère microaérophile est recréée dans une jarre hermétiquement fermée, à l'aide de sachets Campygen (Oxoid). Enfin, les colonies caractéristiques présentes sur les boîtes peuvent finalement être dénombrées.

3.3.2. Isolement

Une fois les colonies caractéristiques dénombrées, trois colonies de chaque phénotype sont isolées sur CampyFood et RAPID' *Campylobacter* par striage 4/4. Ces boîtes sont incubées pendant 48 h à 37°C en microaérobiose.

3.3.3. Confirmation des colonies présumptives

La confirmation des colonies présumptives de *Campylobacter* thermotolérants se fait à l'aide du *Campylobacter* confirm latex kit® (Bio-Rad), d'un test oxydase (VWR) et d'un test catalase (VWR). Ces trois tests sont réalisables à partir des colonies présentes sur les géloses sélectives. Une fois les tests effectués, on procède à l'isolement des colonies

confirmées par striage 4/4 sur gélose au sang de cheval que l'on incube pendant 48h à 37°C en microaérobiose.

***Campylobacter* confirm latex kit®**

Le *Campylobacter* confirm latex kit® (Bio-Rad) est un test rapide d'agglutination sur lame. Les particules de latex sont sensibilisées avec un antisérum polyvalent spécifique du genre *Campylobacter* obtenu chez le lapin. Une fois en contact avec une suspension bactérienne de cette espèce, les particules de latex sensibilisées forment rapidement des agrégats visibles à l'oeil nu. En absence de *Campylobacter*, la suspension de bactéries présente un aspect lisse et laiteux.

Test oxydase

Ce test permet la détection de l'enzyme cytochrome C oxydase des bactéries, qui permet la différenciation des bactéries Gram-négatives. Le test oxydase est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire et est présenté sous la forme d'écouvillons imbibés de phénylènediamine. Un écouvillon est mis en contact avec une colonie isolée. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, le réactif s'oxyde et forme un composé coloré rouge-grenat. À l'inverse, l'écouvillon reste incolore ou légèrement rose s'il n'y a pas de cytochrome C. Ici, les *Campylobacter* doivent obligatoirement réagir positivement à ce test.

Test catalase

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), toxique pour les bactéries, est le produit final du métabolisme aérobie des glucides. Les bactéries contenant l'enzyme catalase décomposent le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Deux à trois gouttes du réactif (H_2O_2 concentré à 3%) sont ajoutées sur la colonie présomptive. L'apparition rapide de bulles de gaz (dioxygène) confirme que le micro-organisme testé est catalase positif. Les espèces de *Campylobacter* recherchées dans le cadre de ce mémoire doivent réagir positivement à ce test.

3.3.4. Identification des souches par Galeries API Campy®

La dernière étape est l'identification des colonies isolées à l'aide d'une galerie API Campy® (bioMérieux).

API Campy® est un système standardisé et miniaturisé qui se présente sous la forme de galeries composées de deux parties et 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. La première partie comprend dix tests enzymatiques. Une suspension bactérienne dense (6 McFarland) est obtenue en récoltant les colonies sur gélose au sang incubées durant 48 h. Les 10 microtubes sont alors inoculés avec cette suspension. Le premier microtube rempli est couvert d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe. Cette

première moitié est incubée 48 h à 37°C en aérobiose. La seconde partie contient un test enzymatique et neuf tests d'assimilation. Le microtube contenant le test enzymatique est inoculé avec la suspension dense. Les autres tests sont quant à eux remplis d'une nouvelle suspension formée par le mélange de 150 µL de la suspension précédente dans un milieu «AUX» (bioMérieux). Cette partie est incubée dans les mêmes conditions que la première partie mais sous atmosphère microaérophile. Lors de la période d'incubation, les réactions produites provoquent des virages colorés instantanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces galeries est possible grâce à un tableau de lecture fourni par bioMérieux (Tableau 3.12). L'identification des espèces est finalement obtenue en encodant les résultats dans le logiciel d'identification API CAMPY®.

Tableau 3.12. Tests effectués par la galerie API Campy® ainsi que les résultats attendus pour *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*. Légende : + (55-100%), - (0-45%), V (45-55%).

Tests	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
Tests enzymatiques			
Hydrolyse de l'uréase	-	-	-
Réduction des nitrates	+	+	+
Test Estérase	+	+	-
Hydrolyse de l'hippurate	+	-	-
Test Gamma Glutamyl Transférase	-	-	-
Réduction du chlorure de Triphényl Tétrazolium	V	+	-
Métabolisme du Pyrrolidonyl Arylamidase	-	-	-
Métabolisme du L-Arginine Arylamidase	-	+	+
Métabolisme du L-Aspartate Arylamidase	-	-	-
Métabolisme de Phosphatase Alcaline	+	+	-
Production d'H ₂ S	-	-	-
Tests d'assimilation/inhibition			
Assimilation du glucose	-	-	-
Assimilation du succinate de sodium	+	+	-
Inhibition par l'acide nalidixique	-	-	-
Inhibition par céfazoline	+	+	-
Assimilation de l'acétate de sodium	V	+	-
Assimilation du propionate	-	+	-
Assimilation du malate	+	-	-
Assimilation du citrate de sodium	-	-	-
Sensibilité à l'érythromycine	-	-	-

Lorsque le logiciel n'arrive pas à correctement identifier une colonie, celui-ci définit le résultat comme étant un «profil inacceptable». Ces colonies sont alors identifiées grâce au

séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S).

3.3.5. Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S

Afin de s'assurer de la précision des galeries API Campy[®], un séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S de toutes les souches isolées est effectué. Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S permet l'identification du genre, et éventuellement de l'espèce bactérienne. Ce gène d'environ 1500 pb est présent dans l'ensemble des souches bactériennes. Cette méthode est intéressante notamment lorsque les méthodes classiques biochimiques ne permettent pas une identification correcte des souches (Lamoril *et al.*, 2008). Pour séquencer le gène d'intérêt, une amplification d'ADN est d'abord effectuée par PCR. La présence de produits PCR est ensuite détectée par électrophorèse sur gel d'agarose. Enfin, l'ADN amplifié est purifié et envoyé au séquençage.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

La *Polymerase Chain Reaction* (PCR) est une méthode permettant l'amplification de fragments d'ADN. Cette amplification est possible grâce à des étapes successives de dénaturation de l'ADN, d'hybridation des amorces sur les brins et d'élongation de ces amorces par une polymérase. Ce cycle est répété 30 fois dans un thermocycleur permettant une amplification exponentielle des fragments d'ADN originaux. La polymérase utilisée est la GoTaq[®]. Les volumes utilisés pour le mélange PCR sont donnés au Tableau 3.13 et les séquences des amorces utilisées sont reprises dans le Tableau 3.14. Le protocole est donné au Tableau 3.15.

Tableau 3.13. Composition du mélange PCR pour avec la polymérase GoTaq[®]

Composants	Volume (µL)
Eau stérile	21
5x GoTaq [®] Reaction Buffer	10
Amorce Forward (10 µM)	5
Amorce Reverse (10 µM)	5
dNTP (2mM)	5
MgCl ₂	3
Polymérase GoTaq [®]	0,25
ADN	1
Total	50

Tableau 3.14. Amorces utilisées pour la PCR.

Amorces	Séquences (5' → 3')
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT

Tableau 3.15. Programme PCR pour l'amplification de l'ADN codant l'ARNr 16S

Étapes	Température	Temps	
Dénaturation initiale	95°C	5'	
Amplification	95°C	1'	} 30 cycles
	52°C	1'	
	72°C	1'	
Élongation finale	72°C	10'	
Conservation	10°C	∞	

Électrophorèse sur gel d'agarose

On utilise l'électrophorèse sur gel d'agarose afin de vérifier le succès de l'amplification de l'ADN. Cette technique consiste à faire migrer les fragments d'ADN à travers le gel grâce à une différence de potentiel électrique. La séparation des fragments se fait en fonction de la taille de ceux-ci : les plus petits migrent plus rapidement à travers le gel. La composition du gel d'agarose est donnée dans le Tableau 3.16. Le BET permet la formation d'un complexe d'ADN qui sera visible une fois exposé à la lumière UV. Un mélange de 1 µL de tampon de charge (Bleu de bromophénol et saccharose) et de 5 µL de chaque produit PCR est introduit dans les puits. Une échelle appelée «*Smart Ladder*» (Eurogentec) est également utilisée pour déterminer la taille des fragments d'ADN. L'électrophorèse est réalisée à 100 V durant 30 min. Finalement, les fragments d'ADN sont révélés aux UV, à l'aide de l'appareil Quantity One (Bio-Rad). La composition du tampon TAE utilisé pour le gel est détaillée ci-dessous (Tableau 3.17).

Tableau 3.16. Composition du gel d'agarose

Composants	Concentration
Tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) (0,5x)	-
Agarose (Agarose LE, ChemCruz™)	0,8%
Bromure d'éthidium (BET)	0,2 µg/mL

Tableau 3.17. Composition du tampon TAE (50x)

Composants	Concentration	Marque
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane	2 M	Merck
NaOAc.3H ₂ O	1 M	Merck
EDTA (0.5 M, pH 8)	0.05 M	Sigma-Aldrich

Séquençage

Si les amplicons révélés par l'électrophorèse montrent une bande de la taille désirée, l'ADN présent dans le mélange PCR est purifié à l'aide du kit GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich). L'ADN purifié est envoyé à la firme MacroGen Corporation (Pays-Bas) qui réalise un séquençage. Une fois reçues, les séquences sont analysées et comparées à la base de données BLAST (NCBI.com). Le pourcentage d'identité de la souche la plus proche doit être supérieur à 97% pour identifier l'espèce.

3.4. *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST)

Un séquençage de type MLST et *core genome* MLST (cgMLST) a également été réalisé sur 17 et 14 souches isolées, respectivement. Cette méthode de séquençage (Maiden *et al.*, 1998) permet de comparer entre elles les souches d'une même espèce de bactérie pathogène. Le MLST des espèces *C. jejuni* et *C. coli* implique le séquençage de l'ADN de sept «*house-keeping genes*» (*aspA*, *glnA*, *gluA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*) et chaque locus se voit attribuer un numéro d'allèle. Ces allèles sont rassemblés et forment un profil allélique qui pourra être comparé avec le profil allélique d'autres souches (obtenu suite à différentes études) grâce à une base de données accessible sur PubMLST (pubmlst.org/organisms/campylobacter-jejunicoli). Plus les souches possèdent des séquences nucléiques communes, plus elles sont apparentées. Dès lors, il est possible de comparer et déterminer les relations moléculaires entre les souches afin de comprendre au mieux l'écologie de *C. jejuni* et *C. coli*. Le cgMLST, est un typage selon 637 loci qui ont été sélectionnés par la firme SeqSphere (www.cgMLST.org).

La première étape est l'extraction d'ADN des souches en utilisant le kit Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega) avec quelques modifications mineures. Le séquençage du génome entier a été réalisé au LIST (Luxembourg Institute of Science and Technology) en utilisant la technologie de séquençage Illumina (Illumina Inc., San Diego, USA) basée sur le séquençage par synthèse. Les lectures ont été coupées par FASTQC (Andrews *et al.*, 2010) et assemblées à l'aide de SPAdes 3.15.2. (Andrey *et al.*, 2020). Le typage MLST a été réalisé sur Ridom SeqSphere+ (version 5.1.0) et la présence de gènes de résistance aux antibiotiques a été déterminée à l'aide de ResFinder 4.1. (Bortolaia *et al.*, 2020; Zankari *et al.*, 2017).

3.5. Isolement des phages de *Campylobacter* spp.

3.5.1. Extraction des phages à partir des échantillons

L'extraction des phages se fait à partir d'échantillons récoltés dans des élevages avicoles (Tableau 3.11). D'abord, une suspension de 25% de l'échantillon d'intérêt est préparée dans le SM Buffer. Cette suspension est alors incubée 4 h à température ambiante avec une agitation de 80 rpm puis 20 h à 4°C, à 80 rpm. Le surnageant est ensuite transféré dans un flacon stérile pour être centrifugé à 3 000 g durant 5 puis 10 min à 4°C. Enfin, après 3 h de décantation, la solution est filtrée à l'aide de filtres de 0,8 µm, 0,45 µm et 0,22 µm (Sartorius) avant d'être concentrée à l'aide d'une colonne Amicon (Merck Millipore). Ces colonnes sont des filtres centrifuges qui permettent une ultrafiltration rapide ainsi que l'augmentation des facteurs de concentration en virus de la solution. La suspension filtrée est transférée dans la colonne et centrifugée 20 min à 4 000 g et à 4°C. Une fois le concentrat récupéré, celui-ci est filtré sur 0,22 µm une nouvelle fois car les colonnes Amicon ne sont pas stériles.

3.5.2. Isolement des phages de *Campylobacter* spp.

L'isolement des phages de *C. jejuni* et *C. coli* a été effectué en utilisant la méthode du *spot assay*. Après une incubation des bactéries de 48 h puis 24 h sur des géloses au sang, 3mL de cBHI sont ajoutés aux boîtes de Pétri sous le flux. À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, les bactéries sont collectées et incubées 4 h à 37°C sous forme de suspension liquide en microaérobiose. 500 µL de culture bactérienne d'intérêt sont mélangés à 5mL de top agar de NZCYM et le mélange est rapidement versé sur la gélose de NZCYM afin de recouvrir cette dernière d'un tapis bactérien lisse et régulier. Les boîtes sont alors séchées 15 min sous le flux laminaire à température ambiante. 15 gouttes de 10 µL de suspension filtrée et concentrée contenant potentiellement des phages sont déposées sur chaque boîte. Dès qu'il a été possible, les suspensions ont été testées en priorité sur les souches bactériennes provenant du même échantillon afin d'augmenter la probabilité que les phages soient testés sur leurs hôtes bactériens spécifiques. Après 48 h d'incubation à 37°C en microaérobiose, les plaques de lyse éventuellement présentes sont récoltées à l'aide d'un tip et resuspendues dans 500 µL de SM Buffer.

3.5.3. Purification des phages de *Campylobacter* spp.

La seconde et dernière étape réalisée durant ce mémoire est la purification. Celle-ci se fait selon la technique du *double layer agar assay*. 100 µL de plusieurs dilutions (10x) des suspensions provenant des plaques de lyse sont mélangées à 400 µL d'une culture de la bactérie cible, puis incubés 15 min à 37°C en aérobiose permettant l'adsorption potentielle des phages. Le mélange est ensuite étalé sur les boîtes de NZCYM qui sont observées après 48 h d'incubation à 37°C en atmosphère microaérophile. Les plaques de

lyse éventuellement présentes sont resuspendues dans 500 μ L de SM Buffer. L'opération est répétée au minimum trois fois.

4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1. Expériences visant à isoler un campylophage

Le premier objectif de ce mémoire visait à isoler des campylophages capables d'infecter une ou plusieurs souches de *C. jejuni* et/ou *C. coli* afin d'approfondir la connaissance scientifique des phages de *Campylobacter* qui ont été peu étudiés jusqu'ici. À long terme, de tels phages pourraient trouver des applications dans les domaines de la phagothérapie ou du biocontrôle.

Le procédé d'isolement de phages se fait à partir de divers échantillons de matières fécales de poulets, selon la méthode du *spot assay*. La présence de phages dans un échantillon est révélée par la formation de plaques de lyse individuelles sur le tapis bactérien formé par la souche d'intérêt.

Seize échantillons différents (Tableau 3.11) ont été testés pour révéler la présence de phages sur un total de 44 souches bactériennes : 41 *C. jejuni* et 3 *C. coli*. Neuf des 16 échantillons testés provenaient d'élevages industriels de poulets de chair, 5 échantillons provenaient d'élevages particuliers et 2 de poules d'ornement. Cinq des souches utilisées sont des souches de référence (*C. coli* LMG 6440, *C. coli* DSM 24 189, *C. coli* DSM 100 395, *C. jejuni* DSM 4688 et *C. jejuni* LMG 23 210) tandis que les autres souches utilisées ont été isolées dans le cadre du second objectif de ce mémoire. Les campylophages étant très spécifiques, chaque échantillon (après traitement) est testé sur 10 souches de *Campylobacter* différentes afin d'augmenter la probabilité d'isoler un phage. Au total, 183 combinaisons de souches et de suspensions contenant potentiellement des phages ont été testées.

Aucune plaque de lyse individuelle (indiquant la présence possible de phages) n'a été observée. Cependant, sur 5 boîtes différentes, de légers «halos» troubles ont été observés (Fig. 4.1) à l'endroit où les gouttes de suspension traitée ont été déposées sur le tapis bactérien, indiquant une éventuelle activité lytique pouvant signaler la présence de campylophages. Ces «halos» ont été observés suite au traitement d'échantillons provenant d'un élevage particulier et de 2 bâtiments d'un élevage de poulets de chair (Tableau 4.1).

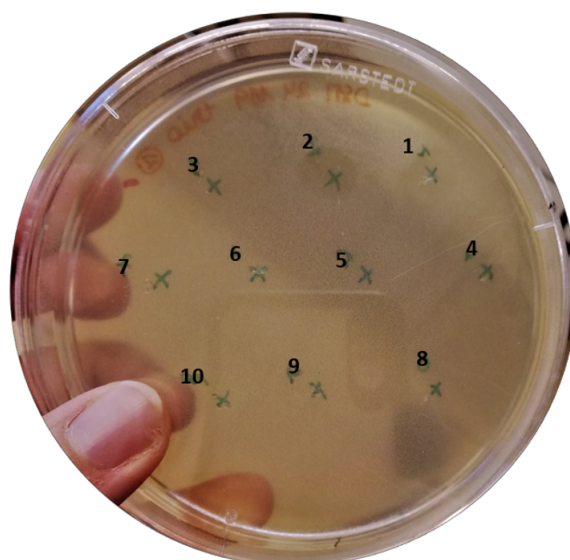


Figure 4.1. «Halos» troubles observés. Les 2 «halos» troubles observés (croix 1 et 2) suite au test de l'échantillon 1 sur la souche de référence *C. coli* DSM 24 189.

Tableau 4.1. Nombre de «halos» troubles observés sur cinq des souches bactériennes testées. La souche de référence DSM 24 189 appartient à l'espèce *C. coli* tandis que les 4 souches environnementales appartiennent à l'espèce *C. jejuni*. Les échantillons sont issus des endroits 1 et 15 (voir Tableau 3.11). L'exploitation numéro 15 compte deux bâtiments d'élevage (a et b).

Nom de la souche	Numéro de l'échantillon	Nombre de «halos» observés
DSM 24 189	1	2
CDMER0510	15a	6
CDMER0510	15b	18
CDMER0512	15a	11
CDMER0518	15b	3

Les campylophages éventuellement présents dans les «halos» troubles ont été récoltés et resuspendus dans du SM buffer. Pour chaque resuspension de potentiel campylophages provenant des 5 boîtes de *spot assay* présentant des «halos» troubles, deux étapes de purifications consécutives ont été effectuées selon la méthode du *double layer agar assay* où 4 dilutions (10x) successives de suspension ont été testées. Après l'étape de purification, aucune plaque de lyse individuelle n'a été observée.

Deux explications à ce phénomène sont possibles : soit la suspension ne contenait pas de phages infectant les souches de *Campylobacter* testées (les «halos» lytiques seraient alors le résultat d'autres facteurs pouvant induire la mort des *Campylobacter*, e.g., bactériocines), soit les phages n'ont pas pu se propager de manière adéquate. Compte tenu de ces observations, il a été décidé d'interrompre cette partie du travail.

Le protocole suivi pour les étapes d'extraction et d'isolement des phages infectant *Campylobacter* est un protocole similaire à ceux rapportés par d'autres groupes de recherche ayant isolé et caractérisé des campylophages auparavant (El-Shibiny *et al.*, 2005 ;

Loc-Carrillo *et al.*, 2007 ; Gencay *et al.*, 2017). Dès lors, il est important de discuter des raisons pouvant expliquer les résultats obtenus. La discussion portera sur trois points : i) le matériel biologique utilisé (échantillons et souches bactériennes), ii) les éléments supplémentaires pouvant être mis en place dans le protocole d'isolement et iii) la présence de «halos» sur certaines boîtes de Pétri.

4.1.1. Matériel biologique utilisé

Un des éléments pouvant expliquer les résultats obtenus est le choix des échantillons utilisés pour l'isolement de phages. Généralement, les phages sont isolés à partir de matrices provenant d'environnements où l'hôte bactérien se trouve en grande quantité. Dans le cas des phages spécifiques à *Campylobacter*, on privilégie souvent la collecte d'échantillons provenant de la volaille (carcasse, intestins, peau, matières fécales, viande de poulet vendue au détail) étant donné que la bactérie est commensale à ces animaux (Janež & Loc-Carrillo, 2013). Néanmoins, certains campylophages ont également été isolés à partir de fèces humaines, de carcasses et déjections de porc, d'effluents d'abattoirs et d'eaux usées (Nafarrate *et al.*, 2021b).

Dans le cadre de ce travail, ce sont les matières fécales de poulets qui ont été choisies comme source potentielle de campylophages. Ces échantillons proviennent d'élevages de poulets de chair et de particuliers. Owens *et al.* (2013) n'ont isolé aucun campylophage à partir de fientes de poulets issus de ces deux types d'élevages, bien que les individus étaient colonisés par *Campylobacter*. Parallèlement, El-Shibiny *et al.* (2005) ont isolé un seul phage à partir de fèces de poulets élevés en plein air alors que durant la même étude, ils isolent des bactériophages depuis 51% des échantillons provenant d'élevages biologiques. Une des raisons expliquant cette variation du taux d'échantillons contenant des phages pouvant être isolés est l'environnement des oiseaux où les prélèvements de matières fécales ont été faits. En effet, les poulets élevés en plein air sont exposés à diverses sources de contaminations environnementales pouvant engendrer la colonisation de ceux-ci par une grande diversité de souches de *Campylobacter* et par conséquent, de leurs phages. Les poulets de chair étant élevés dans des bâtiments fermés, ceux-ci ne sont pas confrontés à de telles expositions. De plus, le taux de contamination des poulets dépend également du nombre d'individus dans le troupeau (Conlan *et al.*, 2007). Dès lors, les phages sont probablement moins présents dans les échantillons issus de poulets de particuliers, bien qu'ils soient eux aussi élevés en plein air.

Un autre paramètre important lors de l'isolement des phages est le choix des souches bactériennes utilisées. Lors de ce travail, la majorité des souches utilisées ont préalablement été isolées de matières fécales. Bien que chaque suspension filtrée ait été testée sur 10 souches différentes, les combinaisons de souches bactériennes/suspensions ont été faites de manière aléatoire pour la plupart des essais. Or, tester les suspensions traitées avec des souches de *Campylobacter* isolées du même échantillon fournit une plus grande proba-

bilité d'avoir un hôte sensible aux phages recherchés (Janež & Loc-Carrillo, 2013). C'est pourquoi lors de l'avant-dernier essai, les échantillons 15a et 15b ont été testés avec des isolats bactériens provenant du même échantillon. C'est suite à cet essai qu'une potentielle activité lytique a été détectée. Toutefois, un seul essai similaire avec un autre échantillon a pu être répété et n'était pas concluant.

En admettant que des phages soient présents dans la suspension testée, il a déjà été rapporté que certains campylophages ne sont pas capable de lyser totalement les souches de *Campylobacter* isolées depuis la même source (El-Shibiny *et al.*, 2005). L'une des possibilités expliquant ce phénomène est la présence de souches de *Campylobacter* ayant acquis une résistance aux phages dans l'échantillon traité. La deuxième possibilité est la présence d'une souche résistante aux phages d'intérêts dans l'échantillon aux côtés de l'hôte spécifique. Ce dernier serait alors présent en trop faible quantité pour permettre l'isolement de tels phages. Ces éléments pourraient contribuer au fait qu'aucun campylophage n'ait été isolé au terme de ce mémoire.

Afin d'éviter ce genre de complication et d'augmenter les chances d'isoler un phage, Gencay *et al.* (2017) et Jäckel *et al.* (2019) préconisent l'utilisation d'une souche indicatrice dont la sensibilité à de nombreux phages lytiques a été démontrée. La souche la plus souvent utilisée est *C. jejuni* NCTC 12 662. En effet, celle-ci s'est avérée être sensible à une large gamme de phages infectant *C. jejuni* et *C. coli*. Toutefois, l'utilisation exclusive de NCTC 12 662 peut engendrer un biais dans le type de phage isolé (Sørensen *et al.*, 2015). Dès lors, il est préférable d'utiliser à la fois des souches de *Campylobacter* indicatrices et isolées de l'environnement pour optimiser l'isolement de campylophages et assurer une diversité d'isolats.

De plus, un phage déjà isolé, caractérisé et séquencé peut également être utilisé d'une part comme contrôle positif d'activité lytique et d'autre part pour appréhender, s'appropriier et maîtriser le protocole. Atterbury *et al.* (2003) proposent l'utilisation du phage $\varphi 2$ (NCTC 12 674) comme contrôle positif.

4.1.2. Protocole mis en place

Bien qu'un certain nombre de «halos» troubles soient visibles sur certaines boîtes de Pétri, la propagation de potentiels phages n'a pas été possible. Ce phénomène a déjà été observé notamment par Janež *et al.* (2014) lors d'une étude visant à isoler et caractériser des campylophages appartenant au groupe III. En effet, sur 14 phages isolés, 5 d'entre eux n'ont pas été capables d'être propagés lors de l'étape de la purification. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce phénomène. Premièrement, si les «halos» sont bien la conséquence de phages virulents, les phages semblent être en trop petite quantité ou présentent un trop faible taux de productivité que pour infecter les bactéries sur le tapis. Une deuxième possibilité est la nature tempérée de ces potentiels phages. En effet, les plaques de lyse dites «turbides» sont souvent liées à la présence de phage accomplissant un cycle lysogénique.

Les phages n'engendrent alors pas de lyse cellulaire systématique. Troisièmement, il a déjà été renseigné que l'un des désavantages de la technique du *double layer agar assay* est la difficulté de propagation des phages à travers l'agar (Hyman, 2019). Cependant, l'absence de contrôle positif ne nous permet pas de tirer de conclusions quant à la raison pour laquelle la purification n'a pas fonctionné.

Il existe une méthode pour s'assurer au préalable de la présence de phages dans un échantillon : le *pre-screening* de cet échantillon par PCR quantitative. Cette méthode a été mise au point par Jäckel *et al.* (2017) et permet la détection rapide ainsi que la discrimination des campylophages appartenant aux groupes II et III. Effectuer une telle étape de détection peut être avantageux pour plusieurs raisons : d'une part, une détection rapide permet de présélectionner les échantillons d'intérêts et de s'assurer de la présence de phages dans ceux-ci. D'autre part, la connaissance du type de phages présents dans l'échantillon semble intéressante pour sélectionner les souches indicatrices et environnementales à utiliser afin d'optimiser l'étape d'isolement. En effet, les campylophages du groupe II et III n'infectent pas tous les mêmes bactéries. Dès lors, il est possible de cibler plus facilement les hôtes spécifiques du phage d'intérêt.

Souvent renseignée dans la littérature, une étape supplémentaire d'enrichissement peut également être effectuée. Carvalho *et al.* (2010b) isolent 33 bactériophages après une étape d'enrichissement avec des souches de *C. coli* isolées à partir de produits dérivés de volaille. Sans cette étape, aucun phage n'a pu être isolé par le groupe de scientifiques. De même, Nafarrate *et al.* (2021b) isolent 304 campylophages en intégrant une étape d'enrichissement à leur protocole. Cette étape consiste en l'incubation de l'échantillon d'intérêt filtré dans une suspension composée d'une souche de *Campylobacter* seule ou bien d'un mélange de souches cibles/indicatrices durant leur phase de croissance exponentielle. Cette méthode permet le développement des phages présents qui peuvent alors se propager dans n'importe quel hôte sensible. Dès lors, la détection de phages lors du *spot assay* est facilitée. Souvent, un bouillon de culture spécifique à *Campylobacter* (Bolton broth ou Preston broth) est utilisé pour assurer une croissance bactérienne optimale (Furuta *et al.*, 2017; Nafarrate *et al.*, 2020). Cette étape supplémentaire permet également l'isolement des campylophages de manière sélective : l'ajout de souches spécifiques dans le bouillon d'enrichissement a un effet sélectif sur les bactériophages puisque seuls ceux capables d'infecter l'une de ces souches se reproduisent. De cette manière il est possible de cibler l'isolement de phages infectant les souches pathogènes les plus répandues dans l'industrie agro-alimentaire ou causant la campylobactériose.

Dans le cadre de ce mémoire, il a néanmoins été décidé de ne pas intégrer d'étape d'enrichissement au protocole. Dans un contexte thérapeutique ou de biocontrôle, l'enrichissement d'échantillons en vue d'isoler un phage fait face à plusieurs limites, notamment celle d'isoler un phage tempéré. En effet, il est nécessaire d'isoler un phage lytique. Dès lors, le choix des souches bactériennes présentes dans le bouillon est primordial : celles-ci ne doivent pas être infectées par un phage effectuant un cycle lysogénique. Le prophage

peut effectuer la transduction et s'intégrer dans un hôte différent. La transduction est un transfert de matériel génétique (ADN bactérien) d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse par l'intermédiaire d'un vecteur viral, un bactériophage. Ce phénomène pouvant entraîner un transfert de gènes de virulence et de gènes de résistance aux antibiotiques, les phages deviennent alors des candidats inappropriés pour la phagothérapie.

4.1.3. «Halos» visibles

Les plaques de lyse produites par *Campylobacter* sont généralement petites (1-3 mm de diamètre) et légèrement turbides (Jäckel *et al.*, 2019). Les «halos» observés (Fig. 4.1) ne présentent pas exactement le même aspect que les exemples fournis par Gencay *et al.* (2017) (Fig. 4.2). De plus, la purification n'étant pas effective, il est intéressant de se demander par quel phénomène sont causés ces «halos» troubles observés.

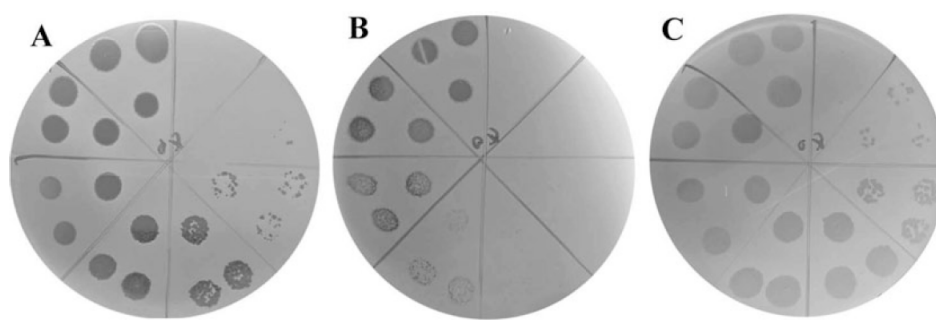


Figure 4.2. Exemples de plaques de lyse engendrées par un phage de *Campylobacter*
(A) Plaques de taille moyenne (1-2 mm) et claires. (B) Plaques parsemées et plaques claires.
(C) Plaques de grande taille (2-3 mm) et troubles, adapté de Gencay *et al.* (2017)

Comme déjà discuté, la propagation de campylophages n'a pas toujours été concluante dans le passé. Cependant, il est également possible que la raison pour laquelle cette étape n'ait pas été concluante ici est l'absence de phages à propager dans la suspension filtrée. Dès lors, l'activité lytique causant les «halos» observés n'est peut-être pas due à des bactériophages. Une hypothèse serait que l'altération du tapis bactérien soit provoquée par des bactériocines ou des métabolites inhibiteurs de croissance de *Campylobacter* produits par d'autres bactéries présentes dans la flore intestinale de l'oiseau. Après une filtration à 0,22 μm les bactéries sont éliminées de la suspension mais pas les matières solubles et les particules de moindre taille. De plus, l'action inhibitrice de certains métabolites produits par des bactéries issues du microbiote intestinal a déjà été testée *in vivo* et s'est avérée efficace pour la réduction de *Campylobacter* chez les poulets de chair (voir section 1.3.3.). Ces résultats laissent penser que ce genre de phénomène inhibiteur se passe également de manière naturelle dans le caecum des poulets. Dès lors, l'activité lytique observée pourrait être provoquée par des bactériocines ou des acides organiques présents dans la suspension traitée et filtrée.

Dans le cadre de ce mémoire, les différents échantillons testés n'ont pas permis d'isoler

un campylophage lytique. Toutefois, plusieurs pistes présentées ici peuvent être exploitées afin d'augmenter les chances d'isoler un phage de *Campylobacter* dans le futur.

4.2. Isolement et identification de souches de *Campylobacter* thermotolérantes

Le second objectif de ce mémoire est l'isolement de souches de *Campylobacter* thermotolérantes depuis des matières fécales de volaille. Dans un premier temps, ces souches étaient isolées dans le but de les utiliser pour l'isolement d'un campylophage, soit l'objectif premier de ce mémoire. Cependant, au vu des résultats obtenus concernant cette partie du travail, l'isolement des souches de *Campylobacter* est devenu un objectif à part entière et l'objectif principal. Toutefois, les manipulations étant secondaires au début du travail, l'échantillonnage n'est pas uniforme. Par conséquent, les résultats présentés dans cette section ne pourront pas permettre de tirer de vraies conclusions quant à la prévalence de *Campylobacter* dans les exploitations agricoles. Dès lors, cette partie du travail permettra la mise en évidence de quelques tendances observables concernant l'écologie de *Campylobacter* dans certains élevages avicoles wallons.

4.2.1. Dénombrement des colonies de *Campylobacter* thermotolérantes

Afin de détecter et d'estimer la charge bactérienne en *Campylobacter* dans les matières fécales des poulets, chaque échantillon est dilué dans de l'EPT et passé au stomacher. Six dilutions décimales sont réalisées depuis cette solution-mère et étalées sur les géloses RAPID'*Campylobacter* (RAPID) et CampyFood (CFA). Le dénombrement des colonies de *Campylobacter* est réalisé sur les géloses après 48 h d'incubation à 41,5°C. Cela permet la croissance sélective des colonies thermotolérantes, à savoir *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis*.

Échantillons

Les échantillons ont été récoltés dans 39 élevages avicoles (voir Tableau 3.11). Certaines exploitations comprenant plusieurs bâtiments d'élevage différents, un total de 54 échantillons ont été collectés et testés afin de détecter la présence potentielle de *Campylobacter* et énumérer à quelle concentration les bactéries s'y trouvent. Il a été choisi d'échantillonner dans différents types d'élevages afin d'assurer une certaine diversité de souches isolées.

Quinze échantillons parmi les 54 analysés contiennent des *Campylobacter* thermotolérantes, ce qui représente 27,8% de ceux-ci (Tableau 4.2). La prévalence de *Campylobacter* dans ces échantillons est moindre que celle rapportée par d'autres études menées préalablement en Espagne, aux Pays-Bas et aux États-Unis qui détectent *Campylobacter* dans 35 à 60% des fientes analysées (Torralbo *et al.*, 2014 ; Horstink, 2020 ; Xu *et al.*, 2021). La

Tableau 4.2. Nombre d'échantillons récoltés et positifs selon le type d'élevage. Un échantillon est considéré comme positif lorsque la présence de *Campylobacter* est détectée sur les géloses spécifiques.

Type d'élevage	Nombre d'échantillons	
	Testés	Positifs (%)
Poulets de chair	41	7 (17%)
Poules pondeuses BIO	5	2 (40%)
Poulets de chair BIO	3	1 (33%)
Poules ornementales	2	2 (100%)
Ferme de foie gras (canards)	1	1 (100%)
Élevage particulier de poules	1	1 (100%)
Élevage particulier de canards	1	1 (100%)
Total	54	15 (27,8%)

différence entre les résultats obtenus et la littérature peut s'expliquer par la différence du nombre d'échantillons analysés. Torralbo *et al.* (2014) et Xu *et al.* (2021) analysent entre 500 et 2.000 matrices fécales, soit 10 à 40 fois le nombre de matrices analysées lors de ce mémoire. De plus, la colonisation des poulets de chair par *Campylobacter* est moindre que celle des poulets ayant accès à l'extérieur (Salvat *et al.*, 2017). Or, la majorité des échantillons analysés proviennent d'animaux élevés confinés dans des bâtiments. En outre, il a déjà été rapporté que la volaille subit un pic de contamination par *Campylobacter* entre les mois de mai et de novembre. Vandeplas *et al.* (2010) mesurent une prévalence des campylobactéries de 100% en été et de 33% en hiver. La récolte des 54 échantillons ayant eu lieu entre novembre et avril, il est possible que la saison influence également ce résultat. Aussi, l'apparition d'une épidémie de grippe aviaire en Belgique cet hiver a eu pour conséquence le renforcement des mesures de biosécurité dans les poulaillers, diminuant certainement la contamination des animaux. Cependant, les élevages possédant le label BIO ont l'obligation de donner à leurs animaux l'accès à l'extérieur lorsque la situation n'est pas critique. Dès lors, des moyens de protection sont mis en place (comme des filets autour de l'enclos par exemple) pour éviter le contact avec d'autres oiseaux. Les échantillons récoltés dans les élevages BIO ont été effectués au mois d'avril lorsque les animaux avaient accès à l'extérieur, la situation sanitaire étant sous contrôle.

On observe que 40% des élevages de poules pondeuses BIO sont positifs à *Campylobacter* (Tableau 4.2). Ce chiffre est également plus bas que ce qui est renseigné dans la littérature. Bien que très peu d'études ont déjà été menées sur la prévalence de *Campylobacter* chez les poules pondeuses; en Finlande, aux États-Unis et en Allemagne, les chiffres varient entre 70 et 95% (Sulonen *et al.*, 2007; El Metwaly Ahmed *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2016). À nouveau, le nombre d'échantillons reste peu représentatif.

Dénombrement

Le dénombrement a été effectué pour 51 échantillons différents sur RAPID et CFA (3 échantillons n'ont été ensemencés que sur RAPID). Les résultats obtenus (Fig. 4.3) sont très différents en fonction des élevages. En ce qui concerne les élevages de poulets, la charge en *Campylobacter* est plus élevée dans les élevages viandeux que dans les élevages de poules pondeuses, d'ornement et de particuliers. En effet, la charge moyenne de *Campylobacter* dans les échantillons provenant des élevages de poulets de chair non-BIO et dans l'échantillon provenant de poulets de chair BIO dépasse 6 log CFU/ml tandis que pour les autres élevages la charge moyenne ne dépasse pas la barre des 4,5 log CFU/ml. En revanche, dans les élevages de canards, on estime la charge entre 5 et 7 log CFU/ml, ce qui est relativement plus élevé que les autres.

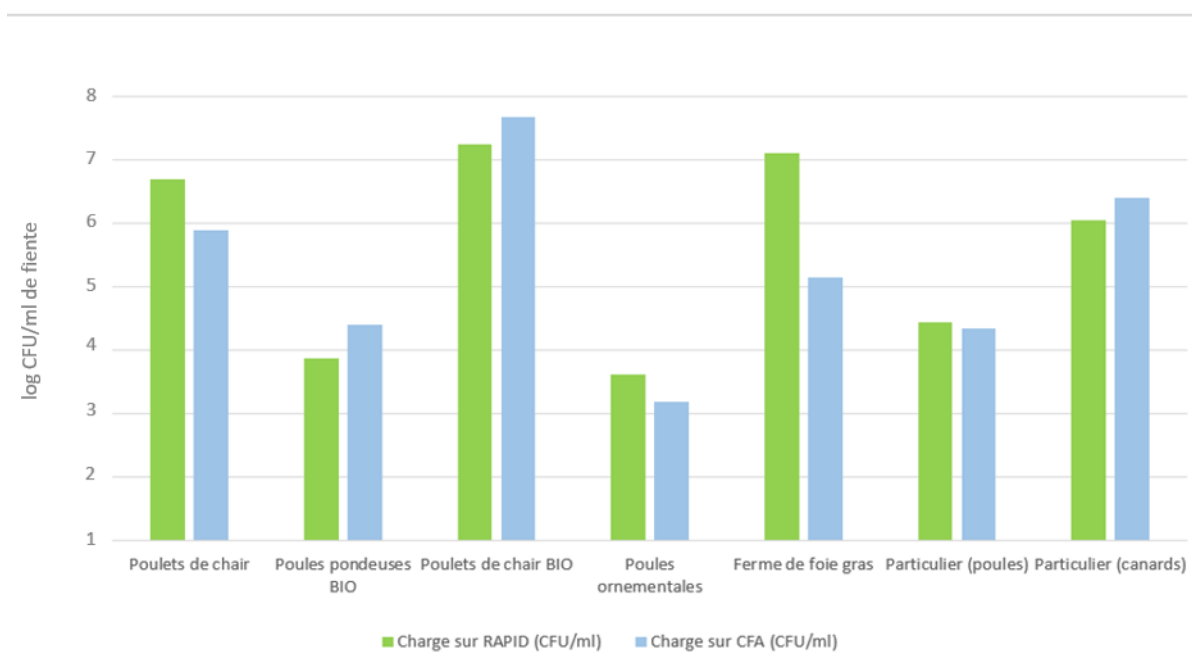


Figure 4.3. Dénombrement moyen des colonies *Campylobacter* sur RAPID et CFA pour les différents types d'élevages.

En Union européenne, aucun critère maximal n'existe en ce qui concerne la contamination des poulets par *Campylobacter* dans la production primaire. Cependant, au moment de l'abattage, l'évaluation de 50 carcasses est effectuée après réfrigération. Si 15 de ces carcasses présentent un dénombrement supérieur à 3 log CFU/g, des moyens sont mis en place pour augmenter la sécurité sanitaire dans l'abattoir mais également dans l'exploitation d'où proviennent les carcasses concernées (Conseil de l'Union européenne, 2017). Bien que tous les résultats obtenus soient au-dessus de 3 log CFU/ml, ces échantillons sont des fientes et non des carcasses. Ces animaux étant vidés à l'abattoir, ce dénombrement influence relativement peu le statut du lot testé (Reich *et al.*, 2008). De ce fait, la législation vise plutôt à minimiser les risques de contaminations croisées sur les surfaces

d'abattages.

La contamination d'un individu par *Campylobacter* dépend majoritairement du type d'élevage (Sibanda *et al.*, 2018). Les poulets issus d'élevages BIO sont généralement plus colonisés par *Campylobacter* que les poulets élevés dans des bâtiments fermés (Heuer *et al.*, 2001). En effet, les poulets élevés selon le cahier de charges BIO sont susceptibles d'entrer en contact avec les micro-organismes présents dans l'environnement extérieur au poulailler. Les insectes, rongeurs, animaux domestiques et animaux sauvages sont souvent porteur de *Campylobacter*. Le sol et l'air peuvent également représenter des sources de contamination. Dès lors, la charge estimée en *Campylobacter* chez les poulets de chair BIO, bien que très élevée, est explicable.

Les élevages intensifs BIO et non-BIO comptent près de 20.000 individus tandis que dans les élevages de poules ornementales et chez les particuliers, les animaux sont élevés à 3 ou 4 individus. Or, un facteur d'influence de la colonisation de *Campylobacter* est la taille du troupeau (Sibanda *et al.*, 2018). Une plus grande prévalence de *Campylobacter* est observée dans les élevages qui comptent plus de 15.000 individus (Näther *et al.*, 2009). La contamination de l'eau, de la nourriture et des équipements du personnel représente un risque élevé pour les animaux. Dès lors, si un animal devient porteur de la bactérie, les contacts avec la litière et entre les individus engendrent la contamination de tout le troupeau en 8 jours (Xu *et al.*, 2021). Ainsi, il n'est pas surprenant d'observer une moindre charge microbienne en *Campylobacter* dans les petits élevages (ornementaux et particuliers).

D'après Han *et al.* (2016), l'âge est un facteur important en ce qui concerne la colonisation des poulets. D'ailleurs, Newell & Fearnley (2003) mettent en évidence le fait que dans les élevages BIO, les animaux sont abattus à l'âge minimum de 80 jours, ce qui peut s'ajouter aux raisons pour lesquelles la charge microbienne des poulets est plus élevée dans ce type d'élevage. Dans le cas présent, aucun *Campylobacter* n'a été isolé à partir de fientes provenant d'élevages de poussins et les 15 échantillons d'où ont été isolées les souches proviennent d'animaux âgés de minimum 4 semaines. Cependant, aucune tendance n'est observée concernant le lien entre la concentration de bactéries estimée et l'âge des individus.

Les résultats de la Fig. 4.3 montrent également que les matières fécales de canards présentent une charge bactérienne plus élevée que celles de poulets. Si on compare les deux élevages particuliers, on observe une différence de presque 2 log CFU/ml entre les deux espèces alors que ces deux particuliers habitent la même rue (Ottignies). Dans ce cas-ci, l'environnement proche ne peut pas expliquer ce résultat. Dans la littérature, Jamali *et al.* (2015) rapportent une plus grande prévalence de *Campylobacter* chez les canards que chez les poulets. De plus, Colles *et al.* (2011) estiment que la charge en *Campylobacter* dans les déjections de canards varie entre 10^5 et 10^7 CFU/mL, ce qui conforte les résultats obtenus. Cependant, Chon *et al.* (2018) rapportent un nombre bien moins élevé de *Campylobacter*

chez les canards ($2 \cdot 10^2$ CFU/mL) qui s'avère être également moins élevé que chez les poulets ($5 \cdot 10^2$ CFU/mL). Certains facteurs comme la zone géographique, la saison, les espèces colonisatrices, l'exposition aux contaminations environnementales et le nombre d'individus peuvent expliquer une telle différence. Néanmoins, il semblerait que l'espèce animale influence également le taux de contamination par *Campylobacter* des individus.

Les chiffres estimés pour l'énumération de *Campylobacter* dans les fèces analysées (Fig. 4.3) diffèrent selon le milieu utilisé : RAPID ou CFA. La variation observée entre les résultats fournis par ces deux milieux sera discutée dans la section 4.4.

4.2.2. Identification des souches de *Campylobacter* et diversité

Après le dénombrement, l'isolement de trois colonies de même phénotype est effectué depuis chaque milieu. Chaque colonie isolée sur le milieu spécifique est soumise aux tests oxydase, catalase et *Campylobacter* confirm latex kit® (test d'agglutination sur lame) afin de procéder à la confirmation du genre *Campylobacter*. Ces colonies sont alors identifiées de manière biochimique par le système miniaturisé des galeries API Campy®.

Identification

La première étape d'identification est facilitée par l'utilisation de milieux spécifiques et chromogéniques où les *Campylobacter* apparaissent sous forme de colonies rouges (Fig. 4.4). Suite à ce critère phénotypique, 115 colonies ont été isolées depuis les boîtes de dénombrement. Six d'entre elles n'ont pas repoussé sur le milieu spécifique, indiquant que ce ne sont pas des *Campylobacter*.

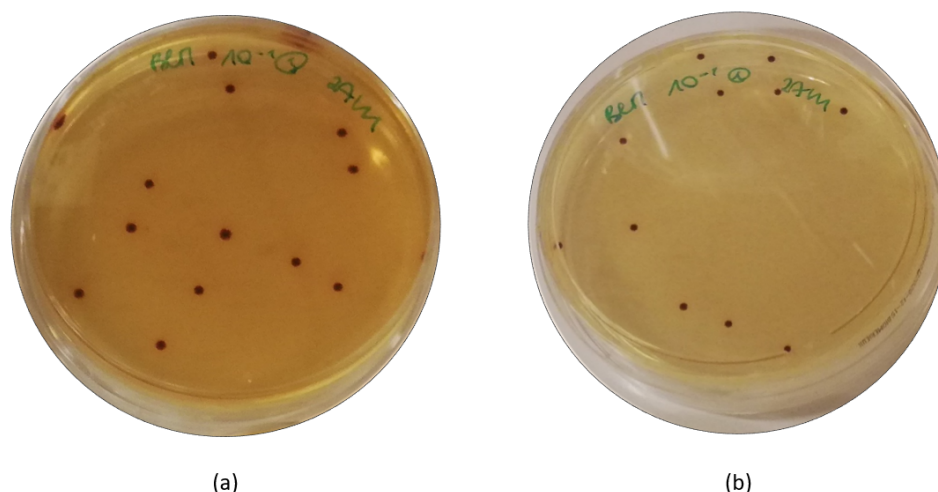


Figure 4.4. Phénotype des colonies de *C. jejuni* sur RAPID (a) et CFA (b) lors du dénombrement.

Une fois isolées, la confirmation des 109 colonies présumées *Campylobacter* est réalisée. Pour rappel, les colonies thermotolérantes de *Campylobacter* doivent répondre positivement aux tests oxydase et catalase. 14 sur 109 souches sont testées comme oxydase négatives tandis que 7 sont testées catalase négatives mais aucune d'entre elles ne sont négatives aux deux tests. Concernant le test latex, 20 souches donnent des résultats difficilement interprétables. L'aspect de la suspension semble laiteux mais parsemé de particules agglutinées. Étant donné qu'aucune des souches ne présente un résultat négatif pour ces trois tests, toutes ont été sélectionnées pour l'identification par galerie API Campy®. Cela a permis l'évaluation de ce système de confirmation des colonies présumées de *Campylobacter*.

Sur les 109 souches testées avec les galeries API Campy® (Fig. 4.5), 74 sont identifiées comme *Campylobacter* par le système miniaturisé (64 *C. jejuni*, 9 *C. coli* et 1 *C. upsaliensis*). Les 35 souches non-identifiées ont été séquencées par la méthode du gène codant pour l'ARNr 16S. 26 d'entre-elles sont des bactéries d'un genre différent et les 9 souches restantes se sont avérées appartenir à l'espèce *C. jejuni*. Au final, 83 souches sont stockées à -80°C.

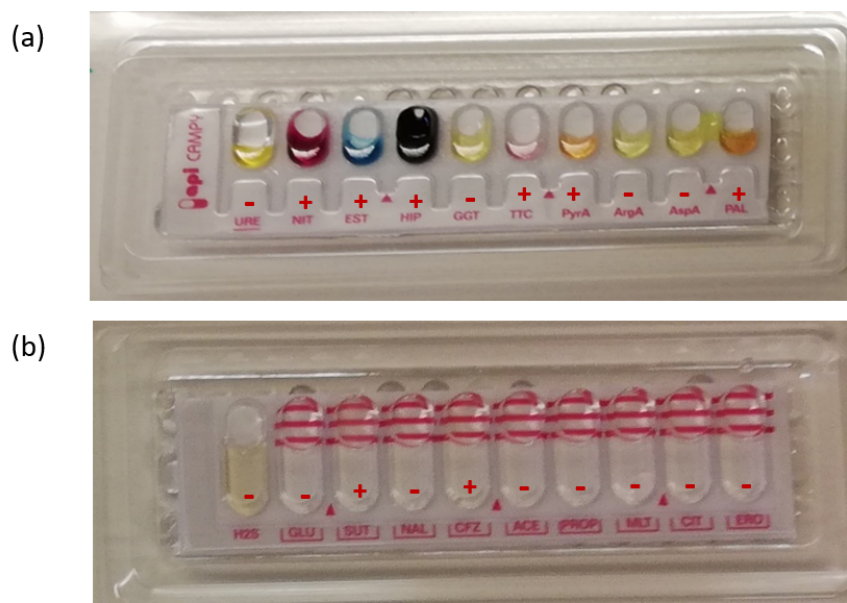


Figure 4.5. Exemple d'identification de colonie *Campylobacter* par galerie API Campy®. La souche CDGEO0904 est identifiée comme *C. jejuni* à une probabilité de 98,6%. La première partie (a) contient 10 tests biochimiques et est incubée en atmosphère aérobie tandis que la seconde partie (b) contient 1 test biochimique et 9 tests d'assimilation/inhibition et est incubée en microaérobiose.

Afin de vérifier la justesse de ce système, un séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S des souches identifiées est effectué par la suite. Le séquençage rapporte que 70 souches sur les 83 sont des *C. jejuni* et que trois des souches identifiées comme étant des *C. coli* ou *C. upsaliensis* sont des *C. jejuni*.

Ces résultats impliquent une remise en question quant aux méthodes utilisées. En effet, il apparaît que les tests de confirmation et les galeries API Campy[®] ne sont pas 100% fiables. Cet aspect sera discuté dans la section 4.4.

Toutefois, suite au séquençage MLST effectué *a posteriori* (section 4.3.), il s'avère qu'une des souches identifiées *C. coli* par la galerie API Campy[®], mais *C. jejuni* par séquençage de gène codant pour l'ARNr 16S, est également identifiée *C. coli* par le MLST. Lors d'une étude visant à évaluer la fiabilité du séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S pour d'identification des espèces de *Campylobacter*, Gorkiewicz *et al.* (2003) démontrent qu'il y a un manque de discrimination entre les espèces *C. jejuni* et *C. coli*. En effet, la majorité des souches testées présentait des séquences de nucléotides très similaires (jusqu'à 99,6% d'identité) pour ce gène. Cette constatation est appuyée par Janda & Abbott (2007) et peut expliquer les résultats contradictoires obtenus dans ce cas-ci. Par ailleurs, la souche en question a été isolée à partir d'une boîte contenant une autre souche identifiée comme *C. coli* par le système API Campy[®] et *C. jejuni* par le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Cependant, celle-ci n'a pas été séquencée par MLST ce qui implique une remise en question de son identité. Pour différencier les deux espèces de manière biochimique, un test d'hydrolyse de l'hippurate peut être effectué. *C. jejuni* doit répondre positif à ce test et *C. coli* non (Dromigny, 2007). D'ailleurs, Bang *et al.* (2002) mettent au point une méthode permettant de discriminer les deux espèces en amplifiant par PCR le gène *hipO* codant pour cette enzyme. Depuis, plusieurs méthodes moléculaires d'amplification d'un gène permettant la différenciation des deux espèces ont été mises au point et sont utilisées aujourd'hui (Klena *et al.*, 2004; Gunther IV *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2011; Banowary *et al.*, 2018). Certains de ces tests proposés auraient été intéressants à effectuer sur la souche problématique et toutes les autres afin de déterminer leurs identités.

Finalement, 70 souches de *Campylobacter* (Annexe) ont été isolées à partir des 15 échantillons positifs. 68 de ces souches appartiennent à l'espèce *C. jejuni* (97%) et une à l'espèce *C. coli* (1,4%). L'espèce de la souche restante n'a pas pu être déterminée avec certitude. Il est surprenant qu'une seule souche isolée soit de l'espèce *C. coli*. Bien qu'il soit rare que cette espèce soit prédominante chez la volaille, celle-ci a déjà été isolée exceptionnellement depuis 92% d'échantillons fécaux de poulets de chair BIO (El-Shibiny *et al.*, 2005). Généralement, la présence de *C. coli* chez la volaille (poulets et canards) est moindre mais varie tout de même entre 12,5 à 51% (Heuer *et al.*, 2001; Vandeplas *et al.*, 2010; Colles *et al.*, 2015; Jamali *et al.*, 2015). Il a déjà été rapporté que la colonisation par *C. coli* devenait de plus en plus importante avec l'âge des oiseaux (El-Shibiny *et al.*, 2005) mais cela ne permet pas d'expliquer ce résultat car, dans ce cas-ci, les animaux ont des âges différents en fonction des élevages. Dès lors, peut-être qu'aucune souche de *C. coli* n'a été introduite dans les élevages concernés dans le cadre de ce mémoire, empêchant la prolifération de l'espèce au sein de ceux-ci. En outre, il a été démontré que la culture de *Campylobacter* sur les milieux spécifiques et chromogéniques était fortement influencée

par les conditions de culture et par la flore accompagnatrice présente dans l'échantillon pouvant influencer le métabolisme des bactéries (Ricke *et al.*, 2019). De ce fait, peut-être que la méthode utilisée n'était pas optimale et que la détection de *Campylobacter* par une méthode moléculaire aurait permis l'isolement de d'avantages de *C. coli*. Les souches appartenant à l'espèce *C. lari* et *C. upsaliensis* sont quant à elle très peu isolées depuis les matières fécales de volaille (< 1%) (Reich *et al.*, 2008 ; Näther *et al.*, 2009). Il n'est donc pas préoccupant qu'aucune souche de ces deux espèces n'ait été isolée à partir des échantillons analysés.

4.3. Séquençage MLST

Afin de mieux comprendre la diversité des souches de *C. jejuni* et *C. coli* isolées lors de ce travail, un séquençage *Multilocus Sequence Typing* (MLST) est réalisé sur 38 souches en partenariat avec le laboratoire Luxembourg Institute of Science and Technology. Par souci de qualité des résultats, un profil allélique a été obtenu pour seulement 17 d'entre elles et un *core genome* MLST (cgMLST) est réalisé sur 14 de ces souches. De plus, des gènes de résistances aux antibiotiques (gènes acquis et mutations spontanées) ont été identifiés chez 26 souches. Le but de ce séquençage est d'analyser la parenté génétique des souches isolées à partir des fientes de poulets afin de comprendre au mieux leur écologie.

Grâce aux résultats du séquençage, il est possible de créer un profil allélique de la souche à partir du séquençage de sept *housekeeping genes* : *aspA*, *glnA*, *gluA*, *glyA*, *pgm*, *tkt* et *uncA* et à chaque locus est attribué un numéro d'allèle. Les profils alléliques sont alors encodés dans la base de données publique PubMLST où les souches isolées peuvent être comparées avec d'autres souches isolées auparavant. Chaque profil allélique est renseigné sous forme de *sequence type* (type de séquence, ST). Les STs sont regroupés en *clonal complex* (complexes clonaux, CC) en fonction de leur similarité avec un profil allélique central dont le génotype est identifié par les organisations de santé publique. Une fois qu'un génotype central a été identifié, les CCs sont définis comme incluant tout ST possédant minimum 4 loci similaires au génotype central (PubMLST, 2021).

Les souches dont le profil allélique a été obtenu proviennent majoritairement d'élevages de poulets de chair (15), de poules ornementales (1) et de l'exploitation produisant du foie gras (1). Les 15 souches issues des fientes de poulets de chair proviennent de 4 élevages différents (échantillons 15, 27, 28 et 30 dans le Tableau 3.11). Pour les 17 souches, 4 STs différents déjà existants ont été identifiés : ST-45, -48, -475 et -1055. La souche provenant de l'exploitation de foie gras présentait un profil allélique dont le ST, «NewST», n'avait encore jamais été enregistré dans la base de données PubMLST. Les 4 STs déjà identifiés appartenaient à 3 CCs différents tandis qu'aucun CC n'a été attribué à la NewST (Tableau 4.3). Les 3 CCs détectés sont associés à des infections chez les poulets et les humains et ont déjà été isolés à plusieurs reprises en Belgique (Tableau 4.4).

Le ST le plus fréquemment observé est ST-45 qui est attribué à 8 des souches. Ensuite,

Tableau 4.3. Génotypes MLST des 17 souches séquencées.

Clonal complex	ST	Numéro d'allèle						
		<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gluA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkt</i>	<i>uncA</i>
ST-45 complex	45	4	7	10	4	1	7	1
ST-48 complex	48	2	4	1	2	7	1	5
	475	2	4	1	4	19	62	5
ST-828 complex	1055	33	39	30	82	104	47	17
-	NewST	22	28	4	26	363	12	35

Tableau 4.4. Distribution des espèces sources des *clonal complex* attribués aux souches de *C. jejuni* (16) et *C. coli* (1), PubMLST (2021).

<i>Clonal complex</i>	Sources				
	Selles humaines	Poulets de chair	Viande de poulet	Bétail	Porcs
ST-45 complex	41,5%	13,7%	12,8%	1,5%	-
ST-48 complex	51,2%	6,4%	6,9%	3,2%	-
ST-828 complex	18%	15,9%	4,4%	2,1%	9,1%

le ST-48 compte 4 souches et le ST-475 compte 3 souches. Enfin, les ST-1055 et NewST sont chacun attribués à une souche. En Belgique, les ST-45 et ST-48 sont souvent reportés comme faisant partie des STs prédominants de souches de *C. jejuni* isolées depuis les fèces de poulets et les selles humaines, respectivement (Duarte *et al.*, 2019; Elhadidy *et al.*, 2020). La souche *C. coli* est ST-1055 et fait partie du CC-828, CC prédominant chez l'espèce *C. coli* (Marotta *et al.*, 2020). Il a également été observé que ces 4 STs correspondent chacun à une exploitation sauf pour le ST-48 qui est attribué à des souches venant de deux fermes différentes (27 et 28 dans le Tableau 3.11). La prédominance d'un certain ST au sein d'une ferme a déjà été reportée par d'autres études, surtout dans le cas où les poulets sont élevés confinés dans un bâtiment (Stone *et al.*, 2013). Dès lors, des clones génétiques peuvent s'accumuler au sein du troupeau et persister.

Des dendrogrammes basés sur le MLST (7 gènes) et le cgMLST (637 gènes) ont été réalisés afin d'observer les liens de parenté entre les souches (Fig. 4.6). À partir de ces deux dendrogrammes, on observe que les souches de ST-48 et ST-475 appartiennent au même CC. Sur le dendrogramme réalisé à partir du cgMLST (Fig. 4.6 a), la souche numérotée 44UCL est séparée des autres souches possédant un ST-48. Cette souche provient d'une ferme différente des autres souches de ST-48 ce qui explique certainement cette séparation. Cela n'apparaît pas sur le dendrogramme (b) car celui-ci ne se base que sur 7 gènes différents tandis que le dendrogramme (a) est créé à partir de 637 gènes, permettant un meilleur aperçu des liens existants entre les différentes souches. On observe également que la souche de ST-1055 partage des séquences avec les ST-48 et -475 (a) et est également reliée à la souche de NewST (b). Malheureusement, cette souche n'apparaît pas sur les deux dendrogrammes, et le lien de parenté ne peut donc pas être attesté car encore une

fois, le dendrogramme (b) s'avère moins représentatif que le (a). Au sein des souches de ST-45, les souches 19UCL et 30UCL sont séparées du noyau central. Celles-ci correspondent à des souches présentant un phénotype différent des autres souches, indiquant un génome sensiblement éloigné et expliquant peut-être leur séparation du reste des souches de ST-45.

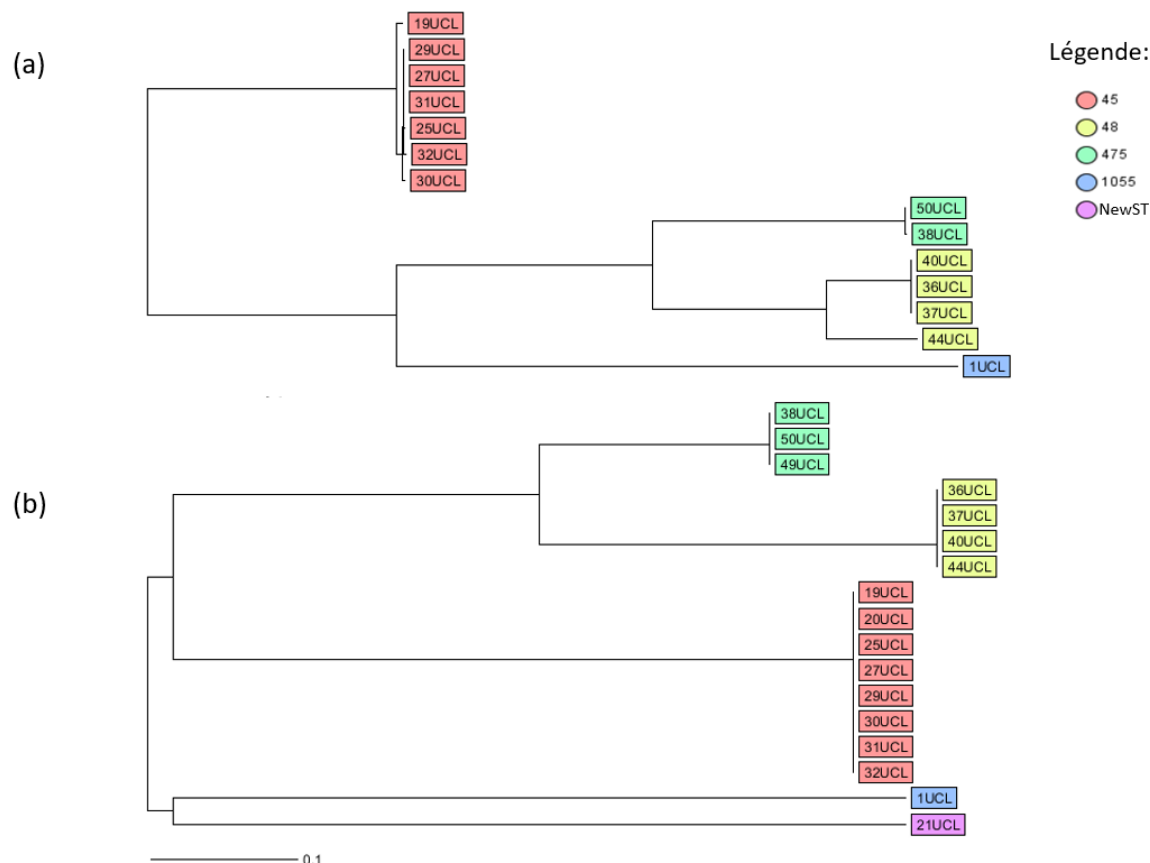


Figure 4.6. Dendrogrammes réalisés à partir du *core genome* MLST de 14 des souches (a) et du MLST pour les 17 souches (b).

Grâce au séquençage MLST, une analyse des résistances aux antibiotiques des souches a également été réalisée. Au total, 26 souches ont été identifiées comme présentant des gènes de résistances acquis (24) et des mutations spontanées (6). Parmi elles, on compte 19 souches issues de poulets de chair, 4 de canards à foie gras, 2 de poules pondeuses BIO et 1 de poules d'ornement. Cinq gènes connus pour la résistance aux β -lactames ont été identifiés : *bla_{OXA-193}*, *bla_{OXA-61}*, *bla_{OXA-453}*, *bla_{OXA-184}* et *bla_{OXA-489}* pour 23 des souches (88,5%). Le gène *lnu(c)* impliquant la résistance aux lincosamides a été identifié à quatre reprises (15,4%) tandis que le gène *aph(3')-III* contre les aminoglycosides est identifié chez 2 souches (7,7%). Pour six des souches (27%), des mutations du gène *gyrA* au point T86I ont été détectées, impliquant des résistances à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine (quinolones). Deux souches provenant de fientes de canards présentent une résistance multiple aux β -lactames, lincosamides, aminoglycosides, acide nalidixique et ciprofloxacine.

La résistance aux β -lactames, et surtout à l'ampicilline, a déjà été largement rapportée parmi des souches de *Campylobacter* isolées depuis les poulets en Belgique (Mattheus *et al.*, 2012 ; Proietti *et al.*, 2020). Les résistances aux lincosamides et aminoglycosides sont également reportées mais à une moindre fréquence chez *Campylobacter*. Il n'est donc pas étonnant d'observer une résistance à ces familles d'antibiotiques dans les souches séquencées. La mutation du gène *gyrA* au point T86I est également souvent observée en Belgique et induit une double résistance aux deux antibiotiques cités précédemment. Cependant, aucune souche n'a été identifiée comme résistante à la tétracycline alors que d'autres études belges reportent qu'entre 47 à 49% des souches isolées de poulets testées y sont résistantes (Elhadidy *et al.*, 2018 ; 2020). Cette absence de souches résistantes à la tétracycline peut être due à l'usage contrôlé ou proscrit de cet antibiotique chez les poulets dans les fermes où a pris place l'échantillonnage. Des résistances à l'érythromycine sont également identifiées par Elhadidy *et al.* (2020) à un taux de 2% alors qu'aucune souche séquencée ne semble résistante à ce composé. Pour cet antibiotique, il est possible que le nombre d'échantillons testés ne soit pas représentatif. Néanmoins, au vu des résultats obtenus et ceux trouvés dans la littérature, la moindre résistance de *Campylobacter* face à ces antibiotiques encourage leur utilisation dans le domaine de la santé humaine à la place d'autres composés dont les effets sont limités sur certaines souches. Deux souches provenant de fientes de canards sont multi-résistantes aux 5 des antibiotiques identifiés. Ce phénomène a déjà été observé chez des canards par Jamali *et al.* (2015) qui identifient une multirésistance chez 68% des souches testées lors de leur étude. Ces deux souches proviennent du même échantillon et possèdent donc certainement un lien de parenté. Les animaux n'ayant pas eu de contact avec les oiseaux sauvages, les multirésistances observées suggèrent une utilisation abusive de ces antibiotiques pour ce troupeau et dans la filière avicole en générale.

4.4. Évaluation de la méthode d'isolement

Le protocole mis en place pour l'isolement des souches thermotolérantes de *Campylobacter* durant ce mémoire a été réalisé avec du matériel spécifique. Les résultats présentés dans la section 4.2. démontrent que les méthodes utilisées pour le dénombrement, la confirmation et l'identification des colonies présentent certaines faiblesses. Dans cette section, une évaluation de ce protocole sera proposée et s'attardera particulièrement sur les milieux sélectifs, le test d'agglutination au latex et les galeries proposées par le système API.

4.4.1. Milieux sélectifs RAPID'*Campylobacter* et CampyFood

Deux milieux sélectifs et chromogéniques ont été utilisés pour l'isolement des souches : RAPID'*Campylobacter* (RAPID) produit par Bio-Rad et CampyFood (CFA) produit par bioMérieux. Les méthodes de dénombrement utilisées sont les méthodes alternatives proposées par les deux firmes. Cette étape de dénombrement a été réalisée sur les deux milieux

en parallèle afin de comparer leur efficacité relative.

Résultats du dénombrement

Pour plusieurs mêmes échantillons, des résultats de dénombrement différents ont été observés sur les deux milieux RAPID et CFA (Tableau 4.5). Pour 51 échantillons testés sur les deux milieux, 32 ont présenté des résultats similaires : 26 échantillons n'ont pas permis la croissance de colonies rouges et 6 échantillons présentaient des résultats de dénombrement égaux (même log CFU/ml). Cependant, cinq échantillons ont présenté des résultats de dénombrement supérieurs sur CFA et cinq échantillons ont présentés des résultats de dénombrement supérieurs sur RAPID avec des différences de l'ordre de 1 à 2 log CFU/ml. De plus, six échantillons ont permis le développement de colonies uniquement sur CFA et ont donné des résultats de dénombrement qui varient entre 1 et 3 log CFU/ml. Le phénomène inverse a été observé pour trois autres échantillons mais seules quelques colonies ont poussé sur une ou deux boîtes : on peut donc les considérer comme des artefacts.

Tableau 4.5. Nombre d'échantillons présentant des variations entre les résultats de dénombrement sur les milieux CFA et RAPID. On inclut dans les «résultats similaires» les échantillons n'ayant pas permis la croissance de colonies rouges (26) et les échantillons présentant les mêmes résultats sur les deux milieux (6).

Résultats du dénombrement	Nombre d'échantillons
Résultats similaires	32
Résultats supérieurs sur le milieu CFA	5
Résultats supérieurs sur le milieu RAPID	5
Résultats positifs uniquement sur le milieu CFA	6
Résultats positifs uniquement sur le milieu RAPID	3

Pour certains échantillons, le dénombrement de colonies sur les deux milieux différents engendre des divergences non négligeables entre les résultats. Dès lors, on peut se poser la question suivante : un des deux milieux serait-il plus sélectif que l'autre ?

Sélectivité des milieux

Les milieux RAPID et CFA sont vendus comme étant des milieux sélectifs qui empêchent la croissance de la plupart des bactéries de la flore accompagnatrice présente dans les échantillons. Cependant, suite à un séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S des souches isolées depuis ces milieux, il s'est avéré que d'autres genres bactériens se développent sous forme de colonies rouges sur les géloses.

Durant l'isolement de souches à partir des géloses CFA (fournies prêtes à l'emploi), il apparaît que 7 genres de bactéries différents présentent un aspect similaire à celui

des *Campylobacter* : *Escherichia fergusonii*, *Brucella* spp., *Cellvibrio* spp., *Citrobacter amalonaticus*, *Arcobacter skirrowii*, *Myroides* spp. et *Pantoea agglomerans*. Les colonies de *E. fergusonii* et *Brucella* spp. étaient relativement plus grandes que les colonies de *Campylobacter* et présentaient une couleur plus rose que les autres. Parallèlement, trois genres autres que *Campylobacter* ont été isolés depuis le milieu RAPID : *Enterococcus faecium*, *Myroides* spp. et *Pseudomonas* spp. Contrairement aux faux-positifs isolés depuis les géloses CFA, les colonies non-*Campylobacter* isolées à partir de RAPID ne présentent aucune caractéristique de différenciation (Fig. 4.8). Il n'est pas surprenant de constater la présence de ces neuf genres bactériens dans les échantillons car ceux-ci ont déjà été isolés depuis des fèces de poulets dans le passé (Hinton *et al.*, 2004 ; Wareth *et al.*, 2020 ; Chen *et al.*, 2019 ; Hashim & AlKhafaji, 2018 ; Atabay *et al.*, 2006 ; Diarra *et al.*, 2010 ; Oh *et al.*, 2012 ; Jones *et al.*, 2012).

Ces observations montrent qu'aucun de ces deux milieux n'inhibe totalement la croissance de la flore accompagnatrice présente dans l'échantillon et est donc totalement sélectif. Cependant, il semblerait que le milieu RAPID soit plus sélectif que le milieu CFA. En effet, il y a deux fois moins de faux-positifs isolés depuis RAPID (5) que depuis CFA (11). Ce manque de sélectivité sur certaines boîtes de RAPID peut être expliqué par le fait que dans le cadre de ce travail, le milieu est préparé au laboratoire. Bien qu'il soit préparé selon les directives du fournisseur, il est possible que les géloses coulées soi-même soient moins performantes que celles fabriquées de manière industrielle. Dans une étude visant à évaluer ce milieu, il est référé que les géloses fournies de RAPID inhibent totalement la croissance d'autres bactéries tandis que des résultats faux-positifs sont obtenus lors de l'utilisation de géloses CFA (Seliwiorstow *et al.*, 2014). Il serait intéressant de comparer la sélectivité des géloses «prêtes à l'emploi» et celles préparées au laboratoire. En outre, il a été mentionné dans la notice fournie par Bio-Rad que le milieu RAPID n'est pas capable de faire pousser certaines espèces de *Campylobacter* telle que *C. upsaliensis*. Dès lors, les géloses de RAPID seraient peut-être trop sélectives en ce qui concerne la croissance des *Campylobacter*.

Phénotype des colonies

Campylobacter pousse sur les deux milieux sélectifs sous forme de petites colonies pouvant apparaître sous plusieurs teintes de rouges avec parfois des reflets argentés (Fig. 4.4). Cependant, il a été observé que sur le milieu RAPID, certaines colonies de *C. jejuni* (provenant de 2 échantillons différents) ne forment pas de colonies rondes mais plutôt des «nuées» ou «taches» qui s'étendent sur la boîte de Pétri (Fig. 4.7).

Généralement, ce phénomène est observé lorsque les boîtes de Pétri sont humides et n'ont pas été séchées avant leur utilisation. Dans le cas présent, il a été évalué qu'un passage à l'étuve pourrait endommager les propriétés du milieu. Néanmoins, les boîtes de Pétri étaient sorties du frigo 1 h avant leur utilisation pour permettre au milieu de perdre

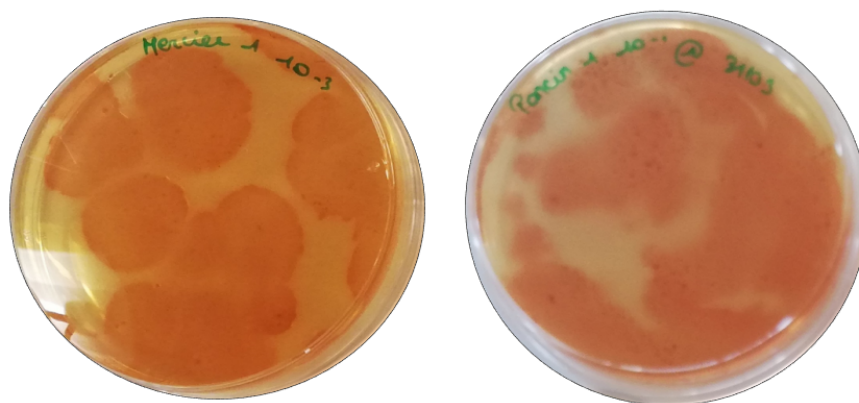


Figure 4.7. Exemples de colonies *C. jejuni* qui forment des nuées sur le milieu RAPID.

son humidité. D'autres études visant à évaluer le potentiel du milieu RAPID reportent également que certaines colonies forment des nuées sur les boîtes, même lorsque ces dernières sont séchées 30 min avant l'ensemencement (Seliwiorstow *et al.*, 2014). Il serait intéressant de faire sécher les boîtes durant une période plus longue (e.g. O/N) afin de vérifier si ce phénomène se reproduit en appliquant de telles conditions. Ceci présente un inconvénient car la formation de ces nuées empêche un dénombrement précis des colonies et amène un biais dans les résultats.

Par ailleurs, les micro-organismes faux-positifs qui poussent sur CFA présentent une morphologie relativement différente que les colonies de *Campylobacter* (Fig. 4.8). De ce fait, une différenciation est possible et évite la surestimation de la charge microbienne pour les utilisateurs les plus aguerris. Au contraire, les faux-positifs observés sur le milieu RAPID ne présentent aucune caractéristique permettant de différencier les *Campylobacter* des autres. Cela peut à nouveau engendrer un biais dans le dénombrement.

Dès lors, ces deux milieux sélectifs et chromogéniques possèdent chacun leurs avantages et inconvénients. D'un côté, le milieu CampyFood présente une sélectivité moindre et de nombreux résultats faux-positifs ont été observés. Cependant, ce milieu permet de dénombrer facilement les colonies de *Campylobacter* qui apparaissent rouges et rondes. De plus, l'aspect de *C. jejuni* diffère légèrement des colonies appartenant à d'autres genres bactériens ce qui permet de les différencier dans la plupart des cas. En outre, ce milieu est fourni sous forme de géloses prêtes à l'emploi. D'un autre côté, le milieu RAPID *Campylobacter* est un milieu qui se vend soit sous forme de géloses préfabriquées, soit sous forme de milieu déshydraté à préparer soi-même. La deuxième option de fabrication peut avoir pour conséquence l'apparition de défauts sur les géloses. Néanmoins, ce milieu s'avère être plus sélectif que CFA malgré qu'il ne permette pas toujours de dénombrer correctement les colonies présentes dans la matrice d'intérêt : celles-ci peuvent former des nuées sur la gélose (bien que cela arrive rarement). Le choix d'utiliser l'un de ces milieux plutôt que l'autre doit être fait en connaissance de cause et en fonction de l'objectif visé par l'opérateur.

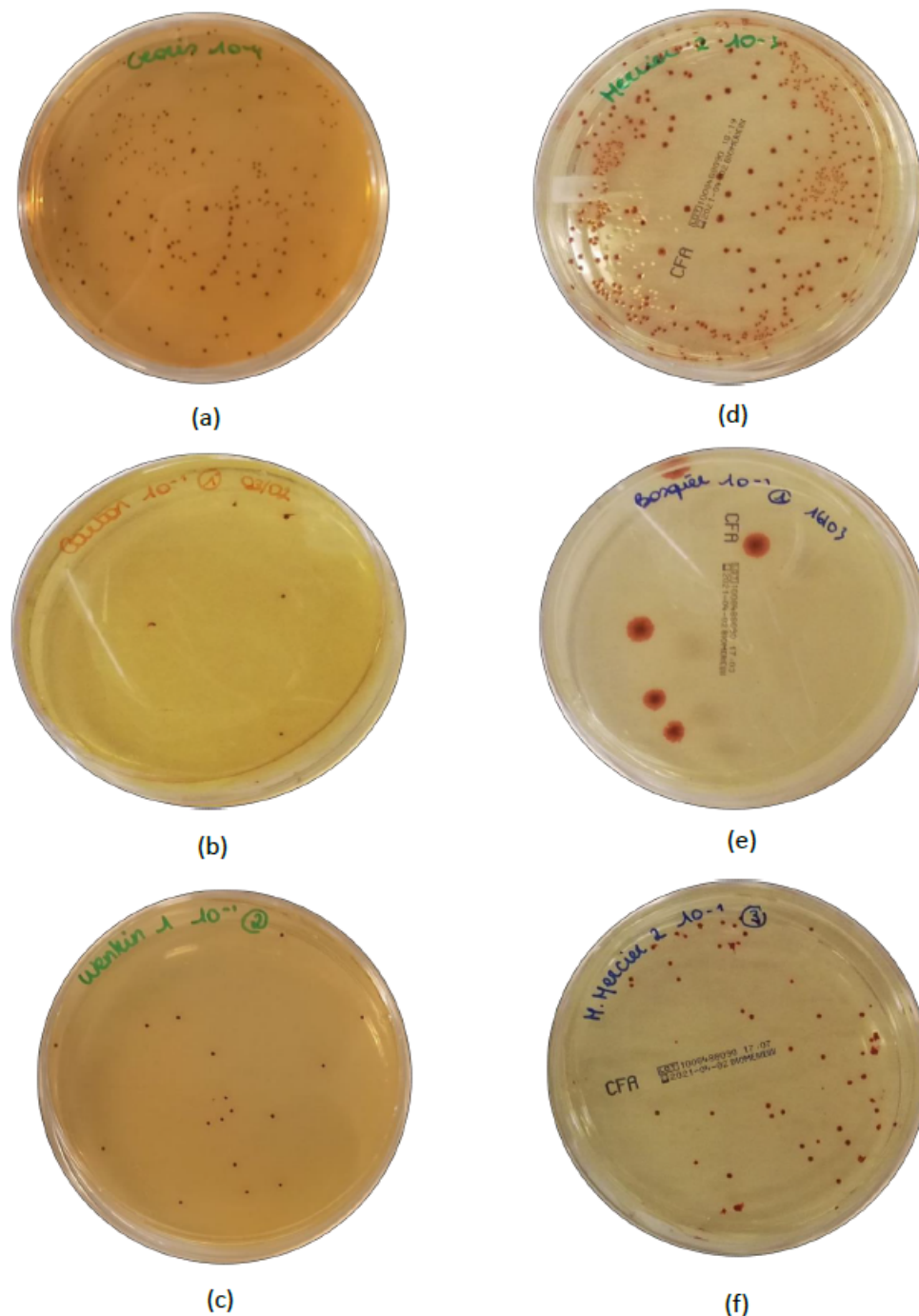


Figure 4.8. Comparaison entre les phénotypes de *C. jejuni* et des colonies faussement positives sur RAPID et CFA. Les colonies sur les boîtes (a) et (d) sont des *C. jejuni*. Les colonies sur les autres boîtes sont : *Myroides* spp. (b), *Enterococcus faecium* (c), *E. fergusonii* (e) et *Brucella* spp. (f).

4.4.2. Confirmation des colonies présumées

Test d'agglutination au latex

Le test d'agglutination utilisé (*Campylobacter confirm latex kit*®) est produit par la firme Bio-Rad. Après une étape d'isolement sur milieu sélectif, une colonie est prélevée

depuis un milieu spécifique et mise en contact avec les particules de latex sensibilisées avec un antisérum spécifique aux *Campylobacter*. Si la formation d'agrégats est observée, alors la réaction est positive et la colonie appartient au genre *Campylobacter*. Une réaction négative se traduit par une suspension à l'aspect laiteux.

La lecture des résultats d'agglutination des particules de latex s'est avérée très difficile malgré qu'un contrôle positif soit effectué en parallèle lors de chaque test (contrôle fourni par la firme). La réaction d'agglutination n'a pas été claire pour vingt des souches testées. Ces souches, étant positives aux deux autres tests, ont néanmoins été sélectionnées pour l'étape suivante. Finalement, suite au séquençage des souches, il a été démontré que le test d'agglutination a donné des résultats corrects pour 64% des souches testées (70/109).

Bien que les tests sérologiques de ce type soient utilisés depuis maintenant une vingtaine d'années, peu d'études ont été mises en place afin d'évaluer les produits proposés à ce jour pour la confirmation de colonies de *Campylobacter*. R. Miller *et al.* (2008) rapportent une justesse de 93% pour ce genre de test tandis que Koenraad *et al.* (1995) obtiennent un taux de 39% de résultats corrects. Le succès du test (64%) évalué au terme de ce mémoire se situe entre ces deux résultats mais est relativement bas par rapport aux performances annoncées par la firme (98,5%). De ce fait, ces tests rapides ne semblent pas être toujours fiables. Par conséquent, il est intéressant de réaliser d'autres tests de confirmation supplémentaires.

Tests oxydase et catalase

Deux autres tests sont réalisés afin de procéder à la confirmation des colonies présumées *Campylobacter* : les tests oxydase et catalase (VWR). Les *Campylobacter* thermotolérants doivent répondre positivement à ces deux tests. Cependant, cela représente un faible critère d'identification étant donné que beaucoup de micro-organismes sont oxydase et catalase positifs. Par ailleurs, les neuf genres bactériens faux-positifs isolés présentent des caractéristiques similaires aux *Campylobacter*. En effet, six des genres bactériens présentent les mêmes résultats aux tests oxydase et catalase (Tableau 4.6).

Les colonies étaient sélectionnées pour l'étape d'identification si elles répondaient positivement à deux des trois tests effectués. Ceci explique en partie pourquoi 39 résultats faux-positifs ont été obtenus. Dès lors, des tests supplémentaires sont nécessaires afin de discriminer les souches appartenant au genre *Campylobacter* des autres. Les tests généralement réalisés sont le test de Gram, le test de motilité et l'observation des colonies au microscope. En outre, certaines méthodes moléculaires telles que la PCR sont également utilisées pour confirmer l'identité des colonies présumées de *Campylobacter* (Gharst *et al.*, 2013).

Tableau 4.6. Résultats présumés des tests de Gram, oxydase et catalase de *Campylobacter* et des autres genres ou espèces bactérien(ne)s isolé(e)s. Garrity *et al.* (2006), Gastra *et al.* (2014), Ateba & Maribeng (2011), Board (2015), Frederiksen (2015) et Siwakoti *et al.* (2018).

Genre ou espèce bactérienne	Gram	Oxydase	Catalase
<i>Campylobacter</i> spp.	-	+	+
<i>Escherchia fergusonii</i>	-	-	+
<i>Enterococcus faecium</i>	+	+	-
<i>Myroides</i> spp.	-	+	+
<i>Brucella</i> spp.	-	+	+
<i>Pseudomonas</i> spp.	-	+	+
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	-	-	+
<i>Arcobacter skirrowii</i>	-	+	+
<i>Pantoea agglomerans</i>	-	-	+
<i>Cellvibrio</i> spp.	-	+	+

4.4.3. Galeries API Campy®

La dernière étape du protocole d'isolement est l'identification des souches par le système d'identification biochimique (11 tests enzymatique et 9 d'assimilation/inhibition de croissance) proposé par bioMérieux : les galeries API Campy®. Les résultats des 20 tests sont transcrits sur une fiche de résultats qui est alors encodée dans un logiciel spécifique. Celui-ci donne l'identification de la souche en fonction des résultats encodés. Si le logiciel ne reconnaît pas les résultats, il qualifie alors la souche de «profil inacceptable».

Durant ce mémoire, 109 souches ont été testées par le système API Campy®. Quatre phénomènes ont été mis en lumière suite au séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S de ces souches : les galeries ont donné i) 85 résultats corrects, ii) une (voire deux) erreur(s) d'identification de l'espèce, iii) 9 résultats faux-négatifs et iv) 13 résultats faux-positifs.

En effet, 85 souches ont été correctement identifiées par les galeries. Parmi ces résultats, 26 souches provenant d'un autre genre bactérien ont été identifiées comme profils inacceptables et 58 ont été correctement identifiées comme étant des *C. jejuni* et une comme étant *C. coli*. Deux autres souches (voir une, section 4.2.2) ont été identifiées comme *C. coli* et *C. upsaliensis* alors que celles-ci ont été identifiées comme *C. jejuni* par le séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S. Cela représente une erreur d'identification de l'espèce de 3%.

L'identification par galerie API Campy® a donné des résultats faux-négatifs : 9 *C. jejuni* ont été identifiées comme profils inacceptables. Ces souches proviennent toutes d'élevages différents. Les feuilles de résultats des neuf souches ont été comparées et quelques caractéristiques sont similaires à toutes (Tableaux 4.7 et 4.8). Toutes ces souches sont négatives au test uréase (URE), inhibition par la céfazoline (CFZ) et sensibilité à l'érythromycine (ERO) et positives aux tests de la réduction des nitrates (NIT), estérase

(EST), hippurate (HIP), gamma glutamyl transférase (GGT), assimilation du glucose (GLU) et du malate (MLT).

Tableau 4.7. Nombre de souches présentant un résultat positif pour chaque test de la première partie de la galleries API Campy®

URE	NIT	EST	HIP	GGT	TTC	PyrA	ArgA	AspA	PAL
0/9	9/9	9/9	9/9	6/9	9/9	7/9	1/9	1/9	5/9

Tableau 4.8. Nombre de souches présentant un résultat positif pour chaque test de la seconde partie de la galleries API Campy®

H ₂ S	GLU	SUT	NAL	CFZ	ACE	PROP	MLT	CIT	ERO	CAT
1/9	9/9	8/9	2/9	0/9	9/9	8/9	9/9	8/9	0/9	9/9

Lorsqu'on compare avec le Tableau 3.12, la plupart des résultats sont en accord avec ce qui est attendu d'une souche *C. jejuni*. Cependant, quelques résultats sont interpellant notamment l'assimilation du glucose, du propionate (PROP) et du citrate de sodium (CIT), la sensibilité à l'érythromycine et la production d'H₂S par une des souches. En effet, *C. jejuni* n'est pas capable d'utiliser le glucose, le propionate et le citrate de sodium comme source d'énergie (Stahl *et al.*, 2012). De plus, on observe que les neuf souches répondent négativement au test ERO, ce qui signifie que toutes ont développé une résistance à cet antibiotique. L'adaptation métabolique de ces souches testées pourrait expliquer ces réactions. De fait, les *Campylobacter* sont des bactéries possédant une grande plasticité génomique leur permettant de s'adapter facilement à leur environnement proche. Il est possible que ces souches aient acquis de nouveaux mécanismes physiologiques tels que la possibilité de métaboliser d'autres sources de carbone que les aa. D'ailleurs, certaines souches de *C. jejuni* ont déjà présenté ce genre d'avantage évolutif (Vegge *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'émergence de souches *C. jejuni* résistantes aux antibiotiques, et notamment à l'érythromycine, est un phénomène d'actualité observé dans les hôpitaux (Corcoran *et al.*, 2006). Curieusement, une de ces souches est capable de produire de l'H₂S. Cette caractéristique n'étant pas commune à *C. jejuni*, il est possible que cette cupule ait été contaminée. Une hypothèse pouvant expliquer ces faux-négatifs serait que ce type de galerie est fabriqué sur base des propriétés biochimiques de souches de références «apprivoisées». Par conséquent, les souches environnementales présentant des adaptations métaboliques ne répondent pas aux tests de manière traditionnelle, impliquant que les galleries ne savent pas les identifier.

Treize des souches ont été identifiées comme *C. jejuni* (8) ou *C. coli* (5) mais étaient en réalité des souches appartenant à d'autres genres bactériens (voir 4.4.1.). Mise à part les colonies de *Cellvibrio*, des souches bactériennes des genres bactériens isolés ont été

renseignées comme profils inacceptables par les galeries lors d'autres périodes de test. Dès lors, il est étrange que le système API Campy[®] ne sache pas discriminer ces genres bactériens à chaque fois que ceux-ci sont testés sur les galeries.

Lorsqu'on compare la fiche d'identification de deux souches *E. fergusonii*, l'une étant un profil inacceptable et l'autre étant identifiée comme *C. coli*, on observe que certains résultats aux tests ne sont pas les mêmes : l'hydrolyse de l'uréase et l'assimilation du propionate et du malate. Ces résultats amènent deux hypothèses : soit une des deux souches présente des caractéristiques biochimiques inhabituelles à l'espèce, soit le produit utilisé est de moindre qualité. En outre, la souche qualifiée de profil inacceptable s'avère être uréase+ alors que l'espèce *E. fergusonii* est uréase- (Hariharan *et al.*, 2007). Il semblerait donc que, lorsque la galerie n'est pas en présence de souches de *Campylobacter*, les produits des réactions testées ne sont pas fiables et ne permettent pas de tirer de conclusions quant à l'espèce bactérienne en présence.

Dans la littérature, le taux de succès d'identification de *C. jejuni* par les galeries API Campy[®] se situe entre 92 et 100% (Huysmans *et al.*, 1995 ; Shih, 2000 ; Martiny *et al.*, 2011). En outre, certains résultats faux-positifs ont été rapportés dans certaines études visant à évaluer la qualité d'identification de ces galeries (Shih, 2000 ; Samosornsuk *et al.*, 2007). Dans le cadre de ce mémoire, 85 souches sur 109, soit 78%, ont été identifiées correctement par cette méthode. Cependant, ce résultat s'avère biaisé par le manque de discrimination établi lors de l'étape de confirmation des colonies présumées. Beaucoup de bactéries non-*Campylobacter* ont été sélectionnées pour l'étape d'identification alors que celles-ci n'ont pas été étudiées en profondeur. Néanmoins, 13 résultats faux-positifs et 9 faux-négatifs ont été donnés par ces galeries. Cela implique que l'identification fournie par ce système fait face à certaines limitations : i) l'identification de souches présentant des adaptations biochimiques est difficile et ii) la galerie donne des résultats aléatoires lorsque les souches identifiées ne sont pas des *Campylobacter*.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Actuellement, *C. jejuni* et *C. coli* font partie des principaux agents pathogènes alimentaires au monde. Dans un contexte d'émergence d'un grand nombre de souches présentant des résistances aux antibiotiques, ce travail a été réalisé dans le but d'isoler un phage spécifique à *C. jejuni* et/ou à *C. coli*. Ceci permettrait d'approfondir la recherche concernant ce type phage et, à long terme, élaborer un moyen de biocontrôle contre *Campylobacter* spp. Un autre objectif était l'isolement de souches environnementales de ces bactéries afin de comprendre leur écologie et d'estimer leur prévalence et leur diversité au sein de différents types d'élevages avicoles de Wallonie. Parallèlement, l'utilisation d'une méthode d'isolement spécifique à *Campylobacter* a permis l'évaluation de celle-ci ainsi que du matériel employé proposé sur le marché.

D'abord, 16 échantillons de matières fécales ont été traités et testés avec différentes souches de *Campylobacter* dans le but d'isoler un campylophage en utilisant la technique du *spot assay*. À cinq reprises, des «halos» clairs ont été observés. Ces «halos» indiquant une potentielle activité lytique provoquée par un phage, une étape de purification est réalisée mais aucune plaque de lyse individuelle n'a été observée. Par conséquent, aucun campylophage n'a pu être isolé au terme de ce mémoire.

Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat. Premièrement, le choix du matériel biologique utilisé est d'une grande importance. Il s'est avéré que les échantillons et souches bactériennes utilisés ainsi que les combinaisons de tests effectuées n'étaient pas toujours optimales pour l'isolement d'un phage. Deuxièmement, certaines étapes peuvent être ajoutées au protocole afin de l'optimiser. En effet, en considérant la présence de phages dans les suspensions testées, ceux-ci n'ont pas été capables de se propager. Dès lors, d'autres méthodes de purification que celle utilisée (*double layer agar assay*) sont peut-être plus adaptées aux campylophages. Par ailleurs, l'ajout d'une étape de *pre-screening* des échantillons permet de s'assurer de la présence de phages et de discriminer les campylophages des différents groupes en présence, permettant ainsi de choisir des souches potentiellement spécifiques à ces phages. En outre, une étape d'enrichissement aurait également pu être effectuée. Cependant, il a été décidé de ne pas procéder à cette étape afin de s'assurer de l'isolement d'un phage lytique et ne présentant pas de gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques (critères nécessaires à son utilisation pour le biocontrôle ou la phagothérapie). Troisièmement, il se peut que les «halos» observés ne soient pas le fruit de l'activité lytique de bactériophages, expliquant qu'il n'y ait pas eu de propagation observée lors de la purification. Cette activité lytique serait alors causée par des métabolites anti-*Campylobacter* (e.g. bactériocines, acides organiques) sécrétés par les bactéries présentes dans les échantillons.

Bien que ça n'ait pas été le cas durant ce travail, l'isolement de campylophages a déjà été réalisé à maintes reprises à partir de différentes matrices. Ainsi, l'étude des campylophages est un des domaines de recherche de plus en plus actif depuis une vingtaine d'années. De nombreuses études démontrent leur capacité à réduire la colonisation par *Campylobacter* du caecum des poulets de chair soit en étant administrés seuls, soit sous forme d'un cocktail de différents phages. Bien qu'aucun produit phagique anti-*Campylobacter* ne soit commercialisé pour la filière vétérinaire et agro-alimentaire, les résultats encourageants de ces recherches laissent entrevoir la possibilité d'utiliser un tel produit dans le cadre de la santé humaine.

Ensuite, en ce qui concerne l'isolement de souches, sur 54 échantillons testés, *Campylobacter* a été détecté dans 15 matrices fécales différentes, ce qui représente 27,8%. Ce chiffre est sensiblement plus bas que les chiffres renseignés dans la littérature. Plusieurs explications sont possibles. D'abord, le nombre d'échantillons est relativement bas comparé aux études menées par le passé dans lesquelles sont analysés entre 500 et 2.000 échantillons. Ensuite, le type d'élevage joue un rôle important dans la prévalence de *Campylobacter*. Les poulets de chair, n'ayant pas accès à l'extérieur, sont des animaux moins colonisés par cette bactérie. Or, leurs fientes représentent la majorité des échantillons ce qui peut induire un biais dans le résultat. Enfin, les échantillonnages ont été réalisés durant l'hiver, période durant laquelle on observe une diminution des contaminations de la volaille.

Aucune législation de l'Union européenne n'impose de critère maximal concernant la contamination des poulets dans les exploitations. Le contrôle de *Campylobacter* dans la volaille se fait à l'abattoir où la charge maximale de 15 poulets d'un lot de 50 ne peut dépasser 3 log CFU/g après réfrigération. De ce fait, aucune conclusion quant à la qualité sanitaire des élevages ne peut être établie.

Malgré l'échantillonnage peu représentatif, quelques tendances peuvent être observées. Dans un premier temps, on observe que les poulets issus d'élevages viandeux présentent une charge en *Campylobacter* plus élevée que les poulets issus d'autres élevages. Dans ce cas-ci, la taille du troupeau joue certainement un rôle prédominant. En effet, le contact étroit et permanent entre les animaux augmente les chances de transmission de la bactérie. Les exploitations de poulets viandeux comptent entre 15.000 et 22.000 animaux par bâtiment comparé à une quarantaine dans les élevages de poules pondeuses BIO et deux à trois poules dans les élevages de particuliers et d'ornement, expliquant en partie cette tendance. De plus, les poulets ayant accès à l'extérieur (poulets de chair BIO, poules pondeuses BIO, poules d'ornement et élevage particulier) sont plus exposés à des contaminations environnementales, augmentant encore plus les chances de colonisation par *Campylobacter*. Il a également été observé que la charge en *Campylobacter* estimée chez les canards dans ce cadre-ci est relativement plus élevée que celle estimée chez les poules. Dès lors, il semblerait également que l'espèce de l'animal influence la colonisation de *Campylobacter*. Aussi, aucune influence de l'âge sur la colonisation des animaux n'a été mise en évidence lors de ce travail.

Au terme de ce mémoire, 68 souches de *C. jejuni* et une *C. coli* ont été isolées à partir de 54 échantillons provenant de poulets de chair non-BIO et BIO, de poules pondeuses BIO, de poules d'ornement, d'élevages de particuliers de poules et de canards et d'une exploitation produisant du foie gras de canard. Parmi elles, 17 souches ont été séquencées par la technique MLST nous permettant d'en apprendre plus sur leurs origines. Il en est ressorti que les *sequence types* (ST) des souches isolées lors de ce mémoire correspondaient aux STs communément présents dans les élevages de poulets belges. Après la réalisation de deux dendrogrammes, il a été observé que, généralement, une même lignée clonale de souche prolifère dans chaque ferme, indiquant une pauvre diversité dans les isolats séquencés. Une analyse des résistances aux antibiotiques de 26 souches est également effectuée et démontre une majorité de résistances aux β -lactames, à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine. Ces résistances sont liées à l'usage de ces composés dans la filière vétérinaire et ont des répercussions dans le domaine de la santé humaine où de plus en plus de cas de souches pathogènes résistantes à ces traitements voient le jour.

Finalement, la méthode d'isolement utilisée a été évaluée. Premièrement, l'utilisation des deux milieux sélectifs et chromogéniques différents, RAPID'*Campylobacter* et CampyFood, a montré des divergences quant aux résultats de dénombrement obtenus. De plus, 39 colonies présentant un phénotype similaire aux *Campylobacter* mais appartenant à un autre genre bactérien ont été isolées depuis chacun des milieux, démontrant qu'aucun n'est capable d'inhiber totalement la croissance de la flore accompagnatrice présente dans les échantillons. La majorité des colonies faussement positives provenaient de géloses CFA, indiquant potentiellement une moindre sélectivité par rapport au milieu RAPID. En outre, il a été observé que certaines colonies forment des nuées sur les géloses RAPID malgré le séchage de celles-ci avant utilisation, rendant le dénombrement imprécis sur ces boîtes. Ensuite, il a été démontré que l'étape de confirmation des colonies présumées *Campylobacter* présente quelques limites. D'une part, la discrimination des souches par les tests oxydase et catalase présente un faible critère d'identification car un grand nombre de micro-organismes présentent les mêmes caractéristiques biochimiques. D'autre part, il s'est avéré que le test d'agglutination au latex était très difficile à interpréter, malgré le contrôle positif fourni par la firme. Enfin, des galeries du système API Campy® ont été utilisées pour identifier les souches isolées. Ces galeries ont identifié correctement 85 souches mais ont donné 13 résultats faux-positifs et 9 faux-négatifs. D'ailleurs, les résultats aux tests de la galerie des faux-positifs et des faux-négatifs étaient surprenants et inhabituels pour le genre bactérien et l'espèce testée. Il en a été conclu que le système API Campy® permet l'identification de souches possédant un profil biochimique proche des souches de références de laboratoire mais présente des difficultés à identifier les souches environnementales manifestant des adaptations physiologiques à leur environnement (e.g., métabolisme du carbone, résistance aux antibiotiques).

Lors de ce mémoire, des méthodes de microbiologie conventionnelles validées par la norme ISO 10272 ont été utilisées pour dénombrer et identifier les *Campylobacter*. Bien

que le protocole utilisé soit validé par les autorités compétentes, il s'est avéré que celui-ci présente quelques limites, souvent dues à la capacité des campylobactéries à s'adapter à leur environnement (flore accompagnatrice, état VNC) (Ricke *et al.*, 2019) mais également en ce qui concerne le temps et l'argent qu'elles nécessitent. De ce fait, bioMérieux propose leur technologie TEMPO® CAM qui est un appareil permettant le dénombrement automatique de *Campylobacter* selon la méthode du «Nombre le plus probable». Son efficacité n'a que très peu été évaluée par la communauté scientifique mais Owen *et al.* (2010) rapportent que la technologie TEMPO® utilisée pour les *Enterobacteriaceae* est fiable mais n'est pas significativement meilleure que les méthodes conventionnelles. Dès lors, d'autres méthodes de détection et de dénombrement sont de plus en plus utilisées telles que la méthode immuno-enzymatique ELISA (Buissonnière *et al.*, 2018), la *multiplex* PCR ou encore la PCR quantitative. Cependant, ces méthodes moléculaires ne permettent pas un dénombrement fiable des *Campylobacter* pour les normes alimentaires (3 log CFU/g) en raison de la sensibilité de l'ADN polymérase aux inhibiteurs présents dans les matrices alimentaires et les bouillons d'enrichissement (Papić *et al.*, 2017). L'identification des espèces peut également se faire par PCR ou *multiplex* PCR en discriminant les espèces grâce à différents gènes spécifiques, par électrophorèse sur gel ou encore par séquençage MLST (Nafarrate *et al.*, 2021a).

En conclusion, l'étude approfondie de la prévalence de *Campylobacter* dans les élevages de volaille représente un enjeu des plus importants pour la santé publique afin de contrôler l'émergence de ce pathogène alimentaire. Comprendre l'écologie des espèces *C. jejuni* et *C. coli* permettrait d'augmenter les capacités de contrôle de celles-ci dans la filière vétérinaire et les usines de transformation agro-alimentaires. Dans ce but, le développement et l'utilisation de méthodes de détection et de dénombrement optimisées est primordiale. Au terme de ce mémoire, il serait intéressant d'approfondir ces deux domaines d'études afin d'appréhender au mieux les stratégies de contrôle à mettre en place contre *Campylobacter* dans la chaîne de production alimentaire, de la ferme à l'assiette.

BIBLIOGRAPHIE

- ACKERMANN, H. (2011). Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, 32(2), 90-94.
- ACKERMANN, H. & PRANGISHVILI, D. (2012). Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Archives of virology*, 157(10), 1843-1849.
- AHMED, R., LEÓN-VELARDE, C. & ODUMERU, J. (2012). Evaluation of novel agars for the enumeration of *Campylobacter* spp. in poultry retail samples. *Journal of microbiological methods*, 88(2), 304-310.
- AJENE, A. N., WALKER, C. L. F. & BLACK, R. E. (2013). Enteric pathogens and reactive arthritis : a systematic review of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*-associated reactive arthritis. *Journal of health, population, and nutrition*, 31(3), 299.
- ALTEKRUSE, S. F., STERN, N. J., FIELDS, P. I. & SWERDLOW, D. L. (1999). *Campylobacter jejuni* — an emerging foodborne pathogen. *Emerging infectious diseases*, 5(1), 28.
- ANDREWS, S. *et al.* (2010). FastQC : a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- ANDREY, P., DMITRY, A., DMITRY, M., ALLA, L. & ANTON, K. (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. *Current protocols in bioinformatics*, 70(1), e102.
- ATABAY, H. I., WAINØ, M. & MADSEN, M. (2006). Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry. *International journal of food microbiology*, 109(1-2), 139-145.
- ATEBA, C. N. & MARIBENG, M. D. (2011). Detection of *Enterococcus* species in groundwater from some rural communities in the Mmabatho area, South Africa : A risk analysis. *African Journal of Microbiology Research*, 5(23), 3930-3935.
- ATTERBURY, R. J., CONNERTON, P. L., DODD, C. E., REES, C. E. & CONNERTON, I. F. (2003). Isolation and characterization of *Campylobacter* bacteriophages from retail poultry. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4511-4518.
- BANG, D. D., BORCK, B., NIELSEN, E. M., SCHEUTZ, F., PEDERSEN, K. & MADSEN, M. (2004). Detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Danish turkeys by PCR and cytolethal distending toxin production of the isolates. *Journal of food protection*, 67(10), 2171-2177.
- BANG, D. D., WEDDERKOPP, A., PEDERSEN, K. & MADSEN, M. (2002). Rapid PCR using nested primers of the 16S rRNA and the hippuricase (*hipO*) genes to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples. *Molecular and cellular probes*, 16(5), 359-369.
- BANOWARY, B., DANG, V. T., SARKER, S., CONNOLLY, J. H., CHENU, J., GROVES, P., RAIDAL, S. & GHORASHI, S. A. (2018). Evaluation of Two Multiplex PCR-High-Resolution Melt Curve Analysis Methods for Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Intraspecies. *Avian diseases*, 62(1), 86-93.
- BARRERO-TOBON, A. M. & HENDRIXSON, D. R. (2012). Identification and analysis of flagellar coexpressed determinants (Feds) of *Campylobacter jejuni* involved in colonization. *Molecular microbiology*, 84(2), 352-369.

- BHANDARE, S. & GOODRIDGE, L. (2021). Bacteriophages as Bio-sanitizers in Food Production and Healthcare Settings. *Bacteriophages : Biology, Technology, Therapy*, 769-788.
- BIGOT, B., LEE, W.-J., MCINTYRE, L., WILSON, T., HUDSON, J., BILLINGTON, C. & HEINEMANN, J. (2011). Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage. *Food Microbiology*, 28(8), 1448-1452.
- BOARD, E. (2015). *Myroides*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-5.
- BOLTON, D. J. (2015). *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food microbiology*, 48, 99-108.
- BORTOLAIA, V., KAAS, R. S., RUPPE, E., ROBERTS, M. C., SCHWARZ, S., CATTOIR, V., PHILIPPON, A., ALLESOE, R. L., REBELO, A. R., FLORENSA, A. F. *et al.* (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491-3500.
- BUENO, E., GARCIA, P., MARTINEZ, B. & RODRIGUEZ, A. (2012). Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. *International journal of food microbiology*, 158(1), 23-27.
- BUISSONNIÈRE, A., BÉNÉJAT, L., CHARRON, P., BESSÈDE, E., LEHOURS, P., VALDENNAIRE, G., RICHER, O. & MÉGRAUD, F. (2018). A new kit to detect *Campylobacter* species in stool specimens : the Orion GenRead *Campylobacter*®. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(8), 1585-1587.
- BURNHAM, P. M. & HENDRIXSON, D. R. (2018). *Campylobacter jejuni* : collective components promoting a successful enteric lifestyle. *Nature reviews Microbiology*, 16(9), 551-565.
- CARVALHO, C., GANNON, B. W., HALFHIDE, D. E., SANTOS, S. B., HAYES, C. M., ROE, J. M. & AZEREDO, J. (2010a). The *in vivo* efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC microbiology*, 10(1), 232.
- CARVALHO, C., SUSANO, M., FERNANDES, E., SANTOS, S., GANNON, B., NICOLAU, A., GIBBS, P., TEIXEIRA, P. & AZEREDO, J. (2010b). Method for bacteriophage isolation against target *Campylobacter* strains. *Letters in applied microbiology*, 50(2), 192-197.
- CATALAO, M. J., GIL, F., MONIZ-PEREIRA, J., SAO-JOSE, C. & PIMENTEL, M. (2013). Diversity in bacterial lysis systems : bacteriophages show the way. *FEMS microbiology reviews*, 37(4), 554-571.
- CHANG, Y. (2020). Bacteriophage-derived endolysins applied as potent biocontrol agents to enhance food safety. *Microorganisms*, 8(5), 724.
- CHEN, S., XIANG, H., ZHANG, H., ZHU, X., WANG, D., WANG, J., YIN, T., LIU, L., KONG, M., LI, H. *et al.* (2019). Rearing system causes changes of behavior, microbiome, and gene expression of chickens. *Poultry science*, 98(9), 3365-3376.
- CHON, J.-W., LEE, S.-K., YOON, Y., YOON, K.-S., KWAK, H.-S., JOO, I.-S. & SEO, K.-H. (2018). Quantitative prevalence and characterization of *Campylobacter* from chicken and duck carcasses from poultry slaughterhouses in South Korea. *Poultry science*, 97(8), 2909-2916.
- CLARK, J. R. & MARCH, J. B. (2006). Bacteriophages and biotechnology : vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in biotechnology*, 24(5), 212-218.

- COLLES, F. M., ALI, J. S., SHEPPARD, S. K., MCCARTHY, N. D. & MAIDEN, M. C. (2011). *Campylobacter* populations in wild and domesticated Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Environmental microbiology reports*, 3(5), 574-580.
- COLLES, F. M., MCCARTHY, N. D., BLISS, C. M., LAYTON, R. & MAIDEN, M. C. (2015). The long-term dynamics of *Campylobacter* colonizing a free-range broiler breeder flock : an observational study. *Environmental microbiology*, 17(4), 938-946.
- CONLAN, A. J., COWARD, C., GRANT, A. J., MASKELL, D. J. & GOG, J. R. (2007). *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens : a modelling perspective. *Journal of The Royal Society Interface*, 4(16), 819-829.
- CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE. (2017). Council regulation (EU) no 2017/1495 [<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32017R1495&from=FR#d1e32-4-1>].
- CORCORAN, D., QUINN, T., COTTER, L. & FANNING, S. (2006). An investigation of the molecular mechanisms contributing to high-level erythromycin resistance in *Campylobacter*. *International journal of antimicrobial agents*, 27(1), 40-45.
- COSTA, D. & IRAOLA, G. (2019). Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species. *Clinical microbiology reviews*, 32(4).
- DASTI, J. I., TAREEN, A. M., LUGERT, R., ZAUTNER, A. E. & GROSS, U. (2010). *Campylobacter jejuni* : a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(4), 205-211.
- DIARRA, M. S., REMPEL, H., CHAMPAGNE, J., MASSON, L., PRITCHARD, J. & TOPP, E. (2010). Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Applied and environmental microbiology*, 76(24), 8033-8043.
- DROMIGNY, E. (2007). *Campylobacter*. Tec Doc Lavoisier. <https://books.google.co.uk/books?id=AZrBPQAACAAJ>
- DUARTE, A., BOTTELDOORN, N., MILLER, W., COUCKE, W., MARTINY, D., HALLIN, M., SELIWIORSTOW, T., DE ZUTTER, L., UYTENDAELE, M., VANDENBERG, O. *et al.* (2019). Relation between broiler and human *Campylobacter jejuni* strains isolated in Belgium from 2011 to 2013. *Journal of applied microbiology*, 126(1), 277-287.
- DUDLER, S. R. J. (2006). Les arthrites réactionnelles. *Rev Med Suisse*, 2, 31107.
- EFSA, for DISEASE PREVENTION, E. C., (EFSA, C. & ECDC). (2019). The European Union One Health 2018 zoonoses report. *EFSA Journal*, 17(12), e05926.
- EL METWALY AHMED, M., SCHULZ, J. & HARTUNG, J. (2013). Air samplings in a *Campylobacter jejuni* positive laying hen flock. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20(1).
- ELHADIDY, M., ALI, M. M., EL-SHIBINY, A., MILLER, W. G., ELKHATIB, W. F., BOTTELDOORN, N. & DIERICK, K. (2020). Antimicrobial resistance patterns and molecular resistance markers of *Campylobacter jejuni* isolates from human diarrheal cases. *PloS one*, 15(1), e0227833.
- ELHADIDY, M., MILLER, W. G., ARGUELLO, H., ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A., DUARTE, A., DIERICK, K. & BOTTELDOORN, N. (2018). Genetic basis and clonal population structure of an-

- tibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from broiler carcasses in Belgium. *Frontiers in microbiology*, 9, 1014.
- EL-SHIBINY, A., CONNERTON, P. & CONNERTON, I. (2005). Enumeration and diversity of *Campylobacter* and bacteriophages isolated during the rearing cycles of free-range and organic chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1259-1266.
- EL-SHIBINY, A., SCOTT, A., TIMMS, A., METAWEA, Y., CONNERTON, P. & CONNERTON, I. (2009). Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. *Journal of food protection*, 72(4), 733-740.
- EPPS, S. V., HARVEY, R. B., HUME, M. E., PHILLIPS, T. D., ANDERSON, R. C. & NISBET, D. J. (2013). Foodborne *Campylobacter* : infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *International journal of environmental research and public health*, 10(12), 6292-6304.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, E., AMORE, G., BELOEIL, P.-A., BOCCA, V., BOELAERT, F., GIBIN, D., PAPANIKOLAOU, A., RIZZ, V. & STOICESCU, A.-V. (2021). *Zoonoses, antimicrobial resistance and food-borne outbreaks guidance for reporting 2020 data* (rapp. tech.). Wiley Online Library.
- FLANAGAN, R. C., NEAL-MCKINNEY, J. M., DHILLON, A. S., MILLER, W. G. & KONKEL, M. E. (2009). Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. *Infection and immunity*, 77(6), 2399-2407.
- FREDERIKSEN, W. (2015). *Citrobacter*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-23.
- FURFARO, L. L., PAYNE, M. S. & CHANG, B. J. (2018). Bacteriophage therapy : clinical trials and regulatory hurdles. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 376.
- FURUTA, M., NASU, T., UMEKI, K., MINH, D. H., HONJOH, K.-I. & MIYAMOTO, T. (2017). Characterization and application of lytic bacteriophages against *Campylobacter jejuni* isolated from poultry in Japan. *Biocontrol science*, 22(4), 213-221.
- GAASTRA, W., KUSTERS, J., VAN DUIJKEREN, E. & LIPMAN, L. (2014). *Escherichia fergusonii*. *Veterinary microbiology*, 172(1-2), 7-12.
- GAMBINO, M. & BRØNDSTED, L. (2021). Looking into the future of phage-based control of zoonotic pathogens in food and animal production. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 96-103.
- GARCIA, P., MARTINEZ, B., OBESO, J. & RODRIGUEZ, A. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in applied microbiology*, 47(6), 479-485.
- GARCIA, P., RODRIGUEZ, L., RODRIGUEZ, A. & MARTINEZ, B. (2010). Food biopreservation : promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in food science & technology*, 21(8), 373-382.
- GARCIA-ANAYA, M. C., SEPULVEDA, D. R., SÁENZ-MENDOZA, A. I., RIOS-VELASCO, C., ZAMUDIO-FLORES, P. B. & ACOSTA-MUÑIZ, C. H. (2020). Phages as biocontrol agents in dairy products. *Trends in Food Science & Technology*, 95, 10-20.
- GARCIA-SÁNCHEZ, L., MELERO, B. & ROVIRA, J. (2018). *Campylobacter* in the food chain. *Advances in food and nutrition research*, 86, 215-252.

- GARÉNAUX, A. (2008). *Better Understanding of the Campylobacter Conundrum*. Nova Science Publishers. <https://books.google.be/books?id=iBqmPQAACAAJ>
- GARRITY, G., STALEY, J., BRENNER, D., KRIEG, N., BOONE, D., DE VOS, P., GOODFELLOW, M., RAINEY, F., GARRITY, G. & SCHLEIFER, K. (2006). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology : Volume Two : The Proteobacteria (Part C)*. Springer US. <https://books.google.be/books?id=dgejA4wa5R4C>
- GENCAY, Y. E., BIRK, T., SØRENSEN, M. C. H. & BRØNDSTED, L. (2017). Methods for isolation, purification, and propagation of bacteriophages of *Campylobacter jejuni*, In *Campylobacter jejuni*. Springer.
- GEORGIEV, M., BEAUVAIS, W. & GUITIAN, J. (2017). Effect of enhanced biosecurity and selected on-farm factors on *Campylobacter* colonization of chicken broilers. *Epidemiology & Infection*, 145(3), 553-567.
- GHARST, G., OYARZABAL, O. A. & HUSSAIN, S. K. (2013). Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of microbiological Methods*, 95(1), 84-92.
- GHOSE, C. & EULER, C. W. (2020). Gram-negative bacterial lysins. *Antibiotics*, 9(2), 74.
- GÖLZ, G., KITTLER, S., MALAKAUSKAS, M. & ALTER, T. (2018). Survival of *Campylobacter* in the food chain and the environment. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5(2), 126-134.
- GORKIEWICZ, G., FEIERL, G., SCHÖBER, C., DIEBER, F., KÖFER, J., ZECHNER, R. & ZECHNER, E. L. (2003). Species-specific identification of *Campylobacters* by partial 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2537.
- GUERRY, P. (2007). *Campylobacter* flagella : not just for motility. *Trends in microbiology*, 15(10), 456-461.
- GUERRY, P., POLY, F., RIDDLE, M., MAUE, A. C., CHEN, Y.-H. & MONTEIRO, M. A. (2012). *Campylobacter* polysaccharide capsules : virulence and vaccines. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 7.
- GUIRIN, G. F., BRUSA, V., ADRIANI, C. D. & LEOTTA, G. A. (2020). Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from broilers at conventional and kosher abattoirs and retail stores. *Revista Argentina de microbiologia*, 52(3), 217-220.
- GUNTHER IV, N. W., ALMOND, J., YAN, X. & NEEDLEMAN, D. S. (2011). *gyrB* versus 16S rRNA sequencing for the identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*. *Journal of Nucleic Acids Investigation*, 2(1), e7-e7.
- HABIB, I., UYTENDAELE, M. & DE ZUTTER, L. (2011). Evaluation of ISO 10272 : 2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. *Food microbiology*, 28(6), 1117-1123.
- HALD, B., SKOV, M. N., NIELSEN, E. M., RAHBK, C., MADSEN, J. J., WAINØ, M., CHRIÉL, M., NORDENTOFT, S., BAGGESEN, D. L. & MADSEN, M. (2015). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wild birds on Danish livestock farms. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58(1), 1-10.
- HAN, Z., PIELSTICKER, C., GERZOVA, L., RYCHLIK, I. & RAUTENSCHLEIN, S. (2016). The influence of age on *Campylobacter jejuni* infection in chicken. *Developmental & Comparative Immunology*, 62, 58-71.

- HARIHARAN, H., LÓPEZ, A., CONBOY, G., COLES, M. & MUIRHEAD, T. (2007). Isolation of *Escherichia fergusonii* from the feces and internal organs of a goat with diarrhea. *The Canadian Veterinary Journal*, 48(6), 630.
- HASHIM, M. H. & ALKHAFAJI, M. H. (2018). Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from chicken meat samples using cultural and molecular techniques. *Iraqi Journal of Science*, 1216-1224.
- HATFULL, G. F. (2015). Dark matter of the biosphere : the amazing world of bacteriophage diversity. *Journal of virology*, 89(16), 8107-8110.
- HAZELEGER, W. C. & BEUMER, R. R. (2014). *Campylobacter* : detection by latex agglutination techniques, In *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Elsevier Ltd, Academic Press.
- HEUER, O. E., PEDERSEN, K., ANDERSEN, J. & MADSEN, M. (2001). Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. *Letters in applied microbiology*, 33(4), 269-274.
- HINTON, A., CASON, J. & INGRAM, K. D. (2004). Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, 91(2), 155-165.
- HOBBS, Z. & ABEDON, S. T. (2016). Diversity of phage infection types and associated terminology : the problem with 'Lytic or lysogenic'. *FEMS microbiology letters*, 363(7).
- HORROCKS, S., ANDERSON, R., NISBET, D. & RICKE, S. (2009). Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe*, 15(1-2), 18-25.
- HORSTINK, O. (2020). *Prevalence of Campylobacter spp. in feces of chickens at children's farms and social care farms in the province of Utrecht* (mém. de mast.).
- HOWARD-VARONA, C., HARGREAVES, K. R., ABEDON, S. T. & SULLIVAN, M. B. (2017). Lysogeny in nature : mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *The ISME journal*, 11(7), 1511-1520.
- HUYSMANS, M. B., TURNIDGE, J. D. & WILLIAMS, J. H. (1995). Evaluation of API Campy in comparison with conventional methods for identification of thermophilic *Campylobacter*. *Journal of clinical microbiology*, 33(12), 3345-3346.
- HYMAN, P. (2019). Phages for phage therapy : isolation, characterization, and host range breadth. *Pharmaceuticals*, 12(1), 35.
- IOVINE, N. M. (2013). Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*, 4(3), 230-240.
- JÄCKEL, C., HAMMERL, J. A., RAU, J. & HERTWIG, S. (2017). A multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of *Campylobacter* phages. *PloS one*, 12(12), e0190240.
- JÄCKEL, C., HAMMERL, J. A. & HERTWIG, S. (2019). *Campylobacter* phage isolation and characterization : what we have learned so far. *Methods and protocols*, 2(1), 18.
- JAMAL, M., BUKHARI, S. M., ANDLEEB, S., ALI, M., RAZA, S., NAWAZ, M. A., HUSSAIN, T., RAHMAN, S. U. & SHAH, S. S. (2019). Bacteriophages : an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *Journal of basic microbiology*, 59(2), 123-133.
- JAMALI, H., GHADERPOUR, A., RADMEHR, B., WEI, K. S. C., CHAI, L. C. & ISMAIL, S. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolates in ducks and geese. *Food Control*, 50, 328-330.

- JANDA, J. M. & ABBOTT, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory : pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761.
- JANEŽ, N., KOKOŠIN, A., ZALETEL, E., VRANAC, T., KOVAČ, J., VUČKOVIĆ, D., SMOLE MOŽINA, S., ČURIN ŠERBEC, V., ZHANG, Q. [Qijing], ACCETTO, T. *et al.* (2014). Identification and characterisation of new *Campylobacter* group III phages of animal origin. *FEMS microbiology letters*, 359(1), 64-71.
- JANEŽ, N. & LOC-CARRILLO, C. (2013). Use of phages to control *Campylobacter* spp. *Journal of microbiological methods*, 95(1), 68-75.
- JONES, ANDERSON, K. E. & GUARD, J. Y. (2012). Prevalence of coliforms, *Salmonella*, *Listeria*, and *Campylobacter* associated with eggs and the environment of conventional cage and free-range egg production. *Poultry science*, 91(5), 1195-1202.
- JONES, GUARD, J., GAST, R., BUHR, R., FEDORKA-CRAY, P., ABDO, Z., PLUMBLEE, J., BOURASSA, D., COX, N., RIGSBY, L. *et al.* (2016). Influence of commercial laying hen housing systems on the incidence and identification of *Salmonella* and *Campylobacter*. *Poultry science*, 95(5), 1116-1124.
- KAAKOUSH, N. O., CASTAÑO-RODRIGUEZ, N., MITCHELL, H. M. & MAN, S. M. (2015). Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 687-720.
- KIM, J. H., KIM, H. J., JUNG, S. J., MIZAN, M. F. R., PARK, S. H. & HA, S.-D. (2020). Characterization of *Salmonella* spp. specific bacteriophages and their biocontrol application in chicken breast meat. *Journal of food science*, 85(3), 526-534.
- KLENA, J. D., PARKER, C. T., KNIBB, K., IBBITT, J. C., DEVANE, P. M., HORN, S. T., MILLER, W. G. & KONKEL, M. E. (2004). Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *Journal of clinical microbiology*, 42(12), 5549.
- KOENRAAD, P. M., GIESENDORF, B. A., HENKENS, M. H., BEUMER, R. R. & QUINT, W. G. (1995). Methods for the detection of *Campylobacter* in sewage : evaluation of efficacy of enrichment and isolation media, applicability of Polymerase Chain Reaction and latex agglutination assay. *Journal of microbiological methods*, 23(3), 309-320.
- KUTTER, E. & SULAKVELIDZE, A. (2004). *Bacteriophages : biology and applications*. Crc press.
- LAMORIL, J., AMEZIANE, N., DEYBACH, J.-C., BOUIZEGARENE, P. & BOGARD, M. (2008). Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. premiere partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 23(5), 260-279.
- LARA-TEJERO, M. & GALÁN, J. E. (2002). Cytolethal distending toxin : limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends in microbiology*, 10(3), 147-152.
- LEFLON-GUIBOUT, V. & MUNIER, A.-L. (2016). Infections à *Campylobacter* : épidémiologie, facteurs de virulence, résistance aux antibiotiques. *Journal des Anti-infectieux*, 18(4), 160-168.
- LINDMARK, B., ROMPIKUNTAL, P. K., VAITKEVICIUS, K., SONG, T., MIZUNOE, Y., UHLIN, B. E., GUERRY, P. & WAI, S. N. (2009). Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC microbiology*, 9(1), 1-10.

- LOC-CARRILLO, C., ATTERBURY, R. J., EL-SHIBINY, A., CONNERTON, P. L., DILLON, E., SCOTT, A. & CONNERTON, I. F. (2005). Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 6554-6563.
- LOC-CARRILLO, C., CONNERTON, P. L., PEARSON, T. & CONNERTON, I. F. (2007). Free-range layer chickens as a source of *Campylobacter* bacteriophage. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92(3), 275-284.
- MAGAJNA, B. A. & SCHRAFT, H. (2015). *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but non-culturable (VBNC) in low nutrient conditions at 4°C more quickly than their planktonic counterparts. *Food Control*, 50, 45-50.
- MAIDEN, M. C., BYGRAVES, J. A., FEIL, E., MORELLI, G., RUSSELL, J. E., URWIN, R., ZHANG, Q. [Qing], ZHOU, J., ZURTH, K., CAUGANT, D. A. *et al.* (1998). MultiLocus Sequence Typing : a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3140-3145.
- MAROTTA, F., DI MARCANTONIO, L., JANOWICZ, A., PEDONESE, F., DI DONATO, G., ARDELEAN, A., NUVOLONI, R., DI GIANNATALE, E. & GAROFOLO, G. (2020). Genotyping and Antibiotic Resistance Traits in *Campylobacter jejuni* and *coli* From Pigs and Wild Boars in Italy. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 627.
- MAROTTA, F., GAROFOLO, G., DI DONATO, G., APREA, G., PLATONE, I., CIANCIAVICCHIA, S., ALESSIANI, A. & DI GIANNATALE, E. (2015). Population diversity of *Campylobacter jejuni* in poultry and its dynamic of contamination in chicken meat. *BioMed research international*, 2015.
- MARTINY, D., DEDISTE, A., DEBRUYNE, L., VLAES, L., HADDOU, N. B., VANDAMME, P. & VANDENBERG, O. (2011). Accuracy of the API Campy system, the Vitek 2 *Neisseria-Haemophilus* card and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Campylobacter* and related organisms. *Clinical microbiology and infection*, 17(7), 1001-1006.
- MATTHEUS, W., BOTTELDOORN, N., HEYLEN, K., POCHET, B. & DIERICK, K. (2012). Trend analysis of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from Belgian pork and poultry meat products using surveillance data of 2004–2009. *Foodborne pathogens and disease*, 9(5), 465-472.
- MILLER, R., SPEEGLE, L., OYARZABAL, O. A. & LASTOVICA, A. J. (2008). Evaluation of three commercial latex agglutination tests for identification of *Campylobacter* spp. *Journal of clinical microbiology*, 46(10), 3546-3547.
- MOORE, J. E., CORCORAN, D., DOOLEY, J. S., FANNING, S., LUCEY, B., MATSUDA, M., McDOWELL, D. A., MÉGRAUD, F., MILLAR, B. C., O'MAHONY, R. *et al.* (2005). *Campylobacter*. *Veterinary research*, 36(3), 351-382.
- MÜLLER, W., BÖHLAND, C. & METHNER, U. (2011). Detection and genotypic differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from laying hens by multiplex PCR and *fla*-typing. *Research in veterinary science*, 91(3), e48-e52.
- NACHAMKIN, I., SZYMANSKI, C. & BLASER, M. (2008). *Campylobacter*. ASM Press. <https://books.google.be/books?id=No0IaqKKkYEC>

- NAFARRATE, I., LASAGABASTER, A., SEVILLANO, E. & MATEO, E. (2021a). Prevalence, molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp. isolates in northern Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 130(4), 1368-1379.
- NAFARRATE, I., MATEO, E., AMÁRITA, F., de MARAÑÓN, I. M. & LASAGABASTER, A. (2020). Efficient isolation of *Campylobacter* bacteriophages from chicken skin, analysis of several isolation protocols. *Food microbiology*, 90, 103486.
- NAFARRATE, I., MATEO, E., MIRANDA-CADENA, K. & LASAGABASTER, A. (2021b). Isolation, host specificity and genetic characterization of *Campylobacter* specific bacteriophages from poultry and swine sources. *Food Microbiology*, 97, 103742.
- NASTASIJEVIC, I., PROSCIA, F., BOSKOVIC, M., GLISIC, M., BLAGOJEVIC, B., SORGENTONE, S., KIRBIS, A. & FERRI, M. (2020). The European Union control strategy for *Campylobacter* spp. in the broiler meat chain. *Journal of Food Safety*, 40(5), e12819.
- NÄTHER, G., ALTER, T., MARTIN, A. & ELLERBROEK, L. (2009). Analysis of risk factors for *Campylobacter* species infection in broiler flocks. *Poultry Science*, 88(6), 1299-1305.
- NEAL-MCKINNEY, J. M., LU, X., DUONG, T., LARSON, C. L., CALL, D. R., SHAH, D. H. & KONKEL, M. E. (2012). Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. *PloS one*, 7(9), e43928.
- NEAL-MCKINNEY, J. M., SAMUELSON, D. R., EUCKER, T. P., NISSEN, M. S., CRESPO, R. & KONKEL, M. E. (2014). Reducing *Campylobacter jejuni* colonization of poultry via vaccination. *PloS one*, 9(12), e114254.
- NEWELL, D. & FEARNLEY, C. (2003). Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4343-4351.
- NICASTRO, J., WONG, S., KHAZAEI, Z., LAM, P., BLAY, J. & SLAVCEV, R. A. (2016). *Bacteriophage Applications-Historical Perspective and Future Potential*. Springer.
- NISHIYAMA, K., SETO, Y., YOSHIOKA, K., KAKUDA, T., TAKAI, S., YAMAMOTO, Y. & MUKAI, T. (2014). *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduces infection by and colonization of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, 9(9), e108827.
- NOBREGA, F. L., VLOT, M., de JONGE, P. A., DREESENS, L. L., BEAUMONT, H. J., LAVIGNE, R., DUTILH, B. E. & BROUNS, S. J. (2018). Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 760-773.
- NOTHAFT, H., DAVIS, B., LOCK, Y. Y., PEREZ-MUNOZ, M. E., VINOGRADOV, E., WALTER, J., COROS, C. & SZYMANSKI, C. M. (2016). Engineering the *Campylobacter jejuni* N-glycan to create an effective chicken vaccine. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- OH, J.-Y., KANG, M.-S., AN, B.-K., SHIN, E.-G., KIM, M.-J., KWON, J.-H. & KWON, Y.-K. (2012). Isolation and epidemiological characterization of heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia fergusonii* from healthy chickens. *Veterinary microbiology*, 160(1-2), 170-175.
- OLIVEIRA, H., THIAGARAJAN, V., WALMAGH, M., SILLANKORVA, S., LAVIGNE, R., NEVES-PETERSEN, M. T., KLUSKENS, L. D. & AZEREDO, J. (2014). A thermostable *Salmonella* phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against Gram-negative pathogens in presence of weak acids. *PLoS One*, 9(10), e108376.
- OLIVER, J. D. (2000). The public health significance of Viable but Non Culturable bacteria. *Nonculturable microorganisms in the environment*, 277-300.

- OWEN, M., WILLIS, C. & LAMPH, D. (2010). Evaluation of the TEMPO® Most Probable Number technique for the enumeration of *Enterobacteriaceae* in food and dairy products. *Journal of applied microbiology*, 109(5), 1810-1816.
- OWENS, J., BARTON, M. D. & HEUZENROEDER, M. W. (2013). The isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* bacteriophages from free range and indoor poultry. *Veterinary microbiology*, 162(1), 144-150.
- PAPIĆ, B., PATE, M., HENIGMAN, U., ZAJC, U., GRUNTAR, I., BIASIZZO, M., OCEPEK, M. & KUŠAR, D. (2017). New approaches on quantification of *Campylobacter jejuni* in poultry samples : the use of digital PCR and real-time PCR against the ISO standard plate count method. *Frontiers in microbiology*, 8, 331.
- PARK, S. F. (2002). The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International journal of food microbiology*, 74(3), 177-188.
- PEI, Z. & BLASER, M. J. (1993). PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in Gram-negative nutrient transport systems. *Journal of Biological Chemistry*, 268(25), 18717-18725.
- PROIETTI, P. C., GUELF, G., BELLUCCI, S., DE LUCA, S., DI GREGORIO, S., PIERAMATI, C. & FRANCIOSINI, M. P. (2020). Beta-lactam resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* chicken isolates and the association between blaOXA-61 gene expression and the action of β -lactamase inhibitors. *Veterinary microbiology*, 241, 108553.
- PUBMLST. (2021). *Clonal complex designation* [<https://pubmlst.org/organisms/neisseria-spp/clonal-complexes> [Accessed : 27-05-2021]].
- RAUTELIN, H., JUSUFOVIC, J. & HÄNNINEN, M.-L. (1999). Identification of hippurate-negative thermophilic *Campylobacter*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 35(1), 9-12.
- REICH, F., ATANASSOVA, V., HAUNHORST, E. & KLEIN, G. (2008). The effects of *Campylobacter* numbers in caeca on the contamination of broiler carcasses with *Campylobacter*. *International journal of food microbiology*, 127(1-2), 116-120.
- REVEZ, J. & HÄNNINEN, M.-L. (2012). Lipooligosaccharide locus classes are associated with certain *Campylobacter jejuni* Multilocus Sequence Types. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(9), 2203-2209.
- RICHARDS, P. J., CONNERTON, P. L. & CONNERTON, I. F. (2019). Phage biocontrol of *Campylobacter jejuni* in chickens does not produce collateral effects on the gut microbiota. *Frontiers in microbiology*, 10, 476.
- RICKE, S. C., FEYE, K. M., CHANEY, W. E., SHI, Z., PAVLIDIS, H. & YANG, Y. (2019). Developments in rapid detection methods for the detection of foodborne *Campylobacter* in the United States. *Frontiers in microbiology*, 9, 3280.
- RIVAS, L., COFFEY, B., MCAULIFFE, O., McDONNELL, M. J., BURGESS, C. M., COFFEY, A., ROSS, R. P. & DUFFY, G. (2010). *In vivo* and *ex vivo* evaluations of bacteriophages e11/2 and e4/1c for use in the control of *Escherichia coli* O157 : H7. *Applied and environmental microbiology*, 76(21), 7210-7216.
- SAHIN, O., YAEGER, M., WU, Z. & ZHANG, Q. (2017). *Campylobacter*-associated diseases in animals. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5, 21-42.

- SAINT-CYR, M. J., GUYARD-NICODÈME, M., MESSAOUDI, S., CHEMALY, M., CAPPELIER, J.-M., DOUSSET, X. & HADDAD, N. (2016). Recent advances in screening of anti-*Campylobacter* activity in probiotics for use in poultry. *Frontiers in microbiology*, 7, 553.
- SALMOND, G. P. & FINERAN, P. C. (2015). A century of the phage : past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 777-786.
- SALVAT, G., GUYOT, M. & PROTINO, J. (2017). Monitoring *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in traditional free-range 'Label Rouge' broiler production : a 23-year survey programme. *Journal of applied microbiology*, 122(1), 248-256.
- SAMOSORNSUK, W., ASAKURA, M., YOSHIDA, E., TAGUCHI, T., NISHIMURA, K., EAMPOKALAP, B., PHONGSISAY, V., CHAICUMPA, W. & YAMASAKI, S. (2007). Evaluation of a cytolethal distending toxin (CDT) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. *Microbiology and immunology*, 51(9), 909-917.
- SAUSSET, R., PETIT, M., GABORIAU-ROUTHIAU, V. & DE PAEPE, M. (2020). New insights into intestinal phages. *Mucosal immunology*, 13(2), 205-215.
- SCALLAN WALTER, E. J., CRIM, S. M., BRUCE, B. B. & GRIFFIN, P. M. (2020). Incidence of *Campylobacter*-associated Guillain-Barré Syndrome estimated from health insurance data. *Foodborne pathogens and disease*, 17(1), 23-28.
- SELIWIORSTOW, T., BARE, J., VERHAEGEN, B., UYTENDAELE, M. & DE ZUTTER, L. (2014). Evaluation of a new chromogenic medium for direct enumeration of *Campylobacter* in poultry meat samples. *Journal of food protection*, 77(12), 2111-2114.
- SHIH, D. Y.-C. (2000). Isolation and identification of enteropathogenic *Campylobacter* spp. from chicken samples in Taipei. *Journal of food protection*, 63(3), 304-308.
- SIBANDA, N., MCKENNA, A., RICHMOND, A., RICKE, S. C., CALLAWAY, T., STRATAKOS, A. C., GUNDOGDU, O. & CORCIONIVOSCHI, N. (2018). A review of the effect of management practices on *Campylobacter* prevalence in poultry farms. *Frontiers in microbiology*, 9, 2002.
- SIWAKOTI, S., SAH, R., RAJBHANDARI, R. S. & KHANAL, B. (2018). *Pantoea agglomerans* infections in children : Report of two cases. *Case reports in pediatrics*, 2018.
- SMIALEK, M., BURCHARDT, S. & KONCICKI, A. (2018). The influence of probiotic supplementation in broiler chickens on population and carcass contamination with *Campylobacter* spp.-Field study. *Research in veterinary science*, 118, 312-316.
- SØRENSEN, M. C. H., GENÇAY, Y. E., BIRK, T., BALDWINSSON, S. B., JÄCKEL, C., HAMMERL, J. A., VEGGE, C. S., NEVE, H. & BRØNDSTED, L. (2015). Primary isolation strain determines both phage type and receptors recognised by *Campylobacter jejuni* bacteriophages. *PLoS One*, 10(1), e0116287.
- SORO, A. B., WHYTE, P., BOLTON, D. J. & TIWARI, B. K. (2020). Strategies and novel technologies to control *Campylobacter* in the poultry chain : A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1353-1377.
- STAHL, M., BUTCHER, J. & STINTZI, A. (2012). Nutrient acquisition and metabolism by *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 5.

- STONE, D., DAVIS, M., BAKER, K., BESSER, T., ROOPNARINE, R. & SHARMA, R. (2013). MLST genotypes and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. isolated from poultry in Grenada. *BioMed Research International*, 2013.
- SULONEN, J., KÄRENLAMPI, R., HOLMA, U. & HÄNNINEN, M.-L. (2007). *Campylobacter* in Finnish organic laying hens in autumn 2003 and spring 2004. *Poultry science*, 86(6), 1223-1228.
- SVENSSON, S. L., FRIRDICH, E. & GAYNOR, E. C. (2008). Survival strategies of *Campylobacter jejuni* : stress responses, the viable but nonculturable state, and biofilms, In *Campylobacter*, Third Edition. American Society of Microbiology.
- TORRALBO, A., BORGE, C., ALLEPUZ, A., GARCIA-BOCANEGRA, I., SHEPPARD, S. K., PEREA, A. & CARBONERO, A. (2014). Prevalence and risk factors of *Campylobacter* infection in broiler flocks from southern Spain. *Preventive veterinary medicine*, 114(2), 106-113.
- TREMBLAY, Y. D., HATHROUBI, S. & JACQUES, M. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 110-116.
- TURNER, D., KROPINSKI, A. M. & ADRIAENSSENS, E. M. (2021). A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses*, 13(3), 506.
- UGARTE-RUIZ, M., GÓMEZ-BARRERO, S., PORRERO, M., ALVAREZ, J., GARCIA, M., COMERÓN, M., WASSENAAR, T. & DOMINGUEZ, L. (2012). Evaluation of four protocols for the detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices. *Journal of applied microbiology*, 113(1), 200-208.
- USHANOV, L., LASAREISHVILI, B., JANASHIA, I. & ZAUTNER, A. E. (2020). Application of *Campylobacter jejuni* phages : challenges and perspectives. *Animals*, 10(2), 279.
- VANDEPLAS, S., DUBOIS DAUPHIN, R., PALM, R., BECKERS, Y., THONART, P. & THÉWIS, A. (2010). Prevalence and sources of *Campylobacter* spp. contamination in free-range broiler production in the southern part of Belgium. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(2), 279-288.
- VEGGE, C. S., JANSEN VAN RENSBURG, M. J., RASMUSSEN, J. J., MAIDEN, M. C., JOHNSEN, L. G., DANIELSEN, M., MACINTYRE, S., INGMER, H. & KELLY, D. J. (2016). Glucose metabolism via the Entner-Doudoroff pathway in *Campylobacter* : a rare trait that enhances survival and promotes biofilm formation in some isolates. *Frontiers in microbiology*, 7, 1877.
- VELLINGA, A. & VAN LOOCK, F. (2002). The dioxin crisis as experiment to determine poultry-related *Campylobacter* enteritis. *Emerging infectious diseases*, 8(1), 19.
- WAGENAAR, J. A., VAN BERGEN, M. A., MUELLER, M. A., WASSENAAR, T. M. & CARLTON, R. M. (2005). Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Veterinary microbiology*, 109(3-4), 275-283.
- WALDENSTRÖM, J., BROMAN, T., CARLSSON, I., HASSELQUIST, D., ACHTERBERG, R. P., WAGENAAR, J. A. & OLSEN, B. (2002). Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5911-5917.

- WALMAGH, M., BRIERS, Y., DOS SANTOS, S. B., AZEREDO, J. & LAVIGNE, R. (2012). Characterization of modular bacteriophage endolysins from *Myoviridae* phages OBP201, φ 2-1 and PVP-SE1. *PLoS One*, 7(5), e36991.
- WARETH, G., KHEIMAR, A., NEUBAUER, H. & MELZER, F. (2020). Susceptibility of avian species to *Brucella* infection : a hypothesis-driven study. *Pathogens*, 9(2), 77.
- WILLISON, H. J., JACOBS, B. C. & van DOORN, P. A. (2016). Guillain-Barré Syndrome. *The Lancet*, 388(10045), 717-727.
- XU, X., ROTHROCK JR, M. J., MOHAN, A., KUMAR, G. D. & MISHRA, A. (2021). Using farm management practices to predict *Campylobacter* prevalence in pastured poultry farms. *Poultry Science*, 101122.
- YANG, Y., FEYE, K. M., SHI, Z., PAVLIDIS, H. O., KOGUT, M., J ASHWORTH, A. & RICKE, S. C. (2019). A historical review on antibiotic resistance of foodborne *Campylobacter*. *Frontiers in microbiology*, 10, 1509.
- ZANKARI, E., ALLESØE, R., JOENSEN, K. G., CAVACO, L. M., LUND, O. & AARESTRUP, F. M. (2017). PointFinder : a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(10), 2764-2768.
- ŻBIKOWSKA, K., MICHALCZUK, M. & DOLKA, B. (2020). The use of bacteriophages in the poultry industry. *Animals*, 10(5), 872.
- ZHANG, H., BAO, H., BILLINGTON, C., HUDSON, J. A. & WANG, R. (2012). Isolation and lytic activity of the *Listeria* bacteriophage endolysin LysZ5 against *Listeria monocytogenes* in soya milk. *Food microbiology*, 31(1), 133-136.
- ZHANG, Q. [Qijing] & SAHIN, O. (2020). Campylobacteriosis. *Diseases of poultry*, 754-769.

Étude de la diversité des espèces de *Campylobacter* dans les fientes de volailles en Wallonie et essais d'isolement de campylophages

Présenté par Célie De Beukelaer

Résumé

Les maladies d'origine alimentaire provoquées par l'émergence de nouveaux pathogènes constituent un problème mondial pour les agences et organisations de santé publique, l'industrie alimentaire et les consommateurs. Actuellement, les bactéries du genre *Campylobacter* spp. font partie des principaux agents responsables de ces maladies. Elles causent la campylobactériose qui est la zoonose la plus reportée au monde depuis 2005. C'est une maladie diarrhéique, souvent bénigne, mais pouvant engendrer de sévères complications, voire la mort. *Campylobacter* étant commensale à une multitude d'animaux et surtout à la volaille, la transmission à l'humain se produit généralement lors de l'ingestion de viande de poulet crue ou pas assez cuite. Cependant, les autres types de viande, le lait cru et l'eau peuvent également présenter des risques d'infection. Ce sont les espèces *C. jejuni* (83%) et *C. coli* (11%) qui sont responsables de la majorité des infections chez l'humain. Suite à l'usage abusif des antibiotiques dans la filière vétérinaire et les élevages dans le passé, on assiste aujourd'hui à l'émergence de plus en plus de souches pathogènes présentant des résistances à ces substances. Dès lors, de nouvelles stratégies de biocontrôle doivent être mises en place dans les élevages avicoles. Une des alternatives présentant un regain d'intérêt depuis plusieurs années est l'utilisation de bactériophages.

Dans ce contexte, le premier objectif de ce mémoire était l'isolement d'un phage de *C. jejuni* et/ou *C. coli* afin d'approfondir la connaissance scientifique de ces phages qui ont été peu étudiés jusqu'ici. À long terme, un tel phage pourrait trouver des applications dans les domaines de la phagothérapie ou du biocontrôle. Bien que certains « halos » troubles ont été observés sur certaines boîtes de Pétri, malheureusement aucun campylophage n'a été isolé au terme de ce mémoire. Plusieurs raisons expliquant ce résultat ont été discutées, comme le choix du matériel biologique utilisé (e.g. échantillons, souches bactériennes, contrôles) ou encore l'optimisation du protocole utilisé. Il est également possible que ces « halos » observés aient été le fruit de l'activité lytique de métabolites bactéricides produits par les bactéries présentes dans l'échantillon et non de celle de phages.

Le second objectif était l'isolement de souches de *Campylobacter* à partir de fientes de poulets dans le but d'en isoler des phages. Au vu des résultats rapportés ci-dessus, cette recherche est devenue l'objectif principal de ce travail. Dès lors, 54 échantillons ont été prélevés dans 39 élevages avicoles wallons de types différents : poulets de chair BIO et non-BIO, poules pondeuses BIO, poules d'ornement, élevages particuliers de poules et canards et exploitation produisant du foie gras de canard. L'analyse de ces échantillons a permis la mise en évidence de certaines tendances concernant la prévalence de *Campylobacter* spp. au sein de ces différents élevages. De plus, cela a permis l'isolement de 68 souches *C. jejuni* et une *C. coli*. Un séquençage MLST a été effectué pour 17 de ces souches permettant ainsi de les comparer entre elles et de détecter la présence de gènes de résistance aux antibiotiques.

Parallèlement, une évaluation de la méthode d'isolement utilisée est proposée. En effet, le dénombrement des espèces de *Campylobacter* thermotolérantes est une méthode spécifique assez peu documentée. Une comparaison entre les deux milieux spécifiques RAPID*Campylobacter* et CampyFood ainsi que la de confirmation des colonies par différents tests, dont un test d'agglutination au latex, ont été réalisées et sont discutées. Enfin, la justesse d'identification des colonies par le système API Campy est aussi rapportée.

Au terme de ce mémoire, ces trois domaines d'études mériteraient d'être approfondis afin d'appréhender au mieux les stratégies de contrôle à mettre en place contre *Campylobacter* spp. dans la chaîne de production alimentaire, de la ferme à l'assiette.

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN
Faculté des bioingénieurs

Croix du Sud, 2 bte L7.05.01, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique | www.uclouvain.be/agro