

Université de Montréal

ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION, DE LA CLONALITÉ ET CARACTÉRISATION  
DES CAMPYLOBACTERS ISOLÉS DE POULETS À GRILLER ET  
D'HUMAINS

Par

ÉRIC NADEAU

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en sciences vétérinaires  
option microbiologie

avril 2003

© Éric Nadeau, 2003



SF  
607  
U54  
2004  
v.001

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION, DE LA CLONALITÉ ET CARACTÉRISATION  
DES CAMPYLOBACTERS ISOLÉS DE POULETS À GRILLER ET  
D'HUMAINS

Présentée par

ÉRIC NADEAU

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Marcelo Gottschalk, président-rapporteur

Sylvain Quessy, directeur de recherche

Serge Messier, co-directeur de recherche

Linda Saucier, membre du jury

Burton Blais, examinateur externe

Marcelo Gottschalk, représentant du doyen de la FES

Thèse acceptée le 03 décembre 2003

## SOMMAIRE

*C. jejuni* est la première cause d'entérite bactérienne d'origine alimentaire chez l'humain. Les cas sporadiques, représentant la majorité des infections, ont été associés à une manipulation ou une cuisson inadéquate du poulet. *C. jejuni* est fréquemment isolé chez le poulet quoique le risque y étant associé varie considérablement selon la littérature. L'hypothèse de base de ce projet était qu'il existe des liens clonaux entre les isolats de *Campylobacter* provenant de cas sporadiques de diarrhée chez l'humain et des poulets à griller, et que certaines souches clonales, ou populations clonales, de *C. jejuni* possèdent des facteurs de virulence associés à une plus grande virulence.

Une collection d'isolats provenant de poulets à griller et de cas humains a été mise sur pied entre juillet 1998 et juin 1999. Au total, 2325 échantillons du contenu cecal de poulets de 93 lots d'abattage et 57 fermes ont été sélectionnés dans deux abattoirs de la région de Saint-Hyacinthe. Une caractérisation phénotypique et génotypique a été effectuée pour 20% de ces échantillons. Ces isolats ont été comparés à 24 isolats de cas humains provenant de l'analyse de tous les échantillons de diarrhée reçus pour culture bactérienne à l'unique hôpital de la région.

Près de 40% des poulets, 60% des lots et 67% des fermes étaient colonisés par *Campylobacter*, particulièrement *C. jejuni* biotypes 1 et 2. Ces analyses ont démontré une forte diversité génétique entre les lots d'abattage de poulets et une faible diversité à l'intérieur des lots. Généralement, pour une ferme donnée, les lots d'abattage issus d'une période de production étaient colonisés par la même souche clonale tandis que des souches clonales différentes ont été identifiées dans les lots de différentes périodes de production. Près de 20% des cas humains ont été associés à des souches clonales de *Campylobacter* communes aux humains et aux poulets à griller.

Les analyses sur les propriétés *in vitro* de virulence ont démontré que tous les isolats de *C. jejuni* adhéraient aux cellules INT-407 et que plus de 60% des isolats envahissaient ces cellules. La proportion des isolats fortement invasifs était significativement plus élevée pour les isolats d'origine humaine que pour les isolats d'origine aviaire. Une activité cytotoxique a été observée pour 13% des isolats. La cytotoxicité a été associée à une toxine sensible à la chaleur causant l'arrondissement, le détachement et la mort des cellules CHO et INT-407. Le pouvoir d'invasion a été associé aux isolats de *C. jejuni* biotypes 1 et 2, et la cytotoxicité aux isolats de *C. jejuni* biotypes 3 et 4, ces isolats cytotoxiques ayant de plus été regroupés génétiquement.

Le phénotype cytotoxique a été associé à une protéine immunogène de 42 kDa et à un locus de 1671 pb homologue à la gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) d'*Helicobacter pylori*. La protéine de 42 kDa pourrait être la sous-unité lourde de la GGT. Cette étude suggère l'existence d'une sous-population de *C. jejuni* constituée d'isolats cytotoxiques de *C. jejuni* biotypes 3 et 4 possédant au moins deux locus homologues à des gènes d'*H. pylori*, dont un homologue à la GGT.

Mots clés: *Campylobacter jejuni*, campylobactériose, poulet, humain, distribution, risque, virulence, gamma-glutamyl transpeptidase, GGT

## SUMMARY

*C. jejuni* is currently recognized as the most common cause of foodborne bacterial gastroenteritis in humans. Most human campylobacteriosis cases are classified as sporadic. Several epidemiological studies have incriminated consumption or handling of poultry products as major risks for sporadic *Campylobacter* infections. *Campylobacters* were isolated frequently from poultry as well as from poultry products, but the risk associated with the presence of this microorganism in poultry varied considerably in the literature. The hypothesis of this project was that clonal links between *Campylobacter* isolates from sporadic cases of human enteritis and chicken broilers exist, and that some clonal lineages of *C. jejuni* have particular virulence factors associated with more virulent strains.

A collection of isolates from chicken broilers and human cases has been created between July 1998 and June 1999. A total of 2325 samples of cecal material from 93 lots and 57 farms were sampled in two abattoirs of the Saint-Hyacinthe area. A phenotypic and genotypic characterization was done on 20% of isolates from poultry. Those isolates were compared to 24 *Campylobacter* isolates from the analysis of all samples of diarrhea received in the only hospital of the area.

Approximately 40% of the broiler chickens in 60% of lots and 67% of the farms were colonized by *C. jejuni* biotypes 1 or 2. This study revealed a high genetic diversity between poultry lots while the diversity was low inside each of these lots. Generally, for a particular farm, all positive lots raised simultaneously had common clonal lineage(s) while different clonal lineages were identified in lots from different growing period. Approximately 20% of human *Campylobacter* cases were related to clonal lineages found in humans and poultry. Analysis of *in vitro* virulence properties showed that all *Campylobacter* isolates adhered to INT-407 cells, and that nearly 60% of the

isolates demonstrated invasiveness for those cells. The proportion of isolates demonstrating a high invasiveness potential was significantly higher for human than for poultry isolates. Cytotoxic activities were observed for 13% of the isolates. Cytotoxic activities were associated with a heat labile toxin causing rounding, detachment and death of the CHO and INT-407 cells. Invasiveness was associated with isolates of biotypes 1 or 2 of *C. jejuni* whereas cytotoxicity was associated with isolates of biotypes 3 or 4 of *C. jejuni*. Cytotoxic isolates were also genetically clustered.

The cytotoxic phenotype has been associated to a 42-kDa protein and a 1671-pb locus highly homologous to the *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase (GGT). The 42-kDa protein could be the large subunit of the GGT. This study suggests the existence of a *C. jejuni* subpopulation represented by biotypes 3 and 4 *C. jejuni* isolates having at least two loci homologous to *H. pylori* genes, one being homologous to GGT

Key words: *Campylobacter jejuni*, campylobacteriosis, chicken, human, distribution, risk, virulence, gamma-glutamyl transpeptidase, GGT

## TABLE DES MATIÈRES

		Page
IDENTIFICATION DU JURY.....		ii
SOMMAIRE.....		iii
TABLE DES MATIÈRES.....		vii
LISTE DES TABLEAUX.....		x
LISTE DES FIGURES.....		xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....		xiii
DÉDICACE.....		xiv
REMERCIEMENTS.....		xv
Chapitre 1.	INTRODUCTION.....	1
Chapitre 2.	RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	6
2.1	La famille <i>Campylobacteraceae</i> .....	7
2.1.1	Taxonomie et nomenclature.....	7
2.1.2	Critères taxonomiques du genre <i>Campylobacter</i> .....	8
2.2	Isolement, culture et identification des campylobacters.....	10
2.2.1	Isolement et culture.....	10
2.2.2	Identification à l'espèce.....	13
2.3	Sous-typage des campylobacters.....	15
2.3.1	Méthodes de phénotypage.....	16
2.3.2	Méthodes de génotypage autre que le PFGE.....	18
2.3.3	Le PFGE ( <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> ).....	20
2.3.4	Principe de clonalité des isolats.....	23
2.3.5	Instabilité génétique et impact sur les profils de PFGE...	24
2.4	Infections à <i>C. jejuni/coli</i> chez l'humain.....	29
2.4.1	Aspects cliniques.....	29
2.4.2	Épidémiologie.....	31

2.5	<i>Campylobacter</i> chez le poulet à griller.....	36
2.5.1	La production de poulets à griller au Québec.....	36
2.5.2	Incidence des campylobacters en production de poulets à griller.....	37
2.5.3	Évolution de la colonisation d'un lot de production.....	40
2.5.4	Identification et distribution des campylobacters.....	41
2.5.5	Transmission et facteurs de risque.....	43
2.5.5.1	La transmission verticale.....	43
2.5.5.2	Réservoirs d'infection et transmission.....	45
2.6	Lien entre les souches d'origine humaine et animale.....	48
2.7	Pathogénèse des entérites à <i>Campylobacter</i> .....	51
2.7.1	Mécanismes et facteurs de virulence.....	51
2.7.1.1	Mobilité et chimiotaxie.....	51
2.7.1.2	Adhésion aux cellules épithéliales.....	52
2.7.1.3	Invasion des cellules épithéliales.....	54
2.7.1.4	Mécanismes d'invasion.....	57
2.7.1.5	Adhésines et/ou invasines.....	59
2.7.1.6	Production de toxines.....	62
2.7.2	Modèles de pathogénie de <i>C. jejuni</i> .....	69
Chapitre 3.	Prevalence and comparison of genetic profiles of <i>Campylobacter</i> strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans.....	73
Chapitre 4.	Comparison of <i>Campylobacter</i> isolates from poultry and humans: association between <i>in vitro</i> virulence properties, biotype and PFGE clusters.....	95
Chapitre 5.	Association of gamma-glutamyl transpeptidase with <i>in vitro</i> cytotoxic activities of <i>Campylobacter jejuni</i> isolates.....	113
Chapitre 6.	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	144
6.1	Incidence des campylobacters en production de poulets à griller.....	147

6.2	Distribution des campylobacters dans la production de poulets à griller .....	149
6.2.1	Distribution et diversité des campylobacters en production de poulets à griller .....	149
6.2.2	Nature de la source d'introduction des campylobacters dans un lot de production de poulets à griller.....	154
6.3	Étude du lien clonal entre les campylobacters d'origine aviaire et les cas sporadiques de diarrhée chez l'humain.....	157
6.4	Étude <i>in vitro</i> des propriétés de virulence des campylobacters.....	159
6.4.1	Évaluation <i>in vitro</i> des propriétés de virulence des campylobacters d'origines aviaire et humaine .....	160
6.4.2	Regroupement des campylobacters selon leurs propriétés de virulence évaluées <i>in vitro</i> .....	163
6.5	Étude du profil protéique des isolats de <i>C. jejuni</i> .....	165
6.6	Association de la cytotoxicité à la gamma-glutamyl transpeptidase.....	168
6.6.1	Fonction de la gamma-glutamyl transpeptidase.....	170
6.6.2.	Hypothèse sur la gamma-glutamyl transpeptidase bactérienne comme facteur de virulence .....	172
Chapitre 7.	CONCLUSIONS.....	178
	BIBLIOGRAPHIE.....	181
	ANNEXE I.....	224

## LISTE DES TABLEAUX

2.1 Schème de biotypage de Lior pour les campylobacters thermophiles.....	17
2.2 Diversité des souches de <i>Campylobacter</i> .....	25
2.3 Critères de Tenover pour l'interprétation des profils de PFGE.....	28
2.4 Taux d'isolement de pathogènes associés à des toxi-infections alimentaires.....	32
2.5 Cas déclarés de campylobactériose dans différents pays industrialisés.....	33
2.6 Comparaison de l'incidence de <i>Campylobacter</i> en production de poulets à griller dans divers pays.....	39
3.1 Biotyping of <i>Campylobacter</i> isolates from Québec, Canada.....	86
3.2 Distribution of <i>KpnI</i> PFGE genotypes of <i>Campylobacter</i> in slaughtered lots and farms from Québec.....	87
4.1 Distribution of invasive and cytotoxic <i>Campylobacter</i> isolates among biotypes according to invasion ability for INT-407 cells and cytotoxic activity for CHO cells .....	105
4.2 Comparison of cytotoxic activities of polymyxin B extracts of human and poultry <i>Campylobacter</i> isolates on different cell lines .....	106
5.1 Comparison of cytotoxic and noncytotoxic <i>C. jejuni</i> isolates from chicken broilers and humans: Results for the CHO-cytotoxicity assay, the presence of PCR generated products, and the presence of the 42-kDa <i>C. jejuni</i> cytotoxicity associated protein with SDS-PAGE and Western-blot .....	130

## LISTE DES FIGURES

2.1 Résumé des différentes phases de colonisation de l'intestin et des facteurs de virulence hypothétiques de <i>C. jejuni</i> .....	72
3.1 Seasonal distribution of <i>Campylobacter</i> isolation among broiler chickens.....	88
3.2 Representative portion of the dendrogram showing genetic relatedness of poultry and human <i>Campylobacter</i> isolates using <i>KpnI</i> enzyme.....	89
3.3 PFGE profiles obtained using restrictive endonucleases <i>KpnI</i> and <i>SmaI</i> of poultry isolates genetically related to isolates from sporadic cases of human campylobacteriosis.....	90
4.1 Representative portions of the PFGE <i>KpnI</i> dendrogram showing high invasive and CHO-cytotoxic <i>C. jejuni</i> isolates.....	107
5.1 Representative SDS-PAGE (A) and Western blots (B) showing the presence of a 42-kDa <i>C. jejuni</i> cytotoxicity associated protein among cytotoxic <i>C. jejuni</i> isolates from chicken broilers and sporadic cases of diarrhoea in humans.....	132
5.2 Representative agarose gels showing a 2 kb <i>C. jejuni</i> -cytotoxicity-associated PCR product generated with a degenerate PCR designed with the N-terminal and the internal peptide sequences of the 42-kDa <i>C. jejuni</i> -cytotoxicity-associated protein and a 1,1 kb <i>C. jejuni</i> -cytotoxicity-associated PCR product generated with a non degenerate PCR designed with the partial sequences of the 2-kb PCR product obtained with the degenerate PCR.....	134
5.3 Nucleotide sequence and organization of the 2431-pb locus, including the deduced amino acid sequence of the 1671-pb putative coding sequence homologous to the gamma-glutamyl transpeptidase of <i>H. pylori</i> , and associated to the cytotoxic activity of <i>C. jejuni</i> isolates .....	135

5.4 Alignment of deduced amino acid sequences of the 1671-pb <i>C. jejuni</i> cytotoxicity associated locus with deduced sequences of polypeptides encoded by the <i>ggt</i> locus of other enteropathogens.....	138
6.1 Résumé des réactions des pro-oxydants provenant du catabolisme du GSH extracellulaire par la GGT et cibles moléculaires impliquées.....	170
6.2 Catalyse du glutathion par la GGT et formation de pro-oxydants.....	173
6.3 Modèle hypothétique pour la dégradation du GSH chez <i>Treponema denticola</i> .....	175
6.4 Modèle hypothétique du rôle de la GGT bactérienne dans la cytotoxicité cellulaire.....	177

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AFLP:	Amplified fragment length polymorphism
CCDA:	Cefoperazone Deoxycholate Agar
CDT:	Cytodistending toxin
CFU :	Unité formatrice de colonies
CHO:	Chinese hamster ovary cells
CPB:	Concentrated polymyxin B extract
CSM:	Charcoal selective medium
Fla ou <i>fla</i> :	Protéine ou gène de la flagelline
GBS :	Syndrome du Guillain-Barré
GGT:	Gamma-glutamyl transpeptidase
GSH:	Glutathion
H <sub>2</sub> S:	Sulfide d'hydrogène
INT-407:	Lignée cellulaire de cellules intestinales humaines (ATCC CCL-6)
kDa:	kilo Dalton
<i>KpnI</i> :	Enzyme de restriction <i>KpnI</i>
MLEE:	Multilocus enzyme electrophoresis
MLST:	Multilocus sequence typing
OD:	Optical density (Densité optique)
pb:	Paire de base
PCR:	Polymerase chain reaction
PFGE:	Pulsed-field gel electrophoresis (Électrophorèse à champs pulsé)
RAPD:	Random amplified polymorphic DNA
RFLP:	Restriction fragment length polymorphic
<i>SmaI</i> :	Enzyme de restriction <i>SmaI</i>
Vero:	Lignée cellulaire Vero (African green monkey kidney cell)
WC:	Whole cell extract

À ma flamme Jacinthe qui, durant le cours de ce projet, a donné jour à deux chatoyantes étincelles.  
Alice et Ludovic

## REMERCIEMENTS

L'élaboration de cette thèse a nécessité l'aide, la confiance et le support de plusieurs personnes et instituts. Je souhaite exprimer mes remerciements à:

Mon directeur de recherche, le Dr Sylvain Quessy, pour son support, son appui, la confiance qu'il m'a témoignée, la latitude qu'il m'a donnée et l'unique joute de racketball qu'il m'a laissée gagner.

Mon co-directeur, le Dr Serge Messier, pour ses conseils et sa disponibilité.

L'équipe du laboratoire du Dr Sylvain Quessy, spécialement Hélène Bergeron, Julie Brassard, Èvelyne Guévremont, Louise Lessard et Ann Letellier pour leur aide immense et pour leur amitié malgré mes choix musicaux rébarbatifs.

Le laboratoire d'Hygiène Vétérinaire et Alimentaire de Saint-Hyacinthe et son équipe, dont Louise Beausoleil, Marie-Claude Bédard et Julie Légaré pour leur aide et la patience qu'elles ont montrée aux changements de protocole du lundi matin.

Les chercheurs du GREMIP et leur équipe, en particulier les Drs Daniel Dubreuil et Josée Harel pour l'aide, les suggestions et les conseils.

Le Dr John Morris Fairbrother pour l'aide, la liberté qu'il m'a accordée durant la fin de ce projet et pour l'aventure qui suivra ensuite.

Danielle Pettigrew (FPPQ), Johanne Hébert (ITA de Saint-Hyacinthe) et le Dr André Bisailon (FMV) pour la confiance qu'ils m'ont manifestée en m'octroyant des contrats et la Faculté de médecine vétérinaire pour leur appui financier.

Jacinthe ma douce flamme, pour son amour, son amitié, son support, sa compréhension, sa patience, et surtout, pour me ramener continuellement à la vraie vie.

Alice et Ludovic, mes étincelles, pour avoir changé ma vie, surtout la nuit!

Ma famille, pour la confiance et la fierté qu'ils me témoignent depuis toujours.

## **CHAPITRE 1. INTRODUCTION**

La colonisation intestinale d'un animal par *C. jejuni* est généralement asymptomatique. À l'opposé, la colonisation accidentelle chez l'humain résulte en des diarrhées. Les infections sporadiques à *C. jejuni*, qui représentent la majorité des cas humains, sont généralement associées à une manipulation ou la consommation de nourriture, spécialement les produits de volaille insuffisamment cuits (Nachamkin, 1995). La problématique associée à la présence de *C. jejuni* dans les produits de viande est d'une grande importance en santé publique puisque cette bactérie est la cause la plus fréquente d'entérites sporadiques d'origine alimentaire chez l'humain (Altekruse *et al.*, 1994; Nachamkin, 1995). Certains auteurs suggèrent d'ailleurs que près de 1% de la population serait infectée par *C. jejuni* annuellement, dépassant largement le taux associé à *Salmonella* (Tauxe, 1992; Nachamkin, 1995; Blaser, 1997).

*C. jejuni* semble être un membre normal de la flore intestinale des poulets et par conséquent, est retrouvé dans une grande proportion d'oiseaux en production aviaire (Stern, 1992). Les efforts déployés pour l'amélioration de l'hygiène dans les abattoirs dans le but de réduire la contamination des carcasses par *Campylobacter* ont des effets limités et ne semblent pas réduire le risque pour les consommateurs (Mead *et al.*, 1995). Donc, en l'absence de méthodes acceptables et rentables de décontamination des carcasses, le but ultime serait de produire des poulets exempts de la bactérie lors de l'entrée à l'abattoir et ainsi réduire le potentiel d'infection de cette source pour l'humain.

Par contre, la réduction de la contamination en production aviaire pose plusieurs défis. Beaucoup d'aspects de cette infection chez l'humain et de l'infection des lots en production aviaire demeurent méconnus à ce jour. L'élaboration de stratégies de contrôle de *Campylobacter* en production aviaire semble très complexe puisque les stratégies utilisées sur la ferme pour contrôler d'autres bactéries d'importance en santé publique semblent inefficaces (Newell et Wagenaar, 2000). Selon Newell et

Wagenaar (2000), la vaccination, jumelée à d'autres méthodes générales d'intervention, serait une stratégie de contrôle de choix. Par contre, les mécanismes et les facteurs de virulence utilisés par la bactérie pour causer une diarrhée chez l'humain sont encore mal connus. Étonnamment, il est impossible de spécifier si tous les *C. jejuni* sont pathogènes pour l'humain ou si, comme c'est le cas pour *Escherichia coli*, la population de *C. jejuni* serait composée de sous populations pathogènes utilisant différents facteurs de virulence et de sous populations non pathogènes. Cette méconnaissance serait attribuée, entre autres, au manque de connaissance existant quant à la virulence et l'absence de modèle *in vivo* mimant l'infection chez l'humain. Il est possible que plusieurs souches de *Campylobacter* capables de coloniser le poulet ne soient pas virulents pour l'humain et à l'opposé, que certaines souches d'origine humaine ne puissent coloniser le poulet (Clark et Bueschkens, 1985; Korolik *et al.*, 1995 et 1998). La discrimination entre ces souches serait un pas important dans l'accroissement des connaissances associées à la virulence et à la diversité des campylobacters. De plus, la détection de souches très virulentes ou de souches possédant des caractéristiques de virulence particulières serait importante pour l'étude de la pathogénie des campylobacters ainsi que pour l'élaboration de méthodes de contrôle adéquates de l'infection. L'amélioration des connaissances des différentes étapes de la colonisation de la bactérie ainsi que des facteurs de virulence permettrait l'identification de nouvelles protéines candidates pour l'élaboration de vaccin contre *Campylobacter*.

Un autre sujet méconnu concernant *C. jejuni* est l'identification des facteurs de risque associés aux infections sporadiques chez l'humain. Les différentes études épidémiologiques cas-témoins (rétrospectives) ont identifié une multitude de facteurs de risques associés à ces infections. La consommation et/ou la manipulation de produits de poulet insuffisamment cuits semble du moins unanimement acceptée comme facteur de risque (Newell et Wagenaar, 2000). Toutefois, le degré de risque associé au poulet est encore inconnu. Peu d'études ont démontré un lien direct entre le poulet et les cas sporadiques de campylobactériose chez l'humain. La différenciation

entre les isolats virulents et les isolats non virulents pour l'humain, dans la mesure où cela est possible, améliorerait considérablement la précision des modèles d'évaluation du risque pour l'humain et permettrait de définir davantage les facteurs de risque associés aux infections chez l'humain.

Comme c'est le cas pour les facteurs de risque associés aux cas humains, les facteurs de risque associés à l'infection des lots de production de poulets sont peu connus. Il existe une controverse en production aviaire en ce qui touche la transmission verticale des campylobacters. On s'interroge sur l'existence du transfert de la bactérie des poules reproductrices aux poussins, par l'œuf, et sur l'implication de ce phénomène dans la colonisation d'un lot de production de poulets. Afin d'apporter des données permettant une meilleure évaluation du risque associé au poulet pour les cas sporadiques d'entérite à *Campylobacter* chez l'humain, et pour l'élaboration éventuelle de stratégies de contrôle de la bactérie en production aviaire, il est primordial d'obtenir des données épidémiologiques telles la prévalence et la distribution des campylobacters en production de poulets à griller. Il existe plusieurs études européennes sur l'épidémiologie des campylobacters en production aviaire mais peu ont été faites en Amérique du Nord et aucune n'a été effectuée au Canada. Puisqu'il existe des différences dans les résultats portant sur la prévalence et la distribution des campylobacters en production de poulets à griller entre les études des différents pays européens, ainsi qu'entre les études d'un même pays, il était important dans la première partie de ce projet d'évaluer ces paramètres pour la production québécoise de poulets à griller.

L'hypothèse de ce projet était qu'il existe des liens clonaux entre les isolats de *Campylobacter* d'origines humaine et aviaire et que certaines souches clonales de *Campylobacter* possèdent des facteurs de virulence associés à une plus grande virulence. Cette étude de la clonalité des isolats de *Campylobacter* avait trois objectifs principaux: 1) de comparer les isolats d'origine aviaire entre les lots d'abattage et les

élevages de poulets à griller dans le but de fournir des données qui permettront d'évaluer la prévalence et la distribution des campylobacters en production de poulets à griller du Québec, 2) de comparer les isolats d'origine aviaire à ceux d'origine humaine dans le but de définir si ces deux hôtes possèdent des souches clonales de *Campylobacter* similaires possédant des caractéristiques phénotypiques similaires, incluant leurs propriétés *in vitro* de virulence, et 3) d'utiliser les données générées à partir des deux premiers objectifs dans le but de détecter des sous-populations de *Campylobacter* possédant des propriétés de virulence particulières et d'identifier une ou plusieurs protéines immunogènes, ayant préférentiellement un rôle potentiel dans la virulence.

## **CHAPITRE 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE**

## 2.1. La famille *Campylobacteraceae*

### 2.1.1. Taxonomie et nomenclature

La nomenclature des espèces de la famille *Campylobacteraceae* a beaucoup évoluée depuis 1913 lorsque McFadyean et Stockman (1913) observèrent pour la première fois des bactéries spiralées associées à des cas d'avortement chez la brebis et la vache. Smith et Taylor en 1919 (cité par Skerman *et al.*, 1980) constatèrent que ces bactéries avaient beaucoup de similarités avec le genre *Vibrio* et proposèrent *Vibrio fetus*. Ensuite, des bactéries similaires furent observées dans des cas de diarrhée chez les bovins (*Vibrio jejuni* proposé par Jones en 1931 [cité par Skerman *et al.*, 1980]), chez les porcs (*Vibrio coli* proposé par Doyle en 1944 [cité par Skerman *et al.*, 1980]) ainsi que dans des cas d'hépatite chez les volailles (*Vibrio hepaticus* proposé par Mathey et Rissberger en 1964, [cité par Skerman *et al.*, 1980]). Ce n'est qu'en 1973 qu'une bactérie semblable fut associée à des entérites chez l'humain (Butzler *et al.*, 1973). Sebald et Véron (1963) notèrent que *V. fetus* était différente des autres bactéries du genre; notamment par son ratio de guanine/cytosine inférieur (35% au lieu de 45%), par son incapacité à fermenter les hydrates de carbone et par sa microaérophilie. Ils proposèrent la nomenclature de *Campylobacter fetus* sous-espèces *fetus*, *veneralis*, *jejuni* et *coli*. Par la suite, plusieurs espèces et sous espèces furent proposées et plusieurs classifications furent adoptées. Le genre *Campylobacter* fut officiellement approuvé en 1980 par « The International Committee of Systematic Bacteriology » (Skerman *et al.*, 1980) et *C. fetus* subsp. *jejuni* fut officiellement nommé *C. jejuni*. *C. laridis*, aujourd'hui *C. lari*, fut d'abord proposé pour les campylobacters thermophiles isolés à partir de fèces de goéland (Benjamin *et al.*, 1983) et fut proposé pour le groupe des campylobacters thermophiles résistants à l'acide nalidixique (ou NARTC) décrit par Skirrow et Benjamin (1980). L'hydrolyse de l'hippurate et la production de sulfure d'hydrogène furent utilisées par Skirrow et Benjamin (1980) pour différencier *C. coli* de *C. jejuni*. La production de sulfure d'hydrogène a permis de distinguer deux biotypes de *C. jejuni*, plus tard nommés *C. jejuni* subsp. *doylei* (Steele et Owen, 1988) et *C. jejuni* subsp. *jejuni* (Howey *et al.*, 1990).

En 1984, le « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology » renonçait à la famille *Spirillaceae* suggérée auparavant par Smith et Muldoon (1974) qui regroupait les genres *Campylobacter* et *Spirillum*. Le genre *Campylobacter* fut placé dans la section 2 « aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibrioid Gram-negative bacteria ». Une révision complète de la taxonomie et de la nomenclature du genre *Campylobacter* et des bactéries apparentées fut proposée par Vandamme *et al.* en 1991. Le genre *Campylobacter* fut alors inclus à la superfamille VI de la classe *Proteobacteria* (sous-division epsilon) avec les genres *Helicobacter*, *Arcobacter*, les espèces *Wolinella succinogenes*, *Bacteriodes gracilis* (maintenant un *Campylobacter*), *Bacteroides ureolyticus*, « *Flexispira rappini* » ainsi qu'avec plusieurs autres bactéries apparentées. Les genres *Arcobacter* et *Campylobacter* présentaient suffisamment d'affinités phylogénétiques et phénotypiques pour justifier leur regroupement au sein d'une même famille, la famille *Campylobacteraceae*. En mars 2001, le genre *Campylobacter* regroupait 16 espèces et 6 sous-espèces (On, 2001).

### **2.1.2. Critères taxonomiques du genre *Campylobacter***

Les campylobacters sont des bacilles légèrement incurvés ou en forme de "S", négatifs à la coloration de Gram, non sporulants, mesurant de 0,2 à 0,8  $\mu\text{m}$  de large par 0,5 à 8,0  $\mu\text{m}$  de long (Smibert, 1974). Par contre, les bactéries peuvent être sphériques ou coccoïdes dans de vieilles cultures ou dans des cultures exposées à l'air ambiant. Pour certains auteurs, cette forme représenterait un mécanisme de survie pour surmonter le manque de nutriment et mènerait au stade de bactérie « viable mais non cultivable » ou VNC (Kelly, 2001). Pour d'autres, la forme coccoïde des campylobacters serait une dégénération de la bactérie par des dommages oxydatifs (Harvey et Leach, 1998). La controverse existe toujours autour du phénomène de *Campylobacter* VNC et les évidences à l'effet que les campylobacters coccoïdes puissent retourner à leur forme spiralée serait faible (Kelly, 2001). Par contre, la

ressuscitation de *C. jejuni* VNC fut possible lors d'inoculation d'œufs embryonniques de poules (Cappelier *et al.*, 1999).

Les campylobacters sont très mobiles et se déplacent avec un mouvement caractéristique en vrille; sauf *C. gracilis* qui est non mobile. Ils possèdent un flagelle non enveloppé à l'une ou à chacune des extrémités; sauf *C. showae* qui possède des flagelles multiples (Nachamkin, 1995). Ils ne peuvent fermenter les hydrates de carbone et puisent donc leur énergie de la dégradation des acides aminés (Smibert, 1974). L'absence de fermentation et d'oxydation des hydrates de carbone complique l'identification des membres du genre *Campylobacter*. Ils possèdent un métabolisme de type respiratoire et sont généralement microaérophiles, quoique quelques souches puissent croître à atmosphère aérobie ou anaérobie (Nachamkin, 1995). *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* sont considérés comme étant les campylobacters d'importance en médecine humaine (Nachamkin, 1995). Leur température de croissance optimale est de 42°C, par opposition à 37°C pour les autres campylobacters, et par conséquent sont nommés les campylobacters thermophiles (Nachamkin, 1995).

*C. jejuni* et *C. coli* ont un génome relativement petit de 1600 à 1700 kb. moins de la moitié de celui de *E. coli* avec ses 4500 kb (van Vliet et Ketley, 2001). Leur contenu en G + C varie de 30-35% (van Vliet et Ketley, 2001). Ils sont naturellement transformables (Wang et Taylor, 1990). Des plasmides ainsi que des bactériophages furent rapportés (van Vliet et Ketley, 2001). Le génome de *C. jejuni* 11168 fut totalement séquencé (Parkhill *et al.*, 2000).

Pour éviter de surcharger le texte, le terme *Campylobacter* sera utilisé dans cette thèse pour désigner *C. jejuni* et *C. coli* lorsque les points traités concernent les deux espèces.

## 2.2. Isolement, culture et identification des campylobacters

### 2.2.1. Isolement et culture

Les spécimens de fèces sont les échantillons de choix pour l'isolement des campylobacters pour les cas d'entérites chez l'humain et pour détecter les animaux porteurs de campylobacters intestinaux. Des échantillons multiples peuvent augmenter le taux d'isolement. Il est recommandé d'utiliser le milieu (ou écouvillon) Cary Blair pour le transport des échantillons, et de les entreposer à 4°C si un délai de plus de deux heures est envisagé entre la récolte et les analyses en laboratoire. Les campylobacters peuvent être détectés directement par la coloration de Gram d'un frottis fécal. Selon Park *et al.* (1983), la sensibilité du frottis direct pour des isolats de cas d'entérites aiguës chez l'humain varie de 66 à 94%, et la spécificité est élevée étant donné la morphologie particulière de la bactérie. Par contre, cette technique est peu utilisée aujourd'hui car certaines espèces bactériennes ayant une morphologie bactérienne similaire aux campylobacters à la coloration de Gram, telles *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter butzleri*, *Helicobacter pullorum*, *Helicobacter cinaedi* et *Helicobacter fennelliae*, ont aussi été associées à des cas de diarrhée chez l'humain (Engberg *et al.*, 2000). L'utilisation de la fuscine carbolique ou de la fuscine basique au lieu de la safranine améliore la coloration de Gram des campylobacters dans les frottis direct de fèces et les cultures pures (Park *et al.*, 1983).

Un grand nombre de milieux d'enrichissement a été formulé pour augmenter la détection des campylobacters dont le milieu Campy-thio (Blaser et Wang, 1979), le milieu Preston (Bolton et Robertson, 1982) et le bouillon d'enrichissement *Campylobacter* (Martin *et al.*, 1983). Plusieurs travaux ont démontré que l'utilisation de l'enrichissement n'augmenterait pas le taux d'isolement des campylobacters (Martin *et al.*, 1983; Agulla *et al.*, 1987). De plus, leur utilisation a abaissé le taux d'isolement à partir de fèces (Atabay et Corry, 1997) et de carcasses de poulets (Aquino *et al.*, 1994). L'enrichissement serait bénéfique en microbiologie alimentaire et dans les échantillons environnementaux lorsqu'une faible charge bactérienne est

soupçonnée (Martin *et al.*, 1983; Agulla *et al.*, 1987). Par contre, l'isolement et la culture des campylobacters à partir de sources alimentaires et environnementales seraient très difficiles (Studer *et al.*, 1999). Le PCR serait beaucoup plus sensible que la culture pour détecter la présence des campylobacters dans des échantillons environnementaux, quoique qu'il ne fasse pas foi de la viabilité des bactéries (Studer *et al.*, 1999).

Plusieurs milieux sélectifs sont recommandés pour l'isolement de *C. jejuni* et de *C. coli* tels le milieu-sang Skirrow (Skirrow, 1977), le *blood-free Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar* (CCDA) (Hutchinson et Bolton, 1984), le *Charcoal-base Selective Medium* (CSM; Karmali *et al.*, 1986), et un milieu semi-solide dont la sélection est basée sur la mobilité des campylobacters (Goossens *et al.*, 1989). La céphalothine, la colistine et la polymyxine B présentes dans certains milieux sélectifs peuvent inhiber la croissance de certaines souches de *C. jejuni* et de *C. coli* et sont inhibitrices pour *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. upsaliensis* et *A. butzleri* (Nachamkin *et al.*, 2000b). Pour ces raisons, il est primordial d'éviter ces préparations et d'utiliser un milieu sélectif contenant de la céfopérazone, remplaçant la céphalothine.

La majorité des laboratoires de diagnostic impliqués dans l'analyse d'isolats d'origine humaine utilise par convention une température d'incubation de 42°C puisque les campylobacters thermophiles sont la cause principale des campylobactérioses. Cette température permet la croissance de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* sur des milieux sélectifs. *C. upsaliensis* croît bien à 42°C mais n'est généralement pas isolé sur les milieux sélectifs conventionnels. *C. fetus* et les arcobacters ont une faible croissance à cette température et ne seront normalement pas isolés. À cette température, les milieux CCDA et CSM seraient plus spécifiques que le milieu Skirrow (Karmali *et al.*, 1986). Par contre, ces conditions sont inadéquates si le but est d'isoler un plus large éventail d'espèces de *Campylobacter*. Tous les campylobacters ont une bonne croissance à 37°C. Certains milieux tels le milieu

Skirrow et le milieu semi-solide seraient peu sélectifs à cette température tandis que le CCDA et le CSM y conserveraient leur caractère sélectif (Endtz *et al.*, 1991).

Idéalement, les géloses ensemencées devraient être incubées à 37°C et à 42°C pour une durée de 72 heures avant d'être rapportées négatives. Endtz *et al.* (1991) ont démontré que l'extension de la période d'incubation de 48 heures à 72 heures augmentait le taux d'isolement des campylobacters. De plus, une combinaison de deux milieux sélectifs incluant le CCDA ou le CSM semble être la méthode d'isolement optimale pour *Campylobacter* (Endtz *et al.*, 1991). Par contre, selon Nachamkin (1995), la méthode optimale pour la détection des espèces de *Campylobacter* lors d'échantillons cliniques est une combinaison de l'ensemencement sur un milieu sélectif et de la technique de filtration. La technique par filtration est recommandée lorsqu'on veut éviter l'utilisation d'agents antimicrobiens pouvant inhiber la croissance de certaines souches de *Campylobacter* ou de d'autres bactéries de genres apparentés tels *Arcobacter* et *Helicobacter* (Goossens et Butzler, 1992). Cette technique étant par contre moins sensible que la culture primaire sur milieux sélectifs conventionnels pour *C. jejuni* et *C. coli*, elle devrait y être utilisée en complément. Le caractère sélectif de cette technique est basé sur le fait que les campylobacters sont capables de traverser avec facilité une membrane filtrante de 0,65 µm comparativement aux autres bactéries des échantillons de fèces (Goossens *et al.*, 1986). L'incubation à 37°C des géloses non sélectives permettra ensuite la croissance de la majorité des espèces de *Campylobacter* et d'*Arcobacter* ainsi que certaines espèces d'*Helicobacter*. Par contre, étant donné les coûts importants engendrés par l'utilisation de plusieurs milieux sélectifs combinés ou non à la méthode de filtration et avec plusieurs températures d'incubation, une approche initiale raisonnable en clinique serait d'utiliser une ou deux géloses sélectives (formulations avec et sans sang) incubées à 42°C (Nachamkin *et al.*, 2000b).

La plupart des espèces de *Campylobacter* nécessitent pour leur croissance une atmosphère microaérobie contenant approximativement 5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, et 85% N<sub>2</sub>. Certaines espèces, telles *C. rectus*, *C. sputorum*, *C. concisus*, *C. mucosalis*, *C. curvus* et *C. hyointestinalis*, nécessitent un apport en hydrogène pour l'isolement primaire et pour la croissance. Un mélange gazeux de 10% CO<sub>2</sub>, 6% H<sub>2</sub> et 84% N<sub>2</sub> est requis pour l'isolement de ces espèces (Nachamkin, 1995).

### 2.2.2 Identification à l'espèce

En général, *Campylobacter* produit des colonies grises, plates, et irrégulières sur des milieux fraîchement préparés. Ces colonies peuvent devenir rondes, convexes et luisantes lorsque l'humidité des milieux diminue (Buck et Kelly, 1981). La morphologie des colonies des arcobacters est similaire à celles des campylobacters. Il n'a pas d'hémolyse sur gélose sang dans les conditions conventionnelles de culture. Pour des analyses initiales, une coloration de Gram et un test d'oxydase doivent être faits sur les colonies suspectes. Des colonies oxydase-positif démontrant une apparence caractéristique à la coloration de Gram et ayant été isolées sur des milieux sélectifs à 42°C sous des conditions microaérobiques peuvent être identifiées *Campylobacter* spp. jusqu'à ce que d'autres tests biochimiques soient effectués (Nachamkin, 1995). Les tests de routine utilisés pour identifier *Campylobacter* incluent la température de croissance (25, 37 et 42°C), la présence de catalase, l'hydrolyse de l'hippurate, l'hydrolyse de l'acétate d'indoxyl et la sensibilité à la céphalothine et à l'acide nalidixique. Nachamkin (1995) a résumé les résultats à ces tests pour identifier les différentes espèces de *Campylobacter* et d'*Arcobacter*.

*C. jejuni* est généralement facile à identifier puisqu'il est le seul *Campylobacter* capable d'hydrolyser l'hippurate. Par contre, certains *C. jejuni* sont hippurate-négatif et ne peuvent être différenciés phénotypiquement de *C. coli*. Des méthodes moléculaires doivent donc être utilisées (Nachamkin *et al.*, 2000b). Plusieurs méthodes existent pour tester l'hydrolyse de l'hippurate (Nicholson et Patton, 1995).

L'hippuricase permet l'hydrolyse de l'acide hippurique et la libération d'acide benzoïque et de glycine (Chan *et al.*, 2000). Les méthodes de détection dépendent de la réaction de la ninhydrine avec la glycine produisant un composé mauve-violet pouvant varier en opacité et en intensité. Le test par disque de Remel serait comparable à la méthode en tube du CDC (Center of Disease Control) lorsqu'un inoculum standardisé est utilisé (Nicholson et Patton, 1995). Selon le fabricant de la méthode de Remel par disque, l'absence de coloration ou une coloration gris pâle représente un résultat négatif. Par contre, l'évaluation de cette méthode par Nicholson et Patton (1995) a démontré que certaines souches caractérisées génétiquement hippurate-négatif développent une coloration mauve pâle, considérées positives selon les recommandations du fabricant. En utilisant le protocole adapté par Nicholson et Patton (1995), un test positif démontre une coloration violet à bleu-noir (comme le mentionne le fabricant) mais les isolats négatifs à l'hydrolyse de l'hippurate vont démontrer une coloration claire, gris pâle à mauve modéré. L'interprétation des résultats peut donc s'avérer difficile pour certains isolats générant une coloration mauve modéré, pouvant être considérés positifs par certains et négatifs par d'autres. La standardisation de la technique avec un inoculum précis et l'utilisation de contrôles est donc primordiale.

L'utilisation de la technique de diffusion sur disque pour la sensibilité à la céphalothine et à l'acide nalidixique est de plus en plus problématique étant donné l'augmentation de la fréquence de résistance aux fluoroquinolones chez les campylobacters (Nachamkim *et al.*, 2000b). Des isolats de *C. jejuni* et *C. coli* résistants à l'acide nalidixique ont été rapportés par plusieurs chercheurs, ainsi que l'augmentation de résistance aux fluoroquinolones (Nachamkim *et al.*, 2000b). Un isolat positif au test d'hydrolyse de l'hippurate correspond donc toujours à un *C. jejuni*, peu importe les résultats de la sensibilité à l'acide nalidixique. Par contre, la résistance à l'acide nalidixique d'un isolat de *C. jejuni* provenant d'un cas infectieux chez l'humain doit être considéré en clinique car l'isolat peut être résistant aux fluoroquinolones.

Il existe plusieurs tests diagnostic commerciaux pouvant aider à identifier les campylobacters au niveau du genre (Nachamkin *et al.*, 2000b). Il existe deux tests immunologiques pouvant détecter *C. jejuni* et *C. coli* mais ne pouvant pas les différencier. Nachamkin et Barbagallo (1990) ont démontré que le test au latex de Meritec-Campy (jcl) a une sensibilité et une spécificité de 100% pour la détection de *C. jejuni* et de *C. coli*, mais semble très peu sensible pour détecter *C. lari*, malgré les spécifications du commerçant. De plus, le test au latex de Meritec-Campy (jcl) semble être plus spécifique et plus facile à utiliser que le test au latex Campyslide (BBL Microbiology Systems; Hodinka et Gilligan, 1988; Nachamkin et Barbagallo, 1990). L'accuprobe (Gen-Pro Inc, San Diego, Californie), un test utilisant des sondes ciblant l'ARN des campylobacters, peut détecter avec une forte sensibilité *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. coli*, et *C. lari*. Par contre, des hybridations croisées avec *C. hyointestinalis* ont été rapportées (Nachamkin *et al.*, 2000b). Pour finir, un système API campy a été développé. Huysmans *et al.* (1995) ont observé une concordance de 100% entre le système API et les méthodes conventionnelles pour l'identification de *C. jejuni* mais de seulement 74% pour *C. coli* et de 2 isolats sur 3 pour *C. lari*.

### 2.3. Sous-typage des campylobacters

Il existe plusieurs méthodes permettant la caractérisation des souches de *Campylobacter* dans un but épidémiologique (Nachamkin, 1995). Ces méthodes incluent : 1) des approches phénotypiques telles le sérotypage, le biotypage, la détection d'enzymes (*Multilocus enzyme electrophoresis* ou MLEE), le typage des acides gras, et le typage à l'aide de phages, et 2) des approches génétiques telles l'électrophorèse à champs pulsés (PFGE), l'analyse des endonucléases de restriction, le ribotypage, le typage des gènes *fla*, le RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), le RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphic*) et le profil des plasmides (Nielsen *et al.* 2000). Les méthodes phénotypiques traditionnelles (biotypage,

sérotypage, et typage par phages) ne seraient pas assez sensibles pour différencier les différentes souches de *Campylobacter* et devraient être combinées à des méthodes génétiques (Khakhria et Lior, 1992). Chacune de ces techniques varie dans leur complexité et leur pouvoir de discrimination. Des méthodes avec un haut niveau de discrimination sont généralement nécessaires pour le typage d'une population clonale tandis que des méthodes stables, mais avec un pouvoir de discrimination moindre, peuvent être bénéfiques pour déterminer les relations entre les isolats de populations panmictiques (Nielsen *et al.*, 2000). Le sous-typage des isolats de *Campylobacter* est important pour les études épidémiologiques et spécialement pour identifier la source et les voies de transmission, identifier et surveiller temporellement et géographiquement des souches spécifiques arborant des caractéristiques phénotypiques importantes, et développer des stratégies pour contrôler l'organisme.

### **2.3.1. Méthodes de phénotypage**

Il existe deux méthodes de sérotypage pour *Campylobacter*, tous deux développés au Canada dans les années 80. Le schème de Lior (Lior *et al.*, 1982) détecte des antigènes sensibles à la chaleur tandis que le schème de Penner (Penner *et al.*, 1983) est basé sur des antigènes stables à la chaleur. Le schème de Lior peut détecter 108 sérotypes de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* (Scott, 1997). Les antigènes du flagelle, et pour certains sérotypes des antigènes non caractérisés de surface, sont les antigènes sérodéterminants (Nachamkin, 1995). Le schème de Penner, plus utilisé que celui de Lior, détecte l'antigène « O ». Ce schème peut détecter plus de 66 sérotypes de *C. jejuni* et de *C. coli* basés sur les lipopolysaccharides (LPS) ou les lipopoligosaccharides (Scott, 1997). Le sérotypage devrait être utilisé seulement dans des laboratoires spécialisés capables de maintenir une banque d'antisérum de qualité (Nachamkin, 1995). De plus, les réactifs commerciaux disponibles pour le sérotypage de Lior seraient de très mauvaise qualité (Nicholson et Patton, 1993). Les principaux désavantages du sérotypage sont le nombre élevé d'isolats de *Campylobacter* dont le typage est impossible (niveau de non typabilité) et le coût élevé pour le maintien des antisérums (Wassenaar et Newell, 2000).

Le typage à l'aide de phages a surtout été utilisé en complément au sérotypage (Newell *et al.*, 2000). Il existe plusieurs schèmes de typage utilisant les phages (Newell *et al.*, 2000). Le schème canadien est une adaptation du schème américain, dont 5 phages isolés de la litière de poulets au Canada ont été ajoutés aux 14 bactériophages virulents isolés de fèces de poulets aux États-Unis (Newell *et al.*, 2000). Le taux de non typabilité peut être élevé, ayant été de 15% dans une étude effectuée sur 2407 isolats de *C. jejuni* (Frost *et al.*, 1999). De plus, l'accessibilité aux phages peut être limitée.

Il existe au moins 6 différents schèmes de biotypage. Les plus utilisés sont ceux développés par Skirrow et Benjamin (1980), Lior et Pattel (Lior, 1984; Lior et Pattel, 1987) et Bolton *et al.* (Bolton *et al.*, 1984). Ce dernier est aussi appelé le biotypage de Preston. Parmi eux, le schème de Lior est le plus utilisé en épidémiologie pour distinguer les campylobacters (Goossens et Butzler, 1992). Il a d'abord été utilisé pour discriminer les souches regroupées dans un même sérotype de Lior. Il utilise l'hydrolyse de l'hippurate, la production de H<sub>2</sub>S et l'activité de l'ADNase (tableau 2.1). Jones *et al.* (1984) rapportaient une association possible entre le type d'hôte et la production de sulfide d'hydrogène. Le pouvoir de discrimination du biotypage est par contre faible et doit obligatoirement être utilisé conjointement avec d'autres techniques de sous-typage.

TABLEAU 2.1: Schème de biotypage de Lior pour les campylobacters thermophiles

	Biotype							
	<i>C. jejuni</i>				<i>C. coli</i>		<i>C. lari</i>	
	1	2	3	4	1	2	1	2
Hydrolyse de l'hippurate	+	+	+	+	-	-	-	-
Production d' H <sub>2</sub> S	-	-	+	+	-	-	+	+
Hydrolyse de l'ADN	-	+	-	+	-	+	-	+

### 2.3.2. Méthodes de génotypage autre que le PFGE

Le typage du ou des gènes de la flagelline (*fla*) est grandement utilisé pour *Campylobacter* car l'application est relativement simple et rapide (Newell *et al.*, 2000). Les campylobacters possèdent deux gènes flagellines, *flaA* et *flaB*, permettant la formation du ou des flagelles (Guerry *et al.*, 1991). Pour le typage de *fla*, un fragment du gène *flaA* et/ou *flaB* est d'abord amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques aux régions conservées amino- et carboxy-terminales. Les variations dans les sites de reconnaissance à un enzyme de restriction dans la partie variable interne de l'amplicon permettent la différenciation entre les souches (Wassenaar *et al.*, 2000). Le niveau de discrimination de cette technique est supérieur au sérotypage mais inférieur au PFGE (Newell *et al.*, 2000). La typabilité est généralement élevée (Newell *et al.*, 2000). Par contre, tout comme pour le PFGE, la comparaison des profils entre les laboratoires est difficile. De plus, le typage de *fla* ne peut être considéré comme étant une méthode de typage stable à long terme car des recombinaisons entre les gènes *flaA* et *flaB* d'une même bactérie, ainsi qu'entre différentes souches, ont été rapportées (Newell *et al.*, 2000).

Le RAPD utilise aussi le PCR. Des amorces créées arbitrairement sont utilisées pour amplifier des fragments provenant de locus sur le génome entier. La présence, le nombre, la distance et la fidélité des mésappariements (*mismatch*) des sites à lesquels les amorces vont se lier sont responsables de la discrimination des souches. Cette technique ne demande donc aucune connaissance de la séquence ciblée. Le RAPD a un pouvoir de discrimination égal ou supérieur au PFGE, est plus rapide et plus économique (Newell *et al.*, 2000). Malgré tout, l'utilisation du RAPD pour le sous-typage des campylobacters est fortement limitée par le manque de reproductibilité de la technique (Newell *et al.*, 2000). De plus, les profils sont complexes et l'interprétation de certaines bandes faibles peut être difficile.

L'AFLP (*Amplified Fragment-Lenght Polymorphism*) implique la digestion de l'ADN avec deux enzymes de restriction (Newell *et al.*, 2000). Des adaptateurs spécifiques sont liés aux fragments générés et seront utilisés comme séquence cible pour l'amplification par PCR. Pour le sous-typage des campylobacters, au moins deux méthodes ont été décrites (Kokotovic et On, 1999; Duim *et al.*, 2001). Toutes deux génèrent entre 50 et 60 fragments détectés par un séquenceur d'ADN automatisé grâce à l'utilisation d'amorces fluorescentes. Le niveau de discrimination semble équivalent à celui du PFGE (Kokotovic et On, 1999). La technique est rapide et facile à standardisée. Par contre, l'équipement est dispendieux et contrairement au PFGE, l'interprétation des profils peut être difficile étant donné leur complexité (Newell *et al.*, 2000).

Le ribotypage dépend des sites de reconnaissance d'enzyme de restriction entre les gènes codant pour l'ARN ribosomal (Wassenaar *et al.*, 2000). Pour *Campylobacter*, les trois locus des gènes ribosomaux sont analysés simultanément par Southern blot en utilisant des sondes spécifiques. La variation entre les souches dépend de la distribution des sites spécifiques aux enzymes de restriction entre les trois gènes ARNr. Pour *Campylobacter*, le pouvoir de discrimination est affaibli étant donné le nombre restreint de gènes ribosomaux (Newell *et al.*, 2000). De plus la technique est fastidieuse. La technique a été complètement automatisée (*Riboprinter system*) la rendant très reproductible et permettant l'échange de résultats entre différents laboratoires. Par contre, le coût en équipement et en temps demandé pour le roulement de cette technique est élevé.

Le typage génomique multilocus (*MultiLocus Sequence Typing* ou MLST) est une adaptation génétique du MLEE (*MultiLocus Enzyme Electrophoresis*), une méthode de caractérisation phénotypique. Le MLEE permet de discriminer les bactéries en fonction de la migration électrophorétique de 15 à 20 isoenzymes cytoplasmiques très conservées (Spratt, 1999) tandis que le MLST permet de détecter

les clones à partir des différences dans la séquence d'ADN des gènes codant pour 6 à 7 isoenzymes (Dingle, *et al.*, 2001). Puisque les variations de ces gènes (ou enzymes) s'accumulent lentement, ces techniques sont utilisées pour déterminer les liens entre des isolats largement distribués temporellement et/ou géographiquement (Spratt, 1999). La technique de MLST a été utilisée pour l'étude de *C. jejuni* (Dingle *et al.*, 2001). Selon les auteurs, leur schéma de MLST, utilisant 7 locus d'isoenzymes, serait un outil intéressant pour l'investigation des campylobacters dans un contexte planétaire et local. Ainsi, il pourrait être utilisé pour confirmer des routes de transmission environnementales et d'animaux de consommation vers les humains.

### **2.3.3. Le PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)**

Le PFGE utilise le polymorphisme des sites de restriction dans l'ADN de la bactérie. Les bactéries sont directement enrobées dans de l'agarose pour ensuite être lysées *in situ*. Cette étape empêche le déchirement de l'ADN lors de la lyse bactérienne (Newell *et al.*, 2000). Le but est d'utiliser un endonucléase de restriction permettant de couper l'ADN ciblé en un nombre restreint de larges fragments d'ADN. Plusieurs enzymes de restriction à clivages peu fréquents (*rare-cutting*), tels *SmaI*, *SalI*, *KpnI*, *ApaI* et *BssHII*, ont donné des résultats satisfaisants pour le génotypage des campylobacters (Wassenaar et Newell, 2000). Les fragments d'ADN sont ensuite soumis à des champs pulsés d'orientations différentes et alternatifs. À chaque changement de direction du champ électrique, les molécules subissent une réorientation. L'écart dans les durées de réorientation permet la séparation de molécules de différentes tailles dans un gel d'agarose. Le PFGE est considéré comme étant l'un des plus puissants et plus reproductibles outils moléculaires pour l'épidémiologie des microorganismes (Shi *et al.*, 1996; Newell *et al.*, 2000). Seul l'AFLP semble avoir un pouvoir de discrimination similaire pour *Campylobacter* (Kokotovic et On, 1999). Le PFGE serait au moins deux fois plus discriminant que le ribotypage et deux à trois fois plus sensible que le typage de *fla* (Newell *et al.*, 2000). Le potentiel élevé de discrimination du PFGE peut être attribué à son habilité à

déterminer le polymorphisme au niveau du génome entier de la bactérie (Nielsen *et al.*, 2000).

Le PFGE a d'abord été utilisé pour déterminer le poids moléculaire du génome de *C. jejuni* (Chang et Taylor, 1990). À cette fin, l'enzyme de restriction devait produire un nombre restreint de fragments bien délimités et de haut poids moléculaire. L'enzyme d'abord utilisé fut le *SmaI*, générant de 7 à 9 bandes. Le PFGE a ensuite été utilisé avec succès dans des études épidémiologiques et plus spécifiquement, pour des campylobacters d'origine vétérinaire (Newell *et al.*, 2000). Selon Tenover *et al.* (1995), le PFGE serait assez sensible pour différencier deux souches s'il y a au moins dix fragments formés. Lorsqu'il y a moins de bandes, la capacité discriminatoire du PFGE demeure inconnue. Par contre, plusieurs auteurs ont utilisé, et utilisent toujours, le *SmaI* pour l'étude épidémiologique de *Campylobacter*. Selon Shi *et al.* (1996), malgré le fait que *SmaI* produit seulement sept bandes, les dendrogrammes générés peuvent quand même donner un aperçu rapide des similarités génétiques entre des souches caractérisées. Par contre, le nombre restreint de bandes lors de l'utilisation d'un seul enzyme, surtout ceux générant moins de 10 fragments, peut réduire le pouvoir discriminatoire du PFGE (Shi *et al.*, 1996; Steele *et al.*, 1998). L'utilisation de plusieurs enzymes de restrictions augmente le pouvoir discriminant de la technique (Wassenaar et Newell, 2000). Suzuki *et al.* (1994) a utilisé deux enzymes de restriction pour caractériser des souches de *C. jejuni*. Le *SmaI* a donné 14 profils génétiques et le *SalI* a permis de discriminer deux profils de *SmaI* en deux sous types distincts. Steele *et al.* (1998) ont aussi utilisé deux enzymes pour augmenter le pouvoir discriminatoire du PFGE lors de la caractérisation de 141 isolats provenant de diverses espèces animales. L'enzyme *SalI* a permis d'identifier 78 profils génétiques, l'enzyme *SmaI* 86 profils, et la combinaison des deux enzymes, 98 profils génétiques. Par contre, ces deux enzymes génèrent chacun moins de 10 fragments. L'utilisation d'un enzyme générant plus de 10 fragments, tel *KpnI*, a permis de discriminer davantage les isolats ayant un même profil *SmaI* (Gibson *et al.*, 1995; On *et al.*, 1998; Kokotovic et On, 1999). Lorsque comparé à *SmaI*, *KpnI* s'est avéré l'enzyme de

choix pour les études épidémiologiques de *Campylobacter* (Michaud *et al.*, 2001). Ces derniers ont démontré que des isolats non reliés de façon épidémiologique avaient des profils identiques avec *Sma*I, mais différents avec *Kpn*I. À l'opposé, les groupements formés par *Kpn*I étaient rarement subdivisés par *Sma*I.

Le PFGE a été utilisé avec succès pour regrouper des isolats de *C. jejuni* provenant de cas d'épidémie chez l'humain, d'un même lot de production de poulets ainsi que d'isolats de vaches contaminées par leur système d'approvisionnement en eau (Newell *et al.*, 2000). De plus, la technique a permis d'associer des isolats de cas sporadiques de diarrhée à *C. jejuni* chez l'humain à des campylobacters isolés chez des animaux de consommation, suggérant différentes sources d'infection (Newell *et al.*, 2000).

Malgré son pouvoir de discrimination élevé, il existe certains désavantages au PFGE. La comparaison des profils entre différents laboratoires est difficile (Wassenaar et Newell, 2000). De plus, certains auteurs rapportent un faible taux de non typabilité pour *Campylobacter* (Wassenaar et Newell, 2000). Dans certains cas, cette non typabilité serait due à la production d'ADNase et peut être surmontée avec un traitement au formaldéhyde (Gibson *et al.*, 1994). Pour finir, la préparation des blocs d'agarose demande beaucoup de temps, et l'appareillage est dispendieux. Par contre, des protocoles rapides (24 à 30 heures) ont dernièrement été rapportés pour *Campylobacter* (Michaud *et al.*, 2001; Ribot *et al.*, 2001).

#### 2.3.4. Principe de clonalité des isolats

Pour être considéré comme un clone de son ancêtre, une bactérie ne doit se différencier que par l'accumulation de mutations ponctuelles, sans événement de recombinaison (Meinersmann, 2000). En excluant la reproduction sexuée, une bactérie se reproduira par fission binaire et la population qui en résultera ne sera génétiquement diverse que par l'accumulation de mutations (Meinersmann, 2000). Certaines barrières, telles que la présence d'antimicrobiens, empêcheront certains individus de se multiplier et sélectionneront les bactéries ayant acquises les caractéristiques leur permettant de surmonter ce stress. Ces sous-populations, ou clones, reflèteront la diversité des individus ayant survécus. Par contre, ce modèle ne considère pas la reproduction sexuée, ou la recombinaison. Ces recombinaisons, ou échanges d'ADN entre les clones, peuvent mener à l'homogénéisation des génomes et le retour à l'absence de distinction entre les clones. Le taux d'homogénéisation dépend du taux de recombinaison par site du génome par génération et du nombre d'individus de la population qui participera aux échanges. Ces modèles mathématiques démontrent par exemple que *E. coli* possède des associations clonales évidentes avec leurs niches écologiques. Par contre, la clonalité est moins évidente, du moins mathématiquement, pour *C. jejuni*, suggérant qu'il existe beaucoup plus de souches de *Campylobacter* dans le monde que d'*E. coli*, ou encore, que les campylobacters ont subi plus de recombinaisons. Par contre, dans la structure méroclone de Milkman et Bridges (1990), la majeure partie du génome serait héritée par la lignée bactérienne directe tandis qu'une portion serait héritée par des mélanges d'ADN entre les clones. Pour *Campylobacter*, la proportion du génome hérité de la lignée directe serait probablement moins importante que pour *E. coli* ou que certains sérovars de *Salmonella enterica* (Meinersmann, 2000). Selon des études par MLEE, *Campylobacter* semble posséder un cadre clonal, mais ce dernier touche une portion plus petite du génome lorsque comparé à *E. coli* (Meinersmann, 2000).

Le seuil pour classifier un organisme clonal dépendra du test génotypique utilisé et des postulats utilisés pour ce test. Par exemple, selon les recommandations de On (1998) et Struelens (1996), on peut assumer que des isolats de *Campylobacter* ayant des profils de PFGE identiques ou similaires appartiennent à une même souche clonale s'ils ont un lien épidémiologique évident (ex.: provenant d'un même lot de production de poulets à griller) et s'ils sont regroupés par d'autres méthodes de caractérisation telles que le sérotypage et le typage du gène *fla*. Les termes « population clonale » et « lignée clonale » ont aussi été utilisés au lieu de « souche clonale ».

### 2.3.5. Instabilité génétique et impact sur les profils de PFGE

L'utilisation de méthodes moléculaires pour l'identification des sources et des routes d'une infection dépend de deux conditions: 1) la présence du clone exclusif dans la source suspectée ainsi que dans le cas infectieux et 2) la stabilité du ou des marqueurs épidémiologiques chez le clone bactérien en question (Steinbrueckner *et al.*, 2001). Pour l'investigation des cas à *Campylobacter* chez l'humain, les travaux ne peuvent démontrer le respect de ces deux conditions. L'isolement de souches multiples de *Campylobacter* pour une unique source possible d'infection a été rapporté (Aarts *et al.*, 1995; Geilhausen *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 2000; Guévremont *et al.* 2004). De plus, la présence de variations génétiques chez un unique clone de *Campylobacter* est de plus en plus acceptée (Wassenaar *et al.*, 2000). L'instabilité génétique est définie comme un événement unique, ou une série d'évènements, générant un changement dans l'organisation génétique d'une souche bactérienne donnée (Wassenaar *et al.*, 2000). Les conséquences hypothétiques et pratiques de cette instabilité génétique sur les méthodes de typages génétiques des campylobacters ont été discutées par Wassenaar *et al.* (2000). La variation génétique utilisée par des bactéries possédant un petit génome, tel que pour *Campylobacter*, augmenterait leur pouvoir d'adaptation à de nouveaux stress environnementaux (Wassenaar, 1998). Ces variations génétiques peuvent d'ailleurs mener à des variations phénotypiques. De fortes diversités génétiques et phénotypiques ont été observées pour *Campylobacter* (tableau 2.2)

TABLEAU 2.2: Diversité des souches de *Campylobacter* (Wassenaar et Blaser, 1999)

Caractéristique	Diversité décrite
Sérotypes de Lior	> 100 différents sérotypes
Sérotypes de Penner	> 60 différents sérotypes
Autres caractéristiques phénotypiques	Diversité observée dans les propriétés d'adhérence et d'invasion, la production de toxines, la résistance au sérum, le potentiel de colonisation du poulet, l'aérotolérance et la tolérance à la température
Génotypes	Diversité génotypique observée par PFGE, RAPD, ribotypage, PCR-RFLP et AFLP

Plusieurs mécanismes sont responsables de l'instabilité génétique pouvant affecter les méthodes de typage génétique tels : 1) les mutations ponctuelles aux sites de restriction, 2) l'insertion ou le retrait de fragments d'ADN par des bactériophages, des transposons ou des séquences d'insertion, 3) les recombinaisons programmées ou aléatoires de segments d'ADN, 4) les mutations à haute fréquence ou hot spots, et 5) l'incorporation d'ADN étranger par transformation naturelle.

La substitution d'une base lors de mutations ponctuelles est généralement sans effet. Par contre, si elle survient dans un site de restriction, il pourra y avoir perte de ce site et ainsi, la perte d'un fragment au PFGE et l'augmentation de la taille d'un autre fragment. De plus, une mutation ponctuelle pourrait créer un site de restriction et ainsi occasionner la perte d'un fragment et l'apparition de deux fragments plus petits dont la somme des tailles correspondrait à la taille du fragment perdu. L'utilisation d'une deuxième enzyme de restriction utilisant d'autres sites de reconnaissance devrait permettre de confirmer cette mutation en créant des profils identiques. À l'opposé, lors de recombinaison de large fragment d'ADN, le deuxième enzyme sera aussi affecté par cette instabilité génétique. Plusieurs éléments mobiles

ont été rapportés pour *Campylobacter* (Wassenaar *et al.*, 2000). La fréquence de transposition semble par contre trop faible pour prendre une place importante dans le phénomène d'instabilité génétique chez *Campylobacter*. Malgré l'existence de plus de 170 bactériophages infectieux pour *Campylobacter*, il n'y a encore aucune évidence de l'effet de l'activité de ces phages sur l'ADN chromosomique de la bactérie. La recombinaison programmée est la base même de la variation antigénique des flagellines de *C. jejuni* (Harrington *et al.*, 1997) et de la couche S de *C. fetus* (Dworkin et Blaser, 1997). Ces recombinaisons résulteraient à l'inversion de gènes ou de promoteurs causant des permutations de l'expression entre les gènes homologues. Les recombinaisons entre les gènes *flaA* et *flaB* chez *Campylobacter* réduiraient la valeur de la technique du génotypage du gène *fla* mais n'affecterait pas les profils de PFGE puisque les segments d'ADN impliqués sont trop petits. De plus, des régions hypervariables près des gènes *fla* ont été identifiées à la suite du séquençage du génome de *C. jejuni* (Parkhill *et al.*, 2000). Par contre, il a été démontré que la position de certains gènes diffère dans les quelques cartes chromosomiques disponibles pour *C. jejuni* (Wassenaar *et al.*, 2000). Contrairement à la recombinaison programmée, cette recombinaison aléatoire de larges fragments d'ADN, ou plasticité de l'ordre des gènes, devrait être détectée par le PFGE. Ce phénomène a été observé également chez *S. typhi* et *H. pylori* (Liu et Sanderson, 1995; Jiang *et al.*, 1996).

La transformation naturelle d'ADN chromosomique ou de plasmides est connue pour les campylobacters (Wassenaar *et al.*, 2000). L'acquisition d'ADN exogène peut affecter les profils de PFGE. Par exemple, un plasmide ne s'intégrant pas dans le chromosome pourra donner une bande supplémentaire au PFGE. Si ce plasmide contient plusieurs sites de reconnaissance pour l'enzyme de restriction utilisé, plusieurs bandes supplémentaires pourront être visibles. La présence d'une ou de quelques bandes ayant une plus faible ou plus forte coloration au bromure d'éthidium que le reste des bandes peut indiquer la présence de plasmides. L'intégration d'ADN exogène dans le chromosome devrait par contre être accompagnée d'une augmentation de la taille du génome tout en observant des bandes de coloration similaire. Cette

intégration d'ADN pourra occasionner un changement de poids moléculaire d'une seule bande, à condition que l'ADN exogène ne contienne pas de site de restriction. Par contre, l'intégration d'ADN exogène occasionnant la perte ou le gain de sites de restriction va causer des changements plus importants dans le profil de PFGE. Créer des liens génétiques entre ces isolats peut donc s'avérer très complexe et difficile.

Pour *Campylobacter*, il a été rapporté que le profil de PFGE de certains *C. coli* peut varier après 20 à 40 passages *in vitro* (On, 1998). Selon l'auteur, le réarrangement de gros fragments d'ADN serait l'explication la plus plausible dans les conditions utilisées. Steinbrueckner *et al.* (2001) ont observé des variations génétiques de *Campylobacter* durant la période d'infection de 10% des cas humains. Des réarrangements affectant les profils de PFGE ont aussi été rapportés dans des lots de poulets (Wassenaar *et al.*, 1998) et durant la colonisation de l'intestin de poussins (Hanninen *et al.* 1999). Des échanges bidirectionnels d'ADN (marqueurs de résistance à des antimicrobiens) entre souches homologues et hétérologues de *C. jejuni* lors d'infection expérimentale chez le poulet ont aussi été rapportés (Boer *et al.*, 2002). Par contre, d'autres auteurs ont démontré la stabilité de certaines souches après 50 passages et après la colonisation de souris (Nielsen *et al.*, 2001). Lors de cette étude, 3 des 4 souches, auparavant identifiées comme étant instables génétiquement, se sont avérées être des cultures mixtes. Petersen *et al.* (2001) rapportaient que certaines souches clonales étaient très répandues géographiquement et temporellement, suggérant que certains clones soient génétiquement stables. De plus, des clones stables ont été identifiés en production de poulets à griller (Petersen et Wedderkopp, 2001). Certains auteurs rapportent des variations de profils de PFGE accompagnées d'une augmentation de la taille du génome de *Campylobacter*, suggérant l'acquisition d'ADN par transformation naturelle (Stephens *et al.*, 1998; On, 1998).

Tenover *et al.* (1995) ont élaboré des critères pour l'interprétation de l'effet de ces phénomènes sur les profils de PFGE. Les critères ont été élaborés pour l'investigation d'épisodes épidémiques causés par des bactéries dont les profils de PFGE ont 10 fragments et plus. Pour certains, les critères de Tenover ne peuvent être appliqués aux études épidémiologiques portant sur *Campylobacter* étant donné que l'enzyme de restriction le plus utilisé, le *Sma*I, génère seulement de 7-10 fragments (Wassenaar *et al.*, 2000). Par contre, ces critères devraient pouvoir être utilisés lorsque des enzymes de restriction générant plus de 10 fragments, tel le *Kpn*I, sont utilisés. Les critères de Tenover (Tenover *et al.*, 1995) sont résumés dans le tableau 2.3. Lorsqu'il y a une différence de 3 fragments et moins entre les profils, les isolats sont considérés fortement reliés génétiquement. Ces critères ne doivent par contre pas être utilisés pour un échantillonnage de plus d'une année.

TABLEAU 2.3: Critères de Tenover pour l'interprétation des profils de PFGE

Lien génétique	No. d'évènements génétiques	No. de différents fragments
Identique	0	0
Fortement relié	1	1 à 3
Possiblement relié	2	4 à 6
Différent	≥3	≥7

Cette plasticité du génome pourrait être la cause de la grande diversité observée pour les isolats de *Campylobacter*. Le tableau 2.2, discuté auparavant, donnait un aperçu des diversités génétique et phénotypique décrites pour *C. jejuni*.

## 2.4. Infections à *C. jejuni/coli* chez l'humain

### 2.4.1. Aspects cliniques

*C. jejuni* subsp. *jejuni* (dorénavant nommé *C. jejuni* dans cette thèse) et *C. coli* sont de loin les plus importants campylobacters entéropathogènes chez l'humain (Vandamme, 2000). Plusieurs études épidémiologiques et cliniques rapportent que *C. jejuni* est l'une des causes la plus fréquente d'entérites sporadiques d'origine alimentaire aux États-Unis (Altekruse *et al.*, 1994; Nachamkin, 1995; Santé-Canada, 2003). Au Canada, la campylobactériose est une maladie à déclaration obligatoire (Rapport mensuel des maladies à déclaration obligatoire : [www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgsp/bid-bmi/dsd-dsm/ndmr-rmmdo/index\\_f.html](http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgsp/bid-bmi/dsd-dsm/ndmr-rmmdo/index_f.html)). Cliniquement, les entérites aiguës à *Campylobacter* peuvent être difficilement différenciées d'une salmonellose ou d'une shigellose quoiqu'une période de fièvre antérieure au début de la diarrhée, des douleurs abdominales intenses et/ou une prostration soient plus fréquentes lors d'une campylobactériose (Skirrow et Blaser, 2000). En général, la dose infectieuse est faible, soit moins de 500 bactéries lors d'infections expérimentales chez l'humain (Skirrow et Blaser, 2000). La période d'incubation est normalement de 24 à 72 heures mais elle peut atteindre une semaine ou plus lorsque la charge bactérienne est faible (Skirrow et Blaser, 2000). Les signes cliniques dépendent de la virulence de la souche, de la dose infectieuse et de la susceptibilité du patient (Skirrow et Blaser, 2000). Les infections varient de porteurs asymptomatiques à des maladies sévères (Nachamkin, 1995). Le début de la maladie est souvent abrupt, avec d'intenses crampes abdominales suivies rapidement de diarrhée liquide, profuse et colorée par la bile. Par contre, plus de 30% des patients souffriraient d'un prodrome ressemblant à une infection à l'influenza avec de fortes fièvres, des maux de tête, des myalgies et des étourdissements (Skirrow et Blaser, 2000). Dans près de 15% des cas, la diarrhée devient hémorragique (avec sang non digéré) indiquant une progression de l'infection dans le colon et le rectum. La diarrhée persiste généralement de quelques jours à plus d'une semaine. Les infections symptomatiques sont généralement autolimitantes, mais des rechutes peuvent survenir dans 5 à 10% des cas non traités (Skirrow et Blaser, 2000). Les infections à *Campylobacter* peuvent ressembler à des appendicites

aiguës à la suite de l'inflammation des ganglions mésentériques, pouvant résulter à des appendicectomies inopportunes. Lorsque l'infection n'est pas traitée, l'excrétion des campylobacters dans les fèces peut durer plusieurs semaines après l'arrêt de signes cliniques (Skirrow et Blaser, 2000). La plupart des données histologiques proviennent de biopsies effectuées lors de cas de colite et de proctite (Skirrow et Blaser, 2000). Généralement, une inflammation aiguë de la muqueuse est observée avec œdème, infiltration par des polymorphonucléaires et formation d'abcès dans les cryptes. Le taux de mortalité est faible quoique la maladie puisse être mortelle chez les bébés et les personnes immunodéficientes (Tauxe, 1992).

Les infections extra intestinales sont diverses (Skirrow et Blaser, 2000). Elles incluent des bactériémies, des hépatites, des cholécystites, des pancréatites, des arthrites, des bursites, des infections du tractus urinaire, des néphrites, des prostatites, des méningites, des endocardites, des péritonites, des avortements et plusieurs infections focales. Plusieurs complications tardives ont aussi été associées aux campylobacters (Skirrow et Blaser, 2000). On retrouve, entre autres, des arthrites réactives telles que celles décrites pour d'autres infections bactériennes des intestins, le syndrome de Guillain-Barré (GBS) et d'autres syndromes similaires au GBS. Le GBS est un désordre autoimmunitaire du système nerveux périphérique (Ho *et al.*, 1995). Les personnes affectées développent rapidement des faiblesses des muscles des jambes et des muscles respiratoires, ainsi que de l'aréflexie. Ce syndrome est généralement autolimitant quoique 15 à 20% des patients puissent avoir des déficits neurologiques sévères pouvant laisser des séquelles. Des données à partir de culture bactérienne et de sérologie ont démontré que 30 à 40% des patients avec le GBS auraient possiblement eu une infection à *Campylobacter* quelques semaines auparavant (Nachamkin *et al.*, 2000). *C. jejuni* sérotype O:19 a d'abord été associé au GBS (Yuki *et al.*, 1993). Par contre, d'autres sérotypes ont plus tard été associés (Nachamkin *et al.*, 2000). Aux États-Unis, on estime qu'il y a 1 cas de GBS par 1000 cas de campylobactériose à *C. jejuni* et 1 cas par 158 infections à *C. jejuni* sérotype O:19 (Nachamkin *et al.*, 2000). La pathogénie du GBS, ou des maladies similaires au GBS.

n'est pas claire mais des antigènes de *C. jejuni* (probablement certains LPS) stimuleraient une production d'anticorps qui réagiraient de façon croisée avec des composantes du tissu nerveux, dont des gangliosides (Nachamkin, 1995).

Dans la majorité des entérites à *Campylobacter*, aucun traitement spécifique est nécessaire (Skirrow et Blaser, 2000). Les antibiotiques sont généralement inefficaces. Par contre, lorsque administrés très tôt dans le développement de la maladie, l'érythromycine ou les fluoroquinolones peuvent diminuer la période des symptômes et l'excrétion des campylobacters dans les fèces (Skirrow et Blaser, 2000). L'érythromycine est l'antibiotique de choix (Skirrow et Blaser, 2000). La résistance à cet antibiotique est généralement faible chez *C. jejuni* (entre 0 et 11%) tandis qu'elle est plus élevée pour *C. coli* (de 0 à 68%) (Nachamkin *et al.*, 2000b). La clindamycine, un autre macrolide, peut être utilisée comme traitement alternatif (Nachamkin *et al.*, 2000b). Par contre, il existe des résistances croisées entre l'érythromycine et les autres macrolides (Skirrow et Blaser, 2000). Les fluoroquinolones (ciprofloxacine) sont actifs pour la majorité des entéropathogènes, incluant *Campylobacter* (Nachamkin *et al.*, 2000b). Par contre, certains travaux ont démontré une acquisition rapide de résistance aux fluoroquinolones par les campylobacters lors de traitement (Nachamkin *et al.*, 2000b). Le taux de *C. jejuni/coli* résistants aux fluoroquinolones atteint 60, 84 et 88% en Taiwan, Thaïlande et Espagne, respectivement (Nachamkin *et al.*, 2000b). Les tétracyclines peuvent être aussi une option alternative mais la résistance est généralement élevée (Nachamkin *et al.*, 2000b).

#### **2.4.2. Épidémiologie**

Blaser (1997) estime que le nombre de campylobactériose chez l'humain dépasse maintenant la somme des cas de maladies reliées à *Salmonella*, *Shigella* et *E. coli* O157:H7. Le nombre de cas déclarés des plus importantes toxi-infections alimentaires aux États-Unis et au Canada est comparé dans le tableau 2.4.

TABLEAU 2.4: Taux d'isolement de pathogènes associés à des toxi-infections alimentaires

Pathogène	No. de cas rapportés / 100 000 habitants en 1998	
	États-Unis* <sup>1</sup>	Canada* <sup>2</sup>
<i>Campylobacter</i>	21,7	47,1
<i>Salmonella</i>	12,4	23,3
<i>Shigella</i>	8,5	5,3
<i>E. coli</i> O157:H7	2,8	4,9* <sup>3</sup>
<i>Listeria</i>	0,5	0,3
Total	45,9	80,9

\*<sup>1</sup>: Données du FoodNet du CDC (Friedman *et al.* 2000).

\*<sup>2</sup>: Données de Santé-Canada (www.hc-sc.gc.ca).

\*<sup>3</sup>: *E. coli* vérotoxigènes.

Le nombre de cas déclarés de campylobactériose peut varier selon les études et selon les pays industrialisés (tableau 2.5). Le taux d'isolement de *C. jejuni* dans les cas de diarrhée dépasse rarement 6% dans les pays industrialisés (Oberhelman et Taylor, 2000). Il a été de 3,8% avec une variation mensuelle de 1,1 à 7,4% en Ontario entre 1978 et 1985 (Thompson *et al.*, 1985) et entre 1,1 et 5,1% selon l'âge entre 1990 et 1992 aux États-Unis (Friedman *et al.*, 2000). Par contre, puisque beaucoup d'hôpitaux ne font pas la culture des campylobacters de façon routinière (Tauxe, 1992) et que sa culture est plus difficile et plus coûteuse que celle de *Salmonella* et de *Shigella*, les cas d'infection à *C. jejuni* sont sous-rapportés (Allos et Blaser, 1995).

TABLEAU 2.5: Cas déclarés de campylobactériose dans différents pays industrialisés

Pays	Source de l'information	Année	Cas déclarés par 100 000 habitants	Cas présumés par 100 000 habitants
Allemagne (Saxe)	Eurosurveillance	1999	86	
Angleterre	Epi-insight	1999	104,9	
Angleterre	Microbiological safety of food funders group	2001	86	655
Australie	Communicable diseases Australia	2000	118	
Canada	Santé-Canada	1998	47,1	
Danemark	National surveillance of communicable diseases	2000	83	
Écosse	Scottish office	1999	116	
Etats-Unis	FoodNet	1998	21,7	
Etats-Unis	CDC	2000	6	740
Irlande	Epi-insight	1999	57,5	
Suède	Swedish institute for infection disease control	1999	80,2	
Suisse	Office fédéral de la santé public	2000	109	

Seulement 5% des cas de *Campylobacter* seraient rapportés au CDC (*Centre of Disease Control*) lors d'études de surveillance passive aux États-Unis. Des études de surveillance des infections à *Campylobacter* jumelées à des estimations basées sur les épidémies et sur des études dans des milieux hospitaliers aux États-Unis et au Royaume-Uni suggèrent que le taux d'infection annuel à *C. jejuni* soit près de 1% de la population soit, 1000 cas par 100 000 habitants (Tauxe, 1992; Nachamkin, 1995; Blaser, 1997). *Campylobacter* affecte tous les groupes d'âge de la population mais les jeunes de moins de 4 ans et les gens entre 15 et 44 ans semblent les plus touchés (Friedman *et al.*, 2000).

L'incidence chez les hommes est près de 1,5 fois plus élevée que chez les femmes (Friedman *et al.*, 2000). Généralement, une augmentation du nombre de cas est observée lors des mois plus chauds dans les pays tempérés (Friedman *et al.*, 2000).

La majorité des infections à *Campylobacter* sont de nature sporadique. Les études épidémiologiques vont généralement identifier les sources probables associées à *C. jejuni*, étant l'espèce la plus isolée dans les cas d'entérites à *Campylobacter* (Friedman *et al.*, 2000). Les infections sporadiques à *Campylobacter* sont généralement reliées à une manipulation ou une cuisson inadéquate de nourriture, spécialement les produits de volaille (Nachamkin, 1995). L'ingestion ou la manipulation de poulet insuffisamment cuit ou cru serait responsable de 50 à 70% des cas endémiques de campylobactériose (Blaser, 1997). Par contre, le risque associé au poulet varie selon les études (Newell et Wagenaar, 2000). Le taux de carcasses contaminées par *Campylobacter* peut varier de 48 à 98% (Stern, 1992). Au Canada, deux études ont démontré que 58% et 74% des carcasses étaient contaminées par *Campylobacter* (Stern, 1992). La surface d'une carcasse de poulet peut contenir entre  $10^3$  à  $10^6$  cellules de *Campylobacter* (Friedman *et al.*, 2000). Ainsi, l'ingestion d'une seule goutte du jus de la carcasse cru serait amplement suffisante pour atteindre la faible dose infectieuse, soit moins de 500 bactéries. Outre la volaille, d'autres sources d'infection telles l'eau de consommation, le lait non pasteurisé et le contact avec les animaux de compagnie et les animaux de ferme ont été rapportées (Pearson *et al.*, 1996). *Campylobacter* semble aussi être une cause importante de la diarrhée du voyageur, celui-ci étant probablement infecté par les mêmes sources durant le voyage (Friedman *et al.*, 2000). De plus, *C. jejuni* est une cause importante d'entérites chez les nouveaux travailleurs oeuvrant dans les abattoirs, plus particulièrement dans les abattoirs de poulets. Une résistance à la maladie semble apparaître par la suite par l'acquisition d'une immunité protectrice (Cawthraw *et al.*, 2000). La population bactérienne des cas sporadiques de campylobactériose chez l'humain est phénotypiquement et génétiquement très variée (Aeschbacher et Piffaretti, 1989;

Owen *et al.*, 1997; Wareing *et al.*, 2002), rendant difficile l'association directe de ces campylobacters avec une source potentielle. Plusieurs études faites avec des méthodes moléculaires de sous-typage ont par contre réussi à identifier des souches clonales identiques isolées de cas sporadiques d'entérites chez l'humains et de différents animaux, tels des poulets à griller, des bovins, des chèvres et des dindes (On *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2000; Fitzgerald *et al.*, 2001; Hanninen *et al.*, 2001).

Contrairement aux cas sporadiques, les épidémies à *Campylobacter* sont généralement rares, soit moins de 1% des cas associés à la nourriture ou à l'eau entre 1980 et 1996 aux États-Unis (Friedman *et al.*, 2000). Les épidémies à *Campylobacter* sont généralement reliées à l'ingestion de lait ou d'eau contaminés et se produisent plutôt dans les mois du printemps et de l'automne (Tauxe, 1992). Par contre, les sources associées aux épidémies ont changé entre 1978 et 1996 aux États-Unis (Friedman *et al.*, 2000). L'eau de consommation et le lait non pasteurisé étaient les causes de 56% des cas épidémiques entre 1978 et 1987 tandis qu'entre 1988 et 1996, 83% des épidémies étaient associées à la consommation de d'autres nourritures que l'eau et le lait. Généralement, le lait est contaminé par les fèces des bovins quoique des mammites à *C. jejuni* aient aussi été responsables de contamination du lait (Morgan *et al.*, 1985). *C. jejuni* a été isolé dans 5% des échantillons de lait et 22% des échantillons de fèces de vaches laitières (Beumer *et al.*, 1988). De plus, Garcia *et al.* (1985) rapportaient que 50% des fermes étaient positives à *C. jejuni* lors d'échantillonnages dans les abattoirs de bovins de boucherie. Selon les conditions hygiéniques, *C. jejuni* peut aussi être retrouvé dans divers aliments, tels des bivalves crus (Abeyta *et al.*, 1993). D'ailleurs au Canada, *C. jejuni* a été isolé dans 1,7% des 533 échantillons de légumes venant d'un marché extérieur sans toutefois être isolé dans 1031 échantillons de légumes dans des supermarchés (Park et Sanders, 1992).

En comparaison aux pays industrialisés, le taux d'isolement de *C. jejuni* dans les cas de diarrhée peut atteindre 34% dans les pays en voie de développement (Bokkenheuser *et al.*, 1979). La plupart des infections symptomatiques dans les pays en développement se produit chez les bébés et les jeunes enfants, l'incidence diminuant ensuite avec l'âge (Nachamkin, 1995). L'incidence des campylobactérioses en Thaïlande et au Mexique peut atteindre 0,4 épisode par enfant de moins de 5 ans annuellement, soit 40 000 par 100 000 enfants (Oberhelman et Taylor, 2000). Dans les pays en développement, les campylobacters sont fréquemment isolés chez des individus asymptomatiques (Nachamkin, 1995). Par contre, les taux de sujets asymptomatiques positifs à *C. jejuni* dépassent rarement 2% dans les pays développés (Skirrow, 1977) alors qu'il peut atteindre 12,5% en Afrique du Sud (Bokkenheuser *et al.*, 1979). Cette différence serait attribuée à la production d'anticorps anti-*Campylobacter* à la suite d'expositions répétées à *C. jejuni* chez les individus des pays en développement (Blaser *et al.*, 1985).

## **2.5 *Campylobacter* chez le poulet à griller**

### **2.5.1. La production de poulets à griller au Québec**

En 2001, un peu moins de 300 millions de kilogrammes (poids éviscéré) de poulets de chair ont été produits au Québec générant près de 420 millions de dollars en recettes monétaires ([www.stat.gouv.qc.ca](http://www.stat.gouv.qc.ca)). Au Québec, la capacité moyenne d'un poulailler est de 15 000 à 20 000 poulets à griller par période de production (ou cycles de production) de 6 à 8 semaines, avec 6 périodes de production annuellement (<http://nfpc-cnpa.gc.ca/>). Généralement, les poulets à griller sont élevés sur litière dans des bâtiments de 2 ou 3 étages avec une densité d'élevage, au poids d'abattage, de plus de 10 oiseaux par mètre carré (CPA, 1998). Plusieurs milliers d'oiseaux sont élevés par étage. Chaque étage peut constituer une chambre de production ou être séparé en deux chambres de production. Les producteurs achètent les poussins de 1 jour des couvoirs. Une densité de plus de 33 poussins par mètre carré est alors acceptable (CPA, 1998). Les poulets à griller atteignent leur poids vif d'abattage, soit

près de 2 Kg (1,6 à 2,6 Kg), en seulement 35 à 42 jours (<http://nfpc-cnpa.gc.ca/>). Comme c'est le cas pour les autres pays producteurs, la pyramide de production de poulets à griller débute avec un nombre restreint d'oiseaux reproducteurs sélectionnés pour leurs caractéristiques commerciales, telles le taux de conversion alimentaire et la conformation corporelle, et se termine par un nombre élevé d'oiseaux au niveau de la production (Mulder, 1997). Un abattoir peut traiter près de 25 000 poulets à griller à l'heure. Les lots d'une période de production sont généralement abattus en 1 à 6 lots d'abattage ayant chacun 6000 oiseaux en moyenne.

### **2.5.2. Incidence des campylobacters en production de poulets à griller**

*C. jejuni* semble être un membre normal de la flore intestinale des poulets (Stern, 1992). Le cæcum est le principal site de colonisation chez le poulet (Beery *et al.*, 1988). La bactérie se retrouve généralement dans la couche de mucus des cryptes cæcales sans toutefois avoir d'association directe avec les cellules épithéliales (Beery *et al.*, 1988). *C. jejuni* a aussi été isolé à partir du foie et de la rate, toujours chez des poulets asymptomatiques, suggérant une possible translocation de l'épithélium intestinal (Beery *et al.*, 1988). Plus de  $10^6$  à  $10^7$  CFU par gramme de fèces ont été rapportées chez la volaille, sans pour autant causer de pathologies apparentes (Stern, 1992). Toutefois, l'hépatite vibrionique aviaire a été associée à *C. jejuni* (Skerman *et al.*, 1980). Cette infection se manifesterait à la suite de facteurs de stress et de d'autres infections concomitantes (Berndson, 1996). Selon Newell et Wagenaar (2000), il est préférable d'échantillonner les lots de production aviaire à l'abattoir car 1) l'échantillonnage sur la ferme demande une manipulation des animaux puisque l'utilisation d'écouvillons cloacaux est préférable à l'échantillonnage des fientes sur le sol, 2) la positivité des lots de production sur la ferme dépend de l'âge des oiseaux et 3) à leur arrivée à l'abattoir, la majorité des oiseaux d'un lot positif sera colonisée. Il a été démontré que l'échantillonnage à l'abattoir est représentatif du taux d'oiseaux colonisés sur la ferme (Whyte *et al.*, 2001). La détermination du taux de poulets ou de fermes colonisés par *Campylobacter* est très importante car la colonisation intestinale par les campylobacters est le plus important des facteurs contribuant à la

contamination des carcasses à l'abattoir (Ooesteron *et al.*, 1983). La prévalence des campylobacters chez le poulet varie considérablement selon les études mais de fortes proportions de lots de production colonisés ont été rapportées. La comparaison de ces études est difficile car différentes méthodes d'isolement ont été utilisées. Généralement, le taux de lots de production positifs à *Campylobacter* varie de 30 à 60% (tableau 2.6) avec un taux élevé d'oiseaux positifs par lot colonisé (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1995). Des taux de lots positifs plus bas, entre 10 et 27%, ont été retrouvés en Norvège et en Suède (Newell et Wagenaar, 2000). Kapperud *et al.* (1993) rapportaient que seulement 18% des 176 lots de production échantillonnés étaient colonisés par *Campylobacter* lors d'un échantillonnage d'un an en Norvège. De plus, seulement 25% des lots avaient un taux élevé de poulets positifs à l'abattoir tandis que près de 60% des lots avaient un taux de poulets positifs de 36% et moins. Ces auteurs expliquaient ces différences par de très bons standards d'hygiène sur les fermes norvégiennes.

Une grande variabilité dans les taux d'oiseaux colonisés par *Campylobacter* a été notée entre les différents lots produits simultanément d'une ferme donnée. Gregory *et al.* (1997) rapportaient que les taux d'isolement de *Campylobacter* étaient de 96,7% à 100% pour trois lots de production et de 6,7% pour l'autre lot produit simultanément sur une même ferme. Berndtson (1996) a fait une étude portant sur 287 lots de production répartis sur 8 fermes. Certaines fermes renfermaient simultanément des lots négatifs et des lots fortement positifs. Pour 89% des lots échantillonnés, tous les échantillons du lot étaient positifs ou négatifs à *Campylobacter*, suggérant une propagation rapide de la bactérie une fois la colonisation amorcée. Dans cette même étude, 2 fermes sur un total de 18 étaient négatives pour tous les lots échantillonnés. Ces données indiquent qu'il est possible d'avoir des lots complètement négatifs à *Campylobacter* et qu'il est possible d'empêcher la propagation de la bactérie entre les lots de production d'une même ferme. Berndtson (1996) notait qu'il était possible que des lots de poulets à griller soient négatifs à *Campylobacter* lors de leur entrée à l'abattoir et qu'ils le demeurent jusqu'au détail.

TABLEAU 2.6: Comparaison de l'incidence de *Campylobacter* en production de poulets à griller dans divers pays

Pays	% de lots colonisés	% d'oiseaux colonisés entrant à l'abattoir	Informations sur l'échantillonnage	Référence
	82		100 lots	Evans and Sayers, 2000
Angleterre	76		49 lots sur 23 fermes	Humphrey <i>et al.</i> , 1993
	36		251 lots	Pearson <i>et al.</i> , 1996
Allemagne		46	12 lots	Atanassova et Ring, 1999
Canada	48		60 lots	Prescott and Gellner, 1984
Danemark		43	89110 poulets de 828 bâtiments	Wedderkopp <i>et al.</i> , 2001
	46		4246 lots	Wedderkopp <i>et al.</i> , 2000
États-Unis	87		32 lots sur 8 fermes	Stern <i>et al.</i> , 2001
	90		10 fermes	Stern <i>et al.</i> , 1995
France	43		75 fermes	Refregier-Petton <i>et al.</i> , 2001
Japon	32		212 lots	Chuma <i>et al.</i> , 2001
Norvège	18		176 lots	Kapperud <i>et al.</i> , 1993
Pays-Bas	82		187 lots	Jacobs-Reitsma <i>et al.</i> , 1994
	67		47 lots sur 9 fermes	Jacobs-Reitsma <i>et al.</i> , 1995
	57		112 lots sur 20 fermes	van de Giessen <i>et al.</i> , 1996
Suède	17			Engvall <i>et al.</i> , 1986
	27		287 lots sur 8 fermes	Berndston, 1996

### 2.5.3. Évolution de la colonisation d'un lot de production

Dans la plupart des lots de production analysés, il est impossible de détecter une colonisation avant le dixième jour de production (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1995; Gregory *et al.*, 1997). Humphrey *et al.* (1993) rapportaient par contre que des poulets étaient positifs dès le sixième jour mais que la plupart des poulets étaient colonisés vers la troisième semaine d'âge. En laboratoire, des oiseaux porteurs de *Campylobacter* introduits dans des groupes d'oiseaux exempts de *Campylobacter* transmettent la bactérie aux autres oiseaux en 3 jours seulement (Stern, 1992). De plus, il a été démontré qu'un nombre restreint d'oiseaux infectés pouvaient être la source d'infection d'un lot entier (Shanker *et al.*, 1990). L'isolement tardif de la bactérie dans un lot de production pourrait être causé par une immunité maternelle protégeant les poussins ou par une charge bactérienne trop faible dans les fèces pour être détectée par les techniques d'isolement utilisées (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1995). Par contre, il n'y aurait pas de phénomène de résistance des poussins vis-à-vis les campylobacters pendant les premières semaines de vie puisque seulement 35 CFU sont nécessaires pour coloniser 50% des poussins de 1 jour d'âge lors d'infection expérimentale (Stern, 1992). De plus, plusieurs travaux ont clairement démontré qu'une dose orale de *Campylobacter*, même très faible, peut permettre la colonisation des intestins de poussins de 1 jour tout en étant facilement isolé à nouveau dans des échantillons cloacaux (Annah-Prah et Janc, 1988; Shanker *et al.*, 1990; Stern, 1992; van de Giessen *et al.*, 1992). Par contre, en production, plusieurs auteurs rapportent qu'aucun poussin n'est positif à *Campylobacter* lors de l'éclosion (Genigeorgis *et al.*, 1986; Stern, 1992; Gregory *et al.*, 1997). D'autres auteurs expliquent cette période d'absence de détection de *Campylobacter* dans les premières semaines de production par un manque d'exposition à la bactérie (Newell et Wagenaar, 2000).

Plusieurs travaux ont démontré qu'une fois la bactérie isolée dans un lot de production, la majorité des oiseaux sont ensuite colonisés en moins d'une semaine et que le taux d'isolement demeure élevé jusqu'à l'abattoir, soit vers 6 à 7 semaines d'âge (Engvall *et al.*, 1986; Jacobs-Reitsma *et al.*, 1995; Gregory *et al.*, 1997; Evans et

Sayers, 2000). Par contre, lors d'infections expérimentales chez le poulet, le niveau de *C. jejuni* tend à diminuer avec l'âge jusqu'à l'arrêt d'excrétion dans les fèces après 12 semaines d'âge (Stern, 1992). La transmission horizontale rapide observée dans un lot de production a aussi été démontrée expérimentalement (Shane, 2000).

Dans plusieurs études, un pic d'isolement des campylobacters en production de poulets à griller et dans les produits dérivés de cette production a été observé pendant les mois de la saison chaude (Annah-Prah et Janc, 1988; Kazwala *et al.*, 1990; Jacobs-Reitsma *et al.*, 1994; Berndtson, 1996; Wedderkopp *et al.*, 2000). Ces pics saisonniers ont été associés à la période d'arrivée d'oiseaux migrateurs et/ou à l'augmentation de l'activité saisonnière des insectes (Jacobs-Reitsma, 1997). Par contre, Gregory *et al.* (1997) ne notaient aucune variation saisonnière dans l'isolement des campylobacters dans une ferme de production de poulets à griller. Certains auteurs ont d'ailleurs fait une association entre les variations saisonnières des campylobactérioses chez l'humain et les variations de la colonisation de la production de poulets à griller (Jones *et al.* . 1990; Berndston, 1996).

#### **2.5.4. Identification et distribution des campylobacters**

Plusieurs travaux ont révélé une forte prévalence de *C. jejuni*, variant de 80 à 100%, parmi les campylobacters isolés dans les élevages de poulets à griller (Griffiths et park, 1990; Kapperud *et al.*, 1993; Berndston, 1996; Evans et Sayers, 2000; Wedderkopp *et al.*, 2001). *C. coli* est généralement la deuxième espèce identifiée en production (Stern, 1992). Selon le système de biotypie de Lior (Lior, 1984), les biotypes 1 et 2 de *C. jejuni* sont majoritairement identifiés en production de poulets à griller (Griffiths et Park, 1990; Kapperud *et al.*, 1993). D'ailleurs, les mêmes biotypes ont été associés aux campylobactérioses humaines (Harris *et al.*, 1986).

À quelques occasions, des lots colonisés simultanément par *C. jejuni* et *C. coli* ont été rapportés (Evans et Sayers, 2000). Plusieurs sérotypes (Prescott et Gellner, 1984; Pokamunski *et al.*, 1986; van de Giessen *et al.*, 1992) et différents patrons de résistance aux antibiotiques (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1994) ont été rapportés pour un même lot de production. Par contre, Berndston (1996) avait identifié un seul sérotype dans la majorité des lots de production et Chuma *et al.* (1997), un seul patron *fla* dans chacun des 21 lots de production colonisés. Jacobs-Reitsma *et al.* (1994), démontraient lors d'infections expérimentales avec deux souches de sérotypes différents, que l'introduction d'un nouveau sérotype pouvait mener en seulement une semaine à la dominance de ce dernier. L'exclusion d'une souche clonale par une autre plus dominante a aussi été démontrée par d'autres auteurs dans des lots expérimentaux (Korolik *et al.*, 1998; Barrow et Page, 2000). Par contre, des analyses utilisant le sérotypage, le typage de *fla* et le PFGE ont démontré que de 1 à 3 différents clones pouvaient coexister dans un lot de production commercial (Peterson *et al.*, 2001; Shreeve *et al.*, 2002). Shreeve *et al.* (2000) rapportaient que près de 60% des lots de production comportaient un seul profil *fla*, tandis que deux profils ont été identifiés dans 30% des lots et trois profils et plus dans seulement 10% des lots. Généralement, des souches clonales différentes sont identifiées dans les différentes périodes de production d'une ferme (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1994). Des sérotypes (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1994) et des profils *fla* (Shreeve *et al.*, 2002) différents ont été généralement identifiés sur une ferme donnée pour des lots consécutifs positifs à *Campylobacter*. Selon Jacobs-Reitsma *et al.* (1994), cette grande variété de souches de *Campylobacter* indique l'entrée d'un flot continu de nouvelles souches clonales en production de poulets à griller.

### 2.5.5. Transmission et facteurs de risque

Jusqu'à présent, les efforts pour développer des mesures de contrôle appropriées en production aviaire ont été entravés par le manque de connaissance quant au mode et à la source de transmission des campylobacters dans un lot de production. Malgré le nombre élevé de travaux effectués sur le sujet, les routes de transmission des campylobacters en production aviaire sont rarement établies et une panoplie de facteurs de risques a été identifiée (Petersen *et al.*, 2001). De plus, les différentes conclusions de ces études sont souvent contradictoires quant à l'identification des routes de transmission et des facteurs de risque associés à la colonisation. Plusieurs sources ont été considérées telles les reproducteurs lors d'une transmission verticale (Pearson *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 1999), l'eau de boisson (Pearson *et al.*, 1993), l'environnement immédiat de la ferme (Payne *et al.*, 1999) et plusieurs autres facteurs incluant la vermine, les insectes, les animaux de compagnie, les animaux de consommation et le personnel sur la ferme (Stern, 1992).

#### 2.5.5.1. La transmission verticale

Les résultats de plusieurs travaux effectués dans des élevages commerciaux semblent nier l'existence de la transmission verticale de *C. jejuni* des poules reproductrices à l'œuf, puis aux poussins (Shane, 2000). Par contre, l'existence ou non de la transmission verticale est un sujet encore très débattu aujourd'hui. Certains auteurs croient que la transmission verticale est possible quoique faible (Annan-Prah et Janc, 1988; van de Giessen *et al.*, 1992). Pearson *et al.* (1996) rapportaient que la distribution des sérotypes indiquait la possibilité de transmission verticale. Par contre, dans une autre étude similaire ayant aussi identifié des sérotypes identiques dans les lots de parents et de leur progéniture, les profils de PFGE étaient différents (Petersen *et al.*, 2001). Différentes études ont démontré que des sérotypes identiques étaient distribués dans différents génotypes (regroupés par PFGE, AFLP et/ou ribotypage) et à l'opposé, différents sérotypes ont été identifiés pour les isolats regroupés par un même génotype (Hanninen *et al.*, 2001). Plusieurs autres équipes concluaient à l'absence de

transmission verticale de *C. jejuni* en production aviaire (Shanker *et al.*, 1986; van de Giessen *et al.*, 1992; Jacobs-Reitsma *et al.*, 1994; Berndston, 1996; Jacobs-Reitsma, 1997). Ces derniers s'appuient sur plusieurs résultats tels que : 1) *C. jejuni* n'est pas isolé dans les chambres à éclosion ni lors des premières semaines de vie des poulets à griller, 2) très peu d'œufs ont été colonisés lors d'infections naturelle et expérimentale. 3) les lots provenant de reproducteurs identiques et produits simultanément étaient fortement colonisés par *Campylobacter* ou exempts, 4) les sérotypes de ces lots colonisés n'étaient généralement pas reliés aux parents, et 5) les lots de poulets à griller provenant des mêmes troupeaux reproducteurs avaient souvent des sérotypes de *Campylobacter* différents.

Par contre, des études récentes utilisant des méthodes moléculaires de détection, telles l'hybridation d'ADN et le PCR, ont démontré une colonisation par *C. jejuni* d'un certains nombre de poussins de 1 jour lors de l'entrée en production (Shane, 2000; Hiatt *et al.*, 2002). De plus, *C. jejuni* a été isolé dans 4 ovaires de poules pondeuses quoique aucun des 219 oeufs fraîchement pondus ne soit colonisé (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1995). Les membranes internes de l'œuf seraient une barrière efficace contre la pénétration de *C. jejuni* (Shane, 2000) et *C. jejuni* aurait une survie très limitée dans l'albumen (Shane, 2000). Par contre, Shanker *et al.* (1986) rapportaient une colonisation de deux poussins après une injection de *Campylobacter* dans 167 oeufs. *C. jejuni* a été isolé par culture dans la coquille interne et dans les membranes d'œufs réfrigérés (Shane *et al.*, 1986) de même que par PCR dans le cæcum d'embryons de poulet de 18 jours, quoiqu'il fût impossible d'isoler la bactérie (Chuma *et al.*, 1994). Clark et Bueschkens (1985) ont démontré que des œufs fertiles pouvaient être infectés par *C. jejuni* en utilisant des différentiels de température ou de pression. Tout dernièrement, certains travaux évoquaient la possibilité que des souches de *C. jejuni* puissent coloniser l'oviducte des poules à partir du cloaque (Camarda *et al.*, 2000). Ces campylobacters ont été observés par microscopie près de l'infundibulum de l'oviducte, pouvant ainsi infecter l'œuf avant même la formation de l'albumen, des membranes et de la coquille. De plus, des œufs de cailles japonaises

auraient été infectés par *C. jejuni* lors du passage dans l'oviducte (Maruyama et Katsube, 1990). *C. jejuni* serait capable de se multiplier dans le jaune d'œuf de poule à 42°C (Clark et Bueschkens, 1986).

#### 2.5.5.2. Réservoirs d'infection et transmission

Tel que mentionné auparavant, la transmission horizontale à l'intérieur d'un lot de production peut être très rapide et la majorité des oiseaux du lot peut être colonisée en moins d'une semaine (Engvall *et al.*, 1986; Pokamunski *et al.*, 1986; Jacobs-Reistma *et al.*, 1995). La coprophagie et la contamination de l'eau, de la nourriture, de la litière ainsi que la promiscuité seraient responsables de cette rapide propagation (Evans, 1992). Malgré le fait que plusieurs facteurs de risque ont été établis pour expliquer cette propagation dans un lot, il est plus difficile de trouver des facteurs de risque associés à l'introduction des campylobacters dans un lot.

La transmission horizontale de *C. jejuni* entre deux lots produits simultanément ou consécutivement sur une ferme serait rare (Pearson *et al.*, 1996; Jacobs-Reitsma, 1997) mais a quand même été rapportée (Shanker *et al.*, 1990; Humphrey *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1993). *C. jejuni* n'est généralement pas isolé dans les unités de production après un nettoyage et une désinfection de routine (Gregory *et al.*, 1997; van de Giessen *et al.*, 1998; Evans et Sayers, 2000; Shreeve *et al.*, 2002). Des sérotypes différents ont été identifiés dans des lots produits consécutivement et des lots négatifs à *Campylobacter* ont souvent été observés à la suite de lots colonisés (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1994). Par contre, Shreeve *et al.* (2002) rapportaient que la transmission de *Campylobacter* entre deux lots consécutifs est possible, mais rare. Pearson *et al.* (1996) notaient que seulement 23 bâtiments de production sur 251 ont eu une colonisation de lots de production consécutifs et que des sérotypes identiques ont été identifiés dans seulement 9 de ces 23 bâtiments. Des sérotypes et des profils de *fla*, de PFGE et/ou de RAPD identiques ont été observés dans des lots consécutifs colonisés (Shane, 2000; Shreeve *et al.*, 2002). Par contre, la présence d'une même souche

clonale dans deux lots consécutifs n'indique pas nécessairement une transmission horizontale de la bactérie d'un lot à l'autre mais peut signifier la présence d'une source persistante et commune pour les deux périodes de production (Shane, 2000).

La transmission horizontale par une source environnementale est la route la plus acceptée pour l'introduction de *C. jejuni* dans les lots de production de poulets à griller (Jacobs-Reitsma, 1997; Hald *et al.*, 2001). Les différentes sources rapportées dans la littérature incluent le système de distribution de l'eau de boisson et de la nourriture, la litière, les boîtes de transports des poulets, les bottes et les mains du personnel (Rosef *et al.*, 1983; Pokamunski *et al.*, 1986; Annah-Prah et Janc, 1988; Kazwala *et al.*, 1990; Humphrey *et al.*, 1993; Kapperud *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1993) ainsi que la présence de vermines, d'oiseaux sauvages, d'insectes, d'animaux domestiques et de d'autres types d'animaux de consommation (Rosef *et al.*, 1983; Annah-Prah et Janc, 1988; Humphrey *et al.*, 1993; Kapperud *et al.*, 1993). Aucune de ces sources n'a été clairement identifiée car les bâtiments, les intrants (eau de boisson, litière, nourriture, etc.) et les vecteurs vivants (vermines, insectes, oiseaux sauvages, etc.) sont généralement négatifs avant l'isolement de la bactérie dans le lot (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1994; Stern *et al.*, 2001). Par contre, ces sources hypothétiques deviennent rapidement positives dès que *C. jejuni* est isolé de certains poulets du lot. Dans les autres cas où la bactérie a été isolée à partir des sources potentielles avant son isolement chez les poulets, les souches clonales étaient différentes (Stern *et al.*, 1995). De plus, les animaux sauvages seraient un réservoir limité pour la colonisation de la production aviaire car peu de souches clonales de *Campylobacter* provenant d'animaux sauvages seraient retrouvées chez les poulets et les humains (Petersen *et al.*, 2001).

L'eau est l'un des facteurs de risque des plus documentés pour la production de poulets à griller. Des poussins exposés expérimentalement à de l'eau contaminée par *Campylobacter* deviennent rapidement colonisés (Shanker *et al.*, 1990). Certaines études ont démontré une relation entre la colonisation de poulets et l'utilisation d'eau de puits ou d'eau non désinfectée (Kapperud *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1993). En Norvège, il est fréquent d'avoir une contamination de l'eau de surface par *Campylobacter* (Brennhovd *et al.*, 1992). Par contre, la bactérie n'a été qu'occasionnellement isolée dans l'eau distribuée aux poulets (Kapperud *et al.*, 1993). Cette différence peut être expliquée par la présence de campylobacters viables mais non cultivables dans l'eau (Pearson *et al.*, 1993) ou par une charge bactérienne trop faible pour permettre l'isolement de la bactérie (Kapperud *et al.*, 1993). Quoique le système de distribution de la nourriture puisse avoir un impact important dans la transmission rapide de la bactérie dans un lot, la nourriture n'est pas considérée comme une source d'infection d'un lot de production (Shane, 2000).

*Campylobacter* a été souvent isolé à partir d'échantillons de mouche et de coléoptère prélevés dans les fermes de poulets à griller (Rosef *et al.*, 1983; Jones *et al.*, 1991; Gregory *et al.*, 1997). Par contre, une désinfection de la surface externe des mouches éliminerait la bactérie, suggérant que les mouches seraient infectées par le lot colonisé (Jones *et al.*, 1991). *C. jejuni* a été isolé du contenu interne de certains coléoptères mais jamais avant la colonisation du lot de production (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1994). Certains auteurs considèrent la vermine comme une source d'entrée de *Campylobacter* en production de poulets à griller car la bactérie a été isolée chez des souris à l'intérieur et à l'extérieur des fermes (Annah-Prah et Janc, 1988). Des études visant à identifier des facteurs de risque ont démontré une association entre la présence de vermine dans les unités de production et la colonisation des poulets (Kapperud *et al.*, 1993). D'autres travaux n'ont par contre pas réussi à isoler *Campylobacter* à partir des souris se retrouvant dans les unités de production de poulets à griller colonisés (Gregory *et al.*, 1997; Shane, 2000). La présence de vermine, tout comme d'insectes, serait un facteur de risque important pour la propagation de la bactérie dans les lots de

production mais non une source d'introduction dans les unités de production (Gregory *et al.*, 1997). La présence d'oiseaux sauvages a aussi été associée à une augmentation de la prévalence de *Campylobacter* dans les unités de production (Berndston, 1996). Pour d'autres auteurs, la présence d'animaux d'une autre espèce que le poulet (porcs, oiseaux sauvages et autres types de volaille, animaux domestiques) sur la ferme n'était pas un facteur de risque associé à la présence de *Campylobacter* (Kapperud *et al.*, 1993) mais pourrait le devenir en absence de procédures de biosécurité appropriées et d'installations empêchant l'entrée d'animaux sauvages (Shane, 2000).

Berndston (1996) observait qu'un nettoyage et une désinfection de routine étaient suffisants pour éliminer *Campylobacter* entre deux lots de production consécutifs et que le taux de colonisation tend à augmenter avec la diminution de la période du vide sanitaire. Par contre, aucune relation entre la présence de *Campylobacter* et le nombre de jours de vide sanitaire, la routine de nettoyage et de désinfection entre les lots, le nettoyage et la désinfection des instruments ainsi que le nettoyage et la désinfection des distributeurs d'eau et de nourriture n'a été faite par Kapperud *et al.* (1993). De plus, Berndston (1996) notait une augmentation de la prévalence dans les fermes où les mesures d'hygiène étaient insuffisantes.

## **2.6. Lien entre les isolats d'origines humaine et animale**

Les campylobacters sont présents dans l'environnement et font partie de la flore normale de l'intestin de plusieurs espèces de mammifères et d'oiseaux, incluant les animaux de compagnie et de consommation (Schouls *et al.*, 2003). Les différentes études épidémiologiques cas-témoins (rétrospectives) ont permis d'identifier une multitude de facteurs de risque associés aux infections sporadiques chez l'humain (Newell et Wagenaar, 2000). Malgré une diversité importante des protocoles utilisés dans ces études, certaines sources dominantes ont été invariablement identifiées, telles la manipulation et l'ingestion de poulet, le contact avec des animaux de compagnie et l'ingestion d'eau contaminée (Friedman *et al.*, 2000). Tel que mentionné auparavant,

l'ingestion ou la manipulation de poulet insuffisamment cuit ou cru serait responsable de 50 à 70% des cas endémiques de campylobactérioses (Harris *et al.*, 1986; Deming *et al.*, 1987, Blaser, 1997). Par contre, la source d'infection de la majorité des cas sporadiques à *C. jejuni* chez l'humain demeure inconnue (Schouls *et al.*, 2003). L'une de ces études de cas-témoins comparait les habitudes alimentaires et de préparation des repas d'un groupe d'individus ayant manifesté une infection sporadique à *C. jejuni* à celles d'un groupe contrôle sans historique de diarrhée (Oosterom *et al.*, 1984). Ils notèrent une association entre les cas sporadiques et la consommation et/ou la manipulation de poulet, mais pas de bœuf ou de mouton, ni avec la présence d'animaux de compagnie. De plus, des variations saisonnières similaires de contamination des poulets à griller et de prévalence des cas humains ont été rapportées (Berndtson, 1996).

D'abord utilisées pour associer les cas infectieux à une épidémie de *Campylobacter*, les techniques de sous-typage des isolats de *Campylobacter* ont été utilisées pour identifier la source des infections sporadiques. Par contre, le niveau de discrimination de ces techniques varie beaucoup selon la littérature. Ceci expliquerait, en partie, les divergences observées dans la littérature pour le risque associé au poulet dans les cas sporadiques à *Campylobacter* chez l'humain (Newell et Wagenaar, 2000). Plusieurs études rapportent l'identification de souches clonales identiques de *Campylobacter* dans les cas sporadiques d'entérite chez l'humain et chez différents animaux de consommation, incluant le poulet (On *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2000; Fitzgerald *et al.*, 2001; Hänninen *et al.*, 2001). On *et al.* (1998) rapportaient, pour des isolats sélectionnés du *Danish zoonosis surveillance programme* et échantillonnés sur une période de 6 mois, l'identification de souches clonales identiques (PFGE avec les enzymes *SmaI*, *SalI*, *kpnI*, et *BamHI*, et sérotypage) chez l'humain, le poulet et/ou le bœuf. Des résultats similaires ont été obtenus par Nielsen *et al.* (2000) au Royaume-Uni en utilisant 6 méthodes de caractérisation génotypique et phénotypique. Dans une autre étude, Hänninen *et al.* (1998) rapportaient que 14 isolats des 176 cas sporadiques de campylobactériose chez l'humain, provenant de 2 régions de la Finlande, avaient

des profils de PFGE identiques (*SmaI* et *SacII*) à certains isolats provenant des poulets. Une autre étude effectuée par la même équipe démontrait la présence de plusieurs génotypes identiques de PFGE (*SmaI* et *SacII*) pour les isolats de cas sporadiques de diarrhée chez l'humain et ceux isolés de la viande de poulet vendue au détail (Hänninen *et al.*, 2000). Ces dernières associations ont par la suite été renforcées par l'identification de ribotypes, de profils d'AFLP et de sérotypes identiques (Hänninen *et al.*, 2001). Aux États-Unis, Fitzgerald *et al.* (2001) rapportaient des profils *fla* et de PFGE (*SmaI*) identiques pour des isolats de cas sporadiques chez l'humain et ceux de vaches, de chèvres et/ou de dindes, le poulet n'ayant pas été évalué dans cette étude. Les auteurs suggèrent par contre d'autres études pour confirmer les liens créés avec *SmaI* étant donné le faible pouvoir de discrimination de cet enzyme. Dans une étude effectuée aux Pays-Bas, incluant 184 isolats d'origine humaine, bovine et aviaire (poulet), la caractérisation par AFLP et MLST révélait une association inattendue entre les isolats d'origine humaine et bovine. Petersen *et al.* (2001) rapportaient que la majorité des isolats provenant d'animaux sauvages ne partageait pas de lien génotypique et phénotypique (typage de *fla*, PFGE avec *SmaI*, *KpnI* et *BamHI*, et sérotypage) avec des isolats d'origines humaine ou aviaire (poulet), mais que les humains partageaient plusieurs souches identiques avec les poulets.

Il est maintenant évident que plusieurs espèces d'animaux de consommation, domestiques et sauvages transportent des campylobacters dans leur tractus intestinal et que ces hôtes peuvent être un réservoir pour les souches associées aux cas humains (Sails *et al.*, 2003). Certaines souches clonales ont été identifiées dans diverses régions géographiques du globe et ont été isolées tant chez l'humain que chez diverses espèces animales. L'estimation de l'importance relative des sources potentielles pour les cas sporadiques chez l'humain s'avère donc difficile à établir.

## 2.7. Pathogénèse des entérites à *Campylobacter*

### 2.7.1. Mécanismes et facteurs de virulence

#### 2.7.1.1. Mobilité et chémotaxie

La mobilité semble être nécessaire aux campylobacters pour contrer l'effet du péristaltisme intestinal et pour la colonisation du mucus intestinal (Wassenaar et Blaser, 1999). La présence de flagelle serait obligatoire pour la colonisation ainsi que pour causer la maladie (Nachamkin *et al.*, 1993; Khoury et Meinersmann, 1995; Wassenaar et Blaser, 1999). Le flagelle de *C. jejuni* consiste en un polymère non-enveloppé de sous-unités de flagelline codées par deux gènes adjacents, *flaA* et *flaB* (Nujten *et al.*, 1990). Ces gènes montrent un degré d'identité très élevé, soit de 95% (Guerry *et al.*, 1990). Une protéine flagellaire serait l'antigène majeur reconnu par les anticorps mucosaux provenant de lavages intestinaux de souris infectées par *C. jejuni* (Wu *et al.*, 1991). Le flagelle serait de plus une cible importante du système immunitaire de l'humain lors de l'infection (Wassenaar et Blaser, 1999). Par contre, des variations antigéniques des flagelles ont été rapportées (Harris *et al.*, 1987) et l'expression des flagelles est réversible et variable (Caldwell *et al.*, 1985; Black *et al.*, 1988). L'étude de Pavlovskis *et al.* (1991), utilisant un modèle de colonisation intestinale chez le lapin, a démontré que le flagelle est important dans l'initialisation de la colonisation et provoque une immunité capable d'inhiber la colonisation. Cette réponse immunitaire n'a par contre empêché la colonisation que pour une souche du même sérotype de Lior, suggérant aux auteurs qu'un antigène protecteur majeur résiderait dans, ou sur, le flagelle des souches d'un même sérotype de Lior. Le flagelle a de plus été utilisé avec succès comme vaccin sous-unitaire chez la souris, suggérant un rôle important de cette structure dans la pathogénie (Lee *et al.*, 1999). Dans cette étude, une protéine recombinante de FlaA de *C. coli* VC167 fusionnée à la MBP (*maltose-binding protein*) de *E. coli* a provoqué une réponse immunitaire capable de protéger les animaux contre une souche hétérologue de *Campylobacter*. Plusieurs mutants ont été utilisés pour démontrer l'importance du flagelle dans la colonisation et la pathogénie de *C. jejuni* (Nachamkin *et al.*, 1993; Wassenaar *et al.*, 1993). Les gènes de la flagelline possèdent chacun leur promoteur et sont exprimés

séparément (van Vliet et Ketley, 2001). Quoique le flagelle soit composé surtout de la protéine FlaA, la protéine FlaB aurait aussi un rôle dans la fonction du flagelle (Wassenaar *et al.*, 1993).

Le déplacement des campylobacters serait dirigé par des stimuli chémotaxiques qui aideraient à la colonisation du mucus (Lee *et al.*, 1986). La chémotaxie est l'habilité à détecter puis à s'approcher ou s'éloigner de gradients chimiques particuliers (van Vliet et Ketley, 2001). Comme pour la mobilité, la chémotaxie semble être nécessaire à la colonisation de *C. jejuni* puisque des mutants non-chémotactiques (*cheY*-) démontraient un taux de colonisation moindre et provoquaient moins de signes cliniques dans des modèles animaux (Takata *et al.*, 1992). *C. jejuni* serait attiré par la mucine, la L-sérine, le L-fucose et certains composants de la bile (Hugdahl *et al.*, 1988). Un pré-traitement des cellules Hep-2 avec de la mucine augmenterait l'adhésion et l'invasion des cellules par *C. jejuni* (de Melo et Pechere, 1988). Plusieurs gènes, tels *cheY*, *cetA* et *cetB*, ont été associés au chémotaxisme chez *C. jejuni* (Golden et Acheson, 2002).

#### **2.7.1.2. Adhésion aux cellules épithéliales**

L'adhésion de la bactérie à la surface de la muqueuse intestinale semble être une étape initiale dans la pathogénie de *C. jejuni* et est un prérequis à la colonisation chez l'humain (Wallis, 1994; Prasad *et al.*, 1996). Elle serait la résultante de deux étapes (Wallis, 1994). D'abord, l'adhésion serait non spécifique et réversible par l'action de saccharides de surface puis, elle deviendrait irréversible par l'union d'une ou plusieurs adhésines à des récepteurs cellulaires.

L'adhésion de *C. jejuni* à diverses lignées cellulaires *in vitro* est un phénomène très documenté. Plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées tant pour évaluer l'adhésion que l'invasion. L'une des lignées dont l'utilisation est des plus documentée est la lignée INT-407 (Newell *et al.*, 1985; McSweegan *et al.*, 1987; Konkel et Cieplak, 1992; Konkel *et al.*, 1992b et 1992c). Cette lignée est issue de cellules intestinales humaines et possède des microvillies (Wooldridge et Ketley, 1997). Selon Newell *et al.* (1984), *C. jejuni* adhérerait davantage à ces cellules. La lignée Caco-2 est aussi issue de cellules intestinales humaines (Wooldridge et Ketley, 1997). Ces cellules polarisées de carcinome possèdent des surfaces apicale et basolatérales, des jonctions intercellulaires, des microvillies, une bordure en brosse et des enzymes à la surface apicale (Finlay et Falkow, 1990; Wooldridge et Ketley, 1997). Elle est surtout utilisée pour les études portant sur la translocation de l'épithélium par *C. jejuni*. Les lignées HEP-2 (Lindblom et Kaijser, 1995; Tay *et al.*, 1996) et HeLa (Pei *et al.*, 1998), toutes deux dérivées de cellules épithéliales non intestinales et non différenciées, ont aussi été grandement utilisées.

Le taux d'adhésion de *C. jejuni* aux cellules HeLa a d'abord été associé à la sévérité de la maladie chez l'humain (Fauchere *et al.*, 1986). Il est maintenant accepté que près de la totalité des campylobacters d'origines humaine et animale adhèreraient aux cellules épithéliales dans des conditions *in vitro* (Konkel et Joens, 1989; Kervella *et al.* 1993; Biswas *et al.*, 2000; Konkel *et al.*, 2000). Par contre, Prasad *et al.* (1996) notaient que certains *C. jejuni* d'origine aviaire n'adhéraient pas aux cellules HeLa. L'adhésion n'impliquerait pas la synthèse *de novo* de protéines lors du contact cellulaire car des campylobacters non viables adhéraient toujours aux cellules (Konkel *et al.*, 1992b). *C. jejuni* adhèrerait aussi bien aux lignées d'origine humaine (INT-407, Hep-2, HeLa, 203 et CaCo-2) qu'aux lignées d'origine animale (Vero, CHO-K1 et MDCK) (Konkel *et al.*, 2000). Le taux d'adhésion (proportion de l'inoculum ayant adhéree aux cellules) se situe généralement entre 0,02 à 2% dans des conditions *in vitro* (Biswas *et al.*, 2000). L'adhésion serait d'ailleurs saturable atteignant un maximum après 30 minutes d'incubation (Konkel *et al.*, 1992c). *C. jejuni* se lierait

préférentiellement à des récepteurs cellulaires se retrouvant en périphérie de jeunes cellules INT-407 (Konkel *et al.*, 1992c).

### 2.7.1.3. Invasion des cellules épithéliales

L'invasion des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale est maintenant reconnue comme un mécanisme important dans la virulence de plusieurs entéropathogènes tels *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Listeria monocytogenes* et les *E. coli* entéroinvasifs (Vazquez-Torres et Fang, 2000). Les résultats obtenus à partir de biopsies du colon d'humains (van Spreedwell *et al.*, 1985), d'infections expérimentales chez de jeunes macaques (Russell, 1983) et de d'autres modèles animaux (Newell et Pearson, 1984; Ruiz-Palacios *et al.*, 1992) ont démontré que *Campylobacter* était capable d'envahir les cellules épithéliales de l'intestin dans des conditions *in vivo*. Dans le modèle animal utilisant les jeunes macaques, cette invasion cellulaire a engendré des effets cytopathiques et a endommagé la muqueuse du colon suggérant que l'invasion ait un rôle dans l'inflammation et la diarrhée (Russell, 1993). L'habileté de *C. jejuni* à envahir, survivre et se répliquer dans les cellules épithéliales en conditions *in vitro* est maintenant bien établie (Konkel *et al.*, 2000) et refléterait l'habileté d'envahir les cellules intestinales *in vivo* (Everest *et al.*, 1992; Konkel *et al.*, 1992c; Kervella *et al.*, 1993; Ketley, 1995; Biswas *et al.*, 2000).

L'habileté de *C. jejuni* à envahir les cellules épithéliales diffère selon les souches (Everest *et al.*, 1992) et pour une même souche, diffère selon les lignées cellulaires utilisées puisque l'invasion est plus efficace dans des lignées d'origine humaine (Konkel et Ciaplak, 1992). Everest *et al.* (1992) rapportaient que les souches isolées de diarrhées inflammatoires et sanguinolentes chez l'humain étaient plus invasives que celles provenant de diarrhées non inflammatoires tandis que d'autres auteurs ne notaient pas de différence dans la capacité d'invasion de ces deux types d'isolats (Tay *et al.*, 1996). Par contre, d'autres études ont démontré que les isolats de cas de diarrhée chez l'humain étaient plus invasifs que les isolats de cas asymptomatiques

chez l'humain, les isolats d'origine animale, incluant le poulet, et les isolats d'origine environnementale (Newell *et al.*, 1985; Konkel et Joens, 1989; Ruiz-Palacios *et al.*, 1992; Prasad *et al.*, 1996; Biswas *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001).

L'une des premières études sur l'habileté d'invasion des campylobacters indiquait que ces bactéries étaient capables d'envahir les cellules épithéliales mais seulement en présence d'autres entéropathogènes invasifs tels *Salmonella* et *Shigella* (Bukholm et Kapperud, 1987). Par contre, il a été clairement démontré depuis que *Campylobacter* était capable d'envahir seul les cellules épithéliales (de Melo *et al.*, 1989; Konkel et Joens, 1989; Everest *et al.*, 1992; Prasad *et al.*, 1996; Tay *et al.*, 1996). Par contre, le niveau d'invasion peut être augmenté en présence de mucine (de Melo *et al.*, 1989) ou lors de co-infection avec des entérovirus (Konkel et Joens, 1989). Le taux d'invasion des souches de *C. jejuni* dans des tests *in vitro* varierait de 0,5 à 5% de l'inoculum (Hu et Kopecko, 2000). Biswas *et al.* (2000) notaient que 6% des isolats d'origines humaine et aviaire étaient faiblement invasifs ( $<10^2$  CFU ou  $<0,0025\%$  de l'inoculum), 9% fortement invasifs ( $>10^5$  CFU ou  $>0,20\%$  de l'inoculum) et que le reste des isolats étaient moyennement invasifs ( $10^3$  à  $10^4$  CFU ou 0,0025 à 0,18% de l'inoculum). Par contre, le taux d'invasion de *C. jejuni* 81-176, une souche largement caractérisée provenant d'un cas de diarrhée inflammatoire chez l'humain, est variable selon les travaux, indiquant que la comparaison des taux d'invasion entre les laboratoires est difficile étant donné la diversité des protocoles utilisés (Konkel *et al.*, 2000).

Les isolats cliniques frais seraient plus invasifs tandis que les passages *in vitro* et l'entreposage des souches par congélation réduiraient le pouvoir d'invasion et/ou le pouvoir pathogénique des souches (Konkel et Joens, 1989; Konkel *et al.*, 1990; Babakhani et Joens, 1993). Plusieurs auteurs ont démontré que des passages intra-péritonéaux, intestinaux, dans des cellules intestinales primaires ou dans des embryons

de poussin restauraient le potentiel d'invasion perdu en conditions *in vitro* (Field *et al.*, 1991; Saha *et al.*, 1991; Babakhani et Joens, 1993; Fernandez *et al.*, 2000).

L'invasion serait impliquée dans l'initiation de l'inflammation, souvent rencontrée lors d'infection à *C. jejuni*, puisque l'invasion des cellules serait requise pour l'induction de plusieurs marqueurs d'inflammation, tel l'interleukine 8, une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par la cellule envahie (Everest *et al.*, 1993 et Hickey *et al.*, 2000). La pénétration et la translocation des tissus intestinaux sous-épithéliaux ont aussi été démontrées pour *Campylobacter* (Everest *et al.*, 1992, Konkel *et al.*, 1992d). La translocation est un mécanisme de virulence utilisé par plusieurs entéropathogènes, tels *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* et *Listeria* pour se disséminer dans l'hôte (Finlay et Falkow, 1997). Quoique la route paracellulaire ait été rapportée, *C. jejuni* utiliserait la route intracellulaire (transcytose) pour la translocation (Bras et Ketley, 1999). Tout comme pour l'invasion, la translocation demanderait la participation du flagelle et la synthèse *de novo* de protéines.

Malheureusement, les conditions optimales pour démontrer le pouvoir d'adhésion et d'invasion des campylobacters dans des conditions *in vitro* sont encore inconnues. Une adhésion et une invasion optimales ont été observées avec des cellules INT-407 de 24 heures incubées à 37°C, tandis que des baisses significatives furent observées pour des cultures de 72 heures et des cultures de 24 heures incubées à 42°C (Konkel *et al.*, 1992b). L'expression de certains gènes, tel *flaB*, peut être modulée par la température, le pH et le niveau de cations bivalents (Alm et Guerry, 1993). L'invasion peut être augmentée en cultivant les bactéries avec de la mucine (de Melo et Perchere, 1990) ou du déoxycholate (Doig *et al.*, 1996). Plusieurs autres facteurs peuvent affecter l'invasion cellulaire dans des conditions *in vitro*. L'utilisation de culture cellulaire semi confluite semble permettre un taux d'invasion optimal tandis que des cultures confluentes, ou plus différenciées dans le cas des cellules CaCo-2, abaissent considérablement l'invasion (Hu et Kopecko, 2000). De plus, le taux

d'invasion semble être affecté par l'inoculum car de l'autoagglutination a été observée lors de forte densité de *C. jejuni* 81-176 (Misawa et Blaser, 2000). Des études sur la cinétique de l'invasion de *C. jejuni* 81-176 dans les cellules INT-407 ont démontré que la bactérie était plus efficace (% de l'inoculum ayant envahie les cellules) pour envahir les cellules épithéliale lorsque le nombre de bactérie par cellule était faible lors de l'infection (0,02 bactérie/cellule) (Hu et Kopecko, 2000). Ceci suggèrerait que *C. jejuni* serait un envahisseur solitaire (Hu et Kopecko, 2000). Dans cette même étude, les auteurs ont observé une invasion cellulaire après seulement 10 minutes d'incubation. Malgré que le nombre de bactéries intracellulaires augmente jusqu'à la fin de leur expérience, soit après 2 heures, le taux d'invasion était maximal pour les premières 90 minutes (Hu et Kopecko, 2000). L'invasion de *C. jejuni* 81-176 serait donc très efficace mais saturable car Hu et Kopecko (2000) observèrent que seulement 66% des cellules INT-407 étaient envahies après deux heures d'incubation et que les cellules ne comportaient pas plus que 2 bactéries. Par contre, Kopecko *et al.* (2001) rapportaient avoir observé en microscopie électronique plus de 7 à 20 bactéries de *C. jejuni* par cellule Caco-2, mais que seulement 5% de la monocouche cellulaire étaient fortement envahie.

#### 2.7.1.4. Mécanismes d'invasion

Les mécanismes utilisés par *Campylobacter* pour envahir les cellules épithéliales ne sont pas encore compris aujourd'hui. Par contre, contrairement à l'adhésion, l'invasion serait un processus actif dépendant de la synthèse *de novo* de protéines bactériennes lors du contact cellulaire et de signaux de transduction de la cellule hôte (Wooldridge *et al.*, 1996; Konkel *et al.*, 1999). Il a été démontré que *C. jejuni* produisait et sécrétait au moins 14 nouvelles protéines, dont huit protéines immunogènes de 12,8 à 108 kDa (CiaA à CiaH pour *Campylobacter Invasive Antigen*), lorsque la bactérie est cultivée avec des cellules INT-407 (Konkel *et al.*, 1999). La présence de cellules hôtes viables ne serait pas nécessaire pour la production de ces protéines puisqu'elles ont été produites lorsque *C. jejuni* a été cultivé dans des milieux contenant du sérum fœtal bovin ou du déoxycholate de sodium

(Rivera-Amill *et al.*, 2001). Un antisérum dirigé contre ces protéines et la mutation du gène *ciaB* ont inhibé l'invasion tout en n'affectant pas l'adhésion (Konkel *et al.*, 1993 et 1999). D'ailleurs, la mutation de *ciaB* a inhibé la production de toutes les autres protéines (Konkel *et al.*, 1999). La protéine CiaB posséderait des similarité dans sa séquence d'acides aminés avec SipB de *Salmonella*, IpaB de *Shigella* et YopB de *Yersinia*, toutes impliquées dans des systèmes de sécrétion de type III (Konkel *et al.*, 1999). De plus, le transfert de la protéine CiaB à l'intérieur des cellules INT-407 a été observée par microscopie confocal à fluorescence (Hu et Kopecko, 2000). Puisque aucun gène analogue ou homologue à un appareil de sécrétion de type III conventionnel dans la séquence génomique de *C. jejuni* NCTC 11168 n'a été identifié. Rivera-Amill *et al.* (2001) suggéraient que la ou les protéines Cia soient sécrétées par un appareil flagellaire de sécrétion, tel que décrit pour *Yersinia*.

Certains mécanismes de la cellule hôte seraient impliqués dans l'internalisation de *C. jejuni*. L'utilisation d'inhibiteurs de protéines kinases de la cellule hôte, telle que la tyrosine kinase, démontrait que la phosphorylation de protéine est importante pour l'invasion (Wooldridge et Ketley, 1997). Les résultats d'études sur les mécanismes moléculaires de l'invasion suggèrent que *C. jejuni* envahirait les cellules épithéliales en interagissant avec les microfilaments, les microtubules, avec les deux ou encore avec aucun de ces deux filaments du cytosquelette de la cellule hôte (Hu et Kopecko, 2000). Ces différences peuvent être attribuées à l'utilisation de multiples lignées cellulaires, protocoles et/ou souches. Hu et Kopecko (2000) observaient, par microscopie confocal à immunofluorescence, une extension tubulaire de la membrane cellulaire (pseudopode) dirigée par un ou quelques microtubules lors du premier contact de la bactérie avec les cellules INT-407. Ensuite, l'invasion se ferait par invagination de la membrane cellulaire et la bactérie serait transportée de la région périphérique jusqu'à la région périnucléaire dans sa vacuole le long des microtubules (Hu et Kopecko, 2000). Selon Biswas *et al.* (2000), qui a aussi observé la présence de pseudopodes cellulaires, l'expression de ces derniers serait stimulée par les bactéries.

Il est intéressant de noter que, jusqu'à maintenant, les études utilisant la mutagenèse aléatoire n'ont identifié que des gènes associés à la mobilité (*flaA*, *flaB*, *pflA*, *cheY*) comme déterminants génétiques impliqués dans l'invasion (Parkhill *et al.*, 2000). De plus, aucun gène de la séquence génomique de *C. jejuni* n'a été clairement associé à un processus d'invasion connu (Parkhill *et al.*, 2000).

#### 2.7.1.5. Adhésines et/ou invasives

Plusieurs adhésines semblent être responsables de l'adhésion des campylobacters aux cellules épithéliales. Ces protéines seraient synthétisées de façon constitutive puisque des bactéries chauffées ou inactivées adhèrent quand même aux cellules épithéliales (Konkel et Cieplak, 1992). Ces bactéries inactivées ou mortes n'envahissaient par contre plus les cellules, indiquant que l'invasion est un processus demandant de l'énergie (Konkel et Cieplak, 1992). Des protéines de la membrane externe et du flagelle, ainsi que des lipopolysaccharides, ont été proposés comme adhésine (Moser *et al.*, 1997). Newell *et al.* (1984) proposaient la présence d'une adhésine flagellaire car des mutants non mobiles par paralysie des flagelles adhéraient davantage aux cellules INT-407 que des mutants non mobiles par l'absence de flagelle. Contrairement à ces travaux, d'autres auteurs rapportaient que l'adhésion était peu réduite par la perte de la mobilité due à une paralysie ou une absence du flagelle mais que l'invasion y était fortement affectée, et cela même si les bactéries non mobiles étaient centrifugées sur les cellules (Grant *et al.*, 1993; Yao *et al.*, 1994). Le flagelle serait donc impliqué en partie dans l'adhésion mais d'autres adhésines (ou invasives) seraient nécessaires à l'invasion (Yao *et al.*, 1994). Par contre, des anticorps dirigés contre les flagelles n'affectaient pas l'adhérence de *C. jejuni* aux cellules INT-407, indiquant que le flagelle n'aurait pas un rôle important dans l'adhésion *in vitro* (Wassenaar *et al.*, 1991). Les résultats d'analyses en microscopie électronique et le fait que *C. jejuni* envahi davantage dans des cultures semi-confluentes indiquent que les récepteurs de la cellule hôte permettant l'invasion seraient situés basolatéralement durant la différenciation cellulaire (Hu et Kopecko, 2000).

Le flagelle et/ou la mobilité serait essentielle à l'invasion:

- par la possession d'un ligand flagellaire,
- pour permettre l'accès aux récepteurs cellulaires séquestrés ou en faible nombre,
- pour permettre l'orientation efficace de la bactérie et favoriser l'association de ligands polaires de la bactérie aux récepteurs cellulaires (Hu et Kopecko, 2000),
- pour permettre l'injection de protéines dans les cellules hôtes (Rivera-Amill *et al.*, 2001).

Plusieurs protéines de la membrane externe (25 à 42 Kda) ayant un rôle potentiel dans l'adhésion ont été isolées et caractérisées. Pei *et al.* (1991) ont caractérisé et purifié quatre protéines (PEB1 à PEB4) dans le but de créer un vaccin sous-unitaire. PEB1, une adhésine potentielle de 28 KDa, était reconnue par le sérum de 80% des patients en phase de convalescence de *C. jejuni* (Pei *et al.*, 1991). Kervella *et al.* (1993) observaient par la suite deux protéines de 27 et 29 kDa ayant un rôle possible dans l'adhésion, soit CBF1 (pour *Cell Binding Factor*) et CBF2, respectivement. Il a été démontré que CBF1 adhérait aux cellules HeLa (de Melo et Perchere, 1990), que cette adhésion pouvait être éliminée par des anticorps spécifiques et que CBF1 était identique à PEB1 (Kervella *et al.*, 1993). L'inactivation du locus *peb1A* codant pour PEB1 (ou CBF1) a réduit l'adhérence de *C. jejuni* par un facteur de 50 à 100, l'invasion par un facteur de 15 et le taux et la durée de la colonisation intestinale chez la souris (Pei *et al.*, 1998). Une autre protéine, CadF, a été proposée comme adhésine potentielle liant la fibronectine (Konkel *et al.*, 1997). Des mutants *cadF* étaient incapables de lier la fibronectine et de coloniser des poussins de 1 jour (Ziprin *et al.*, 1999). Cette protéine de 37 kDa pourrait être la protéine PEB3 de Pei *et al.* (1991). Plusieurs autres adhésines potentielles de la membrane externe ont été rapportées dont des protéines de 26 à 42 kDa et des lipopolysaccharides (Fauchere *et al.*, 1986; McSweegan et Walker, 1986; de Melo et Perchere, 1990; Konkel *et al.*, 1990; Doig *et al.*, 1996). Récemment, Jin *et al.* (2001) rapportaient que la mutation du gène *jlpA*

codant pour une lipoprotéine de surface de 42,3 kDa inhibait l'adhésion de *Campylobacter*.

Certains chercheurs démontraient la production de structures ressemblant à des frimbriaes lorsque *C. jejuni* était cultivé en présence de sels biliaires (Doig *et al.*, 1996). Un mutant sans frimbriae ne démontrait aucune diminution de l'adhésion et de l'invasion des cellules INT-407 et de la colonisation du furet mais démontrait une réduction des symptômes dans ce modèle animal (Doig *et al.*, 1996). Par contre, aucun gène associé à des frimbriaes n'a encore été identifié dans la séquence du génome de *C. jejuni* NCTC 11168 (van Vliet et Ketley, 2001). De plus, Gaynor *et al.* (2001) ont démontré que ces appendices étaient un artéfact causé par la présence de sels biliaires dans le milieu de croissance bactérienne.

Une pré-incubation des cellules Hep-2 avec des lysats de bactérie inhibait, par compétition, l'invasion tout en affectant très peu l'adhésion (Konkel et Joens, 1989). Ceci suggère qu'il existe peut-être un récepteur cellulaire associé à l'invasion mais pas pour l'adhésion ou que la ou les adhésines ne sont pas exprimées lors de culture bactérienne conventionnelle. La comparaison des profils protéiques de souches invasives à ceux de souches non invasives de *C. jejuni* a permis de démontrer qu'il existe un antigène relié à l'invasion (Konkel *et al.*, 1990). Les anticorps monoclonaux créés à partir de cet antigène étaient dirigés contre deux épitopes spécifiques aux *C. jejuni* invasifs. L'un des deux épitopes se situaient sur la surface bactérienne et l'autre sur le flagelle. Par contre, l'invasion n'était pas complètement bloquée lors de la saturation des sites avec des anticorps monoclonaux suggérant la présence de plusieurs récepteurs cellulaires pour l'invasion. Selon le traitement chimique de cet antigène, il serait de nature glycoprotéique. D'autres protéines immunogènes associées à l'invasion (CiaA à CiaH) ont été discutées auparavant. Carvalho *et al.* (2001) rapportaient une forte corrélation entre le phénotype invasif des isolats de cas de

diarrhée chez l'humain et la présence d'un profil particulier de RAPD incluant une région de 1,6 kb nommée par les auteurs IAM pour *Invasive Associated Marker*.

#### 2.7.1.6. Production de toxines

Les symptômes reliés à la diarrhée causée par *Campylobacter*, tels qu'une diarrhée liquide transitoire suivie par une diarrhée sanguinolente, suggèrent la présence de toxines (Pickett, 2000). Malgré qu'il existe beaucoup de travaux autour de la production de toxines, les connaissances sur les toxines de *C. jejuni* sont encore très limitées. Pour la détection d'activité toxique, diverses souches ont été cultivées dans des conditions variées et ont été utilisées dans divers tests *in vitro*, rendant difficile la comparaison entre les études. Pour *C. jejuni*, plusieurs groupes de recherche ont rapporté la présence d'entérotoxines, de cytotoxines ou des deux (Wassenaar, 1997). À l'exception de la toxine CDT (CytoDistending Toxin), les gènes codant pour des toxines n'ont pas été identifiés. La séquence génomique de *C. jejuni* NCTC 11168 contient seulement les gènes *cdt*, deux gènes contenant des domaines d'hémolysine et une phospholipase (*pldA*) responsable de l'activité hémolytique précédemment rapportée pour *C. jejuni* (van Vliet et Ketley, 2001). Une revue des différentes toxines observées pour *C. jejuni* a été faite par Wassenaar (1997) et mise à jour par Pickett (2000).

D'une part, étant donné la présence de diarrhée liquide associée à *C. jejuni*, plusieurs équipes ont cherché la présence d'entérotoxines. Le groupe des entérotoxines, représenté surtout par la toxine de *Vibrio cholerae* (CT) et la toxine labile de *E. coli* (LT), renferme des protéines sécrétées ayant la capacité de se lier à un récepteur cellulaire (GM1), d'entrer dans la cellule et de permettre l'augmentation du taux intracellulaire d'AMP cyclique (Wassenaar, 1997). La diarrhée liquide est la résultante de changements de flux ioniques causant la sécrétion excessive de fluide. L'activité des entérotoxines peut être démontrée *in vitro* par l'élongation des cellules CHO, l'arrondissement des cellules Y-1, en mesurant le taux d'AMPc dans les cellules

impliquées et/ou en détectant l'entérotoxine dans des tests ELISA utilisant le GM1 ou des anticorps spécifiques. Vers la fin des années 80, beaucoup de travaux rapportaient la production d'activités entérotoxiques par *Campylobacter* dont une possédant un lien antigénique avec celle de *Vibrio cholerae* (Klipstein et Engbert, 1985; Baig *et al.*, 1986). Une entérotoxine aurait été isolée chez des souches de *C. jejuni* causant une diarrhée liquide de type *Cholera* (Johnson et Lior, 1984; Black *et al.*, 1988). Bukholm et Kapperud (1987) rapportaient que près de 50% des isolats de *C. jejuni* provenant de cas cliniques frais étaient positifs au test ELISA utilisant le ganglioside GM1. Par contre, plus de 15 ans plus tard, l'existence de ces entérotoxines n'a pas encore été confirmée (Ketley, 1997). Cette hypothèse est d'ailleurs très controversée et n'est plus très répandue aujourd'hui (Wooldridge et Ketley, 1997) car beaucoup de laboratoires ont été incapables de démontrer une activité entérotoxique associée avec des souches de *C. jejuni* et de plus, aucun gène codant pour une toxine similaire à celle de *V. cholerae* n'a été découvert ou identifié dans la séquence génomique de *C. jejuni* NCTC 11168 (Pickett, 2000). Les diverses données supportant la présence d'activités entérotoxiques et celles qui ont mené à la controverse ont été révisées par Wassenaar (1997), et ne seront pas répétées dans cette thèse.

Les cytotoxines sont des protéines tuant les cellules cibles, entre autres, en inhibant la synthèse protéique (ex.: shiga-toxines de *E. coli*), en inhibant la formation de filament d'actine (ex.: toxines A et B de *Clostridium difficile*) ou en formant des pores (ex.: hémolysine alpha de *E. coli*) (Wassenaar, 1997). Les shiga-toxines (aussi nommées vérotoxines) inhibent la synthèse protéique en inactivant les ribosomes (dépurination d'un nucléotide de l'ARNr 28S). Les lignées cellulaires Vero et HeLa sont sensibles aux vérotoxines tandis que les cellules CHO ne possèdent pas le récepteur Gb3 pouvant lier la sous-unité B des shiga-toxines (Wassenaar, 1997). Les toxines de *Clostridium difficile* causent la rupture du cytosquelette d'actine de la cellule en modifiant les liens covalents des protéines Rho (Wassenaar, 1997). Ces toxines causent l'arrondissement des cellules CHO et de plusieurs autres lignées cellulaires. Les porines, ou hémolysines, causeront un large spectre de réactions

secondaires telles le relâchement de cytokines, le dysfonctionnement du cytosquelette, la sécrétion de constituants granulaires et la génération de médiateurs lipidiques. Wassenaar (1997) a proposé une classification des activités cytotoxiques rapportées pour *Campylobacter*. L'auteur proposait l'existence de six cytotoxines selon la spécificité des lignées cellulaires *in vitro*, et lorsque possible, selon le poids moléculaire:

- Une cytotoxine de 70 kDa active sur cellules HeLa, CHO et autres lignées cellulaires mais pas sur cellules Vero
- Une cytotoxine active sur cellules Vero et HeLa
- La toxine CDT
- Une cytotoxine neutralisée par les antitoxines Stx
- Une cytotoxine avec une activité hémolytique
- Une hépatotoxine.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous attarderons à la cytotoxine de 70 kDa, la cytotoxine active sur cellule Vero et la toxine CDT. Les activités de la cytotoxine « *Stx-like* » et de l'hépatotoxine de *Campylobacter* sont peu caractérisées alors que l'hémolyse ne sera pas évaluée dans ce projet.

Plusieurs auteurs rapportent plus d'une activité cytotoxique pour *Campylobacter* (Johnson et Lior, 1986 ; Misawa *et al.*, 1995 ; Schulze *et al.*, 1998). Malgré la classification faite par Wassenaar (1997), la toxine dite de 70 kDa aurait, selon les travaux, un poids moléculaires variant de 30 à 70 kDa (Pickett, 2000). Elle serait active sur cellule HeLa, CHO, Hep-2, INT-407 et sur d'autres lignées cellulaires mais inactive sur cellule Vero. Les cellules affectées deviennent rondes et meurent (Pickett, 2000). La toxine serait sensible à la chaleur et à la trypsine. Par contre, Wassenaar (1997) considère la sensibilité à la chaleur comme un critère peu fiable étant donné qu'elle varie selon la pureté des préparations. De plus, cette toxine ne serait pas neutralisée par des antitoxines anti-Stx ou anti-*Clostridium*. L'expression de cette

activité cytotoxique serait perdue après des passages *in vitro* (Pang *et al.*, 1987 ; Daikoku *et al.*, 1989) et après un entreposage d'une année à -70°C (Florin et Antillon, 1992). Les titres observés varient selon les travaux et, dans la majorité des cas, sont bas (Pickett, 2000). Par contre, une augmentation de cette activité cytotoxique a été obtenue après un traitement de la culture bactérienne avec de la polymyxine B (Johnson et Lior, 1984 et Guerrant *et al.*, 1987). La polymyxine B est un peptide polycationique de 1200 Da utilisée comme antimicrobien. Le mécanisme exact de la polymyxine B est méconnu (Wiese *et al.*, 1998). Elle agirait en premier lieu en se liant aux LPS, augmentant la perméabilité de la membrane externe à diverses molécules du milieu et du périplasme (Daugelavicius *et al.*, 2000). Il a été proposé dans quelques études que la cytotoxine de 70 KDa soit associée aux membranes bactériennes (Pickett, 2000). Par contre, puisque la cytotoxine de 70 kDa n'est toujours pas identifiée, les activités lui étant attribuées par Wassenaar (1997) et Pickett (2000) peuvent être la résultante de diverses cytotoxines.

Quelques auteurs ont observé une activité cytotoxique active sur cellule Vero (Wassenaar, 1997). Dans ces cas, les cellules Vero étaient plus sensibles que les cellules HeLa dans les tests cytotoxiques (Johnson et Lior, 1984 et 1986; Florin et Antillon, 1992). Par contre, pour d'autres auteurs, les cellules HeLa étaient plus sensibles (Klipstein *et al.*, 1985b; Akhtar et Huq, 1989). Comme pour la toxine de 70 KDa, la toxine active sur cellules Vero ne serait pas neutralisée par les antitoxines anti-Stx et anti-*Clostridium* (Wassenaar, 1997), causerait l'arrondissement et la mort des cellules, et les titres observés seraient faibles (Pickett, 2000). Lee *et al.* (2000) rapportaient une activité cytotoxique active sur diverses lignées cellulaires incluant les cellules Vero. Cette activité a été associée à une protéine supérieure à 50 kDa liée à la membrane et dont l'incidence serait supérieure pour des isolats d'origine humaine que d'origine aviaire. Par contre, la réponse des cellules Vero à cette cytotoxine était plus faible et plus variable que celle des autres lignées cellulaires.

La production de CDT a été rapportée pour la première fois par Johnson et Lior (1988), nommée à l'époque CLDT pour *Cytolytic Distending Toxin*. La CDT cause une distension progressive des cellules, plus de 10 fois la surface des cellules contrôles, puis la mort des cellules CHO, HeLa, Vero, Hep-2 et CaCo-2 après 72-96 heures (Bang *et al.*, 2001). Elle est inactive sur les cellules Y-1. Dans les premières 48 heures, la toxine cause une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc et l'élongation des cellules CHO. À ce point, elle ne peut être généralement différenciée d'une entérotoxine (Johnson et Lior, 1988; Florin et Antillon, 1992). Comme pour l'invasion, cette activité a été observée sur des cellules fraîches tandis qu'elle sera absente sur des cultures cellulaires confluentes (Pickett, 2000). La toxine CDT serait sensible à la chaleur et aux protéases, non dialysable et son activité serait stable après plusieurs passages *in vitro* de la bactérie (Pickett, 2000). Selon Johnson et Lior (1988), la production de CDT n'aurait aucune relation avec le sérotype, le biotype ou le pays d'origine des isolats. Comme pour *E. coli*, trois gènes structuraux, *cdtA*, *cdtB* et *cdtC*, sont nécessaires à l'activité cytotoxique (Pickett *et al.*, 1996). Ces gènes sont similaires à ceux d'*E. coli* mais les séquences en acides aminés divergent significativement. Par contre, le poids moléculaire des protéines est similaire à celles d'*E. coli*. Les gènes *cdt* semblent présents chez toutes les souches de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* (Pickett, 2000). Auparavant, l'incidence rapportée d'isolats exprimant CDT était de moins de 40% (Johnson et Lior, 1988; Schulze *et al.*, 1998; Florin et Antillon, 1992). Les études récentes démontrent par contre une incidence élevée, quoique les titres soient très variables (Pickett *et al.*, 1996; Eyigor *et al.*, 1999; Bang *et al.*, 2001). L'augmentation du taux d'observation de l'activité CDT serait attribuable à l'amélioration des tests *in vitro* (Bang *et al.*, 2001). La toxine CDT causerait un blocage permanent dans la phase G2 du cycle cellulaire, empêchant ainsi la mitose (Whitehouse *et al.*, 1998). Comme pour l'invasion, il a été démontré que la toxine CDT de *C. jejuni* était capable d'induire la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales (Hickey *et al.*, 2000). La structure de l'holotoxine de CDT n'est pas encore déterminée (Pickett, 2000). Par contre, les trois protéines semblent être présentes. La toxine CDT serait associée aux membranes bactériennes et n'a jamais été observée en état soluble dans les surnageants de culture cellulaire, indiquant que l'activité observée

dans les surnageant serait attribuable à des particules membranaires contenant la toxine CDT (Pickett, 2000). D'ailleurs, les tests utilisant les cellules HeLa et effectués avec des sonicats de bactéries ont été plus sensibles que celui de Johnson et Lior (1988) effectué avec des surnageants de culture bactérienne. Il suffirait d'une période d'incubation courte de 5 minutes avec des sonicats pour engendrer, quelques jours plus tard, les effets attribués à la CDT (Hanel *et al.*, 1998). De plus, il a été démontré que certains isolats produisaient simultanément des lésions CLDT (CDT), causant l'élongation des cellules, et CLRT (*CytoLethal Rounding Toxin*) causant l'arrondissement des cellules (Schulze *et al.*, 1998).

Pour finir, certaines porines ont été proposées. Bacon *et al.* (1999) ont identifié et purifié une porine contenant des lipopolysaccharides causant l'arrondissement des cellules en 24-48 heures. De plus, l'une des protéines majeures de la membrane externe de *C. jejuni* serait une porine de 43 kDa, classée dans la famille des porines trimériques (Bolla *et al.*, 1995).

Il a été démontré que la production et la détection des cytotoxines étaient grandement influencées par les conditions de culture et les tests utilisés (Johnson et Lior, 1988; Misawa *et al.*, 1994 et 1995). Il existe plusieurs protocoles dérivés de celui de Johnson et Lior (1986) pour détecter l'activité cytotoxique des isolats de *Campylobacter*. Brièvement, les surnageants de culture ou les extractions de polymyxine B dilués en série sont ajoutés à des cellules épithéliales préalablement adhérees (1 à 4 heures) au puits. À l'inverse, l'ajout des cellules aux surnageants ou aux extractions de polymyxine B préalablement diluées augmenterait la sensibilité de la technique (Mcfarland et Neill, 1992). Le titre de l'activité cytotoxique est généralement identifié lorsque, par observation microscopique, plus de 50% des cellules sont mortes (coloration vitale au bleu Trypan) ou démontrent les changements morphologiques recherchés. Pour contrer la subjectivité, Coote et Arain (1996) ont adapté un test colorimétrique MTT (*Mitochondrial Test*). Ce test permet la

quantification de l'activité cytotoxique des extractions de campylobacters et utilise le réactif (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Ce dernier est transformé en formazan, un pigment bleu, par les mitochondries des cellules vivantes. Selon les auteurs, ce test serait aussi sensible que la coloration au bleu Trypan et serait facilement quantifiable (Coote et Arain, 1996). Il serait par contre moins sensible pour identifier les différents changements morphologiques observés par Johnson et Lior (1986) puisque les surnageants de culture ne produisaient pas de cytotoxicité (Wassenaar, 1997).

L'incidence de l'activité cytotoxique a été déterminée et comparée aux manifestations cliniques chez l'humain (Wassenaar, 1997). Une forte corrélation a été observée entre la production de cytotoxine active sur cellules Vero et HeLa et des diarrhées inflammatoires (Klipstein *et al.*, 1985b). Perez-Perez *et al.* (1989), rapportaient une plus forte incidence de cytotoxicité, probablement reliée à la cytotoxine de 70 Kda, chez des patients souffrant de diarrhées inflammatoires. Par contre, d'autres travaux rapportaient de faibles corrélations entre la production de toxines et les manifestations cliniques (Florin et Antillon, 1992). Comme pour l'invasion, une incidence plus élevée d'isolats cytotoxiques pour les cellules HeLa a été rapportée pour les cas de diarrhée chez l'humain lorsque comparés à des isolats d'humains porteurs asymptomatiques, d'origine aviaire (Akhtar et Huq, 1989) et d'origine environnementale (Newell *et al.*, 1985). Par contre, Misawa *et al.* (1995) n'ont noté aucune différence de cytotoxicité entre des isolats d'origines animale et humaine. Prasad *et al.* (1996) ne rapportaient une activité cytotoxique que pour trois isolats de *C. jejuni* provenant de cas de diarrhées inflammatoires, un isolat de cas de diarrhées liquides ou sécrétrices, mais pour aucun des isolats d'origine aviaire. Le taux d'isolats cytotoxiques provenant de cas de diarrhée chez l'humain varierait de 48 à 81% (Goosens *et al.*, 1985; Johnson et Lior, 1986; Pang *et al.*, 1987; Bok *et al.*, 1991). L'incidence de production de cytotoxine (Wassenaar, 1997) et de CDT (Purdy *et al.*, 2000) serait plus importante chez *C. jejuni* que chez *C. coli*.

### 2.7.2. Modèles de pathogénie de *C. jejuni*

Les symptômes des entérites à *C. jejuni* observés chez l'humain varient de quelques fèces molles, en passant par de fortes diarrhées liquides jusqu'à des diarrhées de type dysentérique avec du sang et des leucocytes (Black *et al.*, 1988). La sévérité de ces manifestations cliniques pourrait varier selon la souche infectante, l'expression des facteurs de virulence de la bactérie et la réponse immunitaire de l'hôte (Wallis, 1994). Les défenses humorale et cellulaire de l'hôte sembleraient avoir un rôle important dans la pathogénie (Wallis, 1994; Wassenaar et Blaser, 1999). Il n'est pas encore clair si les souches de *C. jejuni* peuvent être divisées en deux pathotypes, soit toxigénique et adhérente menant à une diarrhée liquide ou invasive et inflammatoire menant à une diarrhée de type dysentérique, ou si l'expression de la maladie serait plutôt influencée par la susceptibilité de l'hôte ou par d'autres facteurs non déterminés (Hu et Kopecko, 2000). Selon Wassenaar et Blaser (1999), il serait possible que les pathotypes de *C. jejuni* puissent être aussi variés que ceux d'*E. coli*.

Les mécanismes exacts utilisés par *C. jejuni* pour causer l'entérite sont encore méconnus. L'habileté à causer la maladie proviendrait d'un processus complexe et multifactoriel demandant l'expression de plusieurs gènes (Konkel *et al.*, 1999). Quelques modèles de la pathogénie de *C. jejuni* ont été proposés (Ketley, 1997; Wooldridge et Ketley, 1997; Konkel *et al.*, 2000). Plusieurs mécanismes de virulence potentiels, tels la mobilité créée par le flagelle, l'adhésion aux entérocytes, l'invasion cellulaire et la production de toxines, ont été proposés (van Vliet et Ketley, 2001). Le modèle de Wooldridge et Ketley (1997) présente trois scénarios différents selon l'état du système immunitaire du patient vis-à-vis l'agent causal:

- 1) Si l'hôte a un système immunitaire « naïf », il ne produira pas d'anticorps spécifiques contre *Campylobacter*. La bactérie colonisera la couche de mucus et produira une ou plusieurs toxines. Si la bactérie est invasive, elle envahira les entérocytes et pourra pénétrer les couches profondes de l'intestin, dont la *lamina propria*. Les toxines et la réponse inflammatoire causeront des

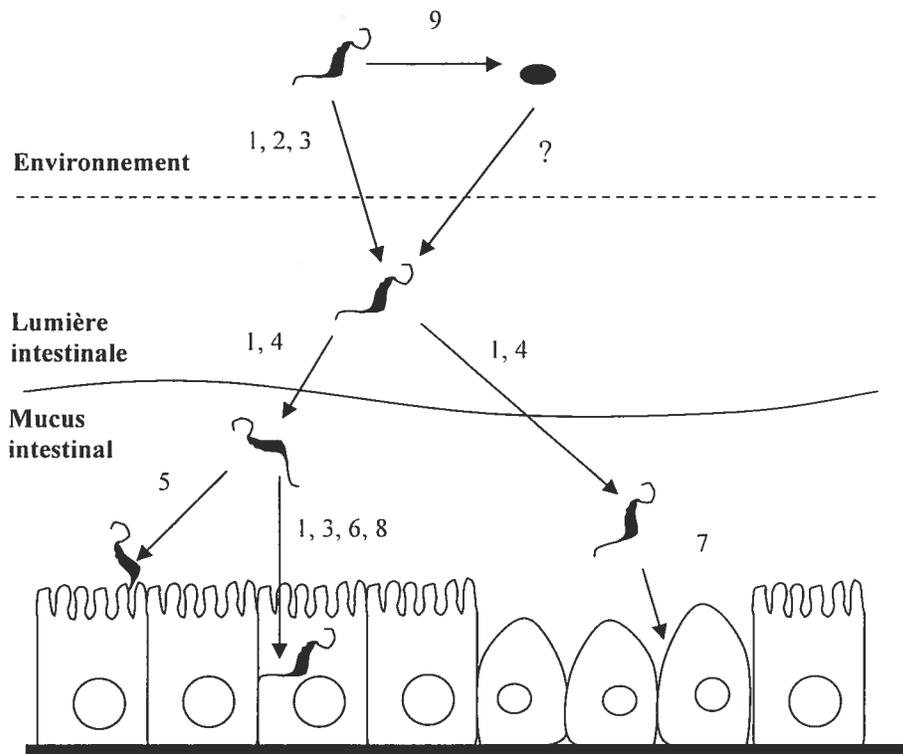
dommages tissulaires. Une perte de fluide occasionnée par l'invasion cellulaire et/ou par les toxines et/ou par la réponse inflammatoire causera une diarrhée liquide qui peut dégénérer en diarrhée sanguinolente selon l'inflammation.

- 2) S'il y a production d'anticorps partiellement protecteurs (anticorps hétérogènes ou première exposition), la bactérie colonisera le mucus. Si la souche est invasive, elle envahira les entérocytes. Par contre, les anticorps mucosaux et/ou les anticorps sériques réduiront l'invasion de la *lamina propria*. Une diarrhée liquide se manifesterà à la suite des dommages occasionnés par l'invasion cellulaire et/ou la production de toxine. Il y aura peu de réactions inflammatoires.
- 3) S'il y a une protection complète, la bactérie colonisera la couche de mucus sans pouvoir envahir les cellules épithéliales, puisqu'elle sera neutralisée par les anticorps mucosaux. Ces individus ne manifesteront pas de diarrhée et pourront devenir des porteurs asymptomatiques.

Toujours selon Wooldridge et Ketley (1997), certaines souches de *C. jejuni* seraient capables, en absence d'anticorps spécifiques, d'envahir les cellules épithéliales, de survivre dans ces cellules, de les détruire et de survivre avec les phagocytes professionnels. Comme pour les modèles de Wooldridge et Ketley (1997), celui de Konkel *et al.* (2000) suggère que pour créer l'entérite, *C. jejuni* doit d'abord traverser la couche de mucus, adhérer aux cellules épithéliales et l'envahir. Chez un individu avec un système immunitaire « naïf », l'invasion cellulaire permettrait à la bactérie d'éviter l'activité du complément et la phagocytose, tandis que chez les individus ayant eu une exposition antérieure à la bactérie, l'invasion permettrait en plus d'éviter les anticorps spécifiques. *Campylobacter* colonisera ensuite la couche épithéliale et y causera des dommages par l'invasion cellulaire, par la production de toxine et/ou par l'induction d'apoptose. Certaines bactéries pourront traverser l'épithélium et atteindre la *lamina propria*. Dans le modèle de Ketley (1997), la réponse immunitaire crée une perturbation de l'organisation de l'épithélium

permettant un accès direct à la *lamina propria*. Un schéma des phases de la colonisation et des mécanismes de virulence hypothétiques a été proposé par van Vliet et Ketley (2001) (figure 2.1). Tous ces modèles demeurent hypothétiques puisque aucun de ces mécanismes de virulence n'a encore été directement associé à la pathogénie de *Campylobacter*. De plus, plusieurs autres mécanismes de virulence potentiels ont été proposés depuis, tels que l'autoagglutination associée entre autres à la présence de la protéine flagellaire FlaA (Misawa et Blaser, 2000), la présence de capsule (Bacon *et al.*, 2000; Karlyshew *et al.*, 2001), la présence d'un plasmide de virulence (pVir) possiblement impliqué dans l'adhésion et l'invasion et possédant des protéines homologues au système de sécrétion de type IV d'*H. pylori* (Bacon *et al.*, 2000), et la translocation vers les tissus sous-épithéliaux (Everest *et al.*, 1992; Konkel *et al.*, 1992d).

Figure 2.1: Résumé des différentes phases de la colonisation de l'intestin et des mécanismes de virulence hypothétiques de *C. jejuni*



Les chiffres dans la figure indiquent les mécanismes suivants:

- (1) Mobilité, (2) Réponse au stress de température, (3) Défense au stress oxydatif,
- (4) Chémotaxie, (5) Adhésion, (6) Invasion, (7) Production de toxine, (8)
- Acquisition du fer, (9) Forme coccoïde

## **CHAPITRE 3**

**Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated  
from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans**

**Manuscript publié dans *Journal of Food Protection***

**2002, 65:73-78**

**Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans**

Éric Nadeau, Serge Messier, Sylvain Quessy

Chaire de recherche en salubrité des viandes, Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec

Téléphone: 1-450-773-8521

Fax: 1-450-778-8113

Courriel: [sylvain.quessy@umontreal.ca](mailto:sylvain.quessy@umontreal.ca)

Key words: *Campylobacter*; poultry; chicken; campylobacteriosis; PFGE

## RÉSUMÉ

Entre juillet 1998 et juin 1999, 93 lots de poulets à griller distribués dans 57 fermes ont été échantillonnés dans deux abattoirs de la province de Québec (Canada). Un total de 2325 échantillons de contenu cæcal a été analysé pour évaluer la prévalence des campylobacters. Le biotypage et l'électrophorèse à champs pulsés (PFGE) ont été utilisés pour 20% des isolats de *Campylobacter* dans le but d'étudier leur distribution en production de poulets à griller. Les profils des isolats aviaires, obtenus par (PFGE), ont été comparés aux profils de 24 isolats de *Campylobacter* de cas sporadiques de diarrhée chez l'humain afin d'évaluer leur lien génétique. Près de 40% des poulets à griller de 60% des lots d'abattage et 67% des fermes étaient colonisés. *C. jejuni* biotypes 1 et 2 ont été les biotypes les plus fréquemment identifiés pour les isolats d'origines aviaire et humaine. Les dendrogrammes générés à partir des analyses de PFGE ont révélé une forte diversité génétique pour les isolats d'origine aviaire, avec 49 génotypes pour les 56 lots positifs à *Campylobacter*. Plus de 75% de ces lots étaient colonisés par un génotype unique. Tous les lots positifs produits simultanément sur une ferme donnée avaient un ou des génotypes communs. Des génotypes différents ont par contre été identifiés pour les lots produits à des périodes de production différentes d'une ferme donnée. Dans quelques cas, des génotypes identiques ont été observés pour différentes périodes de production d'une ferme donnée ou pour différentes fermes. Les profils de PFGE ont démontré que près de 20% des isolats d'origine humaine étaient reliés génétiquement à des génotypes retrouvés en production de poulets à griller. La présence de ces liens génétiques et de la forte prévalence de *C. jejuni* biotypes 1 et 2 suggère que les campylobacters en production de poulets à griller de la province de Québec soient une source potentielle de dangers pour la santé public.

## ABSTRACT

Between July 1998 and June 1999, 93 lots of broiler chickens distributed on 57 farms were sampled in two abattoirs of the province of Québec (Canada). A total of 2325 samples of cecal material were analyzed to determine the prevalence of campylobacters. Biotyping and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) were done on 20% of the *Campylobacter* isolates to study the distribution within poultry production. Macrorestriction profiles were compared to profiles of 24 *Campylobacter* strains isolated from sporadic cases of human diarrheic patients in order to evaluate genetic relationships. Approximately 40% of the broiler chickens in 60% of lots and 67% of the farms were colonized. Biotypes 1 and 2 of *C. jejuni* were the most prevalent biotypes in poultry and in human isolates. The PFGE dendrograms revealed a high genetic diversity among poultry isolates, with 49 different genotypes from the 56 positive lots. More than 75% of these lots were colonized by a unique genotype. All positive lots raised simultaneously on the same farm had common genotype(s). Different genotypes were isolated from lots raised at different grow-out periods on a farm. In some cases, identical genotypes were found at different grow-out period on a farm and also from different farms. Macrorestriction profiles showed that approximately 20% of human *Campylobacter* isolates were genetically related to genotypes found in poultry. This genetic relationship and the high prevalence of *C. jejuni* biotypes 1 and 2 in poultry indicated that *Campylobacter* in broiler production of the province of Québec could be a potential source of hazard for public health.

## INTRODUCTION

Thermotolerant campylobacters are currently recognized as the most common cause of foodborne bacterial gastroenteritis in humans (1). Most human campylobacteriosis cases are classified as sporadic (3). The true incidence of *Campylobacter* diarrhea is estimated to be about 1% of the population per year in the United-States and the United Kingdom (1). *C. jejuni* and *C. coli* are the most common species isolated from human cases (20), with a prevalence of more than 90% for *C. jejuni* (24). Campylobacters are common inhabitants of the intestinal tract of poultry and were isolated frequently from poultry as well as from poultry products (1). Evans (6) reported that up to 50 % of broiler flocks may be infected and that most of the birds in an infected flock carry the bacteria until slaughter. Several epidemiological studies have incriminated consumption or handling of poultry products as major risks for sporadic *Campylobacter* infections (16). Human campylobacteriosis has also generally been associated with poultry products in epidemiological studies using standardized questionnaire to assess recent food consumption or exposures (4). However, very few studies could establish a direct link between poultry and human strains by genetic characterization of strains from sporadic cases of campylobacteriosis. Basic data, such as prevalence and characterization of the bacteria in animal and human populations, and distribution of the strains within the animal population, are needed to analyze the risk associated with the presence of this microorganism in poultry products and to develop appropriate control measures to be applied in a farm to table approach.

The objectives of this study were: (i) to determine the prevalence of *Campylobacter* in bird populations and broiler flocks in the province of Québec (Canada); (ii) to evaluate the genotypic diversity (by pulsed field gel electrophoresis [PFGE]) and the distribution of *Campylobacter* strains isolated from colonized broiler flocks; and (iii) to evaluate the relationship between *Campylobacter* isolated from poultry and sporadic cases of human campylobacteriosis in a defined geographical region.

## MATERIALS AND METHODS

**Poultry samples.** The sampling was conducted between July 1998 and June 1999 in two abattoirs receiving birds from all regions of the province of Québec (Canada). The average number of birds by lot was 6000. These plants process approximately 1 million birds each week which represents approximately one-third of the birds slaughtered a year in the province of Québec. Generally, one or two lots were sampled per week for a total of 93 lots. Twenty-five chickens from each lot were randomly sampled for a total of 2325 birds. The intestines were manually collected from the eviscerating line, individually packed in sterile plastic bag and stored on ice for 2 to 4 h until being processed in the laboratory. Each intestine was identified with a chicken number (1 to 25), a lot number (1 to 93) and was associated with a farm according to the information provided by the abattoir

**Human samples.** The sampling was conducted at one hospital, located in St-Hyacinthe (Québec), during the same time and in the same geographical region that the poultry sampling was done. It is the only hospital in the area. A significant proportion of chicken products found in supermarkets of this area come from the sampled abattoirs. Every week, all fecal samples from sporadic cases of diarrheic patients were analyzed in our laboratory to detect the presence of thermotolerant *Campylobacter*.

**Isolation and identification of thermotolerant *Campylobacter*.** The surface of each caecum collected at the abattoirs was seared with a hot spatula. An incision was made with a sterile scalpel, and approximately 1 g of the content was sampled with a sterile cotton swab. When the content was not liquid enough, it was emulsified in 1 ml of buffered peptone water. Poultry cecal contents and human feces specimens were directly inoculated onto charcoal-based selective medium (Karmali *Campylobacter* agar base supplemented with SR 167E; Oxoid, Hampshire, UK) as described by Karmali *et al.* (17) and Endtz *et al.* (5). The plates were incubated at 42°C. in anaerobic jars (Oxoid) for 48 h under microaerobic conditions (Campy gen. Oxoid). Suspect colonies were identified on the basis of Gram-stain morphology, mobility

under phase contrast microscope, oxidase and catalase reactions, growth at 25 and 42°C, susceptibility to nalidixic acid and cephalothin, indoxyl acetate hydrolysis, and hippurate hydrolysis (20). All *Campylobacter* isolates were tested with the Meritec-Campy (jlc) latex agglutination test (Meridian Diagnostics, Cincinnati, Ohio) as described by Nachamkin and Barbagallo (21). The *Campylobacter* strains were freeze-stored at -70°C in Brucella broth with 15% glycerol. Biotyping and PFGE were done for all human *Campylobacter* isolates and for 20% of the poultry isolates selected by stratified sampling (20% of isolates sampled randomly in each lot). For biotyping, according to the scheme of Lior (18), the strains were submitted to DNase detection (19) and the H<sub>2</sub>S reduction test.

**PFGE.** DNA-containing agar blocks were prepared as described by Gibson *et al.* (7) with modifications. Briefly, the bacterial suspension, prepared from a 48 h bacterial culture on Mueller-Hinton agar (Quelab Laboratories, Québec, Canada) containing 6% sheep blood, was adjusted to an optical density of 2.1 to 2.3 at 405 nm in sodium chloride-EDTA buffer (75 mM NaCl and 25 mM EDTA, pH 7.5). Each bacterial suspension was heated to 56°C, and 250µl was then mixed with an equal volume of 2.0% wt/vol low-gelling-temperature agarose (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), dispensed in a plug mold (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.), and allowed to solidify at 4°C. Plugs were then incubated in 2 ml of the first lysis buffer (6.0 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.2% wt/vol sodium deoxycholate, and 0.5% wt/vol lauryl sarcosine, pH 7.6) with 0.5 mg ml<sup>-1</sup> of lysozyme (Sigma) at 37°C overnight. The solution was then changed for the second lysis buffer (1.0% wt/vol *N*-lauryl sarcosine, 0.5 mM liter<sup>-1</sup> EDTA, pH 9.5) with 0.5 mg ml<sup>-1</sup> proteinase K (Sigma) solution at 56°C for 48 h. The plugs were then washed three times for 30 minutes in Tris-EDTA buffer (10 mM Tris and 10 mM EDTA, pH 7.5) and stored in Tris-borate-EDTA buffer (45 mM liter<sup>-1</sup> Tris, 45 mM liter<sup>-1</sup> boric acid, 1.0 mM liter<sup>-1</sup> EDTA) at 4°C. According to the observation of Whatling and Thomas (26) for *Pseudomonas fluorescens*, a preelectrophoresis was conducted to improve the restriction patterns of *Campylobacter* isolates. Plugs were inserted first in sterile plastic test tubes perforated at each extremity with a sterile 18-gauge needle. Test tubes were then immersed in a

premigration chamber containing Tris-borate-EDTA buffer and filled. Preelectrophoresis was performed at 60 V for 45 min. Macrorestriction profiling was performed as described by On *et al.* (23) with modifications. For restriction enzyme digestion, agarose plugs were incubated in 100  $\mu$ l of *Kpn*I or *Sma*I buffer at 37°C for 1 h. Then, 100  $\mu$ l of fresh buffer containing 20 U of *Kpn*I or *Sma*I (Gibco-BRL by Life Technologies Inc., Paisley, Scotland) was added, and the DNA was digested overnight at 37°C. DNA fragments were separated by PFGE in a 1.2% wt/vol high-gelling-temperature agarose (Sigma) with Gene Navigator apparatus (Pharmacia, Uppsala, Sweden) for 20 h at 200 V and 14°C, with ramped pulse time of 5 s for 9 h, 25 s for 9 h, 5 s for 2h, in 0.5 times Tris-borate-EDTA buffer. A  $\lambda$  DNA ladder (Bio-rad) was used as the molecular weight markers. Following electrophoresis, gels were stained with ethidium bromide, visualized, and photographed under a UV transilluminator. Macrorestriction profiles were analyzed with ImageMaster version 3.01 (Pharmacia). Following criteria established by Tenover *et al.* (25), isolates were identified as genetically indistinguishable if their macrorestriction profiles had the same number of bands and if the corresponding bands had the same apparent size, and they were identified as genetically closely related if their profiles differed by two or three bands.

## RESULTS

**Prevalence of *Campylobacter* in poultry and sporadic cases of human diarrhoea.** The prevalence of campylobacters in the 2325 birds sampled was 40.7 % (95 % confidence interval [CI], 38.7 to 42.7). *C. jejuni* was recovered from 95.2 % of the colonized birds and *C. coli* from 4.8 %. For biotyping and PFGE, 195 strains were selected by stratified sampling. Table 3.1 summarizes the biotyping of *Campylobacter* isolates. The 93 lots sampled during the year were distributed on 57 farms. *Campylobacter* was isolated from 60.2 % (95 % C.I. 49.5 to 70.1) (56 of 93) of the lots and 66.7 % (95 % C.I. 52.8 to 78.2) (38 of 57) of the farms. In most of the positives lots (40 of 56), prevalence superior to 50% was observed. While some variations were observed from a month to another, no evidence of seasonal variation in *Campylobacter* isolation from broiler chickens could be demonstrated (Figure 3.1). A total of 296 fecal samples from human patients suffering from diarrhoea were analyzed. *Campylobacter* was recovered from 8.1% (C.I. 95 % 5.4 to 12.0) (24 of 296) of the samples, and *C. jejuni* was identified the most frequently (91.7 %) whereas *C. coli* accounted for 8.3 % of the isolates. As with poultry samples, *C. jejuni* biotypes 1 and 2 were the most frequent biotypes isolated from diarrheic patients (Table 3.1).

**Macrorestriction profiles and distribution of *Campylobacter* isolates from poultry and sporadic cases of human diarrhoea.** Despite several attempts, it was impossible to obtain a macrorestriction profile with the *KpnI* endonuclease for 8 of the 195 poultry isolates. The PFGE dendrogram showed that the isolates obtained from the 56 colonized lots gave a total of 49 different *Campylobacter* genotypes, arbitrarily named 1 to 49 (Table 3.2). Only one genotype was identified in 76.8 % (43 of 56) of these lots, while 23.2 % (13 of 56) of them were colonized by more than one genotype. Table 3.2 summarizes the distribution of genotypes by farms and lots. All positive lots raised during the same grow-out period on the same farm (sampled on the same day) had common genotype(s) (farms A, D, F, G, H, R, X, Z, BB, QQ, SS, TT and XX). In most cases, genotypes were different when lots were raised on the same

farm but at different grow-out periods (farms A, G and SS). Genotypes 10 (farm EE) and 18 (farm A) were isolated from two lots grown on the respective farms but slaughtered at different times. Identical genotypes were also isolated from lots originating from different farms. For instance, genotype 13 was isolated from lots coming from four different farms (farms E, J, OO and SS) between October 1998 and February 1999. Other genotypes, such as 15 (farms F and QQ), 17 (farms I and EE), 18 (farms A and WW), and 27 (farms JJ and NN), were also isolated from different farms.

Macrorestriction profiles were obtained for all human strains by *KpnI* digestion. Profile analysis showed genetically similar isolates among the human sampling (Figure 3.2). Human isolates 142 and 144 were genetically indistinguishable. These strains were isolated from the same patient but at different sampling periods. Furthermore, isolates 70, 89 and 279 were genetically indistinguishable, and isolate 67 was closely related to isolate 161.

**Genetic relationships between *Campylobacter* from poultry and human sporadic campylobacteriosis in Québec.** The 24 *Campylobacter* strains isolated from fecal samples of patients with sporadic diarrhoea were compared to the poultry isolates by the same criteria as described previously (25). Isolates genetically similar when examined by *KpnI* digestion were also compared using a second restriction enzyme, *SmaI*, to confirm the similarity (Figure 3.3). Human isolates 23 and 196 were indistinguishable from poultry genotypes 17 and 35, respectively. Human isolate 63 was closely related to poultry genotype 23, and the closely related human isolates 67 and 161 were closely related to poultry genotype 37 (Figures 3.2 and 3.3).

## DISCUSSION

This study shows that approximately 40% of the broiler chickens entering two abattoirs in Québec were colonized by campylobacters, particularly *C. jejuni*. The positive birds were distributed among 60% of lots and 67% of the poultry farms sampled. Humphrey *et al.* (12) also found similar prevalence at the flock level and Jacobs-Reitsma *et al.* (14), who reported that 76% and 67% of poultry flocks were colonized. Longitudinal studies have demonstrated that the propagation of *Campylobacter* is very rapid when the bacteria are introduced in one flock and that this flock remains colonized up to slaughter (8, 15). This can explain the high rates of positive birds we observed in colonized lots. While other studies have reported a higher contamination rate during warmer period (14, 16), no evidence of seasonal variation in isolation of *Campylobacter* from poultry samples was noticed in this study. Gregory *et al.* (8) also reported no evidence of seasonal variation of colonized flocks in a 1-year study. The high prevalence of *C. jejuni* biotypes 1 and 2 in poultry was also reported by Griffiths and Park (9). The same two biotypes were also found to be the most prevalent in the fecal samples we analysed from diarrheic patients. Similar results have been reported previously (10).

The large number of macrorestriction profiles showed by PFGE is suggestive of a broad genetic diversity among the different *Campylobacter* isolates recovered in the various poultry production units. Despite this diversity, PFGE showed that the majority of the positive lots were colonized by only one genotype, suggesting a unique source of colonization of a lot or cross contaminations between lots raised simultaneously on a farm. Jacobs-Reitsma (13) found no evidence of horizontal transmission of campylobacters between lots during the same grow-out period. Furthermore, similar to results obtained by Berndston *et al.* (2), both negative and positive lots were found during the same grow-out period (farms P, GG and WW). These findings suggest a common and unique source of contamination instead of horizontal transmission of campylobacters in lots raised simultaneously on a farm. This unique source should allow introduction of new strains at different grow-out

periods on a farm as shown in this study by the isolation of completely different genotypes at different positive grow-out periods. However, at the present time, we cannot rule out the possibility that the culture techniques that were used may have select particular subtypes of *Campylobacter*. Furthermore, in this study, identical genotypes were isolated from different grow-out periods on the same farm on only two occasions. Some genotypes were isolated on more than one farm. This finding suggests a common source of contamination for those farms. Unfortunately, because of the lack of information about the geographical location and suppliers to these farms, it was not possible to make any supposition as to the origin of the source of contamination.

Despite the broad genetic diversity observed among the human isolates and the different periods of isolation, we found three genetically similar isolates associated with human campylobacteriosis. It would suggest that particular subsets of genetically related isolates might be associated with sporadic cases of campylobacteriosis. The rate of sporadic cases of human campylobacteriosis linked to poultry campylobacters varies between studies (22). In this study, approximately 20% of human isolates from sporadic cases of *Campylobacter* infection were genetically and phenotypically (biotypes) related to poultry campylobacters. These results suggest a link between sporadic cases of human campylobacteriosis and campylobacters in poultry production. Other studies have also identified common PFGE profiles of *Campylobacter* from poultry and sporadic cases of human campylobacteriosis isolates in Europe (11, 23). The genetic relationship between isolates and the high prevalence of *C. jejuni* biotypes 1 and 2 in poultry showed that the presence of *Campylobacter* in broiler chickens is a potential source of hazard for humans. On the other hand, further studies on virulence factors and the discrimination of pathogenic from nonpathogenic *Campylobacter* strains isolated in poultry production would give a better assessment of this hazard.

Appropriate control measures should be applied at the farm level to reduce the number of colonized flocks entering and contaminating slaughter lines. Control

strategies at the farm level should take into consideration the unique source of different lots of a same grow-out period, the source allowing the introduction of different strains at different grow-out periods and, in some cases, the common source for different farms. In view of the better control of bacteria in the poultry industry, further work with molecular typing techniques is needed to establish the exact role of the environment and hatchery supplies in flock colonization.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We wish to acknowledge Èvelyne Guévremont, Julie Légaré, and Marie-Hélène Venne. We specially thank Santé-Canada for their collaboration and for access to their facilities.

## TABLES

Table 3.1. Biotyping of *Campylobacter* isolates from Québec, Canada

	No. (%) of <i>Campylobacter</i> isolates					
	CJ-I <sup>a</sup>	CJ-II	CJ-III	CJ-IV	CC-I <sup>b</sup>	CC-II
Poultry	77 (39,5)	76 (39,0)	22 (11,3)	1 (0,5)	14 (7,2)	5 (2,6)
Human	6 (25,0)	14 (58,3)	0 (0,0)	2 (8,3)	1 (4,2)	1 (4,2)

<sup>a</sup>: CJ, *C. jejuni* followed by the biotype number.

<sup>b</sup>: CC, *C. coli* followed by the biotype number.

TABLE 3.2. Distribution of *KpnI* PFGE genotypes of *Campylobacter* in slaughtered lots and farms from Québec

Farm	Sampling <sup>a</sup>	Genotype	Farm	Sampling	Genotype	Farm	Sampling	Genotype
A	98-11-23	18, 19, 20	Q	99-04-13	37	II	99-02-02	29
	98-11-23	18, 19, 20	R	98-11-24	21	JJ	99-01-13	27
	99-05-25	44		98-11-24	21, 22	KK	99-04-06	Negative
	99-05-25	18, 44	S	99-04-28	Negative	LL	99-03-10	36
B	99-02-01	30		99-04-28	Negative	MM	99-02-08	Negative
C	99-06-01	Negative	T	98-09-09	Negative	NN	99-01-13	27
	99-06-01	Negative		98-09-09	Negative	OO	99-01-06	13
D	98-09-23	12	U	99-04-20	39, 40	PP	98-09-08	Negative
	98-09-23	12	V	98-12-02	Negative	QQ	98-12-15	15, 25
E	98-10-05	13	W	98-09-28	Negative		98-12-15	15
	99-01-25	Negative	X	99-02-23	34	RR	99-06-23	49
F	98-10-26	15		99-02-23	34	SS	98-10-19	13
	98-10-26	15	Y	98-12-09	Negative		98-10-19	13
G	99-02-16	32, 33	Z	99-06-07	47		99-05-11	42
	99-05-18	43		99-06-07	47		99-05-11	42
	99-05-18	43	AA	99-04-20	38	TT	99-02-01	28
			BB	99-01-12	26		99-02-01	28
H	99-06-15	48		99-01-12	26	UU	99-04-06	Negative
	99-06-15	48, 49	CC	99-01-06	Negative	VV	99-06-23	Negative
I	98-11-18	16, 17	DD	99-03-16	Negative		99-06-23	Negative
J	99-02-15	13		99-03-16	Negative	WW	99-05-26	18
K	99-06-01	45, 46	EE	98-09-03	10		99-05-26	Negative
L	98-09-28	Negative		98-11-18	10, 17	XX	98-12-07	23
	99-06-16	Negative	FF	98-09-23	Negative		98-12-07	23
	99-06-16	Negative	GG	98-12-02	Negative	YY	98-07-08	1,2,3,4
M	98-10-06	Negative		98-12-09	Negative	ZZ	98-07-15	5
	98-10-06	Negative		99-02-09	31	AAA	98-07-22	6,7,8
N	98-11-17	Negative		99-02-09	Negative	BBB	98-08-19	9
	98-11-17	Negative	HH	99-02-16	Negative	CCC	98-09-17	11
O	99-03-10	35		99-04-13	Negative	DDD	98-08-05	Negative
P	99-05-04	41				EEE	98-10-05	Negative
	99-05-04	Negative						

<sup>a</sup> Day of lot' sampling (yr-mo-day). Each date represent a slaughtered lot

## FIGURES

Figure 3.1: Seasonal distribution of *Campylobacter* isolation among broiler chicken. Bars indicate a confidence interval of 95 % (MIN-MAX).

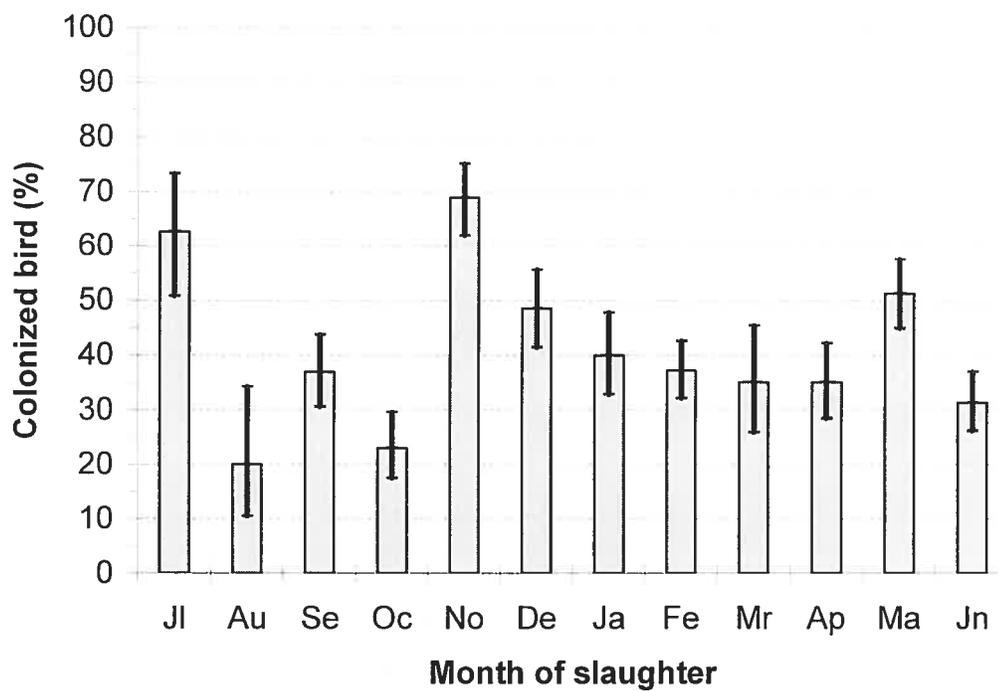


Figure 3.2: Representative portion of the dendrogram showing genetic relatedness of poultry and human *Campylobacter* isolates using *KpnI* enzyme. The scale measured similarity values. Levels of similarity were calculated with the Dice coefficient, and the UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical averages) was used for cluster analysis. Poultry genotypes are designed by the genotype number, which is followed, in parentheses, by the amount of poultry isolates clustered in the same genotype. Poultry genotypes and human isolates bracketed together are indistinguishable or closely related by Tenover's criteria.

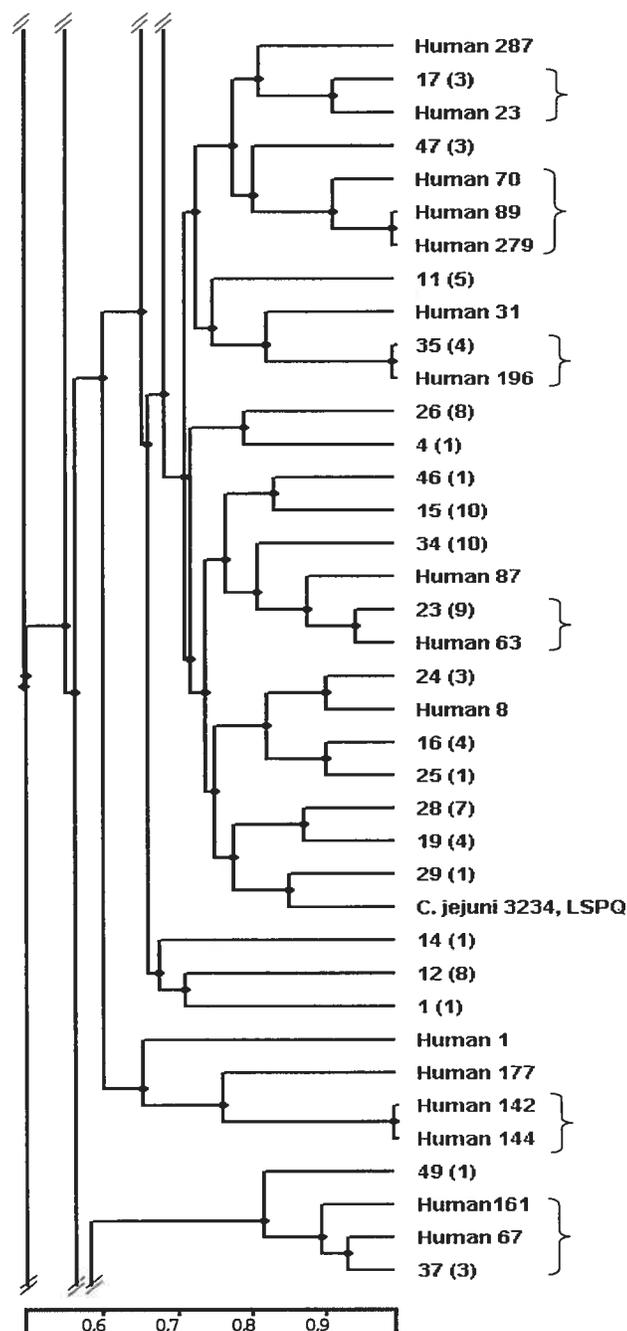
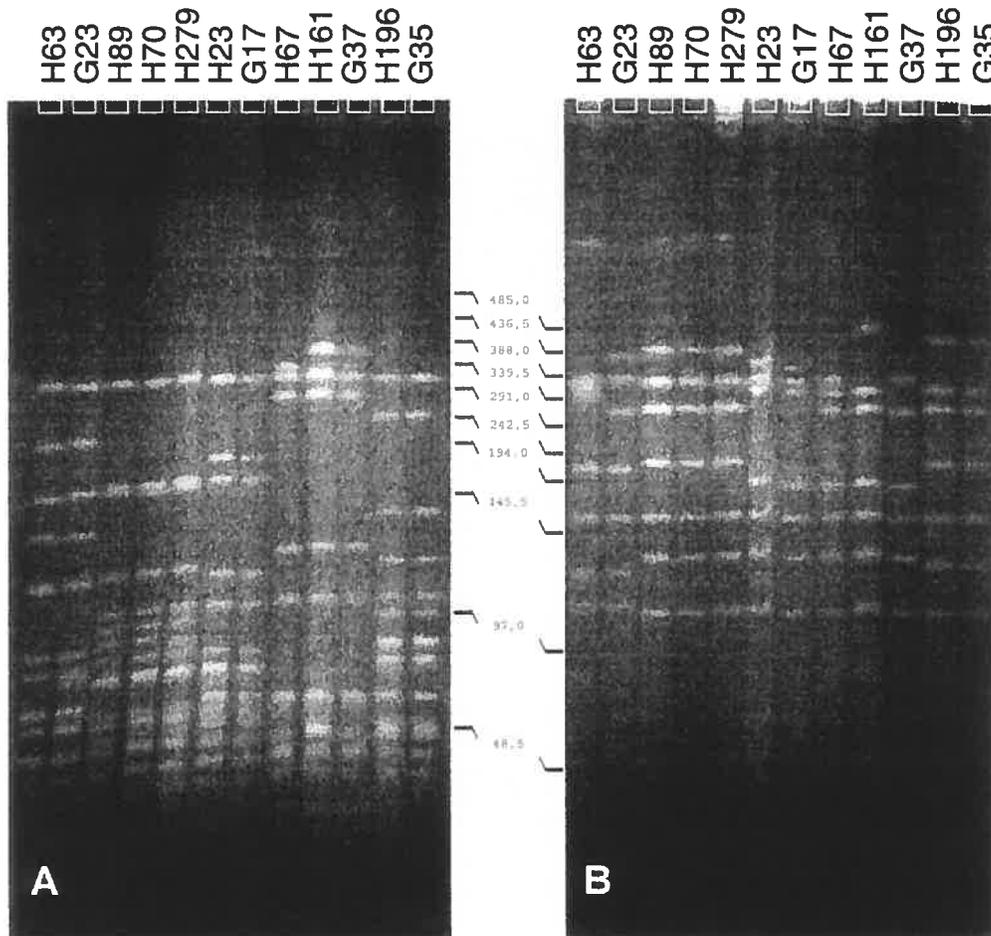


Figure 3.3: PFGE profiles obtained using restriction endonucleases *KpnI* (A) and *SmaI* (B) of poultry isolates genetically related to isolates from sporadic cases of human campylobacteriosis. Poultry genotype numbers are preceded by a "G". Human and poultry isolate numbers refer to isolate identifications in Figure 3.2. Molecular weight markers,  $\lambda$  ladder inserted between pictures.



## REFERENCES

1. Atabay, H.I., and J.E.L. Corry. 1997. The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.* 83: 619-626.
2. Berndston, E., U. Emanuelson, A. Engvall, and M.-L. Danielsson-Tham. 1996. A 1-year epidemiological study of campylobacters in 18 Swedish chicken farms. *Prev. Vet. Med.* 26: 167-185.
3. Blaser, M.J. 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni*. *J. Inf. Dis.* 176(Suppl 2): S103-105.
4. Eberhart-Phillips, J., N. Walker, N. Garrett, D. Bell, D. Sinclair, W. Rainger, and M. Bates. 1997. Campylobacteriosis in New Zealand: results of a case-control study. *J. Epidemiol. Community Health.* 51: 686-691.
5. Endtz, H.P., G.J.H.M. Ruijs, A.H. Zwinderman, T. van der Reijden, M. Biever, and R.P. Mouton. 1991. Comparison of six media, including a semisolid agar, for the isolation of various *Campylobacter* species from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1007-1010.
6. Evans, S.J. 1992. Introduction and spread of thermophilic campylobacters in broiler flocks. *Vet. Rec.* 131: 574-576.
7. Gibson, J.R., K. Sutherland, and R.J. Owen. 1994. Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 357-358.
8. Gregory, E., H. Barnhart, D.W. Dreesen, N. Stern, and J.L. Corn. 1997. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in Broilers: source, time of colonization, and prevalence. *Avian Dis.* 41: 890-898.

9. Griffiths, P.L., and R.W. Park. 1990. *Campylobacters* associated with human diarrhoeal disease. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 281-301.
10. Harris, N.V., N.S. Weiss, and C.M. Nolan. 1986. The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* enteritis. *Am. J. Public Health.* 76: 407-411.
11. Hänninen, M.L., S. Pajarre, M.-L. Klosner, and H. Rautelin. 1998. Typing of human *Campylobacter jejuni* isolates in Finland by pulsed field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1787-1798.
12. Humphrey, T.J., A. Henley, and D.G. Lanning. 1993. The colonization of broiler chickens with *Campylobacter jejuni*: some epidemiological investigations. *Epidemiol. Infect.* 110: 601-607.
13. Jacobs-Reitsma, W.F. 1997. Aspect of epidemiology of *Campylobacter* in poultry. *Vet. Q.* 19: 113-117.
14. Jacobs-Reitsma, W.F., N.M. Bolder, and R.W. Mulder. 1994. Cecal carriage of *Campylobacter* and *Salmonella* in Dutch broiler flocks at slaughter: a one-year study. *Poult. Sci.* 73: 1260-1266.
15. Jacobs-Reitsma W.F., A.W. van de Giessen, N.M. Bolder, and R.W. Mulder. 1995. Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. *Epidemiol. Infect.* 114: 413-421.
16. Kapperud, G., E. Skjerve, L. Vik, K. Hauge, A. Lysaker, I. Aalmen, S.M. Ostroff, and M. Potter. 1993. Epidemiological investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidemiol. Infect.* 111: 245-255.

17. Karmali, M.A., A.E. Simor, M. Roscoe, P.C. Fleming, S.S. Smith, and J. Lane. 1986. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J. Clin. Microbiol.* 23: 456-459.
18. Lior, H. 1984. New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and "*Campylobacter laridis*". *J. Clin. Microbiol.* 20: 636-640.
19. Lior, H., and A. Patel. 1987. Improved toluidine Blue-DNA agar for detection of DNA hydrolysis by campylobacters. *J. Clin. Microbiol.* 25: 2030-2031.
20. Nachamkin, I. 1995. *Campylobacter* and *Arcobacter*. p. 483-491. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (eds.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
21. Nachamkin, I. and S. Barbagallo. 1990. Culture confirmation of *Campylobacter* spp. by latex agglutination. *J. Clin. Microbiol.* 28: 817-818.
22. Newell, D.G., and J.A. Wagenaar. 2000. Poultry infections and their control at the farm level. p. 497-509. In I. Nachamkin, and M.J. Blaser (eds.), *Campylobacter*, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
23. On, S.L.W., E.M. Nielsen, J. Engberg, and M. Madsen. 1998. Validity of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Sal*I, *Kpn*I, and *Bam*HI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiol. Infect.* 120: 231-237.

24. Tauxe, R.V. 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. p. 9-19. In I. Nachamkin, M.J. Blaser, and L.S. Tompkins (eds.), *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
25. Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239.
26. Whatling, C.A., and C.M. Thomas. 1993. Preelectrophoresis of agarose plugs containing bacterial chromosomal DNA prepared for analysis by pulsed field gel electrophoresis can improve the clarity of restriction patterns. *Anal. Biochem.* 210: 98-101.

## **CHAPITRE 4**

**Comparison of *Campylobacter* isolates from poultry and humans: Association between *in vitro* virulence properties, biotypes and Pulsed-Field gel electrophoresis clusters**

**Manuscrit publié dans *Applied and Environmental Microbiology***

**2003, 69 (10): 6316-6320**

**Comparison of *Campylobacter* isolates from poultry and humans: Association between *in vitro* virulence properties, biotypes and Pulsed-Field gel electrophoresis clusters**

Éric Nadeau, Serge Messier, Sylvain Quessy

Chaire de recherche en salubrité des viandes, Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec

Téléphone: 1-450-773-8521

Fax: 1-450-778-8113

Courriel: [sylvain.quessy@umontreal.ca](mailto:sylvain.quessy@umontreal.ca)

## RÉSUMÉ

Les propriétés de virulence *in vitro* de 197 isolats de *Campylobacter* d'origines aviaire et humaine reliés spacio-temporellement ont été comparées. Les résultats des propriétés de virulence ont de plus été comparés à l'intérieur des génotypes et des biotypes. Tous les isolats ont adhéré, et 63% ont envahi les cellules INT-407, tandis que 13% étaient cytotoxiques pour les cellules CHO. Les extraits démontrant une activité cytotoxique pour les cellules CHO étaient de plus cytotoxiques pour les cellules INT-407. La sensibilité pour les cellules Vero était par contre variable. La proportion d'isolats démontrant un fort potentiel d'invasion ( $>1000$  CFU ml<sup>-1</sup>) ou une cytotoxicité pour les cellules Vero était significativement plus élevée pour les isolats d'origine humaine que pour les isolats d'origine aviaire. Le pouvoir d'invasion a été associé aux isolats de *C. jejuni* biotypes 1 et 2, tandis que la production de l'activité cytotoxique pour les cellules CHO et Int-407 a été associée aux isolats de *C. jejuni* biotypes 3 et 4. Les isolats cytotoxiques ont de plus été regroupés par PFGE.

## ABSTRACT

The *in vitro* virulence properties of 197 temporally and geographically related *Campylobacter* isolates from chicken broilers and humans were compared. Comparisons of the virulence properties associated with genotypes and biotypes were made. All isolates adhered to, and 63% invaded, INT-407 cells, whereas, 13% were cytotoxic for CHO cells. CHO cell-cytotoxic extracts were also cytotoxic for INT-407 cells, but the sensitivity for Vero cells was variable. The proportion of isolates demonstrating a high invasiveness potential ( $>1000$  CFU ml<sup>-1</sup>) or Vero cell cytotoxicity was significantly higher for human than for poultry isolates. Invasiveness was associated with *C. jejuni* isolates of biotypes 1 and 2, whereas CHO and INT-407 cell cytotoxicity was associated with *C. jejuni* isolates of biotypes 3 and 4. Cytotoxic isolates were also clustered according to PFGE profiles.

## TEXT

*Campylobacter* spp. are recognized as the most common cause of food-borne bacterial gastroenteritis in humans (2). Epidemiological studies revealed that consumption of poultry products is an important risk factor for sporadic cases of human campylobacteriosis (14, 15) and many studies have identified common types of *Campylobacter* from poultry and humans (5, 26, 28, 29). The extent to which poultry consumption is responsible for human infections is nevertheless not exactly known (12). Asymptomatic infections, watery diarrhea and dysentery-type illnesses of humans have been reported (36). *C. jejuni* strains associated with dysentery-like illness have been shown to be more invasive and cytotoxic than other *campylobacter* strains in *in vitro* assays (22). Adherence to and invasion of host mucosal surfaces were proposed as essential steps in the pathogenesis (11). In addition, many cytotoxic activities have been reported, but their significance in human disease remains unclear (37). Subgrouping *Campylobacter* strains with respect to their virulence factors would be an important step in understanding the epidemiology and the pathogenesis of the infection. PFGE is one of the most powerful techniques for the genotyping of *Campylobacter* (27). Although the restriction endonuclease *Sma*I has been widely used for *Campylobacter* PFGE analysis, *Kpn*I appears to be most suitable for epidemiological studies of *Campylobacter* (24).

In a previous study, we reported that approximately 40% of chicken broilers and 60% of lots of slaughtered birds in the province of Quebec (Canada) were colonized by *Campylobacter*. PFGE and biotyping revealed that approximately 20% of human isolates were related to poultry isolates (26). To assess their pathogenic potential and to determine if clonally related isolates have common characteristics, temporally and geographically related *Campylobacter* isolates from chicken broilers and sporadic cases of human enteritis were compared for their *in vitro* virulence abilities.

**Sampling and identification of *Campylobacter* isolates.** A total of 197 *Campylobacter* isolates, 173 from chicken broilers and 24 from sporadic cases of human diarrhea, were used in this study. *Campylobacter* isolates were cultured during a 1-year sampling (July 1998 to June 1999) as described previously (26). Samples of poultry cecal contents in two abattoirs in the region of St-Hyacinthe, Québec, Canada, which originated from 52 slaughter lots of 33 farms, were obtained. The human fecal samples originated from the only hospital of the area, located in St-Hyacinthe. Fecal samples from all sporadic cases of diarrhea (n=296) processed for bacteriology at the hospital were also analyzed in our laboratory. Samples were directly inoculated onto charcoal selective medium (CSM), and the plates were incubated at 42°C under microaerobic conditions. All *Campylobacter* isolates were identified by standard microbiological procedures as previously described (26). *C. jejuni* accounted for 95,6% and 91,7% of poultry and human isolates, respectively, whereas the remaining isolates were identified as *C. coli*.

**Adhesion and invasion assays of INT-407 cells.** For *in vitro* virulence properties, associations were determined using the Fisher exact test ( $\alpha=0.05$ ). Adhesion and invasion assays were performed as described by Grant et al. (7), except that  $7,0 \times 10^4$  INT-407 cells were seeded into each well of 24-well tissue culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark) to obtain semiconfluent monolayers after an incubation at 37°C for 24 h in 5% CO<sub>2</sub>. Briefly, each well was then inoculated with  $5 \times 10^7$  CFU *Campylobacter*, and the plates were centrifuged. For the adhesion assay, plates were incubated for 30 min at 37°C, whereas for the invasion assay they were incubated for 3 h and incubated for another 2 h in minimal essential medium (MEM) containing 1% fetal bovine serum (FBS) and 250 µg of gentamicin ml<sup>-1</sup>. Adherent or intracellular bacteria were evaluated by plating serial dilutions of the cell lysates on CSM agar plates without selective supplement and by counting the colonies after incubation.

In accordance with the findings of other studies (11, 20), all *C. jejuni* and *C. coli* isolates adhered to INT-407 cells. The number of bacteria that adhered ranged from  $1,0 \times 10^3$  to  $1,8 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>, representing 0,001 to 1,8% of the bacterial inoculum, in accordance with results observed in other studies (17, 18, 32). The ability of *Campylobacter* to invade epithelial cells *in vitro* is recognized as strain dependent (17). As observed by Lindblom and Kaijser (20), the proportions of poultry and human isolates that showed invasiveness were not statistically different ( $p_{\text{exact}}=0,1547$ ), being 63,6 and 58,3%, respectively. Lindblom and Kaijser (20) reported that 40% of human and hen isolates were invasive, whereas Tay et al. (34) reported invasiveness properties for 82% of human isolates. Adhesion to and invasion of epithelial cells by *Campylobacter* are affected by assay parameters, and considerable variations in *in vitro* techniques are described in the literature (10, 17, 30). Consequently, the comparison of *in vitro* adhesion and invasion abilities of *Campylobacter* isolates among studies is difficult. In the present study, the number of invasive bacteria ranged from  $1 \times 10^2$  to  $5 \times 10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>, representing 0,0001% to 0,05% of the bacterial inoculum. Although 21,3% of the isolates showed intracellular numbers  $>1000$  CFU ml<sup>-1</sup>, the proportion of human isolates above this level was significantly higher than the proportion of poultry isolates ( $p_{\text{exact}}=0,0277$ ) (table 4.1). However, a higher number of isolates from humans would be required to confirm this dissimilarity since the discrepancy between the numbers of human and poultry isolates may skew the invasion results in favor of human isolates.

**Cytotoxin assay on epithelial cells.** *Campylobacter* cells were harvested from a 24-h culture on a Mueller-Hinton agar plate incubated at 42°C, washed with phosphate-buffered saline, and resuspended at an optical density at 650 nm ( $OD_{650}$ ) of 0,75 in MEM containing 0,15% (wt/vol) polymyxin B sulfate (Sigma). Suspensions were incubated at 37°C for 30 min and centrifuged at  $2500 \times g$  for 20 min, and the supernatant was filtered through a 0,45- $\mu\text{m}$ -pore-size disposable filter (Millipore). Toxin assays were carried out in 96-well tissue culture plates (Nunc). Polymyxin B extracts were added (100  $\mu\text{l}$ ) in triplicate, and doubling dilutions were performed with MEM supplemented with 3% FBS. Freshly trypsinized Chinese hamster ovary (CHO)

cells ( $4 \times 10^5$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ) suspended in MEM supplemented with 3% FBS were then added (100  $\mu\text{l}$ ). Plates were incubated at 37°C for 48 h in 5%  $\text{CO}_2$ . Wells were observed at 24-h intervals using an inverted microscope. After 48 h, the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) dye reduction assay was performed as previously described (4) to minimise subjective errors. The cytotoxic titer was the dilution of the well in which cell death ( $1 - [\text{mean OD of test wells} / \text{mean OD of negative control wells}] \times 100$ ) was  $\geq 25\%$ . This cutoff value was estimated by doubling the percentage of intraplate variation of CHO cell growth. Titers  $< 1/4$  were considered as nonspecific. All CHO cell-cytotoxic isolates were also tested with Vero and INT-407 cells by the same assay but with a serum concentration of 5% for INT-407 cells and 1% for Vero cells.

CHO cell cytotoxicity was observed for 26 (13,2%) of the *Campylobacter* isolates (table 4.1). Cytotoxicity was associated with rounded and detached cells. For some isolates, this activity was observed microscopically as soon as 24 h after incubation. Titers varied from 1/16 to 1/128 for 23 of the 26 cytotoxic isolates, whereas they were less than 1/16 for the three others. *Campylobacter* cytotoxic activities have been classified into those of cytodistending toxin (CDT) and non-CDT toxins (31, 37), but comparison of cytotoxic activities among studies is difficult due to confusion concerning *Campylobacter* cytotoxins. Distension of cells by CDT can normally be observed after 48 h of incubation (9, 13). CDT activities have been frequently observed when sonication or supernatants of *Campylobacter* cultures were used (6, 13, 33). Non-CDT activities were observed in the present study. McFarland and Neill (23) also reported only non-CDT activity when CHO cells were added to *Campylobacter* polymyxin B extracts. Nevertheless, we cannot rule out the possibility that the cytotoxicity observed in the present study was associated with viable *Campylobacter* cells that may have passed through the 0,45- $\mu\text{m}$ -pore-size filters. If this were the case, however, the viable bacteria would have reduced the MTT, consequently concealing the epithelial cell death caused by the cytotoxicity. Furthermore, no bacterial growth was observed in wells with the inverted microscope.

The proportion of human cytotoxic isolates was much lower than that reported in the literature (37). It is possible that titers considered as nonspecific ( $<1/4$ ) reflected a weak activity of cytotoxicity since non-CDT titers are generally low (31). Moreover, the cytotoxic cutoff value chosen might also contribute to concealing weak cytotoxic activities. Some authors reported more non-CDT cytotoxic activity in human isolates than in animal isolates (1, 19, 32, 33), whereas, as in the present study (table 4.1), others reported no difference (20, 25).

All tested CHO cell-cytotoxic extracts were also cytotoxic for INT-407 cells (table 4.2). Poultry isolates were generally not toxic for Vero cells or, if so, had weaker titers, whereas four of the five CHO cell cytotoxic human isolates were cytotoxic for Vero cells. A significantly higher proportion of human than poultry CHO cell-cytotoxic extracts were cytotoxic for Vero cells ( $p\text{-exact}=0,0372$ ). Other authors reported a weaker reaction on Vero cells than on other cell lines (1, 16, 19) and conflicting results with regard to Vero cell sensitivity (31). Since more than one cytotoxin activity has been previously observed (31) and since the results obtained for the Vero cell assay were variable among CHO cell-cytotoxic isolates, we cannot eliminate the possibility of multiple cytotoxin activities for the tested isolates.

**Subgrouping *Campylobacter* isolates with regard to their *in vitro* virulence abilities.** The isolates were biotyped according to the scheme of Lior (21). PFGE was done as described previously using *KpnI* enzyme (26). Genetic relationships of strains were also established as described previously (26, 35). In the dendrogram, genotypes were delineated with a 90% similarity cutoff level. The 197 *Campylobacter* isolates were distributed in 57 different *KpnI* genotypes. Only poultry isolates ( $n=155$ ) were clustered in 37 genotypes. Both human ( $n=5$ ) and poultry isolates ( $n=18$ ) were found in 4 genotypes, and the remaining human isolates ( $n=19$ ) were clustered in 16 genotypes.

Nearly all invasive isolates with an intracellular numbers  $>1000$  CFU ml<sup>-1</sup> belonged to biotypes 1 and 2 of *C. jejuni*, whereas CHO cell-cytotoxic isolates were associated with *C. jejuni* biotypes 3 and 4 (table 4.1). This latter association has not been previously reported except for the observation of a higher cytotoxic activity for a polymyxin B extract of a *C. jejuni* biotype 4 isolate (8). Unlike Carvalho et al. (3), who identified a RAPD fingerprinting cluster comprising the more-invasive isolates, we observed that invasive isolates were distributed throughout the PFGE dendrogram. On the other hand, 18 of the 21 CHO cell-cytotoxic isolates from poultry were clustered in three genotypes (table 4.2) and in two clusters in the dendrogram (figure 4.1). These results suggest that these cytotoxic isolates represent a subgroup of *Campylobacter* sharing particular characteristics. Nevertheless, we cannot rule out the possibility that the clusters are due to a geographical relationship since the exact locations of the farm and patients are not known.

Higher invasiveness has been reported among noncytotoxic isolates (20). In this study, CHO cell-cytotoxic isolates generally had an intracellular numbers of 0 to 1000 CFU ml<sup>-1</sup> except for two *C. jejuni* biotype 3 cytotoxic isolates from poultry and two *C. jejuni* biotype 1 cytotoxic isolates from humans that showed an intracellular numbers  $>1000$  CFU ml<sup>-1</sup>. Since invasive isolates belonged to different biotypes than cytotoxic isolates, it is possible that distinct *Campylobacter* populations carry these two putative virulence factors. On the other hand, the cytotoxic activity might affect the invasion process and the ability to measure invasion.

Finally, isolates clustered in a particular *KpnI* genotype had similar invasion abilities, with few exceptions, and had the same CHO cell cytotoxic status (cytotoxic or not), except for the poultry cytotoxic isolate 876, which clustered with the noncytotoxic isolate 867 (figure 4.1). This homogeneity of *in vitro* virulence properties within a particular *KpnI* genotype suggests that the phenotype may be stable for isolates clustered in a particular genotype. Surprisingly, all isolates included inside the four genotypes comprising poultry and human cases were not invasive or were weakly invasive ( $\leq 1000$  CFU ml<sup>-1</sup>) and not cytotoxic.

Overall, the data presented in this study revealed an association of *in vitro* virulence properties with biotype, genotype and host of origin. Invasive isolates were associated with biotypes 1 and 2 of *C. jejuni*, whereas CHO cell- and INT-407 cell-cytotoxic isolates were associated with biotypes 3 and 4 of *C. jejuni* and were clustered with PFGE groups. Human isolates were more invasive and Vero cell cytotoxic than poultry isolates. These data also suggest that clonally related isolates have common *in vitro* virulence characteristics and that subgroups of *Campylobacter*, with respect to potential virulence abilities, exist. Further work is needed to determine if cytotoxic *C. jejuni* isolates associated with biotypes 3 and 4 are widely distributed among *C. jejuni* strains and to characterize the subgroup of biotype 3 and 4 *C. jejuni* cytotoxic isolates.

We acknowledge Health Canada authorities at the Food and Veterinary Hygiene Laboratory of Saint-Hyacinthe for their collaboration and access to their facilities.

## TABLES

TABLE 4.1: Distribution of invasive and cytotoxic *Campylobacter* isolates among biotypes according to invasion ability for INT-407 cells and cytotoxic activity for CHO cells

No. (% of the total sample) of isolates that were:				
Biotype <sup>a</sup>	Invasive (intracellular no. >1000CFU ml <sup>-1</sup> )		Cytotoxic (polymyxin B extracts)	
	Human (n=24)	Poultry (n=173)	Human (n=24)	Poultry (n=173)
CJ-1	4 (16,7)	13 (7,5)	1 (4,2)	0 (0,0)
CJ-2	4 (16,7)	15 (8,7)	2 (8,3)	0 (0,0)
CJ-3	0 (0,0)	3 (1,7)	0 (0,0)	20 (11,6)
CJ-4	1 (4,2)	0 (0,0)	2 (8,3)	1 (0,0)
CC-1	0 (0,0)	2 (1,1)	0 (0,0)	0 (0,0)
CC-2	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	9 (37,5) <sup>b</sup>	33 (19,1)	5 (20,8) <sup>c</sup>	21 (12,1)

<sup>a</sup> CJ = *C. jejuni* and CC = *C. coli*

<sup>b</sup> Statistically higher than for poultry ( $p_{\text{exact}}=0,0277$ )

<sup>c</sup> Not statistically higher than for poultry ( $p_{\text{exact}}=0,1172$ )

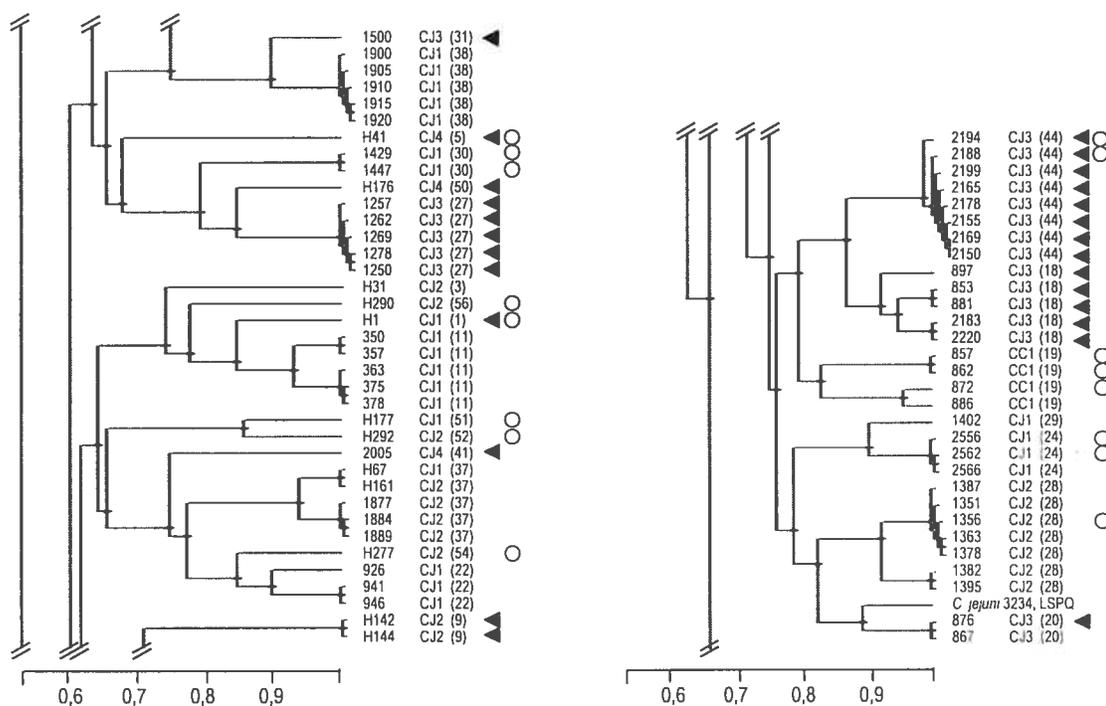
TABLE 4.2: Comparison of cytotoxic activities of polymyxin B extracts of human and poultry *Campylobacter* isolates on different cell lines

Isolate no.	Genotype <sup>a</sup>	Biotype <sup>b</sup>	Cytotoxic activity <sup>c</sup> on cell line:		
			CHO	INT-407	Vero
853	18	CJ-3	64	16	<4
881	18	CJ-3	16	16	<4
897	18	CJ-3	32	NT	NT
2183	18	CJ-3	16	NT	NT
2220	18	CJ-3	4	8	<4
876	20	CJ-3	8	NT	NT
1250	27	CJ-3	8	16	16
1257	27	CJ-3	128	16	4
1262	27	CJ-3	32	32	<4
1269	27	CJ-3	16	16	<4
1278	27	CJ-3	32	16	8
1500	31 (U)	CJ-3	32	16	<4
2005	41 (U)	CJ-4	64	32	8
2150	44	CJ-3	64	32	<4
2155	44	CJ-3	16	16	<4
2165	44	CJ-3	32	8	<4
2169	44	CJ-3	16	NT	NT
2178	44	CJ-3	32	32	<4
2188	44	CJ-3	64	8	<4
2194	44	CJ-3	32	16	<4
2199	44	CJ-3	16	16	<4
Human-1	1 (U)	CJ-1	64	32	16
Human-41	5 (U)	CJ-4	16	16	<4
Human-142	9	CJ-2	64	16	8
Human-144	9	CJ-2	64	16	4
Human-176	50 (U)	CJ-4	16	16	32
2070 <sup>d</sup>	42	CJ-2	<4	<4	<4

<sup>a</sup> *KpnI* profiles, U, unique, <sup>b</sup> CJ= *C. jejuni*, <sup>c</sup> Reciprocal cytotoxicity titers, <sup>d</sup> Noncytotoxic strain, NT: Not tested.

## FIGURE

Figure 4.1: Representative portions of the PFGE *KpnI* dendrogram. The scale measured similarity values. Levels of similarity were calculated with the Dice coefficient and the UPGMA was used for cluster analysis. Human *Campylobacter* isolate numbers are preceded by H, and poultry isolates consist of numbers only. Each isolate number is followed by the biotype (CJ, *C. jejuni*; CC, *C. coli*) and, in parentheses, the PFGE *KpnI* genotype. Circles, isolates with an intracellular numbers >1000 CFU ml<sup>-1</sup>; triangles, CHO cell-cytotoxic isolates. Genotypes were delineated with a 90% similarity cutoff level.



## REFERENCES

1. Akhtar, S.Q., and F. Huq. 1989. Effect of *Campylobacter jejuni* extracts and culture supernatants on cell culture. *J. Trop. Med. Hyg.* 92:80-5.
2. Atabay, H.I., and J.E.L. Corry. 1997. The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.* 83:619-626.
3. Carvalho, A.C.T., G.M. Ruiz-Palacios, P. Ramos-Cervantes, L.-E. Cervantes, X. Jiang, and L.K. Pickering. 2001. Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 39:1353-1359.
4. Coote, J.G., and T. Arain. 1996. A rapid, colourimetric assay for cytotoxin activity in *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13:65-70.
5. Duim, B., T.M. Wassenaar, A. Rigter, and J. Wagenaar. 1999. High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2369-2375.
6. Eyigor, A., K.A. Dawson, B.E. Langlois, and C.L. Pickett. 1999. Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Campylobacter* spp. isolated from chicken carcasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1501-1505.
7. Grant, C.C.R., M.E. Konkel, W. Jr. Cieplak, and L.S. Tompkins. 1993. Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infect. Immun.* 61:1764-1771.

8. Guerrant, R.L., C.A. Wanke, R.A. Pennie, L.J. Barrett, A.A. Lima, and A.D. O'Brien. 1987. Production of a unique cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 55:2526-2530.
9. Hänel, I., F. Schulze, H. Hotzel, and E. Schubert. 1998. Detection and characterization of two cytotoxins produced by *Campylobacter jejuni* strains. *Zentralbl. Bakteriol.* 288:131-143.
10. Hu, L., and D.J. Kopecko. 1999. *Campylobacter jejuni* 81-176 associates with microtubules and dynein during invasion of human intestinal cells. *Infect. Immun.* 67:4171-4182.
11. Hu, L., and D.J. Kopecko. 2000. Interactions of *Campylobacter* with eukaryotic cells: gut luminal colonization and mucosal invasion mechanisms, p. 191-215. *In* I. Nachamkin, and M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Jacobs-Reitsma, W. 2000. *Campylobacter* in food supply, p. 467-481. *In* I. Nachamkin, and M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. Johnson, W.M., and H. Lior. 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.* 4:115-126.
14. Kapperud, G., E. Skjerve, L. Vik, K. Hauge, A. Lysaker, I. Aalmen, S.M. Ostroff, and M. Potter. 1993. Epidemiological investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidemiol. Infect.* 111:245-255.
15. Ketley, J.M. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology* 143:5-21.

16. Klipstein, F.A., R.F. Engert, H. Short, and E.A. Schenk. 1985. Pathogenic properties of *Campylobacter jejuni*: assay and correlation with clinical manifestations. *Infect. Immun.* 50:43-49.
17. Konkel, M.E., M.D. Corwin, L.A. Joens, and W. Cieplak. 1992. Factors that influence the interaction of *Campylobacter jejuni* with cultured mammalian cells. *J. Med. Microbiol.* 37:30-37.
18. Konkel, M.E., L.A. Joens, and P.F. Mixter. 2000. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* virulence determinants, p. 217-240. *In* I. Nachamkin, and M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
19. Lee, A., S.C. Smith, and P.J. Coloe. 2000. Detection of a novel *Campylobacter* cytotoxin. *J. Appl. Microbiol.* 89:719-725.
20. Lindblom, G.-B., and B. Kaijser. 1995. In vitro studies of *Campylobacter jejuni/coli* strains from hens and humans regarding adherence, invasiveness, and toxigenicity. *Avian dis.* 39:718-722.
21. Lior, H. 1984. New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and "*Campylobacter laridis*". *J. Clin. Microbiol.* 20:636-640.
22. Mahajan, S., and F.G. Rodgers. 1990. Isolation, characterization, and host-cell-binding properties of a cytotoxin from *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 28:1314-1320.
23. McFarland, B.A., and S.D. Neill. 1992. Profiles of toxin production by thermophilic *Campylobacter* of animal origin. *Vet. Microbiol.* 30:257-266.

24. Michaud, S., Ménard, S., Gaudreau, C., and R.D. Arbeit. 2001. Comparison of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Kpn*I: a population-based study. *J. Med. Microbiol.* 50:1075-1081.
25. Misawa, N., T. Ohnishi, K. Itoh, and E. Takahashi. 1995. Cytotoxin detection in *Campylobacter jejuni* strains of human and animal origin with three tissue culture assay systems. *J. Med. Microbiol.* 43:354-359.
26. Nadeau, É., S. Messier, and S. Quessy. 2002. Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans. *J. Food Prot.* 65:73-78.
27. Newell, D.G., Frost, J.A., Duim, F.B., Wagenaar, J.A., Madden, R.H., van der Plas, J, and S.L.W. On. 2000. New developments in the subtyping of *Campylobacter* species, p. 27-44. *In* I. Nachamkin, and M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
28. Nielsen, E.M., J. Engberg, and M. Madsen. 1997. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 19:47-56.
29. On, S.L.W., E.M. Nielsen, J. Engberg, and M. Madsen. 1998. Validity of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Sal*I, *Kpn*I, and *Bam*HI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiol. Infect.* 120:231-237
30. Pei, Z., C. Burucoa, B. Grignon, S. Baqar, X.-Z. Huang, D.J. Kopecko, A.L. Bourgeois, J.-L. Fauchere, and M.J. Blaser. 1998. Mutation in the *peb*1A locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect. Immun.* 66:938-943.

31. Pickett, C.L. 2000. *Campylobacter* toxins and their role in pathogenesis, p. 179-190. In I. Nachamkin, and M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
32. Prasad, K.N., T.N. Dhole, and A. Ayyagari. 1996. Adherence, invasion and cytotoxin assay of *Campylobacter jejuni* in HeLa and Hep-2 cells. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 14:255-259.
33. Schulze, F., I. Hanel, and E. Borrmann. 1998. Formation of cytotoxins by enteric *Campylobacter* in humans and animals. *Zentralbl. Bakteriologie*. 288:225-236.
34. Tay S.T., S. Devi, S. Puthuchery, and I. Kautner. 1996. In vitro demonstration of the invasive ability of *Campylobacter*s. *Zentralbl. Bakteriologie*. 283:306-313.
35. Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239.
36. Wallis, M.R. 1994. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*. *Br. J. Biomed. Sci.* 51:57-64.
37. Wassenaar, T.M. 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:466-476

## **CHAPITRE 5**

**Association of gamma-glutamyl transpeptidase with *in vitro* cytotoxic activities of  
*Campylobacter jejuni* isolates**

**Manuscrit en préparation, 2003**

**Association of gamma-glutamyl transpeptidase with *in vitro* cytotoxic activities of  
*Campylobacter jejuni* isolates**

Éric Nadeau et Sylvain Quessy

Chaire de recherche en salubrité des viandes, Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec

Téléphone: 1-450-773-8521

Fax: 1-450-778-8113

Courriel: [sylvain.quessy@umontreal.ca](mailto:sylvain.quessy@umontreal.ca)

## RÉSUMÉ

Afin de caractériser une activité cytotoxique, précédemment observée et associée à des extraits de polymyxine B d'isolats de *C. jejuni* biotypes 3 et 4, 79 isolats cytotoxiques et non cytotoxiques de *C. jejuni* ont été comparés. Ces isolats provenaient de poulets à griller et de cas sporadiques de diarrhée chez l'humain. Cette activité cytotoxique, pour les cellules CHO et INT-407, causait l'arrondissement, le détachement puis la mort des cellules. Les isolats cytotoxiques sont demeurés cytotoxiques après un entreposage de plus de 2 ans à  $-70^{\circ}\text{C}$ , quoique des titres de cytotoxicité plus faibles aient été observés. Le phénotype cytotoxique a été associé à une protéine d'environ 42 kDa et à un locus de 1671 pb, ce dernier étant fortement homologue à la gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) d'*H. pylori*. La séquence N-terminale de la protéine de 42 kDa concordait avec la séquence peptidique N-terminale hypothétique de la sous-unité lourde de la GGT d'*H. pylori*. La protéine de 42 kDa a été détectée par Western blot, à l'aide d'un antiserum polyclonal, dans les extraits de protéines totales (WC) et les extractions à la polymyxine B concentrées (CPB) des isolats cytotoxiques sans toutefois être détectée dans les extractions des isolats non cytotoxiques. La séquence nucléotidique en aval du gène *ggt* hypothétique de *C. jejuni* était homologue à l'extrémité C-terminale d'une autre protéine d'*H. pylori*, la Ycf5, une protéine de biogénèse du cytochrome C.

## ABSTRACT

With the aim of characterizing a previously observed cytotoxic activity associated with polymyxin B extracts of *C. jejuni* biotypes 3 and 4 isolates, 79 cytotoxic and noncytotoxic *C. jejuni* isolates from chicken broilers and sporadic cases of diarrhea in humans were compared. This cytotoxic activity caused rounding, detachment and death of CHO and INT-407 cells. The cytotoxic isolates remained cytotoxic for CHO cells after at least two years of freeze storage at  $-70^{\circ}\text{C}$ , but the titers were lower. The cytotoxic phenotype was associated to a protein of approximately 42-kDa and a 1671-pb locus highly homologous to the *H. pylori*

gamma-glutamyl transpeptidase (GGT). The N-terminal sequence of the 42-kDa protein matched with the putative deduced N-terminal sequence of the large subunit of the *H. pylori* GGT. A polyclonal antisera directed against the 42-kDa protein identified, by western blot, the protein in the whole cell protein extracts (WC) and the concentrated polymyxin B extracts (CPB) of the cytotoxic isolates whereas it was not detected for the noncytotoxic isolates. The downstream sequence of the putative *C. jejuni ggt* was homologous to another *H. pylori* protein, the Ycf5, a cytochrome C biogenesis protein.

## INTRODUCTION

*Campylobacter* is the most important cause of foodborne enteritis in human (2). The majority of *Campylobacter* infections occur as sporadic cases (3) and are mostly caused by *C. jejuni* (17). Several epidemiological studies have incriminated handling and consumption of chicken products as risks for sporadic *C. jejuni* infections (12). *C. jejuni* is frequently isolated from chicken and chicken products (2).

Mechanisms by which *C. jejuni* initiates the diarrhea are still poorly known and the pathogenesis seems multifactorial and complex (10). Many virulence factors were proposed for this infection. The motility, the adherence to and invasion of epithelial cells, and the production of toxins are often reported (13). Many toxic activities have been reported for *Campylobacter* but their importance in disease remains unclear (24). Cytodistending toxin (CDT) is the most characterized *C. jejuni* toxin (20). However, our knowledge about non-CDT cytotoxin activities is limited (20, 24). The non-CDT toxins cause rounding, detachment and death of the cells. Most non-CDT cytotoxin activities have been classified as Vero negative toxin, when active on CHO/HeLa cells but not on Vero cells, or Vero positive toxin, when active on both HeLa and Vero cells. The cytotoxin active on CHO and HeLa cells was also named the "70-kDa cytotoxin". Lee et al (15) also reported a >50 kDa cytotoxin that may be active on INT-407, CHO and HeLa cells. Another cytotoxin found active on CHO cells was named CLRT for "cytolethal rounding toxin" (9).

In a previous study, we reported the presence of a cytotoxin activity associated with chicken and human biotypes 3 and 4 *C. jejuni* isolates (19). These cytotoxic isolates were also clustered by PFGE. The cytotoxicity was observed for both CHO and INT-407 cells, but the activity was weaker and variable for Vero cells. The objective of this study was to characterize the cytotoxin activity associated with the biotypes 3 and 4 *C. jejuni* isolates from chicken broilers and sporadic cases of diarrhea in humans.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains.** Twenty-four cytotoxic *C. jejuni* isolates (5 from sporadic cases of human diarrhea and 19 from chicken broilers) were compared to 55 noncytotoxic isolates (10 from sporadic cases of human diarrhea and 45 from chicken broilers). *C. jejuni* isolates were previously isolated during a 1-year sampling period, as described previously (18), and were also characterized for their *in vitro* virulence properties (19). The cytotoxic phenotype was observed for 21 *C. jejuni* biotypes 3 and 4 isolates and 3 *C. jejuni* biotypes 1 and 2 isolates. All the noncytotoxic isolates were identified as *C. jejuni* biotype 1 and 2. Isolates were frozen and stored at -70°C in brucella broth with 15% glycerol. Before testing, isolates were inoculated onto charcoal selective medium and incubated for 48 h at 42°C under microaerobic conditions. They were then cultured for another 24 h onto Mueller-Hinton agar plate at 42°C under microaerobic conditions. The poultry isolate 1257, a strongly cytotoxic *C. jejuni* isolate, was used for molecular analysis.

**Preparation of polymyxin B extracts.** *C. jejuni*-polymyxin B extracts were prepared as described previously (19). Briefly, bacterial suspensions were adjusted at an OD<sub>650</sub> of 0.75 in MEM containing 0.15% (w/v) polymyxin B sulfate (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), incubated at 37°C for 30 min, centrifuged and the supernatant filtered through a 0.22 µm disposable filter (Millipore Corp., Bedford, Mass.). Twenty polymyxin B extracts, 3 from cytotoxic human isolates, 7 from cytotoxic poultry isolates, 3 from noncytotoxic human isolates, and 7 from noncytotoxic poultry isolates, were concentrated by lyophilization. Extracts were dialyzed against 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) using a 10 000 molecular weight cutoff dialysis tubing (Spectrum, Houston, Tex.). Polymyxin B extracts were lyophilized and dissolved in PBS to obtain an approximately 10-fold concentration, designated concentrated polymyxin B extract (CPB).

**Cytotoxin assay on epithelial cells.** Isolates used in this study were previously tested with different cytotoxin assays using CHO, INT-407 and Vero cells (19). Since *C. jejuni* isolates were freeze stored for more than two years, the previously described cytotoxin assay using CHO cells (18) was repeated to confirm the stability of the cytotoxin activity. In addition, the CPB extract of the isolate 1257 was tested in the cytotoxin assay. Polymyxin B extracts were tested in triplicata. Briefly, dilutions were performed in 96-wells tissue culture plate (Nunclon). Two fold diluted MEM-Polymyxin B sulfate solution was used as negative control for the polymyxin B extracts while sterile PBS was used for the dialyzed CPB extract. CHO cells were added and plates were incubated at 37°C for 48 h. The MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma) dye reduction assay was performed as described previously (5, 19) to evaluate the percentage of cell death.

**SDS-PAGE.** Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed by the method of Laemmli (14). Bacterial suspensions were adjusted to an OD<sub>625</sub> of 1.9 to 2.0 in PBS for the whole cell protein extracts (WC). WC and CPB extracts were separated in 12,5% polyacrylamide gels with a 4.5% stacking gel. Low-range molecular weight standards (Bio-Rad Laboratories) were used as molecular weight markers. Gels were stained using Coomassie brilliant blue (Bio-Rad Laboratories).

**N-terminal amino acids sequencing of the 42-kDa *C. jejuni* cytotoxicity associated protein.** The WC extract of the poultry isolate 1257 was used for the N-terminal sequencing of the 42-kDa cytotoxicity associated protein. The WC was separated by SDS-PAGE as described above, transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad Laboratories) in CAPS buffer (10 mM 3-[cyclohexylamino]-1-propane sulfonic acid [Sigma], pH 11, 10% methanol), and stained with Coomassie Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories). The appropriate band was cut out, air dried, and sent to the Eastern Quebec Proteomics Center (CHUL Research Center, Saint-Foy, Quebec, Canada) for N-terminal sequencing. In addition, the CPB extract of the isolate 1257 was also separated by SDS-PAGE for N-terminal

sequencing and internal sequencing, using cyanogen bromide cleavage (CnBr). The 42-kDa SDS-PAGE gel band was shipped to the Sheldon biotechnology center (McGill University, Montreal, Quebec, Canada).

**Rabbit polyclonal antisera against the 42-kDa *C. jejuni* cytotoxicity associated protein.** The CPB extract of the poultry isolate 1257 was used for the production of the rabbit polyclonal antisera. After SDS-PAGE separation, the 42-kDa-gel band was excised, crushed and electroeluted according to the manufacturer's protocol (model 422 electroeluter; Bio-Rad Laboratories). The N-terminal sequence of the injected protein was confirmed as described previously. Adult New Zealand rabbits were injected intramuscularly once a week for 6 weeks with the eluted protein mixed with Freund incomplete adjuvant (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA), and were sacrificed one week after the last injection. Antisera were stored at -20°C.

**Western immunoblotting.** Following SDS-PAGE, separated antigens were transferred to 0.45- $\mu$ m-pore-size nitrocellulose membranes with the Mini Trans-Blot system (Bio-Rad Laboratories). Membranes were incubated 1 h in Tris-HCl (10 mM; pH 7.4) supplemented with 2% non-fat dry milk, washed three times with Tris-HCl, and incubated at room temperature overnight with the polyclonal antisera anti-42 kDa protein diluted 1:200 in Tris-HCl supplemented with 2% non-fat dry milk. After being washed, the membranes were incubated at room temperature for 1 h with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (Sigma) 1:1000 in Tris-HCl containing 2% non-fat dry milk. They were washed again, and bound antibodies were detected with 4-chloro-1-naphthol as substrate.

**PCR procedures.** Genomic DNA was extracted using a genomic DNA extraction kit (Qiagen), and stored at -20°C. Degenerate primers DegF42 (5'-GCI GCI AAY CCI GAY ATH CAR GA-3') and DegR42 (5'-GGI TTY AAR CAI CTY TAD GGG VT-3') were designed on the basis of the N-terminal and the internal amino acid sequences of the 42-kDa protein. Deoxyinosine residues were used to reduce the degeneracy of the sequences. Primers were synthesised by InvitroGen (Carlsbad,

California). One-microliter aliquots of genomic DNA were used as templates for PCR amplification. Each 50- $\mu$ l PCR reaction contained 0.2 mM (each) dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, 2.0  $\mu$ M (each) degenerate primers, and 1.25 U of *HotTub* DNA polymerase (Amersham Life Science, Cleveland, Ohio) in 1 $\times$  *HotTub* DNA polymerase buffer containing 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. The optimal amplification program consisted of a denaturation period of 3 min at 94°C followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 40°C, and 2 min at 72°C, with a final extension step at 72°C for 10 min.

Partial sequences of the 2-kb cytotoxicity associated PCR product, amplified with the degenerate PCR described above, were used to design the non-degenerate PCR primers 310F (5'-ACT TGA TGG CTC CTG CTA-3') and 1700R (5'-CCA AAA GGC TCT GTT CTG A-3'). For amplification, one-microliter of the genomic DNA was used as template. Each 50- $\mu$ l PCR reaction was identical as those described for the degenerate PCR except 0.2  $\mu$ M (each) non-degenerate primers. A denaturation period of 3 min at 94°C followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C, and 1.5 min at 72°C, with a final extension step at 72°C for 5 min were used.

**Inverse PCR.** Inverse PCR was used to amplify the region upstream of the 2-kb product amplified with the degenerate PCR, and subsequently, to complete the sequence of the putative *C. jejuni* gamma-glutamyl transpeptidase gene (*ggf*). Genomic DNA of the cytotoxic isolate 1257 was digested using the *Hind*III enzyme in a 20  $\mu$ l digestion reaction mixture (5 h, 37°C) containing 2  $\mu$ l of 10x enzyme buffer, 8  $\mu$ l of genomic DNA and 1  $\mu$ l of *Hind*III enzyme. *Hind*III-digested genomic DNA was circularized in a 40- $\mu$ l ligation reaction mixture (18 h, 14°C) containing 8  $\mu$ l of 5x ligation buffer, 20  $\mu$ l of digested DNA, and 2  $\mu$ l of T4 ligase. Inverse PCR primers LigF723 (5'-GGG TGC TCA TAT CAT CGA A-3') and LigR310 (5'-GTA GCG ATC AAG CAT AGC A-3') were designed on the basis of the forward sequence of the 2-kb product amplified with the degenerate PCR. Five- $\mu$ l of the circularized *Hind*III-digested genomic DNA was used as templates for PCR amplification. Each 50- $\mu$ l PCR reaction was identical as those used for the non-degenerate PCR. For

amplification, a denaturation period of 3 min at 94°C followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 1,5 min at 72°C, with a final extension step at 72°C for 5 min were used. All PCR products were analyzed in horizontal 1.0 % agarose gels stained with ethidium bromide.

**Nucleotide sequencing.** DNA of the poultry isolate 1257 was used for nucleotide sequencing. The 2-kb cytotoxic associated PCR product band, generated by use degenerate primers, was excised from the agarose gel. The DNA was extracted and purified using a commercial extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The 1,1-kb cytotoxicity associated PCR product amplified with the non-degenerated PCR and the 1-kb PCR product amplified with the inverse PCR were purified using a commercial kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. DNA products were partially sequenced using the respective forward and reverse primers by the Sheldon biotechnology center (McGill University, Montreal, Quebec, Canada).

**Amino acid and nucleotide similarity searches.** The Blastn and Blastx programs from the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) were used to identify similar sequences. Multiple alignments were generated using the CLUSTAL program (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>).

## RESULTS

**CHO cell-cytotoxicity assays.** All 24 *C. jejuni* cytotoxic isolates remained cytotoxic for CHO cells after at least two years of freeze storage at -70°C, but titers were lower (table 5.1). The cytotoxicity titer of the CPB extract of the poultry isolate 1257 was higher than the unconcentrated polymyxin B extract (table 5.1). No cytotoxicity was observed for the previously identified noncytotoxic isolates.

**SDS-PAGE and Western immunoblotting.** A wide diversity of protein profiles was observed for the WC and CPB extracts of human and poultry isolates (figure 5.1). An approximately 42-kDa SDS-PAGE band was associated with the cytotoxic isolates (figure 5.1). For the WC extracts, this 42-kDa band was generally composed of three minor bands, one being associated with cytotoxic isolates and two adjacent bands being observed for some of the noncytotoxic isolates. The 42-kDa band was not surrounded by the two other bands and was a major protein within the CPB extract of the cytotoxic isolates (figure 5.1). The 42-kDa cytotoxicity associated protein was observed for all WC and all tested CPB extracts of cytotoxic isolates whereas it was absent in 53 of the 55 WC extracts and in all tested CPB extracts of noncytotoxic isolates (table 5.1). For 2 WC extracts of noncytotoxic isolates, it was not possible to evaluate the presence or the absence of the 42-kDa protein due to the high number of bands nearby this area in SDS-PAGE gels.

The polyclonal antisera generated with the 42-kDa protein of the poultry isolate 1257 detected a 42-kDa protein for all WC extracts and all tested CPB extracts of cytotoxic isolates, but not for the noncytotoxic isolates (table 5.1 and figure 5.1). For the WC extracts, several other proteins were detected by the polyclonal antisera but only few proteins, and occasionally only the 42-kDa protein, were detected in the CPB extracts.

**Peptide sequencing and degenerate PCR.** The N-terminal peptide sequencing confirmed that the 42-kDa protein of the CPB extract (AANPDIQDRTG) was the same protein observed in the WC extract (AANPDIQDRTGTVLVL) of the poultry isolate 1257. The degenerate PCR, designed using this N-terminal peptide sequence and an internal peptide sequence of the 42-kDa protein, amplified 3 to 8 different PCR products for the cytotoxic and the noncytotoxic isolates (table 5.1 and figure 5.2). An approximately 2-kb PCR product was observed for all the cytotoxic isolates whereas it was absent for all the noncytotoxic isolates (table 5.1 and figure 5.2). All the cytotoxic isolates, except one, had the same five PCR bands. PCR products of approximately 300, 500, and 600 pb were observed for almost all isolates and an approximately 1 kb product was amplified for 60 of the 79 isolates, but without association with cytotoxicity.

**Analysis of the locus associated with the 42-kDa cytotoxicity associated protein.** The non-degenerate PCR produced a band of approximately 1,1 kb in agarose gel for all the cytotoxic isolates but for none of the noncytotoxic isolates (table 5.1 and figure 5.2). The inverse PCR amplified an approximately 1 kb product. The alignment of the partial sequences of the products from the degenerate, non-degenerate, and inverse PCRs gave a 2431-pb fragment (figure 5.3). This sequence contained a 1671-pb putative coding sequence (position from 498 to 2166 pb) with a predicted protein showing 67% sequence identity with the *H. pylori* gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) (NP\_207909). This deduced *C. jejuni* protein of 556 amino acids shared consensus sequences with many bacterial GGT (figures 5.3 and 5.4). Its calculated molecular mass was 60 256 Da. The multiple alignment showed that the putative *C. jejuni* GGT had an overall structure similar to that of *H. pylori* GGT. As for the *H. pylori* GGT, the putative *C. jejuni* GGT had the two potential cleavage sites (Ala26-Ala27 and Asn379-Thr380), which result into the large and the small subunits of GGT (4) (figures 5.3 and 5.4). The N-terminal peptide sequence of the 42-kDa *C. jejuni* cytotoxicity associated protein matched with the N-terminal sequence of the putative large subunit of the *H. pylori* GGT (figure 5.3).

Sequences of the upstream and downstream segments of the GGT associated coding sequence were analyzed. The last 222 pb of the 262-pb downstream segment of the GGT associated locus was homologous (58% of identity) to the C-terminal extremity of another *H. pylori* protein, the Ycf5, a putative cytochrome C-type biogenesis protein (NP\_207176). The first 269 pb of the 498-pb upstream segment was homologous (36% of identity) to the N-terminal extremity of a putative type IIS restriction/modification enzyme of *C. jejuni* (NP\_281253) (figure 5.3).

## DISCUSSION

In a previous study, we reported a heat labile cytotoxin activity affecting CHO and INT-407 cells that was strongly associated to biotypes 3 and 4 of *C. jejuni* isolates from chicken broilers and sporadic cases of human campylobacteriosis (19). In the present study, this cytotoxin activity was associated with a 42-kDa protein and a 1671-pb putative coding sequence homologous to the *H. pylori* gamma-glutamyl transpeptidase and to other orthologue GGTs.

Bacterial *ggt* gene has been sequenced for several bacteria such as *E. coli* (23), *Pseudomonas* spp. (11), *Bacillus subtilis* (25), and *H. pylori* (4). GGT activity is common to all *H. pylori* strains (4). The *H. pylori ggt* gene consists of a 1681-bp open reading frame encoding, in order, a signal peptide, a large and a small subunits (4). The calculated molecular mass of the *H. pylori* GGT was 61 kDa (4), similar as for the putative *C. jejuni* GGT. The protein is translated as a pro-GGT of 575 to 587 amino acids, depending of the bacterial species. The pro-GGT is cleaved and assembled into the active enzyme composed of large and small non-covalently associated subunits of approximately 20 kDa and 40 kDa, respectively. For *E. coli*, GGT has been observed in the periplasmic space, but the cell localization varies among bacterial species (4). In the present study, the finding of the cytotoxic activity in the polymyxin B extracts is in agreement with the periplasmic localization of the GGT since polymyxin B disturbs the outer membrane permeability, allowing exchanges between the periplasm and the extracellular environment (6).

The N-terminal peptide sequencing showed that the 42-kDa SDS-PAGE protein of the CPB and the WC were the same. Surprisingly, the degenerate primers designed with the N-terminal and the internal peptide sequences of the 42-kDa protein produced an unexpected 2-kb product. For *H. pylori* (4), the first 26 amino acids of the GGT constitute the peptide signal while large and small subunits are composed of the amino acids 27 to 378 and 379 to 567, respectively. In agreement with the *H. pylori* GGT, the N-terminal peptide sequence of the 42-kDa protein matched with the N-terminal

extremity of the large subunit. A calculated mass of 38 kDa was reported for the large subunit of the *H. pylori* GGT (4). Those results suggest that the 42-kDa *C. jejuni* cytotoxicity associated protein could be the large subunit. The reverse degenerate primer designed with the internal peptide sequence of the 42-kDa protein was not specific to an internal sequence of the GGT, but bound to approximately 300 pb downstream of the 1671-pb coding sequence associated to the *H. pylori* GGT. This unspecific binding could be due to the high degeneracy of the primer, incorrect CnBr digestion of the 42-kDa protein, or an improper peptide sequencing of the internal peptide. The *C. jejuni* putative GGT showed high identity with the *H. pylori* GGT since the latter shared 53%, 48%, and 38% of identity with *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *Bacillus* GGTs, respectively (4). As previously described for the *H. pylori* GGT (4), the putative *C. jejuni* small subunit was slightly more conserved than the large subunit. The small subunit of the *H. pylori* GGT contains the catalytic site (4).

Interestingly, the downstream segment of the *C. jejuni* putative GGT locus possessed similarity with the end of another *H. pylori* gene. The upstream segment was homologous with the beginning of a *C. jejuni* gene, although the identity was weak. However, sequence analysis of the four other degenerate-PCR products observed for cytotoxic isolates of the present study showed sequence identity of >95% with *C. jejuni* NCTC 11168 genes (data not shown). Intra- and inter-species recombinations occur frequently for *Campylobacter* and may contribute to genetic diversity (21). Cytotoxic *C. jejuni* isolates of the present study were previously clustered by PFGE and biotyping (19). It is possible that these isolates could be members of a *C. jejuni* subpopulation that are descended from one or few ancestors that acquired one or several *Helicobacter* genes. These genes could confer some advantages to the bacteria. The *ggt* gene has been associated with the virulence of *H. pylori*. By deletion of the *ggt* gene, it was found that the enzyme is essential for *H. pylori* infection of the mice (4) or at least, confers an advantage for *H. pylori* in colonizing the gastric mucosa of piglet and mice (16). Shibayama *et al.* (22) reported that GGT plays a significant role in *H. pylori*-mediated apoptosis. On the other hand, defects in *ggt* didn't affect infection in suckling mice in another study but the authors

attributed this to the short course of the infection (8). Furthermore, using subtractive hybridization, Ahmed *et al.* (1) reported a locus homologous to the *H. pylori ggt* for the *C. jejuni* strain 81116, described as a good colonizer of chicken intestines. A cytotoxic activity similar as the one observed in this study has been reported for this *C. jejuni* strain 81116 (15).

The exact function of the bacterial GGT is unknown. However, it appears that GGT plays a role in glutathione metabolism (25). For *E. coli*, extra-cellular glutathione penetrates into the periplasm during the stationary phase and its gamma-glutamyl residue is cleaved off by the GGT localized in the periplasm (23). The released cysteinylglycine is transported into the cytoplasm and cleaved. The resultant cysteine and glycine are used as cysteine and glycine sources. Given that the bacterial GGT is poorly characterized, it is possible that this enzyme, or one of its subunits, possess other functions.

SDS-PAGE and immunoblotting showed that all cytotoxic isolates expressed the 42-kDa protein. This protein was immunogenic and this immunogenicity was stable among isolates as demonstrated by western immunoblotting using the polyclonal antisera generated against the 42-kDa protein of the poultry isolates 1257. Like the 42-kDa protein, the cytotoxic activity was concentrated after dialysis, suggesting that this cytotoxic activity was dose dependent and attributed to a protein over than 10 kDa. These data, in addition with the correlation between the *ggt* gene, the expression of the 42-kDa protein, and the cytotoxic phenotype, suggest that the *C. jejuni* cytotoxicity is associated to a gene homologous to *H. pylori* GGT, and to a 42 kDa protein associated to the large subunit of the GGT.

It is difficult to associate the cytotoxin activity observed in the present study with any other reported cytotoxin activities. No non-CDT *C. jejuni* activity has been associated to an already known protein and no biotyping was done in other studies. On the other hand, several characteristics of this cytotoxic activity are in agreement with the *C. jejuni* “70-kDa cytotoxin” (24). The later toxin has been associated to heat

labile cytotoxins of 30 to 70 kDa. A reduction and an increase of the “70-kDa cytotoxin” activity has been observed after freeze storage at  $-70^{\circ}\text{C}$  (7) and after polymyxin B treatment of *C. jejuni* isolates (24), respectively. However, we cannot exclude that the CLRT heat labile cytotoxin active on CHO cells described by Hänel *et al.* (9) and the  $>50$  kDa cytotoxin active on INT-407, CHO and HeLa cells described by Lee *et al.* (15) can be associated to the “70-kDa cytotoxin” and to the cytotoxin activity observed in the current study.

In this study, we associated a *C. jejuni* cytotoxin activity to a coding sequence homologous to the *H. pylori* gamma-glutamyl transpeptidase and to an immunogenic 42-kDa protein. This protein was associated with the large subunit of the GGT, and was probably accumulated in the periplasm. This cytotoxin activity was previously associated to a subpopulation of *C. jejuni* biotypes 3 and 4 isolates from chicken broilers and sporadic cases of human campylobacteriosis clustered by PFGE. Further work is needed to establish a direct link between the *C. jejuni* GGT associated locus, the 42-kDa protein, and the cytotoxin activity. Further analysis on the distribution and the characterization of the *C. jejuni* GGT locus, the *C. jejuni* putative GGT and the 42-kDa *C. jejuni* cytotoxicity associated protein would be also of great interest.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to acknowledge authorities from Health Canada at the Food and Veterinary Hygiene Laboratory for their collaboration and access to their facilities. We especially thank Julie Brassard, Èvelyne Guévremont and Louise Lessard for valuable technical assistance.

## TABLES

TABLE 5.1: Comparison of cytotoxic and not cytotoxic *Campylobacter jejuni* isolates from chicken broilers and humans: Results for the CHO-cytotoxicity assay, the presence of PCR products (kb), the presence of the 42-kDa C. *jejuni* cytotoxicity associated protein with SDS-PAGE and Western-blot.

Isolate number <sup>a</sup>	Biotype <sup>b</sup>	CHO assay <sup>c</sup>		Degenerate PCR <sup>d</sup>								PCR <sup>e</sup>		SDS PAGE <sup>f</sup>		Western-blot <sup>g</sup>	
		2000	2002	0,3	0,5	0,6	0,8	1,0	1,6	2,0	>2,0	1,1	WC	WC	WC	CPB	
1257	CJ-3	128	32	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NA
CPB 1257	CJ-3	NT	256	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+
853	CJ-3	64	32	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NT
876	CJ-3	8	8	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
881	CJ-3	16	8	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NT
897	CJ-3	32	8	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NT
1250	CJ-3	8	8	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NT
1262	CJ-3	32	8	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NT
1278	CJ-3	32	16	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NT
1500	CJ-3	32	16	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NT
2005	CJ-4	64	16	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2150	CJ-3	64	16	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2155	CJ-3	16	16	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NT
2165	CJ-3	32	8	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NT
2178	CJ-3	32	8	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NT
2183	CJ-3	16	8	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2188	CJ-3	64	8	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NT
2194	CJ-3	32	16	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NT
2199	CJ-3	16	4	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2220	CJ-3	4	4	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Human-1	CJ-1	64	16	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Human-41	CJ-4	16	16	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Human-142	CJ-2	64	16	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Human-144	CJ-2	64	16	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NT
Human-176	CJ-4	16	16	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	NT
Not cytotoxic <sup>h</sup> CJ-1 or 2		<4	<4	+	+	+	V	V	V	V	-	-	-	-	-	-	-

Legend on the next page

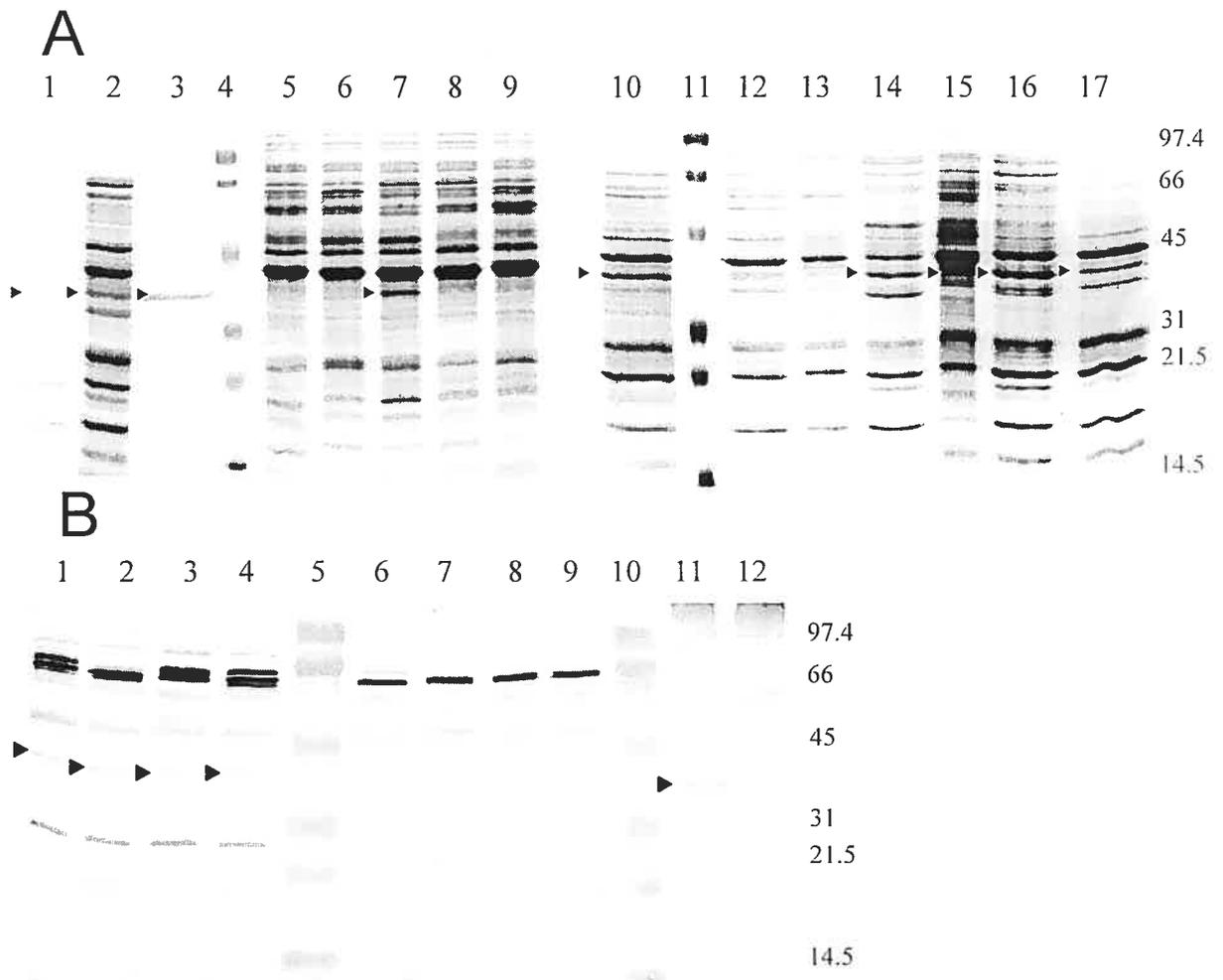
## Legend of the table 5.1

<sup>a</sup> *C. jejuni* human isolate numbers are preceded by a “H” and poultry isolates are presented with the number only, <sup>b</sup> CJ, *C. jejuni* followed by the biotype, <sup>c</sup> Reciprocal cytotoxicity titers in the cytotoxicity assay for the years 2000 and 2002 after freeze storage at -70°C, <sup>d</sup> Estimation of the molecular weight (kb) of the PCR products generated with de degenerate primers designed with the N-terminal and the internal amino acid sequences of the 42-kDa *C. jejuni* cytotoxic associated protein, <sup>e</sup> Non-degenerate PCR product of approximately 1,1 kb generated with primers designed with the sequences of the cytotoxicity associated 2,0-kb PCR product obtained with the degenerate PCR, <sup>f</sup> Presence of the 42-kDa *C. jejuni* associated protein in the whole cell extracts (WC) and in the concentrated polymyxin B extract (CPB), <sup>g</sup> Detection of the 42-kDa *C. jejuni* associated protein in the WC and CPB extracts, using the antisera anti-42 kDa protein, <sup>h</sup> Poultry and human noncytotoxic *C. jejuni* isolates, n=55, except for tests using CPB of not cytotoxic isolates, n=10, <sup>i</sup> It was not possible to make a statement for 2 noncytotoxic isolates (see results).

+: Presence of the trait, -: absence of the trait, NT: not tested, NA: not applicable. V: variable, CPB 1257: concentrated polymyxin-B extract of the poultry cytotoxic isolate 1257.

## FIGURES

Figure 5.1: Representative SDS-PAGE (A) and Western blots (B) showing the presence of a 42 kDa *Campylobacter jejuni* cytotoxicity associated protein among cytotoxic and noncytotoxic *C. jejuni* isolates from chicken broilers and sporadic cases of diarrhea in humans.

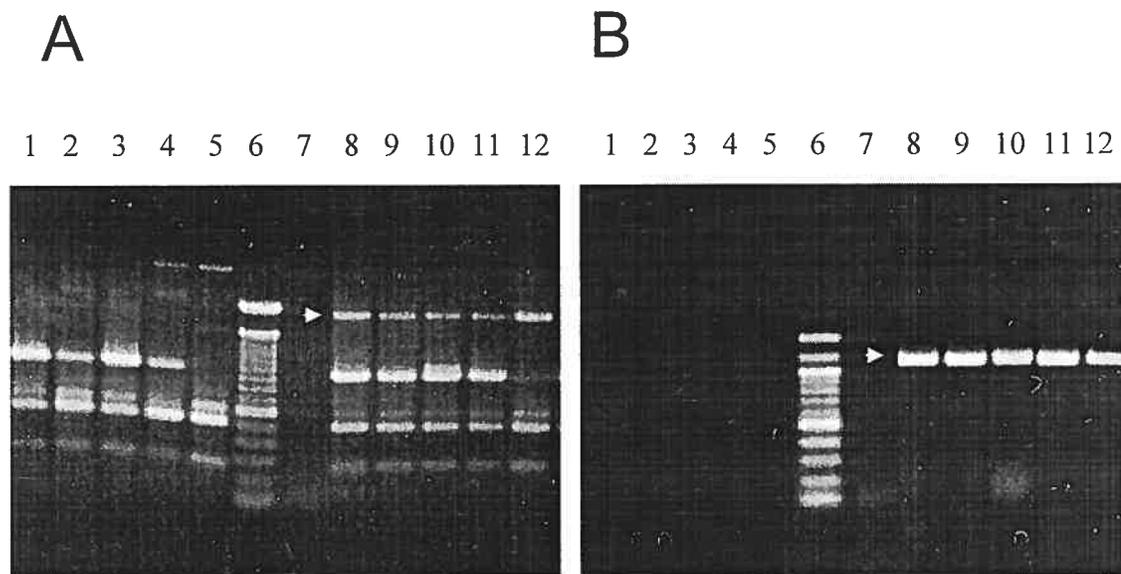


Legend on the next page.

### Legend of the figure 5.1

Immunoblots of proteins obtained from the whole cell extracts (WC) and the concentrated polymyxin B extracts (CPB). Arrows indicate the position of the 42-kDa *C. jejuni* cytotoxicity associated protein. (A) SDS-PAGE analysis. Lanes: 1 to 3, polymyxin B extract, twenty-fold CPB extract, and electroeluted 42-kDa *C. jejuni* cytotoxicity associated proteins of the cytotoxic isolate 1257, respectively; 4 and 11, low range molecular weight marker; 5, 6, 8, and 9, WC extract of noncytotoxic isolates; 7 and 15, WC extract of cytotoxic isolates; 10, 14, 16, and 17, CPB extract of cytotoxic isolates; 12 and 13, CPB extract of noncytotoxic isolates. (B) Western analysis: Lanes 1 to 4, WC extract of cytotoxic isolates; 5 and 10, Low range molecular marker; 6 to 9, WC extract of noncytotoxic isolates; 11, CPB of cytotoxic isolate; 12, CPB of noncytotoxic isolate. Right of gels: molecular masses (in kilo Daltons) of low-range protein markers.

Figure 5.2: Representative agarose gels showing a 2-kb *C. jejuni* cytotoxicity associated PCR product generated with degenerate primers designed with the N-terminal and internal peptide sequences of the 42-kDa *C. jejuni* cytotoxicity associated protein and a 1,1 kb *C. jejuni* cytotoxicity associated PCR product generated with a non degenerate primers designed with the partial sequences of the 2-kb PCR product obtained with the degenerate PCR.



Electrophoresis showing PCR analysis of the degenerate (A) and the non-degenerate (B) PCRs. Arrows in (A) indicate the position of the 2-kb *C. jejuni* cytotoxicity associated PCR product from the degenerate PCR, and (B), the position of the 1,1-kb *C. jejuni* cytotoxicity associated PCR product from the non-degenerate PCR. (A) Degenerate PCR. Lanes: 1 to 5, noncytotoxic isolates; 6, 100-pb molecular weight marker; 7, primers only, 8 to 12, cytotoxic isolates. (B) Non-degenerate PCR. Lanes: 1 to 5, noncytotoxic isolates; 6, 100-pb molecular weight marker; 7, primers only, 8 to 12, cytotoxic isolates.

Figure 5.3: (A) Nucleotide sequence of the 2431-pb locus including the deduced amino acid sequence of the 1671-pb locus homologous to the gamma-glutamyl transpeptidase of *H. pylori*, and associated to the cytotoxic activity of *C. jejuni* isolates. The predicted amino acid sequences of the 1671-pb locus are shown below the nucleotide sequence. The termination codon is indicated (\*). Arrows over nucleotide sequence indicates the location and the orientation of primers. Solid arrow over nucleotide sequence in capital indicates the degenerate forward primer DegF42 (5'-GCI GCI AAY CCI GAY ATH CAR GA-3') designed with the N-terminal peptide sequence (AANPDIQDRTG) of the 42-kDa *C. jejuni* cytotoxicity associated protein. Black arrows over nucleotides sequences in small letters indicate the primers used for the non-degenerate PCR. Dashed arrows indicate the primers used for the inverse PCR. The box indicates the restriction site of the *Hind*III enzyme used for the inverse PCR. Black triangles indicate the two cleavage sites of the gamma-glutamyl transpeptidase of *H. pylori*, generating, in order, the peptide signal, the large subunit, and the small subunit. (B) Schematic diagram showing the arrangement of the putative coding sequences. The arrows indicate the directions of transcription. The black arrow indicates segments homologous to the N-terminal extremity of the *C. jejuni* putative type IIS restriction/modification enzyme (NP\_281253). The grey arrow indicates segment homologous to the C-terminal extremity of the *H. pylori* Ycf5, a putative cytochrome C-type biogenesis protein (NP\_207176). The white arrow indicates the putative gene homologous to the *H. pylori* gamma-glutamyl transpeptidase enzyme (GGT) (NP\_207909). In agreement with the *H. pylori* GGT sequence (4), the dashed box indicates the peptide signal. The large and small subunits are indicated. The white triangle indicates the cutting site of the *Hind*III enzyme for the inverse PCR. PCR products amplified are indicated below.

See next page.

## A

1    tggttaagccatctttttaaggcccaagtctataccgctgttgcttggtatgcttttgg  
 61    acttcgcattggaaagataaattgttcagaaaaatttgctaagagcatttgctacaagg  
 121   aatcttcggtgtttttgagattattctcctaaagtttattttatagctcttttaaagtttg  
 181   ataaattcgttttagttctgttttctaagataggctttttgctggtgtagggatttaaaat  
 241   tctttttcatttatagcttcaaatttcataattgcactttcaataaaattttaaatatttta  
 301   gcaaaaaaatctcaagtttggatataaaatttaaaagttactttttgtaattttataaaaa  
 361   aataattatataaaatgagaatatttgatacaaaaattttaaatttttaaatattttata  
 421   aaaatatatcatttttaatttatcaatacccctagttttgttacataattctatata  
  
 481   tcattaaaaaggagtaaaatgcggttatttagctatatttgcgatttcaatcacgctaagt  
                                   M R Y L A I F A I S I T L S 14  
 541   tttgggtGCAGCTAATCCACCTATAACAAGAtagaacaggcacaggacttgttttatcaagt  
           F G A A N P P I Q D R T G T G L V L S S 34  
 601   catgaactagccaataaaataggcaagaagttcttgataaaggcgaaatgccatagat  
           H E L A N K I G K E V L D K G G N A I D 54  
 661   gcagctgtagcagtaggattatgctttggctgtagtgcatctgcagcaggaacataggt  
           A A V A V G Y A L A V V H P A A G N I G 74  
 721   ggtggtggcctttgcagtcattcatctagccaatggagaaaaataccacgcttgattttaga  
           G G G F A V I H L A N G E N T T L D F R 94  
 781   gaaatggcaccttttaaagcaagcagaatattgtatcttgatagcaaaggagaanttata  
           E M A P L K A S R N M Y L D S K G E X I 114  
 841   aaagatgcttcaactataggttatctagctgctggagtaccaggaacgggttaaaggtatg  
           K D A S T I G Y L A A G V P G T V K G M 134  
 901   agtgcctatgcttgatcgctacggcactatgaaactaaaagacttgatggctcctgctata  
           S A M L D R Y G T M K L K D L M A P A I 154  
 961   aaactagctgaaaaaggttatctcatcaatgatccacaagaacaaacctagctagaagct  
           K L A E K G Y L I N D P Q E Q T M L E A 174  
 1021   aaagatatgtttaaagaatttcctagttcaagcaaatatttccttaaaaaagatggcagc  
           K D M F K E F P S S S K Y F L K K D G S 194  
 1081   acttataaaaagcgggattttgtttgtccaaaaagatctagcaaaaactttaaaacttatc  
           T Y K S G D L F V Q K D L A K T L K L I 214  
 1141   gcaaaggaaggtcctgatgctttttataagggaaaaatcgctgatttaatagcagcggat  
           A K E G P D A F Y K G K I A D L I A A D 234  
 1201   atggctaaaaacaaaggcattatcactaaagaagatctagcacaataccaagctattttgg  
           M A K N K G I I T K E D L A Q Y Q A I W 254  
 1261   agaaaaacctgtagaaggcacttataggggttatgatattcatttccatgtcgccacctagc  
           R K P V E G T Y R G Y D I I S M S P P S 274  
 1321   agtgggggtgctcaatacactcgaatttttaaatatcatggaaaatgccaatatagaaaat  
           S G G A H I I E I L N I M E N A N I E N 294  
 1381   ttaggctttgcaagctctaaaactttacacataatggctgaagctatgcgtcgaagcttat  
           L G F A S S K T L H I M A E A M R Q A Y 314  
 1441   gcgatagatcagaatacatggcgatcctgattttgtaaaaatcccacttgataaactt  
           A D R S E Y M G D P D F V K I P L D K L 334  
 1501   acaagcaagaatacgcctaaagaaatttatgcaaaaattccaaaagataaggctttacca  
           T S K E Y A K E I Y A K I P K D K A L P 354  
 1561   agctcaaaagttaaactggttttaggacaaattcacgaaggacataataccactcattat  
           S S K V K P G L G Q I H E G H N T T H Y 374  
 1621   tctgtactagatagcaaaaggcaatgctgtaagcattacctatagatcaatgaggttat  
           S V L D S K G N A V S I T Y T I N A S Y 394  
 1681   ggttcagggtgctacggttgaaggggaggggttttactcaatgatgaaatggatgatttt  
           G S G A T V E G A G F L L N D E M D D F 414  
 1741   tcaatcaaacaggcgtgccaattttatagcacttgtagggcggagaagctaatgctata  
           S I K P G V P N L Y G L V G G E A N A I 434  
 1801   gaacctaaaaaaagacctttaagctctatgagtcactatcatactaaaaagatggaaaa  
           E P K K R P L S S M S P T I I L K D G K 454  
 1861   gtatttatggtagtaggttagtccaggtggttctaggatcatcacgacagttttacaagt  
           V F M V V G S P G G S R I I T T V L Q V 474  
 1921   atttcaaatgtgatcataaaaatggatatacaacagcggtagaatctccaagatt  
           I S N V I D H K M D I S T A V E S P R F 494  
 1981   cacatgcagtggtacctgatgaaatcagaacagagccttttgggaatcatcaaagatgtg  
           H M Q W L P D E I R T E P F G I I K D V 514

```

2041 caaaacaatcttgaaaaaatgggctataaaatcacaaaagaaccttatatgggtgatgta
      Q N N L E K M G Y K I T K E P Y M G D V 534
2101 aatgctatcatggctgatccaaaaactggaaaaatcataggctctatggatacaagaaaa
      N A I M V D P K T G K I I G S M D T R K 554
2161 gaattctaaacttcttatttaccccttgaatttcaagggtaaatttatgcaggacttttaa
      E F * 556

2221 gttttcttttaaaaaatgctcctaaaattaaaatcactgtaaaagcaatgaaaaatata
2281 aaaatttaggcacaggcacaggatctcctggtgcataagaatgcaatcctgaaagataga
2341 aatttaccctccaaaataagtcacataaaaatagaataaaaatcctataaacactcgacttgcaa
2401 aggcgtaaggattgttaaatttgagataaat

```

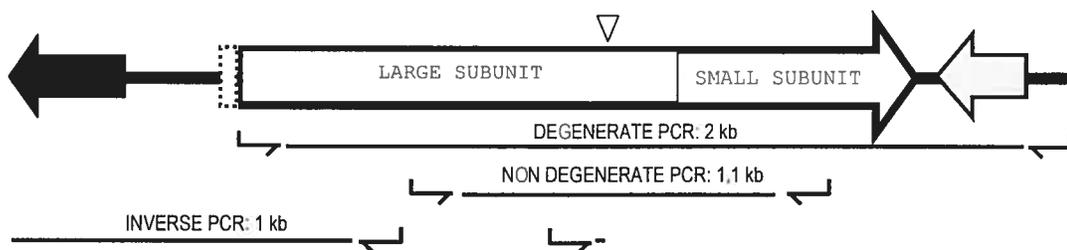
**B**

Figure 5.4: Alignment of the deduced amino acid sequences of the 1671-pb *Campylobacter jejuni* cytotoxicity associated locus with deduced sequences of polypeptides encoded by the *ggt* locus of other enteropathogens. *E. coli* O157:H7 (NC\_002695), *S. typhimurium* (NC\_003197), *H. pylori* 26695 (AAD08162), *H. pylori* J99 (NC\_000921). The alignment was performed with the CLUSTAL program, and the shading was done with BOXSHADE. The dark shading indicates identical residues, while the light shading indicates conserved substitutions.

See next page.

*H. pylori*\_26695 1 MRRSFLKTIGLGVIALFLG LNPLSAASYPP KN-----TKVGLALSSHP  
*H. pylori*\_J99 1 MRRSFLKTIGLGVIALFLG LNPLSAASYPP KN-----TKVGLALSSHP  
*C. jejuni*#1257 1 -----RYATFALSITLSFGAANPPIQDR-----TGTGLVLSSE  
*E. coli*\_O157\_H7 1 ---MIKPTFLRRVAIAALFTGSCFSTVAAPPAPSPVSYGVEEDVFHPVRAKQGVASVDA  
*S. thyphimurium* 1 ----MKPTFLRWVAIAALLAGGTESAIVANPPVAPPVSYGVEEDVFHPVRATQGVASVDA

*H. pylori*\_26695 46 LAETEGOKVLEEGGNAIDAAVAIGALAVVHPAAGNIGGGGFAVIHLANGENVALDFREK  
*H. pylori*\_J99 46 LAETEGOKVLEEGGNAIDAAVAIGALAVVHPAAGNIGGGGFAVIHLANGENVALDFREK  
*C. jejuni*#1257 37 LANKIGKQVLEKGGNAIDAAVAVGYALAVVHPAAGNIGGGGFAVIHLANGENTLDFREM  
*E. coli*\_O157\_H7 58 TATQGVVLEKGGNAIDAAVAVGYALAVTHPOAGNIGGGGFMITSKNGNTTALDFREM  
*S. thyphimurium* 57 TATQGVVLEKGGNAIDAAVAVGYALAVTHPOAGNIGGGGFMITKQATTALDFREM

*H. pylori*\_26695 106 APLKATINMFLDKQGNVPPKLSSEGYLAAGVPGTVAGMEAMLKKYGTKKLSQLDPAIKL  
*H. pylori*\_J99 106 APLKATINMFLDKQGNVPPKLSSEGYLAAGVPGTVAGMEAMLKKYGTKKLSQLDPAIKL  
*C. jejuni*#1257 97 APLKATINMFLDKQGNVPPKASTIGYLAAGVPGTVKGMSSAMLEIYGTMKLKDLPAPAIKL  
*E. coli*\_O157\_H7 118 APAKATINMFLDDQGNPDSKSLTSHLAGCTPGTVAGFSLALSKYGTMPLNKQPAFKL  
*S. thyphimurium* 117 APAGATINMFLDDQGNADAKKSLTSHLAGCTPGTVAGFSLALSKYGTMPLNKQREPAIKL

*H. pylori*\_26695 166 AENGYAISQROAETLKEARERFLKSSSKYFFKKGHLDYQEGDLFVQKDLAKTINQIKT  
*H. pylori*\_J99 166 AENGYAISQROAETLKEARERFLKSSSKYFFKKGHLDYQEGDLFVQKDLAKTINQIKT  
*C. jejuni*#1257 157 AEKGYLINDPEQETLLEAKMEKEPSSSKYFLKKGSTYKSGDLFVQKDLAKTILKIAK  
*E. coli*\_O157\_H7 178 ARDGEVNDLEAEDLKYGSEVLPNHENSKAIFWKGEPLKKGDKLVQALAKLEIAEIAE  
*S. thyphimurium* 177 AEEGEVNDALANDLKYGSEVLPNHENSKAIFWKGEPLKKGDKLVQALAKLEIAEIAE

*H. pylori*\_26695 226 LGAKRFYQGOAFLIEKDMKNGGIITKEDLASVVKWRKPVVIGYRKYKII SMSPPSSG  
*H. pylori*\_J99 226 LGAKRFYQGOADLIEKDMKNGGIITKEDLASVVKWRKPVVIGYRKYKII SMSPPSSG  
*C. jejuni*#1257 217 EGPDAFYKGTADLIAADMANKNGIITKEDLAQYAWRKPVEGYRKYKII SMSPPSSG  
*E. coli*\_O157\_H7 238 NGPDEFYKGTIAEOTIAOMKNGGITKEDLAAYKAEERTPSGDYRGYQI SMSPPSSG  
*S. thyphimurium* 237 NGPDEFYKGTIADOTIAGMOKNGGITKEDLANYKAEERTPSGDYRGYQI SMSPPSSG

*H. pylori*\_26695 286 GTHIQILNIMENADISALGNGSKNHIHIAEAMROAYADRSVYMGDADFVSVPPDKLIN  
*H. pylori*\_J99 286 GTHIQILNIMENADISTLGGSKNHIHIAEAMROAYADRSVYMGDADFVSVPPDKLIN  
*C. jejuni*#1257 277 GAHIIQILNIMENADINENLGFSSKTHIHIAEAMROAYADRSEYMGDPDFVKKPDKLTS  
*E. coli*\_O157\_H7 298 GIHIQILNIMENFDKKYGFSGDAQIMAEAEYAYADRSEYGDPDFVKVPQALTN  
*S. thyphimurium* 297 GIHIQILNIMENFDKKYGFSGDAQIMAEAEYAYADRSEYGDPDFVKVPQALTN

*H. pylori*\_26695 346 KAYAKTIDTIDTQPDVTVPSSQIKPGVGOHEGNSNTHYSVADWGNNAVSVTYTINASYGS  
*H. pylori*\_J99 346 KAYAKTIDTIDTQPDVTVPSSQIKPGVGOHEGNSNTHYSVADWGNNAVSVTYTINASYGS  
*C. jejuni*#1257 337 KEYAKETIAKTPKDKALPSSKIKPGVGOHEGHNSNTHYSVADSKGNNAVSVTYTINASYGS  
*E. coli*\_O157\_H7 358 KAYAKSTIAEQIDIKAKPSSKIPGKLAPYENSNTHYSVADWGNNAVSVTYTINASYGT  
*S. thyphimurium* 357 KAYAKTADQIDIKAKPSSQIKPGKLAPYENSNTHYSVADWGNNAVSVTYTINASYGT

*H. pylori*\_26695 406 GAVVAGAGFLLNEMDDFSIKPGVNPPLYGLVGGDANAIEANKRPLSSMSPTIVLKNKVF  
*H. pylori*\_J99 406 GAVVAGAGFLLNEMDDFSIKPGVNPPLYGLVGGDANAIEANKRPLSSMSPTIVLKNKVF  
*C. jejuni*#1257 397 GAVVAGAGFLLNEMDDFSIKPGVNPPLYGLVGGDANAIEPKRPLSSMSPTIVLKGKVF  
*E. coli*\_O157\_H7 418 GIVAGEGILLNEMDDFSIKPGVNPPLYGLVGGDANAIPNKRPLSSMSPTIVLKGKVT  
*S. thyphimurium* 417 GIVAGNTGILLNEMDDFSIKPGVNPPLYGLVGGDANAIPNKRPLSSMSPTIVLKGKVT

*H. pylori*\_26695 466 LVVGSPPGSRITTTVLQVISNVIDYNNISEAVSAPRFHMOWLPELREKFGPADVVKD  
*H. pylori*\_J99 466 LVVGSPPGSRITTTVLQVISNVIDYNNISEAVSAPRFHMOWLPELREKFGPADVVKD  
*C. jejuni*#1257 457 LVVGSPPGSRITTTVLQVISNVIDHKMISTAVEPRFHMOWLPELREKFGIKDVQN  
*E. coli*\_O157\_H7 478 LVTGSPGSLITTTVLQVISNVIDYNNISEAVSAPRFHMOWLPELREKFGFSPDTLK  
*S. thyphimurium* 477 LVTGSPGSRITTTVLQVISNVIDYNNISEAVSAPRFHMOWLPELREKFGFSPDTLK

*H. pylori*\_26695 526 NLTKMGYQIVTKPVMGDVNATQVLPKTKGSVYFGIDPRKEE-----  
*H. pylori*\_J99 526 NLTKMGYQIVTKPVMGDVNATQVLPKTKGSVYFGIDPRKEE-----  
*C. jejuni*#1257 517 NLEKMGYKIKPEPYMGDVNATMVDPKTG--KIGMDTRKEE-----  
*E. coli*\_O157\_H7 537 LLEAKGCKALKEAMGSTQIMVGPDGE---YGAIDPRSVDDLTAGY  
*S. thyphimurium* 536 LLEQKCKALKEAMGSTQIMVGPDGE---YGAIDPRSVDDLTAGY

## REFERENCES

1. Ahmed, I.H., Manning, G., Wassenaar, T.M., Cawthraw, S., and D.G. Newell. 2002. Identification of genetic differences between two *Campylobacters jejuni* strains with different colonization potentials. *Microbiology*. 148: 1203-1212.
2. Atabay, H.I., and J.E.L. Corry. 1997. The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.* 83: 619-626.
3. Blaser, M.J. 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni*. *J. Inf. Dis.* 176(Suppl 2): S103-105.
4. Chevalier C, Thiberge JM, Ferrero RL, and A. Labigne. 1999. Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol. Microbiol.* 31:1359-1372.
5. Coote, J.G., and T. Arain. 1996. A rapid, colourimetric assay for cytotoxin activity in *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13:65-70.
6. Daugelavicius R, Bakiene E, and D.H. Bamford. 2000. Stages of polymyxin B interaction with the *Escherichia coli* cell envelope. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44:2969-2978.
7. Florin, I., and F. Antillon. 1992. Production of enterotoxin and cytotoxin in *Campylobacter jejuni* strains isolated in Costa Rica. *J. Med. Microbiol.* 37: 22-9.
8. Guo BP, and J.J. Mekalanos. 2002. Rapid genetic analysis of *Helicobacter pylori* gastric mucosal colonization in suckling mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:8354-8359.

9. Hänel, I., F. Schulze, H. Hotzel, and E. Schubert. 1998. Detection and characterization of two cytotoxins produced by *Campylobacter jejuni* strains. *Zentralbl. Bakteriol.* 288:131-143.
10. Hu, L., and D.J. Kopecko. 2000. Interactions of *Campylobacter* with eukaryotic cells: gut luminal colonization and mucosal invasion mechanisms. p. 191-215. *In* I. Nachamkin, and M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Ishiye M, Yamashita M, and M. Niwa. 1993. Molecular cloning of the gamma-glutamyl transpeptidase gene from a *Pseudomonas* strain. *Biotechnol. Prog.* 9:323-331.
12. Kapperud, G., E. Skjerve, L. Vik, K. Hauge, A. Lysaker, I. Aalmen, S.M. Ostroff, and M. Potter. 1993. Epidemiological investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidemiol. Infect.* 111: 245-255.
13. Ketley, J.M. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology* 143:5-21.
14. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
15. Lee, A., Smith, S.C., and P.J. Coloe. 2000. Detection of a novel *Campylobacter* cytotoxin. *J. Appl. Microbiol.* 89:719-725.
16. McGovern KJ, Blanchard TG, Gutierrez JA, Czinn SJ, Krakowka S, and P. Youngman. 2001. Gamma-Glutamyltransferase is a *Helicobacter pylori* virulence factor but is not essential for colonization. *Infect. Immun.* 69:4168-4173.

17. Nachamkin, I. 1995. *Campylobacter* and *Arcobacter*. p. 483-491. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (eds.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed., ASM Press, Washington, D.C.
18. Nadeau, É., S. Messier, and S. Quessy. 2002. Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans. *J. Food Prot.* 65:73-78.
19. Nadeau, É., S. Messier, and S. Quessy. 2003. Comparison of *Campylobacter* isolates from poultry and humans: association between in vitro virulence properties, biotypes and PFGE clusters. *Appl. Environ. Microbiol.* (submitted).
20. Pickett, C.L. 2000. *Campylobacter* toxins and their role in pathogenesis, p. 179-190. In I. Nachamkin, and M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
21. Schouls LM, Reulen S, Duim B, Wagenaar JA, Willems RJ, Dingle KE, Colles FM, and J.D. Van Embden. 2003. Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination. *J. Clin. Microbiol.* 41:15-26.
22. Shibayama, K, Kamachi, K, Nagata, N, Yagi, T, Nada, T, Doi, Y, Shibata, N, Yokoyama, K, Yamane, K, Kato, H, Iinuma, Y, and Y. Arakawa. 2003. A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 47:443-451.
23. Suzuki H, Kumagai H, Echigo T, and T. Tochikura. 1989. DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 gamma-glutamyl transpeptidase gene, *ggt*. *J. Bacteriol.* 171: 5169-72.

24. Wassenaar, T.M. 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. Clin. Microbiol. Rev. 10:466-476.
25. Xu K, and M.A. Strauch. 1996. Identification, sequence, and expression of the gene encoding gamma-glutamyl transpeptidase in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 178:4319-4322.

## **CHAPITRE 6. DISCUSSION GÉNÉRALE**

*C. jejuni* est la première cause de gastro-entérites d'origine alimentaire chez les humains avec une incidence estimée à 1 cas par 1000 personnes annuellement (Atabay et Corry, 1997). Néanmoins, plusieurs aspects sont méconnus quant à l'infection par ce pathogène. Il est encore impossible de spécifier si tous les *C. jejuni* sont pathogènes pour l'humain puisque les facteurs de virulence utilisés par la bactérie sont à ce jour indéterminés. Il se pourrait que la population de *C. jejuni* soit constituée de sous-populations non pathogènes et de sous-populations pathogènes utilisant différents facteurs de virulence, comme c'est le cas pour *E. coli*. La nature sporadique des infections à *C. jejuni* chez l'humain complique considérablement les études épidémiologiques. L'identification des facteurs de risques associés aux infections sporadiques à *C. jejuni* chez l'humain est un autre aspect problématique. Il existe plusieurs études sur l'épidémiologie des infections sporadiques à *C. jejuni* chez l'humain et plusieurs facteurs de risque ont été identifiés. La consommation et/ou la manipulation de produits de poulet insuffisamment cuits semble unanimement accepté comme facteur de risque important pour les infections sporadiques à *C. jejuni* chez l'humain (Newell et Wagenaar, 2000). Par contre, la caractérisation du risque associé à la consommation de poulet est encore méconnue puisque peu d'études ont démontré un lien direct entre le poulet et les cas sporadiques de campylobactériose chez l'humain. Comme c'est le cas pour les infections sporadiques de campylobactérioses chez l'humain, une multitude de facteurs de risque a été suggérée pour la colonisation d'un lot de production de poulets. Il existe une controverse à savoir si la transmission verticale des campylobacters par l'œuf, en présumant qu'elle existe, ou si la transmission horizontale par des sources environnementales serait responsable de la colonisation d'un lot de production de poulets.

Cette méconnaissance concernant *C. jejuni* complique l'élaboration de stratégies de contrôle efficaces de cette bactérie. Ceci semble particulièrement problématique en production aviaire puisque les stratégies utilisées à la ferme pour contrôler d'autres bactéries d'importance en santé publique semblent inefficaces pour *C. jejuni* (Newell et Wagenaar, 2000).

En première partie de ce projet, nous avons évalué la prévalence et la distribution des campylobacters dans la production québécoise de poulets à griller. L'obtention de ces données épidémiologiques est une étape primordiale pour permettre l'évaluation du risque associé au poulet dans les cas sporadiques de campylobactérioses chez l'humain et pour l'élaboration éventuelle de stratégies de contrôle de la bactérie en production aviaire. Il existe plusieurs études européennes sur l'épidémiologie des campylobacters en production de poulets à griller mais peu ont été faites en Amérique du Nord et aucune n'a été effectuée au Canada (section 2.5.2; tableau 2.6). Par contre, les résultats de prévalence et de distribution des campylobacters en production de poulets à griller diffèrent entre les études des différents pays européens et entre les études d'un même pays.

Toujours dans le but de caractériser les campylobacters en production de poulets à griller, nous avons effectué, dans un deuxième temps, une étude de comparaison de la diversité génotypique et phénotypique (incluant les propriétés *in vitro* de virulence) des isolats de *Campylobacter* de poulets à griller et de cas sporadiques de diarrhée chez l'humain. Pour permettre une évaluation du risque associé au poulet dans les cas sporadiques de diarrhée chez l'humain, tous ces isolats ont été échantillonnés durant la même période et dans la même région. Les isolats regroupés génétiquement et phénotypiquement ont par la suite été associés à différentes souches clonales. Dans cette étude, une souche clonale consistait à des isolats regroupés par PFGE (chapitre 3), possédant un biotype et un statut de production de cytotoxicité identiques, ainsi qu'un pouvoir d'adhésion et d'invasion similaires (chapitres 3 et 4). L'étude des souches clonales des campylobacters d'origines aviaire et humaine avait plusieurs buts. Premièrement, celui de faire une estimation du risque associé au poulet en évaluant le lien clonal entre les isolats d'origine aviaire et ceux de cas sporadiques de campylobactériose chez l'humain. Deuxièmement, celui d'identifier des sous-populations de *Campylobacter* possédant des facteurs de virulence particuliers en regroupant les isolats selon leur propriétés de virulence tout en considérant leur liens clonaux. Le dernier objectif de ce projet était d'analyser les différentes souches

clonales de *Campylobacter* afin d'identifier et de caractériser une ou plusieurs protéines, si possible immunogènes, associées à la virulence. Selon Newell et Wagenaar (2000), l'association de la vaccination à d'autres stratégies serait une méthode de choix pour le contrôle de *C. jejuni* en production aviaire. L'amélioration des connaissances sur les facteurs de virulence de *C. jejuni* pourrait permettre de cibler de nouvelles protéines, candidates potentielles à l'élaboration de vaccin.

### **6.1. Incidence des campylobacters en production de poulets à griller**

Le premier objectif de ce projet était d'obtenir des données épidémiologiques, telles la prévalence et la distribution des campylobacters chez le poulet à griller lors de l'entrée des oiseaux à l'abattoir (chapitre 3). Environ 0,4% des lots de poulets à griller, soit 1 sur 250 lots abattus annuellement au Québec, ont été échantillonnés dans le cadre de ce projet. Cette étude a démontré que près de la moitié des poulets à griller et près de 60% des lots d'abattage et des fermes étaient contaminés par *Campylobacter*, particulièrement *C. jejuni*, lors de l'entrée à l'abattoir. Ces taux sont similaires à ceux obtenus dans la majorité des études européennes et nord-américaines, à l'exception de la Suède et de la Norvège où des incidences de lots colonisés inférieures à 30% ont été rapportées (section 2.5.2; tableau 2.6).

Un taux élevé d'oiseaux positifs à *Campylobacter* (>50% des oiseaux) a été observé pour la majorité des lots colonisés lors de l'entrée à l'abattoir. Les études longitudinales de la colonisation des lots de poulets à griller par *C. jejuni* ont démontré qu'une fois introduite dans un lot de production, la bactérie peut coloniser la quasi-totalité des oiseaux du lot en seulement une semaine, ce lot demeurant colonisé jusqu'à l'abattage (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1994; Gregory *et al.*, 1997). La coprophagie, ainsi que la colonisation des mangeoires et des abreuvoirs, seraient responsables de cette propagation rapide de la bactérie dans un lot de production et expliquerait le fait qu'un nombre restreint d'oiseaux porteurs pourrait permettre la contamination de la totalité d'un lot de production (Shane, 2000).

Étonnamment, malgré les faits que la bactérie se propage rapidement à l'intérieur d'un lot de production une fois introduite et que *C. jejuni* est considérée comme une bactérie commensale du poulet (Newell et Wagenaar, 2000), il est possible de retrouver des lots exempts de *Campylobacter* lors de l'entrée à l'abattoir. Par contre, le fait de retrouver simultanément des lots fortement contaminés et des lots exempts de *Campylobacter* lors de l'entrée à l'abattoir est problématique puisque des contaminations croisées ont été rapportées lors du processus d'abattage (Rivoal *et al.*, 1999). Un enjeu important en production de poulets à griller serait d'identifier les lots fortement contaminés et éliminer la bactérie ou, du moins, réduire le taux d'oiseaux porteurs à l'intérieur des lots lors de l'entrée à l'abattoir. Puisque le risque de contamination croisée s'accroît rapidement avec l'augmentation du taux d'oiseaux colonisés à l'intérieur d'un lot d'abattage, un faible taux de colonisation dans des lots réduirait le risque de contamination croisée entre les carcasses d'un même lot et/ou entre différents lots. Par contre, puisque les facteurs de risque associés à l'introduction des campylobacters dans un lot de production sont actuellement indéterminés, les stratégies de contrôle devraient tenter de réduire la propagation rapide de la bactérie dans le lot de production et/ou de tenter de réduire le taux d'oiseaux colonisés en fin de production. Il sera par contre difficile de contrer la propagation rapide de la bactérie par l'utilisation simple de mesures d'hygiène particulières étant donné la densité et la proximité des poulets dans les conditions d'élevage actuelles. Le développement de vaccin, de probiotiques et/ou d'immunothérapie passive orale anti-*Campylobacter* seraient des stratégies qui pourraient permettre d'abaisser le taux de porteurs lors de l'entrée à l'abattoir. Les probiotiques choisis devront par contre coloniser la niche intestinale particulière occupée par *C. jejuni* chez le poulet, soit les cryptes intestinales. L'identification de bactéries commensales ou capables de coloniser les cryptes intestinales du poulet pourrait mener à l'élaboration de probiotiques efficaces dans le contrôle des campylobacters en production aviaire.

## **6.2. Distribution des campylobacters dans la production de poulets à griller**

L'étude de la distribution des campylobacters à l'intérieur des lots d'abattage, entre les lots d'abattage et entre les fermes d'origine a apporté des informations pertinentes sur la diversité des campylobacters en production de poulets à griller et sur la nature de la ou des sources potentielles d'introduction de la bactérie dans un lot de production (chapitre 3).

### **6.2.1. Distribution et diversité des campylobacters en production de poulets à griller**

D'une façon générale, nous pouvons tirer quatre grandes conclusions quant à la distribution et la diversité des campylobacters en production de poulets à griller: 1) une seule souche clonale de *Campylobacter* est généralement isolée dans un lot d'abattage colonisé, 2) une seule souche clonale de *Campylobacter* est généralement isolée dans les différents lots provenant d'une même ferme et étant abattus le même jour (même période de production), 3) une souche clonale donnée est rarement isolée à nouveau dans une autre période de production d'une même ferme ou de d'autres fermes, et 4) chaque période de production, dont au moins un des lots est colonisé, possède sa propre souche clonale de *Campylobacter*.

Étonnamment, une faible diversité de souches clonales de *Campylobacter* a été observée lors d'une période de production donnée tandis qu'une forte diversité a été observée entre les différentes périodes de production d'une ferme donnée ou de fermes différentes. Tel que mentionné auparavant, une période de production consiste en tous les lots produits simultanément sur une ferme donnée.

La faible diversité observée à l'intérieur d'un lot de production (chapitres 3, Shreeve *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2001) peut paraître surprenante étant donnée la forte diversité génétique rapportée pour *Campylobacter*. Une grande diversité a été démontrée chez *C. jejuni* par les différentes méthodes de sous-typage (PFGE, AFLP, RAPD, etc.) ainsi que par les analyses génétiques et phénotypiques utilisant le MLST, le MLEE et les biopuces (Dorrell *et al.*, 2001, Wassenaar et Blaser, 1999). Plusieurs résultats de cette étude démontrent cette diversité. En excluant la faible diversité observée à l'intérieur des lots de production de poulets à griller, l'analyse par PFGE a révélé une forte diversité génétique parmi les isolats de *Campylobacter* d'origines aviaire et humaine (chapitre 3). Une forte diversité dans les profils protéiques et dans les propriétés *in vitro* de virulence a d'ailleurs été observée (Chapitre 4). De plus, la diversité dans les profils obtenus avec le PCR dégénéré (Chapitre 5) suggère une diversité dans la présence de certains gènes ou fragments de génome pour *C. jejuni*. Ces profils d'amplicons obtenus avec le PCR dégénéré étaient identiques pour les isolats groupés dans un génotype de PFGE donné (données non présentées). Ceci suggère que ces variations de profils ne sont pas causées par un manque de reproductibilité du PCR dégénéré. Les analyses avec le programme BLASTN (NCBI) des séquences partielles de 5 de ces amplicons ont démontré qu'à l'exception de la bande de 2 kb associée à la cytotoxicité et à la GGT d'*H. pylori*, tous les autres produits de PCR étaient associés à des loci de séquences génomiques de *C. jejuni* 11168 (séquence génomique complète) et de *C. jejuni* RM1221 (séquence génomique partielle). Ainsi, les gènes Cj0671 (*dcuB*: codant pour une protéine hypothétique transporteur de C4-dicarboxylate anaérobique) et Cj0860 (codant pour une protéine membranaire hypothétique) ont été amplifiés pour tous les isolats de l'étude. Par contre, les gènes Cj0769 et/ou Cj0770 (le locus amplifié chevauchant ces deux gènes codant pour deux protéines périplasmiques hypothétiques) étaient absents pour 19 des 79 isolats testés. La présence de certains autres amplicons, qui n'ont pas été séquencés, variait de plus d'un isolat à l'autre. Des variations importantes dans le contenu des gènes de *C. jejuni* ont été rapportées par Dorrell *et al.* (2001). Ces derniers ont utilisé la technologie de biopuce génomique (Microarray) contenant le génome complet de *C. jejuni* 11168 pour démontrer que seulement 1300 gènes (78,6%

des gènes testés) étaient communs aux 12 isolats d'origine humaine testés et que plus de 354 (21,4%) gènes manquaient pour au moins un isolat. Fait intéressant, plusieurs gènes codant pour des facteurs de virulence potentiels (*cdt's*, *peb's*, *ciaB*, *cadF* et *cheY*) étaient présents chez toutes les souches testées suggérant que ces gènes sont essentiels à la virulence. Malheureusement, seulement des isolats humains ont été testés dans cette étude. Cette diversité observée pour *C. jejuni* serait peut être la conséquence de plusieurs phénomènes d'instabilité génétique, notamment d'évènements de recombinaison intra- et inter-spécifiques (Meinersman, 2000; Newell *et al.*, 2000).

Pour certains auteurs, la faible diversité notée à l'intérieur des lots de production de poulets à griller serait la conséquence d'un processus épidémique confiné à un bâtiment. Cette faible diversité génétique est associée à une faible diversité phénotypique dans cette étude. Ceci suggère que les mécanismes d'instabilité génétique suggérés pour *Campylobacter* sont peu exploités lors de la propagation de la bactérie à plusieurs milliers d'oiseaux et lors du maintien de la colonisation dans un lot de production. Ceci demeure vrai que pour les mécanismes de variation génétique pouvant varier les profils de PFGE et/ou les caractères phénotypiques testés dans cette étude. Des réarrangements génétiques ont été observés par PFGE dans des lots de poulets à griller (Wassenaar *et al.*, 1998), durant la colonisation de l'intestin de poussins (Hanninen *et al.*, 1999) et lors d'infection expérimentale chez le poulet (Boer *et al.*, 2002). Dans ce dernier cas, des échanges bidirectionnels de marqueurs de résistance aux antibiotiques ont été observés dans des conditions *in vitro* et *in vivo* entre souches homologues et hétérologues de *C. jejuni*. Le potentiel de variation génétique ne serait limité qu'à certaines souches puisque plusieurs auteurs ont rapporté une stabilité génétique d'isolats, tant dans des conditions *in vivo* qu'*in vitro* (Nielsen *et al.*, 2001; Petersen et Wedderkopp, 2001). Certaines souches clonales ont d'ailleurs été observées dans des types d'environnement différents, sur une longue période et/ou dans des régions géographiques éloignées, suggérant que certains clones soient génétiquement stables (Manning *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2001). Dans cette étude,

quelques souches clonales ont d'ailleurs été observées dans plusieurs fermes et/ou sur une période de plus de six mois.

Cette faible diversité clonale des campylobacters dans les lots de production suggère l'existence d'une source unique d'infection permettant l'introduction de la bactérie dans l'élevage. Par contre, l'exclusion d'une souche clonale par une autre a été rapportée dans des lots expérimentaux de poulets à griller (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1994; Korolik *et al.*, 1998; Barrow et Page, 2000). Ainsi, les isolats de *Campylobacter* échantillonnés à l'abattoir pourraient ne pas refléter toutes les sources de campylobacters dans un lot de production. L'ampleur de ce phénomène d'exclusion est par contre indéterminée en production commerciale. À l'opposé, la cohabitation de différentes populations clonales à l'intérieur d'un lot de production a été observée dans cette étude et dans plusieurs autres études (Prescott et Gellner, 1984; Pokamunski *et al.*, 1986; van de Gienssen *et al.*, 1992; Chuma *et al.*, 1997; Shreeve *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2001). Il a de plus été suggéré que certaines souches de *Campylobacter* soient sélectionnées par les méthodes de culture, réduisant la diversité observée pour les lots de production (Jacobs-Reitsma 1997). Par contre, une faible diversité de *Campylobacter* dans les lots de production a été rapportée dans la majorité des études, peu importe les protocoles d'échantillonnage, d'isolement et de culture utilisés (Chuma *et al.*, 1997; Shreeve *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2001). D'ailleurs, la forte diversité génétique observée entre les différentes périodes de production de cette étude suggère que diverses souches clonales de *Campylobacter* aient la capacité de croître sur les milieux utilisés. Nous suggérons donc que, dans la majorité des cas, la diversité des campylobacters à l'intérieur des lots de production de poulets à griller est faible, et serait due à une source unique d'introduction de la bactérie dans l'élevage.

Cette faible diversité à l'intérieur des lots d'abattage semble commune à tous les lots colonisés produits simultanément dans une ferme. Au Québec, un lot d'abattage peut contenir des oiseaux de deux lots de production, souvent retrouvés sur deux étages différents d'un même bâtiment. Ainsi, l'identification d'une seule souche clonale dans différents lots d'abattage d'une ferme donnée peut indiquer une source unique pour tous les lots produits simultanément sur la ferme, c'est à dire pour une période de production donnée. À l'opposé, les analyses de cette étude suggèrent qu'il existe une diversité importante de *Campylobacter* entre les périodes de production de poulets à griller. Plus précisément, plus de 49 génotypes ont été identifiés pour les 56 lots d'abattage colonisés et distribués dans 41 périodes de production de 38 fermes (chapitres 3).

Ces résultats indiquent que la majorité des périodes de production avec des lots positifs à *Campylobacter* possède leur propre souche clonale de *Campylobacter*. Dans la majorité des cas, cette souche clonale ne serait pas présente dans une autre période de production de la totalité de la production de poulets à griller, du moins pour une période d'un an. Des résultats similaires ont été rapportés pour différentes périodes de production d'une ferme donnée (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1994; Chuma *et al.*, 1997; Shreeve *et al.*, 2002). De plus, des sérotypes (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1994) et des profils *fla* (Shreeve *et al.*, 2002) différents ont été identifiés pour des lots de production consécutifs colonisés par *Campylobacter*. Cette distribution des campylobacters suggère l'avènement d'un phénomène similaire à une épidémie confinée à chacun des bâtiments de production. De plus, cette grande diversité de profils génétiques de *Campylobacter* suggère l'entrée d'un flot continue de nouvelles souches clonales en production de poulets à griller.

### 6.2.2. Nature de la source d'introduction des campylobacters dans un lot de production de poulets à griller

La distribution des campylobacters dans les lots d'abattage décrite précédemment suggère l'existence d'une source unique de *Campylobacter* pour une période de production d'une ferme donnée. Cette source permettrait l'introduction d'une nouvelle souche clonale pour chaque période de production positive à *Campylobacter*. Des distributions similaires ont été rapportées de par le monde pour les lots de production de poulets à griller, peu importe le type de production et les sources environnementales suggérées (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1994; Berndson, 1996; Chuma *et al.*, 1997; Shreeves *et al.*, 2002).

La transmission horizontale par des sources environnementales est la route la plus acceptée pour l'introduction de *C. jejuni* dans les lots de production de poulets à griller (Jacobs-Reitsma, 1997; Hald *et al.*, 2001). Par contre, la distribution des souches clonales observée dans cette étude, ainsi que certaines données de la littérature, laissent croire que d'autres sources d'introduction de la bactérie doivent être considérées. Il est difficile de concevoir une source environnementale capable de générer des souches clonales différentes pour deux périodes de production consécutives d'une ferme donnée, tout en limitant l'entrée d'une seule souche clonale pendant les 7 à 8 semaines de chacune de ces périodes de production. Il a été démontré qu'un nettoyage et une désinfection de routine des unités de production éliminent la bactérie (Gregory *et al.*, 1997; van de Giessen *et al.*, 1998; Evans et Sayers, 2000; Shreeve *et al.*, 2002). En considérant que la source de contamination est de nature environnementale, il est difficile d'envisager que cette désinfection élimine en plus la souche clonale des sources environnementales potentielles, telles la vermine, l'eau, les insectes et les oiseaux sauvages. Ainsi, il est logique de penser qu'une souche clonale qui persisterait dans l'environnement infecterait à nouveau les unités de production désinfectées. Par contre, des souches clonales différentes sont généralement identifiées pour les différentes périodes de production d'une ferme. Par conséquent, il serait plus approprié de penser que la source des campylobacters est

étroitement associée à des facteurs qui diffèrent d'une période de production à une autre.

Plusieurs éléments retrouvés dans la littérature supportent l'hypothèse que la source d'introduction des campylobacters dans un lot de production de poulets à griller serait associée aux oiseaux de remplacement du lot. Premièrement, les sources environnementales suggérées dans la littérature sont généralement exemptes de *Campylobacter* avant l'isolement de la bactérie des poulets du lot. Par contre, une fois la bactérie isolée des oiseaux, elle l'est aussi des sources environnementales suggérées (Jacobs-Reirisma *et al.*, 1994; Stern *et al.*, 2001). De plus, dans les rares cas où la bactérie a été isolée à partir des sources environnementales suggérées avant son isolement des oiseaux, les souches clonales étaient différentes (Stern *et al.*, 1995). Deuxièmement, il est rare d'isoler *Campylobacter* avant le dixième jour de production de poulets à griller (Jacobs-Reirisma *et al.*, 1995; Gregory *et al.*, 1997) malgré qu'une dose orale très faible de *Campylobacter* puisse permettre la colonisation des poussins de 1 jour et l'isolement rapide de la bactérie à partir des échantillons cloacaux (Annah-Prah et Janc, 1988; Shanker *et al.*, 1990; Stern, 1992; van de Giessen *et al.*, 1992).

À la lumière de ces informations, nous suggérons que la transmission horizontale par les poussins de 1 jour et la transmission verticale par l'œuf doivent être considérées et évaluées pour l'introduction de *C. jejuni* dans un lot de production de poulets à griller. Plusieurs données de la littérature supportent l'existence de la transmission verticale de *C. jejuni* en production aviaire. La colonisation de l'oviducte de poules à partir du cloaque (Camarda, 2000; Hiatt *et al.*, 2002), la contamination d'œufs de cailles japonaises lors de leur passage dans l'oviducte (Maruyama et Katsube, 1990), l'isolement de la bactérie dans des œufs réfrigérés (Shane *et al.*, 1986) et la détection de la bactérie par PCR ou par sondes génétiques dans le caecum d'embryon de poulets de 18 jours (Chuma *et al.*, 1994) ainsi que chez des poussins de 1 jour (Shane, 2000; Hiatt *et al.*, 2002) ont été rapportés. Puisqu'il ne faut qu'un

faible nombre d'oiseaux porteurs pour coloniser rapidement la quasi-totalité d'un lot de production (Shane, 2000), un faible taux de transmission verticale pourrait être suffisant pour créer le patron de colonisation observé en production de poulets à griller.

Il existe par contre plusieurs aspects de la colonisation des lots de production de poulets qui font obstacle à la mise en évidence de la transmission verticale, en autant qu'elle existe. La culture de *C. jejuni* à partir des œufs, des embryons et des jeunes poussins de 1 jour est difficile. L'utilisation de méthodes moléculaires telles le PCR et les sondes génétiques (Shane 2000; Hiatt *et al.*, 2002) peut permettre d'éviter la culture mais ces techniques ne démontrent pas la viabilité des bactéries. De plus, l'identification d'un nombre plus élevé de souches clonales dans les lots de reproducteurs que dans les lots de production de poulets à griller (Peterson *et al.*, 2001) complique l'identification de souches clonales communes aux reproducteurs et à leurs descendants. Pour finir, la transmission verticale pourrait n'être associée qu'à certaines souches clonales de *Campylobacter* capables de survivre dans l'oviducte et dans l'œuf. L'identification de ces souches clonales peut être difficile d'autant plus qu'on ne peut déterminer l'ampleur de la variabilité génétique lors de ce passage hypothétique d'un environnement favorable, l'intestin, à des environnements limités tels le système reproducteur des poules et l'œuf. La caractérisation d'isolats de *Campylobacter* capables de coloniser le système reproducteur de poules et des études sur la colonisation de lots expérimentaux de poulets à griller provenant de parents infectés avec ces bactéries pourraient permettre de confirmer ou d'infirmer l'existence de la transmission verticale en production aviaire.

### 6.3. Étude du lien clonal entre les campylobacters d'origine aviaire et les cas sporadiques de diarrhée chez l'humain

Le risque associé au poulet est généralement déterminé par des études cas-témoins (études rétrospectives) puisqu'il est difficile de faire un lien direct entre la souche de *C. jejuni* isolée d'un cas sporadique de diarrhée chez l'humain et celle de l'aliment en cause. La deuxième partie de ce projet avait comme objectif principal d'évaluer le lien clonal entre les isolats de *Campylobacter* d'origine aviaire et ceux provenant de cas sporadiques de diarrhée chez l'humain (chapitre 3). Dans le but de permettre de faire une évaluation du risque associé au poulet, tous les isolats d'origines aviaire et humaine ont été échantillonnés durant la même année et dans une région définie.

Les résultats de cette étude ont démontré que près de 20% des cas sporadiques de campylobactériose chez l'humain, soit 5 cas sur 24, étaient associés à des souches clonales de *C. jejuni* également isolées en production de poulets à griller. Au total, 4 souches clonales communes aux cas humains et aux poulets furent identifiées puisque 2 isolats d'origine humaine furent classés dans la même souche clonale. Ces 4 souches clonales consistaient en 1 ou 2 isolats d'origine humaine associés, selon le cas, à un groupe de 3 à 9 isolats d'origine aviaire. En accord avec la définition de souche clonale, ces isolats ont été regroupés par PFGE, avaient le même biotype et présentaient des propriétés *in vitro* de virulence similaires (chapitres 3 et 4). Une étude d'antibiorésistance effectuée dans le cadre d'un autre projet et utilisant en partie ces isolats (Guévremont *et al.*, 2003) a démontré des profils de résistance identiques pour 3 de ces 4 souches clonales. Plus précisément, selon la souche clonale, les isolats d'origines aviaire et humaine étaient sensibles à tous les antimicrobiens, résistants à la tétracycline, ou résistants à la tétracycline, à l'ampicilline et la streptomycine. La quatrième souche clonale consistait en 2 isolats d'origine humaine et en 3 isolats d'origine aviaire. Ces isolats d'origine aviaire provenaient d'un même lot d'abattage

et, tout comme pour les deux isolats d'origine humaine, avaient des profils de PFGE qui divergeaient d'une à deux bandes. L'un des isolats d'origine humaine avait par contre un profil de PFGE identique à un isolat d'origine aviaire. Tous deux étaient résistants à la tétracycline et l'ampicilline. L'autre isolat d'origine humaine était sensible à tous les antimicrobiens tandis que tous les isolats d'origine aviaire de cette souche présentaient des résistances multiples.

Ces résultats suggèrent qu'une proportion significative des cas sporadiques de diarrhée à *C. jejuni* chez l'humain serait associée aux poulets à griller. Il est considéré difficile de faire une association directe entre les cas sporadiques de campylobactériose chez l'humain et une source animale puisque les campylobacters sont communs dans l'environnement et font partie de la flore intestinale normale de plusieurs espèces de mammifères et d'oiseaux (Schouls *et al.*, 2003) et sont phénotypiquement et génétiquement très diversifiés (Aeschbacher et Piffaretti, 1989; Owen *et al.*, 1997; Wassenaar et blaser, 1999; Wareing *et al.*, 2002). Le succès du lien décrit dans cette étude est probablement attribué au fait que l'échantillonnage était limité à une période et à une région précises. Les dendrogrammes générés à partir des analyses de PFGE ont de plus démontrés que la majorité des isolats de cas sporadiques chez l'humain étaient distribués parmi les isolats d'origine aviaire. Ceci suggère que les deux populations de *Campylobacter* renferment des souches clonales rapprochées. Des associations génétiques et des sérotypes communs ont déjà été rapportés pour les isolats de *Campylobacter* d'origines aviaire et humaine (On *et al.*, 1998; Hudson *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2000; Duim *et al.*, 2001; Fitzgerald *et al.*, 2001; Hanninen *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2001; Wareing *et al.*, 2002). Petersen *et al.* (2001) ont d'ailleurs rapporté que les campylobacters d'origines humaine et aviaire possédaient des souches clonales rapprochées, ces dernières étant totalement différentes de ceux isolés de l'environnement ou d'animaux sauvages.

Malgré ces résultats, il est difficile d'évaluer exactement le risque associé au poulet puisque plusieurs facteurs de risque associés aux cas sporadiques de diarrhée à *C. jejuni* chez l'humain ont été rapportés. Il est d'ailleurs impossible de déterminer la source des autres cas humains de cette étude qui n'ont pas été associés au poulet. Il est du moins envisageable qu'une certaine proportion de ces cas soit également associée à la consommation ou la manipulation de poulet. Puisqu'il nous a été impossible d'obtenir des informations sur les cas humains, il se pourrait que certains des patients de l'étude aient contracté l'infection par la consommation ou la manipulation de produits de poulet mais à l'extérieur de la région échantillonnée, ou encore, que le poulet acheté dans la région échantillonnée aurait été élevé dans une autre région de production.

#### **6.4. Étude *in vitro* des propriétés de virulence des campylobacters**

La discrimination entre les isolats pathogènes et non pathogènes de *Campylobacter*, en autant qu'elle puisse se faire, permettrait d'évaluer plus précisément le risque associé au poulet dans les cas sporadiques d'entérite à *Campylobacter* chez l'humain. De plus, la mise en évidence de sous-populations bactériennes possédant des propriétés de virulence particulières serait une contribution importante pour l'étude de l'épidémiologie et de la pathogénie de *C. jejuni*. La grande variabilité des symptômes observés pour les entérites à *C. jejuni* chez l'humain (Nachamkin, 1995) et la diversité génétique et phénotypique observée pour *C. jejuni* (Wassenaar et Blaser, 1999) suggèrent l'existence de variations dans le pouvoir pathogène des isolats. Par contre, l'évaluation de la virulence des campylobacters est difficile puisqu'il n'existe pas à ce jour de modèle animal mimant adéquatement l'infection chez l'humain (Young *et al.*, 2000). Les seuls modèles capables de créer des lésions intestinales et l'acquisition d'une immunité, ceux du furet et du jeune macaque, sont peu accessibles et très coûteux. En conséquence, des méthodes *in vitro* sont généralement utilisées pour l'évaluation des propriétés de virulence de *C. jejuni*. Par contre, les résultats retrouvés dans la littérature sont souvent contradictoires. La comparaison des résultats entre différentes études peut s'avérer difficile d'autant plus

qu'il n'existe pas de protocoles standardisés pour l'étude des propriétés *in vitro* de virulence de *C. jejuni*.

Le deuxième objectif de ce projet était de comparer les propriétés *in vitro* de virulence de 197 isolats de *Campylobacter* d'origines aviaire et humaine. L'analyse des propriétés *in vitro* de virulence des isolats regroupés génétiquement par PFGE et/ou phénotypiquement par biotypage a été effectuée dans le but d'identifier des sous-populations de *Campylobacter* possédant des propriétés de virulence particulières (chapitre 4). Puisque les mécanismes de virulence de *C. jejuni* sont à ce jour méconnus (Konkel *et al.*, 1999), nous avons choisi d'évaluer la production d'activité cytotoxique et la capacité des isolats à adhérer et à envahir les cellules épithéliales. Ces mécanismes sont probablement importants dans la pathogénie de *C. jejuni* (van Vliet et Ketley, 2001). La capacité à envahir les cellules épithéliales et la production d'une activité cytotoxique ont d'ailleurs été associées aux cas de diarrhées inflammatoires et sanguinolentes chez l'humain (Wallis, 1994).

#### **6.4.1. Évaluation *in vitro* des propriétés de virulence des isolats de *Campylobacter* d'origines aviaire et humaine**

Les résultats obtenus dans cette étude ont démontré que les isolats de *Campylobacter* d'origines aviaire et humaine n'ont pas tous les mêmes propriétés de virulence *in vitro* (chapitre 4). D'abord, tous les isolats de *Campylobacter* ont adhéré aux cellules épithéliales. Par contre, 64% et 13% des isolats de l'étude ont démontré une capacité à envahir les cellules épithéliales et à produire une activité cytotoxique, respectivement. Nous avons d'ailleurs observé des différences significatives dans les propriétés *in vitro* de virulence entre les isolats provenant de cas sporadiques de diarrhée chez l'humain et ceux provenant des poulets à griller. Une proportion plus grande d'isolats fortement invasifs a été observée pour les *Campylobacter* d'origine humaine. De plus, les isolats d'origine humaine ont produit une activité cytotoxique

qui, en plus d'être active pour les cellules CHO et INT-407, l'était aussi pour les cellules Vero.

Il est maintenant reconnu que la majorité des *C. jejuni* adhèrent aux différentes lignées cellulaires d'origines humaine et animale (Konkel et Joens, 1989; Kervella *et al.*, 1993; Biswas *et al.*, 2000; Konkel *et al.*, 2000). Le pouvoir *in vitro* d'adhésion serait commun à tous les *C. jejuni* puisque la bactérie serait capable d'adhérer sans la synthèse *de novo* de protéines lors du contact cellulaire ou sans la présence de récepteur cellulaire particulier (Konkel *et al.*, 1992b). Par contre, d'autres facteurs permettant aussi une adhésion aux cellules épithéliales impliqueraient la synthèse d'une ou plusieurs adhésines régulées par la température car l'adhésion est moindre lorsque la bactérie est cultivée à 42°C au lieu de 37°C (Konkel *et al.*, 1992d). La température corporelle du poulet de près de 42°C (Beery *et al.*, 1988) pourrait contribuer au fait que *C. jejuni* colonise généralement la couche de mucus des cryptes cecales sans toutefois s'associer intimement aux entérocytes. Plusieurs protéines de la membrane externe et du flagelle ainsi que des lipopolysaccharides ont été proposées comme adhésines (Moser *et al.*, 1997). L'adhésion aux cellules épithéliales est un prérequis à l'invasion. Les résultats de certaines études suggèrent l'existence d'un récepteur cellulaire initiant le processus de l'invasion (Konkel et Joens, 1989). La distinction entre les molécules d'adhésion associées à un mécanisme ultérieur de virulence de celles associées uniquement à l'adhésion serait une étape importante dans l'étude des mécanismes de virulence et dans le développement de stratégies de contrôle de *C. jejuni*.

Il a été démontré que l'habileté de *C. jejuni* à envahir les cellules épithéliales varie selon les souches (Everest *et al.*, 1992). De plus, pour une même souche, l'invasion est généralement plus efficace en utilisant des lignées cellulaires d'origine humaine (Konkel et Cieplak, 1992). Dans cette étude, la proportion d'isolats invasifs d'origine humaine était similaire à ceux d'origine aviaire. Par contre, la proportion

d'isolats fortement invasifs était significativement plus élevée pour les isolats d'origine humaine. Certaines études ont d'ailleurs démontré que des isolats cliniques d'origine humaine étaient plus invasifs que des isolats de cas asymptomatiques chez l'humain, des isolats d'origine animale (incluant le poulet) ou des isolats d'origine environnementale (Newell *et al.*, 1985; Konkel et Joens, 1989; Prasad *et al.*, 1996; Ruiz-Palacios *et al.*, 1992; Biswas *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001) suggérant que l'invasion est un processus utilisé par la bactérie pour causer une entérite chez l'humain.

Tel que mentionné auparavant, il peut s'avérer hasardeux de comparer les résultats de propriété de virulence des campylobacters entre les études. Ceci est d'autant plus vrai pour les activités cytotoxiques puisque plusieurs protocoles ont été utilisés et diverses activités cytotoxiques ont été décrites. L'activité cytotoxique observée dans cette étude était sensible à la chaleur et causait l'arrondissement, le détachement, puis la mort des cellules. Cette activité diffère de celle de la toxine CDT, la toxine la plus étudiée et la plus caractérisée chez *Campylobacter*. La CDT crée une distension progressive des cellules. La superficie des cellules affectées peut atteindre plus de 10 fois celle des cellules contrôles (Bang *et al.*, 2001). L'absence d'activité CDT dans cette étude est surprenante puisque l'incidence de cette activité et de la présence des gènes *cdt* est généralement élevée pour *C. jejuni* (Pickett *et al.*, 1996; Eyigor *et al.*, 1999; Bang *et al.*, 2001). Dans le cas de la CDT de *C. jejuni*, la cytotoxine serait fortement associée aux membranes bactériennes et ne serait pas observée à l'état soluble (Pickett, 2000). L'utilisation de la polymyxine B dans cette étude pour amplifier le pouvoir cytotoxique des isolats de *Campylobacter* pourrait être la cause de cette absence d'activité CDT. La polymyxine B agirait comme un détergent en se liant aux lipopolysaccharides, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane externe à diverses molécules solubles du milieu et du périplasma (Daugelavicius *et al.*, 2000). L'extraction à la polymyxine B est souvent utilisée pour permettre la libération de toxine soluble emmagasinée dans l'espace périplasmique. D'ailleurs, les titres cytotoxiques élevés observés dans cette étude sont probablement

une conséquence de l'utilisation de la polymyxine B. Par contre, une faible proportion des isolats, soit 13%, étaient cytotoxiques. Cette proportion est plus faible que celle rapportée dans la majorité des études (Wassenaar, 1997). Cette activité cytotoxique se manifestait sur les lignées cellulaires CHO et INT-407. De plus, les isolats cytotoxiques d'origine humaine étaient cytotoxiques pour les cellules Vero. L'importance de cette activité cytotoxique sur les cellules Vero demeure inconnue puisque peu d'études rapportent une activité cytotoxique sur ces cellules (Wassenaar, 1997). De plus, tel qu'observé dans cette étude (chapitre 4), les activités Vero-cytotoxiques sont généralement plus faibles et plus variables que celles observées pour les autres lignées cellulaires (Lee *et al.*, 2000). Cette différence entre les isolats d'origines humaine et aviaire pourrait suggérer l'existence d'une activité cytotoxique différente ou l'existence d'une combinaison de plusieurs cytotoxines chez les campylobacters d'origine humaine. Plusieurs activités cytotoxiques ont déjà été observées pour une même population de *Campylobacter* (Pickett, 2000).

#### **6.4.2. Regroupement des campylobacters selon leurs propriétés de virulence évaluées *in vitro***

La mise en évidence de sous-populations de *C. jejuni* possédant certaines caractéristiques associées aux cas humains ou à certaines propriétés de virulence permettrait de diriger les études sur certaines sous-populations de *C. jejuni*. Wassenaar et Blaser (1999) suggéraient que la diversité des pathotypes de *C. jejuni* serait similaire à celle d'*E. coli*. Cette étude a démontré qu'il existe, du moins dans des conditions *in vitro*, des sous-populations de *C. jejuni* ayant certaines caractéristiques de virulence, dont une activité cytotoxique (chapitre 3). Les isolats de l'étude ont été regroupés par PFGE et par biotypage selon leur capacité à envahir les cellules épithéliales et à produire une activité cytotoxique (chapitre 4). Le schéma de biotypage de Lior est maintenant peu utilisé pour la caractérisation des campylobacters puisque cette méthode est peu discriminante. Toutefois, ce faible pouvoir de discrimination peut être utilisé pour faire un premier regroupement des isolats de *C. jejuni* selon certains critères prédéterminés. La comparaison des propriétés *in vitro* de

virulence des isolats de *Campylobacter* à l'intérieur des biotypes a permis d'associer la capacité à envahir les cellules épithéliales aux isolats de *C. jejuni* biotypes 1 et 2 et la production d'une activité cytotoxique aux isolats de *C. jejuni* biotypes 3 et 4.

C'est la première fois qu'une association entre des propriétés *in vitro* de virulence d'isolats de *C. jejuni* et les biotypes soit faite. Contrairement aux isolats invasifs, les isolats cytotoxiques ont de plus été regroupés par PFGE. Subséquemment, les isolats cytotoxiques de cette étude, et par conséquent les isolats de *C. jejuni* biotypes 3 et 4, constitueraient une sous-population de *C. jejuni* possédant des propriétés de virulence particulières. À l'opposé, les isolats fortement invasifs étaient largement distribués dans le dendrogramme de PFGE. Carvalho *et al.* (2001) rapportaient un regroupement génétique des isolats invasifs à l'aide du RAPD. Ils ont noté une bande spécifique de 1,6 kb, nommée *invasive associated marker* ou IAM. Les caractéristiques génétiques du IAM n'ont pas été à ce jour publiées. Le PFGE et le RAPD utilisent le génome entier pour former des profils génétiques (Newell *et al.*, 2000). Contrairement au RAPD, qui génère des profils complexes de petits fragments d'ADN, le PFGE ne génère généralement pas de fragments inférieurs à 20 kb, ces derniers étant largement supérieur au IAM. Il se pourrait que les souches clonales invasives soient génétiquement très diversifiées, mais auraient acquis certains gènes leur permettant d'envahir les cellules épithéliales.

Néanmoins, le PFGE demeure une méthode de choix pour l'épidémiologie moléculaire et la comparaison des isolats de *Campylobacter*. L'homogénéité des propriétés *in vitro* de virulence, des profils d'antibiorésistance (données non présentées) et du biotype à l'intérieur des génotypes de PFGE suggère que l'enzyme *KpnI* permet le regroupement efficace des campylobacters en différentes souches clonales possédant des caractéristiques phénotypiques similaires.

### 6.5. Étude du profil protéique des isolats de *C. jejuni*

La dernière partie du projet avait pour but d'associer une ou plusieurs protéines à une propriété *in vitro* de virulence (Chapitre 5). Tout en considérant la relation clonale et les propriétés *in vitro* de virulence des isolats de *Campylobacter*, une caractérisation protéique a été effectuée afin d'identifier une ou plusieurs protéines, préférablement immunogène et associée à la virulence. L'étude protéique consistait d'abord à comparer les 195 isolats de *Campylobacter* préalablement caractérisés (PFGE, biotypage et propriétés *in vitro* de virulence) par SDS-PAGE et Western blot. De plus, certains isolats ont été sélectionnés pour l'identification de protéines exprimées *in vivo* après un passage de 24 h dans des microchambres intra-péritonéales à diffusion chez le porc (Annexe 1).

Pour les analyses par Western blot, il nous a été impossible d'obtenir un sérum d'humain convalescent à une infection à *C. jejuni*. Il aurait été de plus inapproprié d'utiliser le sérum de poulets porteurs de *C. jejuni* puisque la bactérie est considérée non pathogène pour l'oiseau et interagit peu avec les cellules de l'hôte. Nous avons donc utilisé un antisérum créé chez le lapin avec des sonicats de bactéries totales de *C. jejuni* isolées de cas humains et ayant eu au moins un passage *in vitro* avant l'utilisation comme antigènes. L'analyse des isolats de *Campylobacter* avec ce sérum n'a pas permis d'associer une protéine immunogène avec une propriété *in vitro* de virulence, malgré l'observation d'une multitude de profils protéiques (Annexe 1).

Il a été démontré que les passages *in vitro* réduisaient considérablement la virulence des campylobacters (Konkel et Joens, 1989; Konkel *et al.*, 1990; Babakhani et Joens, 1993). Des passages dans la cavité intra-péritonéale de souris, dans des intestins, dans des cellules intestinales primaires, ou dans des embryons de poussin ont été tentés, dans certains cas avec succès, pour restaurer la virulence de *C. jejuni* (Field *et al.*, 1991; Saha *et al.*, 1991; Babakhani et Joens, 1993; Fernandez *et al.*, 2000). En revanche, les bactéries étaient toujours cultivées à nouveau avant l'évaluation de la

virulence. Pour contrer les effets inhibiteurs de la culture *in vitro* sur l'expression de facteurs de virulence, nous avons utilisé des microchambres à diffusion (partie d'un barillet de seringue fermée aux extrémités par des filtres 0,22 µm) implantées dans la cavité abdominale de porc (Quessy *et al.*, 1994). Les bactéries sont ensuite directement accessibles à l'intérieur des microchambres. Malheureusement, ce passage abdominal de 24 heures a été sans succès (Annexe 1). La microscopie électronique a démontré que les campylobacters avaient perdu leur morphologie spiralée et étaient devenus coccoïdes (Annexe 1). La fonction de l'état coccoïde de *C. jejuni* est controversée. Pour certains chercheurs, la morphologie coccoïde serait un mécanisme de survie pour surmonter le manque de nutriment et mènerait au stade de bactérie « viable mais non cultivable » (Kelly, 2001) tandis que pour d'autres, elle serait le résultat d'une dégénérescence de la bactérie par des dommages oxydatifs (Harvey et Leach, 1998). Ce transfert rapide à la forme coccoïde (24 h) dans des conditions *in vivo* est surprenant puisqu'il est rare de noter des campylobacters coccoïdes avant 48 h dans des cultures *in vitro* (Nachamkin, 1995). *C. jejuni* est pourtant associé à une multitude de pathologies extraintestinales, dont des péritonites (Nachamkin 1995).

L'analyse des isolats de *Campylobacter* par SDS-PAGE n'a pas permis de faire une association entre une protéine et le pouvoir d'invasion (Annexe 1). L'invasion serait un processus actif dépendant de la synthèse *de novo* de protéines bactériennes lors du contact cellulaire (Wooldridge *et al.*, 1996; Konkel *et al.*, 1999). Il a été démontré que ces protéines associées à l'invasion peuvent également être exprimées par la culture de la bactérie dans des milieux contenant du sérum fœtal bovin ou du déoxycholate de sodium (Rivera-Amill *et al.*, 2001). Par contre, dans cette étude, aucun changement dans les profils protéiques ne fut observé après une incubation d'isolats fortement invasifs dans un surnageant de culture cellulaire contenant du sérum fœtal bovin (Annexe 1).

En revanche, une bande protéique de 42 kDa a été associée à la cytotoxicité. Cette protéine de 42 kDa était une protéine majeure de l'extraction à la polymyxine B des isolats cytotoxiques. Ceci suggère qu'elle serait emmagasinée, du moins dans des conditions *in vitro*, dans le périplasme de la bactérie. Un antisérum anti-protéine de 42 kDa fut produit chez le lapin à partir de la protéine de 42 kDa de l'isolat d'origine aviaire 1257, un isolats fortement cytotoxique. Les analyses par Western blot ont également démontrées la présence de la protéine de 42 kDa chez tous les isolats cytotoxiques, tant dans les extraits bactériens de protéines totales que dans l'extraction à la polymyxine B.

En faisant abstraction de l'activité variable observée sur les cellules Vero, l'activité cytotoxique observée dans cette étude possède plusieurs points en commun avec l'activité de la toxine dite « de 70 kDa » (Wassenaar, 1997). Cette cytotoxine a un poids moléculaire variant de 30 à 70 kDa, est active sur les cellules CHO et INT-407, cause l'arrondissement, le détachement et la mort cellulaire et est sensible à la chaleur (Pickett, 2000). De plus, son activité a été augmentée par le traitement des isolats à la polymyxine B (Johnson et Lior, 1984; Guerrant *et al.*, 1987). L'expression d'une activité cytotoxique similaire a de plus disparu après des passages *in vitro* (Pang *et al.*, 1987; Daikoku *et al.*, 1989) et après un entreposage d'une année à -70°C (Florin et Antillon, 1992). Nous avons d'ailleurs observé une baisse de l'activité cytotoxique à la suite de l'entreposage de la majorité des isolats cytotoxiques à -70°C (Chapitre 5). Cette baisse de l'activité cytotoxique concorde d'ailleurs généralement avec une baisse de l'intensité de la bande de 42 kDa sur gel de SDS-PAGE (données non présentées). La réduction de l'intensité de la protéine de 42 kDa de concert avec une réduction de l'activité cytotoxique renforce le lien entre la cytotoxicité et cette protéine. Cette réduction de l'activité cytotoxique à la suite de la congélation suggère un système de régulation de l'expression de l'activité cytotoxique.

## 6.6. Association de la cytotoxicité à la gamma-glutamyl transpeptidase

L'isolat aviaire 1257, un isolat fortement cytotoxique, a été sélectionné pour entreprendre l'identification et la caractérisation de la bande de 42 kDa (chapitre 5). Pour débiter la caractérisation de la protéique, il fallait s'assurer que la protéine observée dans l'extrait bactérien de protéines totales était la même que celle observée dans l'extraction à la polymyxine B concentrée. La comparaison des séquences peptidiques N-terminales des bandes de 42 kDa a établi que les bandes des deux fractions protéiques étaient composées de la même protéine. Par contre, aucune homologie avec une protéine et/ou un gène connu n'a pu être déterminée lors de la comparaison de cette courte séquence peptidique avec les séquences accessibles dans différentes banques de séquences protéique et génétique. Cette séquence N-terminale et une séquence interne de la protéine de 42 kDa, obtenue après le clivage de la protéine au bromure de cyanogène (CnBr), ont été utilisées pour créer des amorces dégénérées. Ce PCR dégénéré a permis d'amplifier entre 3 et 8 loci pour les 79 isolats de *C. jejuni* d'origines aviaire et humaine, soit 24 isolats cytotoxiques et 55 isolats non cytotoxiques. Un locus d'environ 2 kb a été associé aux isolats cytotoxiques. Des amorces non dégénérées conçues à partir des séquences partielles de ce produit de 2 kb ont généré un amplicon interne d'environ 1,1 kb. Ce locus fut également associé aux isolats cytotoxiques. L'alignement des séquences partielles des locus de 2 kb (PCR dégénéré) et de 1,1 kb (PCR non dégénéré) a produit un fragment homologue à la GGT d'*H. pylori* et à plusieurs autres GGT orthologues d'origine bactérienne. Un PCR inverse fut créé pour obtenir la séquence en amont de l'amplicon de 2 kb et ainsi finaliser la séquence du locus associé à la GGT d'*H. pylori*. L'alignement des séquences partielles des PCR dégénérés, non-dégénérés et inverses a produit un fragment de 2431 pb, incluant une séquence codante hypothétique de 1671 pb. Cette dernière avait un degré d'identité de 67% avec la GGT d'*H. pylori*.

Curieusement, les amorces dégénérées conçues à partir des séquences N-terminale et interne de la protéine de 42 kDa ont produit un amplicon d'environ 2 kb. L'analyse des séquences a démontré que l'amorce dégénérée conçue à partir de la séquence peptidique interne s'est appariementée à environ 300 pb en aval du locus associé à la GGT (chapitre 5). Ceci nous a néanmoins permis d'avoir des informations sur la séquence nucléotidique en aval du locus de *C. jejuni* associé à la GGT. L'acquisition possible du gène *ggt* d'un *Helicobacter* est supportée par le fait que dans cette étude, le fragment séquencé en aval est homologue à l'extrémité C-terminale d'une autre protéine d'*H. pylori*; la *ycf5*, une protéine de biogenèse du cytochrome C. La séquence en amont était en revanche homologue avec l'extrémité N-terminale d'une protéine de *C. jejuni*. Il se pourrait donc qu'une sous-population de *C. jejuni*, par conséquent des *C. jejuni* biotypes 3 et 4, ait acquis le gène *ggt* d'un *H. pylori* ou d'un autre *Helicobacter* partageant davantage les écosystèmes de *C. jejuni*. À l'inverse, il est possible que des hélicobacters puissent avoir hérité du gène *ggt* d'un *C. jejuni*. Par contre, le gène *ggt* est présent chez la totalité des isolats d'*H. pylori*, et de plusieurs autres espèces d'*Helicobacter*, tout en ayant été observé que pour une faible proportion d'isolats de *C. jejuni* de cette étude. Les échanges horizontaux intra et inter-spécifiques seraient fréquents chez *C. jejuni* (Dingle *et al.*, 2001) et seraient le moyen de variation génétique le plus utilisé puisque le génome de *C. jejuni* 11168 ne possède pas de séquence associée à des transposons, des éléments d'insertion et des séquences répétitives (Parkhill *et al.*, 2000).

Pour le reste de la discussion, le locus de 1671 pb homologue à la GGT d'*H. pylori* et associé aux isolats cytotoxique de *C. jejuni* sera considéré comme étant un gène codant pour un enzyme similaire à la GGT.

### 6.6.1. Fonction de la gamma-glutamyl transpeptidase

La GGT est un enzyme retrouvé chez les eucaryotes et les procaryotes jouant un rôle fondamental dans le métabolisme du glutathion (GSH), son substrat naturel (Xu et Strauch, 1996). Les cellules mammaliennes ne peuvent directement assimiler le GSH. La GSH est un tripeptide composé du gamma-glutaminate, de la cystéine et de la glycine. La GGT fragmente le GSH extracellulaire en pro-acides-aminés individuels capables d'être assimilés par les cellules. Une fois assimilés, ces pro-acides-aminés sont utilisés pour synthétiser une nouvelle molécule intracellulaire de GSH (figure 6.1). Le GSH est le principal antioxydant thiol intracellulaire et plusieurs fonctions antitoxiques et de défense de la cellule lui ont été attribuées (Meister et Anderson, 1983; Paolicchi *et al.*, 2002). Par contre, aucun mécanisme d'anti-oxydation n'a été décrit pour le GSH et, comme pour la GGT, son rôle physiologique est encore méconnu (Paolicchi *et al.*, 2002).

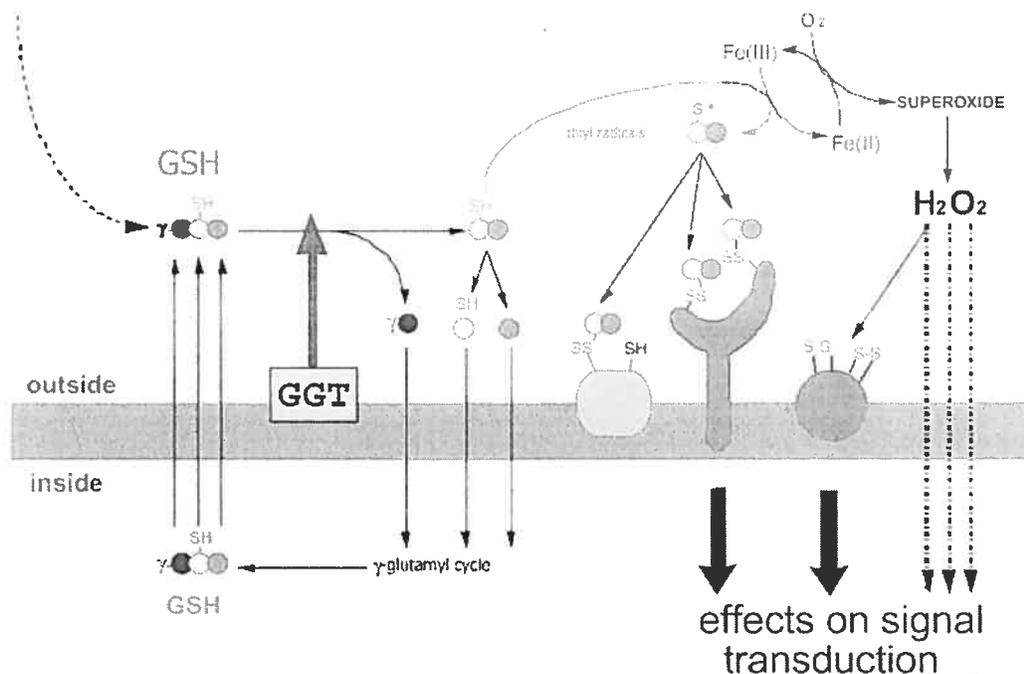


Figure 6.1: Résumé des réactions des pro-oxydants provenant du catabolisme du GSH extracellulaire par la GGT et cibles moléculaires impliquées (Paolicchi *et al.*, 2002)

Chez les bactéries, le gène *ggt* a été identifié et séquencé pour plusieurs bactéries (voir section 2.7). La conformation du gène de ces bactéries est similaire à celle des eucaryotes qui de 5' à 3' code dans une unique fenêtre de lecture pour un peptide signal, une sous-unité lourde et une sous-unité légère. Le gène est d'abord traduit en une protéine pro-GGT de 575 à 587 acides aminés, selon l'espèce bactérienne, qui est ensuite scindée et assemblée en un enzyme actif composé de la sous-unité lourde d'environ 40 kDa et de la sous-unités légère d'environ 20 kDa. Chez *E. coli*, l'enzyme est localisé dans le périplasme (Suzuki *et al.*, 1986). Le rôle physiologique exact de cet enzyme chez les bactéries n'est pas clair mais aurait un rôle dans le catabolisme du GSH. Selon Suzuki *et al.* (1998), le GSH entre dans le périplasme durant la phase stationnaire des bactéries et serait scindé par la GGT. Le cycle de la catalyse du GSH par la GGT serait similaire à celui des cellules eucaryotes.

La séquence protéique déduite du locus de 1671 pb de *C. jejuni* associé à la GGT d'*H. pylori* possédait les deux sites de clivage identifiés pour la GGT d'*H. pylori* (Chapitre 5) (Shibayama *et al.*, 2003). Chez *H. pylori*, ces sites de clivage distinguent, dans l'ordre, le peptide signale, la sous-unité lourde et la sous-unité légère. La séquence N-terminale de la protéine de 42 kDa était homologue à la séquence N-terminale de la sous-unité lourde de la GGT d'*H. pylori*. En considérant que le locus homologue à la GGT identifié dans cette étude est organisé similairement à l'enzyme GGT d'*H. pylori*, la protéine de 42 kDa pourrait correspondre à la sous-unité lourde. Il fut par contre impossible d'observer une protéine d'environ 20 kDa associée à la cytotoxicité et qui aurait pu correspondre à la sous-unité légère. Puisque l'organisation du locus homologue à la GGT semble similaire à celle de la GGT des autres bactéries, il est raisonnable de croire que l'enzyme complet serait produit chez *C. jejuni*. Tel que mentionné auparavant, la pro-GGT est scindée et assemblée en un enzyme actif, la GGT, composée des sous-unités lourde et légère, du moins pour *E. coli*. Il se pourrait que pour *C. jejuni*, les deux sous-unités ne s'assemblent pas et que seulement la sous-unité lourde s'accumule dans le périplasme. La sous-unité légère pourrait être métabolisée à l'intérieur du cytoplasme ou excrétée hors de la bactérie

lors de la culture. Si toutefois les deux sous-unités s'assemblaient, comme pour *E. coli*, la dénaturation par SDS-PAGE scinderait les deux sous-unités de la GGT qui sont liées d'une façon non covalente.

### 6.6.2. Hypothèses sur la GGT bactérienne comme facteur de virulence

L'activité de la GGT est commune à toutes les souches d'*H. pylori*, ainsi qu'à plusieurs autres espèces d'*Helicobacter*, et est utilisée comme marqueur pour l'identification d'*H. pylori* (Chevalier *et al.*, 1999). Chez *H. pylori*, le gène *ggt* consiste en une fenêtre de lecture de 1681 pb codant pour une protéine de masse moléculaire déduite de 61 kDa. (Chevalier *et al.*, 1999). Le gène *ggt* a été associé à la virulence d'*H. pylori*. La délétion du gène par Chevalier *et al.* (1999) a empêchée la colonisation de la muqueuse gastrique de souris par les souches mutantes tandis qu'une délétion similaire effectuée par McGovern *et al.* (2001) n'a pas totalement contré la colonisation de l'estomac de souris et de porcelets mais a diminué la charge bactérienne ayant colonisée l'estomac. Dernièrement, la GGT d'*H. pylori* a été associé à une activité apoptotique (Shibayama *et al.*, 2003). Ces données suggèrent la participation du gène *ggt* dans la pathogenèse d'*H. pylori*. Le gène *ggt* n'est pas présent dans le génome de *C. jejuni* 11168. Par contre, une étude utilisant l'hybridation soustractive pour identifier des fragments de gènes retrouvés chez *C. jejuni* 81116 (fort colonisateur des intestins de poulet) mais absents chez *C. jejuni* 11168 (faible colonisateur du poulet) a associé un insert clonal homologue au gène *ggt* d'*H. pylori* (Ahmed *et al.*, 2002). Fait intéressant, une activité cytotoxique similaire à celle observée dans cette étude à été observée pour *C. jejuni* 81116 (Lee *et al.*, 2000). Des analyses par ultrafiltration suggéraient que l'activité observée par Lee *et al.* (2000) était associée à une protéine de plus de 50 kDa.

La GGT eucaryote a par contre été associée à de la toxicité cellulaire. Certaines équipes ont démontré un rôle pro-oxydant aux métabolites dérivés de la catalyse du GSH par la GGT (Paolicchi *et al.*, 2002). D'une façon générale, la GGT hydrolyse le

lien gamma-glutamyl entre le glutamate et la cystéine du GSH, relâchant ainsi la cystéinyglycine (Cys-Gly) qui est par la suite scindée en cystéine et en glycine par des dipeptidases membranaires (Paolicchi *et al.*, 2002). La Cys-Gly et la cystéine extracellulaires peuvent être utilisés comme substrats pour générer une production de superoxydes, de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de radicaux thiyl (figures 6.1 et 6.2). L'interaction de ces pro-oxydants avec certaines cibles intra et extracellulaires serait responsable de modulations de diverses cascades de transduction de signaux intracellulaires. Ces pro-oxydants dérivés de l'action de la GGT sur le GSH, plus précisément le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, joueraient un rôle important dans la balance « prolifération cellulaire/apoptose » (Paolicchi *et al.*, 2002). Ces derniers rapportent que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provenant de l'action du GGT aurait une action anti-proliférative sur les cellules, inhibant la multiplication cellulaire. À l'opposé, des niveaux faibles continus de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, toujours issus de l'action de la GGT, auraient une action anti-apoptotique favorisant la survie cellulaire. Ces données concordent d'ailleurs avec l'observation d'une activité apoptotique associée à la GGT d'*H. pylori* (Shibayama *et al.*, 2003)

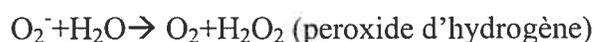
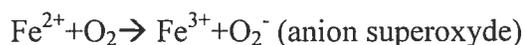
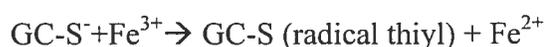
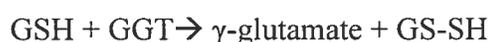


Figure 6.2: Catalyse du glutathion par la GGT et formation de pro-oxydants (Paolicchi *et al.*, 2002). GSH: glutathion, GC: cyteinyglycine, SH: disulfure

La fonction anti-proliférative des pro-oxydants dérivés de l'action de la GGT pourrait être responsable de la cytotoxicité observée dans cette étude. Ce mécanisme de virulence serait d'ailleurs en accord avec certaines données *in vitro* et *in vivo* suggérant que *C. jejuni* semble privilégier les cellules en multiplication. *C. jejuni* a un

tropisme particulier pour les cryptes intestinales du poulet et de l'humain (Tauxe, 1992). Les cryptes intestinales contiennent des cellules indifférenciées en multiplication continue qui deviennent matures et se différencient en entérocytes lors de leur déplacement vers l'apex des villis (Falk *et al.*, 1998). Par exemple, une crypte intestinale de souris peut générer plus de 300 cellules par jour soit près de 12 cellules à l'heure. Il a été démontré que *C. jejuni* se lie préférentiellement à des récepteurs cellulaires se trouvant en bordure de cellules INT-407 en division (Konkel *et al.*, 1992c) et que l'utilisation de cultures cellulaires confluentes ou trop différenciées abaissent considérablement le taux d'invasion dans des tests *in vitro* (Hu et Kopecko, 2000). De plus, le toxine CDT, fortement distribuée chez les campylobacters, affecte la division cellulaire en causant un blocage permanent dans la phase G2 du cycle cellulaire (Whitehouse *et al.*, 1998). Hu and Kopecko (1999) suggéraient d'ailleurs que l'invasion des cellules épithéliales par *C. jejuni* est dépendante du cycle cellulaire de l'hôte. Ainsi, différents mécanismes pouvant affecter le cycle normal de multiplication cellulaire seraient important pour la virulence de *C. jejuni*. Il serait intéressant d'utiliser des cellules isolées de cryptes intestinales ou des cellules IEC-6 dérivées des cryptes intestinales d'un rat normal (Kimura *et al.*, 1997) pour comparer les pathotypes des isolats de cette étude. L'utilisation de ces cellules permettrait d'être davantage fidèle aux conditions *in vivo* de *Campylobacter*.

Puisque la cytotoxicité observée dans cette étude a été fortement associée aux isolats de *C. jejuni* biotypes 3 et 4, il existerait peut-être un lien entre la GGT et la classification des isolats de *C. jejuni* dans ces biotypes. Selon le schéma de biotypage de Lior (Lior, 1984), les biotypes 3 et 4 de *C. jejuni* diffèrent des biotypes 1 et 2 par leur capacité à produire du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S). La présence de H<sub>2</sub>S d'origine bactérienne a été associée aux infections périodontiques (Ratcliff et Johnson, 1999), aux colites ulcéraives (Suarez *et al.*, 1998) et à certains autres désordres intestinaux chroniques (Pitcher *et al.*, 2000). Certaines études *in vitro* ont d'ailleurs démontré des actions directes du H<sub>2</sub>S sur différentes lignées cellulaires (Granlund-Edstedt *et al.*,

1991 et 1993; Ratkay *et al.*, 1995; Lancero *et al.*, 1996; Ratcliff and Johnson, 1999). Dans le colon, ce gaz bloquerait le processus d'oxydation du *n*-butyrate par les cellules épithéliales du colon compromettant ainsi l'intégrité des membranes cellulaires des colonocytes (Roediger *et al.*, 1997). Il a été démontré que *Treponema denticola*, une bactérie du biofilm sous gingival associée aux maladies périodontiques, utilise le GSH, la Cys-Gly et la cystéine pour produire du H<sub>2</sub>S, du glutamate, de la glycine, de l'ammoniaque et du pyruvate (Chu *et al.*, 2002). Un modèle hypothétique de production de H<sub>2</sub>S par *T. denticola* (Chu *et al.* 2002) implique la participation de la GGT (figure 6.3). Ainsi, la GGT présente chez *C. jejuni* pourrait être impliquée dans la production de H<sub>2</sub>S et pourrait être responsable de la classification des *C. jejuni* en biotypes 3 et 4. Dans cette étude, la GGT ne demeure pas moins associé à la cytotoxicité puisque des isolats de *C. jejuni* biotypes 1 et 2 étaient cytotoxiques, exprimaient la protéine de 42 kDa et étaient porteurs du locus homologue à la GGT d'*H. pylori* tout en ne produisant pas de H<sub>2</sub>S.

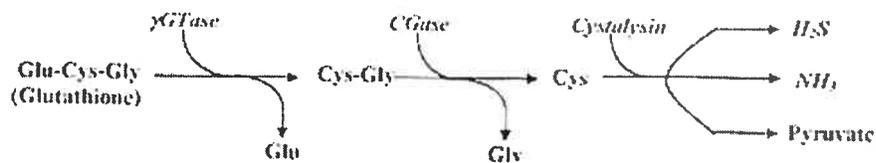


Figure 6.3: Modèle hypothétique pour la dégradation du GSH chez *T. denticola*. Gtase: Gamma-glutamyl transpeptidase ou GGT; Cgase: cystéinyglycinase (selon paolicchi *et al.*, 2002)

En supposant que la GGT identifiée chez *C. jejuni* ne possède pas d'autre fonction que celles décrites pour les GGT, elle n'initierait pas directement le processus de cytotoxicité mais enclencherait une cascade de réactions menant à la formation de produits toxiques. Ainsi, l'activité cytotoxique observée pourrait être reliée à la présence d'un ou de plusieurs de ces produits toxiques dans les extractions à la polymyxine B. Par contre, l'activité cytotoxique observée dans cette étude a été

inactivée par la chaleur (70°C), est demeurée active après une dialyse utilisant une tubulure de 10 000 MWCO (*molecular weight cut-off*) et a pu être concentrée par lyophilisation (Chapitre 4 et 5) suggérant l'implication d'une composante protéique de plus de 10 kDa.

Un modèle hypothétique construit à partir des données retrouvées dans la littérature est présenté à la figure 6.4. Il est important de noter que ce modèle n'est qu'une extrapolation des informations connues jusqu'à ce jour sur le GGT et présume que la protéine exprimé à partir du locus de *C. jejuni* homologue à la GGT se comporte comme une GGT eucaryote. La GGT de *C. jejuni*, en scindant le GSH, pourrait créer une activité cytotoxique par la production de H<sub>2</sub>S et/ou la production de pro-oxydants et/ou une autre action indéterminée. Dans des conditions de culture *in vitro*, cet enzyme serait confiné à l'espace périplasmique et ne se retrouverait pas dans le surnageant de culture. D'ailleurs Coote et Arain (1996), utilisant un test de cytotoxicité similaire à celui utilisé dans cette étude, rapportaient une faible activité cytotoxique avec les extractions à la polymyxine B mais aucune activité avec les surnageants de culture. En plus de l'action cytotoxique, il ne faut pas oublier que les activités anti-oxydantes associées à la GGT et décrites pour la GGT eucaryote pourraient jouer un rôle dans la défense de la bactérie contre certains stress oxydatifs lors de l'infection. De plus, puisque les campylobacters puisent leur énergie de la dégradation des acides aminés et non de la fermentation des hydrates de carbone (Smibert, 1974), la présence de la GGT pourrait permettre l'acquisition d'acides aminés en scindant la GSH en pro-acides aminés.

Il est difficile de déterminer l'importance de la présence de cette activité cytotoxique, de la protéine de 42 kDa et du locus associé à la GGT dans les cas d'entérite à *C. jejuni* chez l'humain puisque les *C. jejuni* biotypes 3 et 4 sont relativement rares (Lior, 1984; Megraud *et al.*, 1987; Georges-Courbot *et al.*, 1989). Par contre, en se référant aux estimations stipulant qu'il y aurait 1000 cas de

campylobactériose par 100 000 habitants (Tauxe, 1992; Nachamkin, 1995; Blaser, 1997), on peut évaluer la prévalence des campylobactérioses à *C. jejuni* biotypes 3 et 4 à 50 cas par 100 000 habitants, un taux non négligeable. Ces bactéries regroupées en *C. jejuni* biotypes 3 et 4 représenteraient une sous-population de *C. jejuni* possédant un mécanisme de virulence particulier, la GGT. Une proportion d'entérites à *C. jejuni* dégénère en problèmes extra-intestinaux (Nachamkin, 1995). Outre pour le syndrome de Guillain-Barré qui est associé à certains sérotypes de *C. jejuni* (Nachamkin *et al.*, 2000), il est impossible de déterminer actuellement si ces cas extra-intestinaux sont la résultante de souches clonales particulières de *C. jejuni* ou du statut immunitaire de l'hôte.

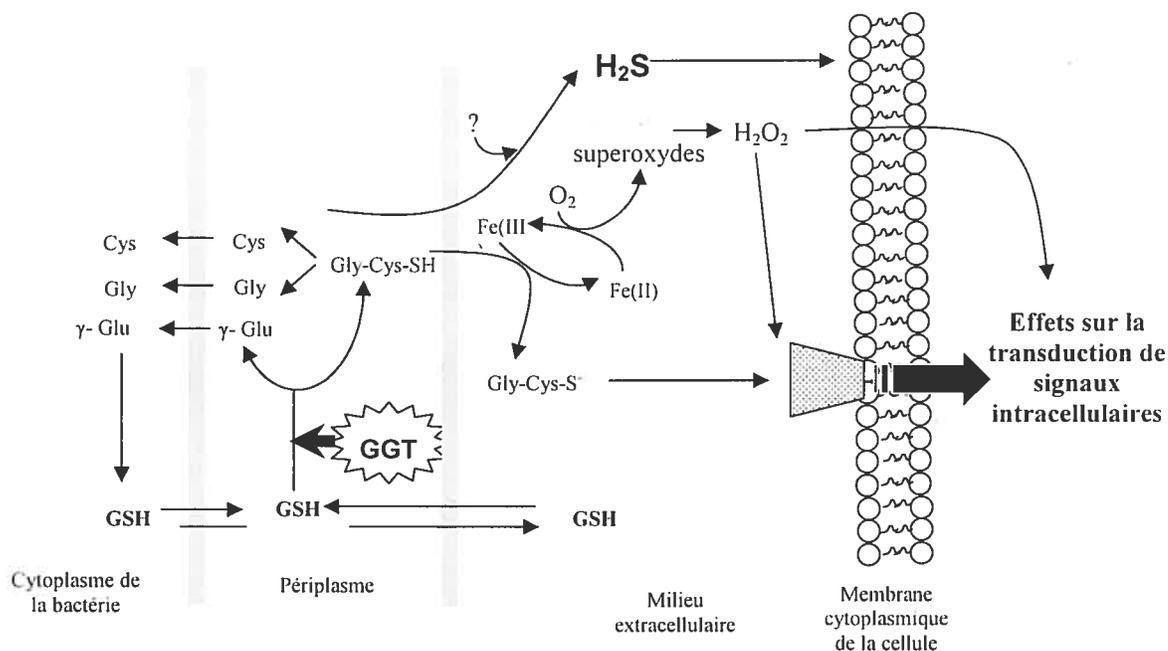


Figure 6.4: Modèle hypothétique du rôle de la GGT bactérienne dans la cytotoxicité cellulaire. Cys: cystéine, GGT: gamma-glutamyl transpeptidase, -Glu: -glutamate, Gly: glycine, Gly-Cys: cystéinylglycine, GSH: glutathion.

## **CHAPITRE 7. CONCLUSIONS**

Les études effectuées dans le cadre de ce projet ont permis d'accroître les connaissances sur la prévalence, la distribution et la caractérisation des isolats de *Campylobacter* en production de poulets à griller au Québec. Elles ont d'ailleurs permis d'évaluer la diversité génétique et phénotypique des campylobacters et de confirmer l'implication du poulet dans les cas sporadiques de diarrhée à *C. jejuni* chez l'humain. Ce projet a également contribué à l'accroissement des connaissances sur les facteurs de virulence de *C. jejuni* en identifiant un nouveau facteur de virulence potentiel. Plus précisément, les conclusions de ce projet sont:

- L'incidence de *C. jejuni* en production de poulets à griller québécoise est élevée quoique similaire à celle des autres régions ou pays industrialisés.
- Pour une ferme donnée, une source unique permet généralement l'introduction d'une seule souche clonale de *Campylobacter* dans un lot de production de poulets, cette souche clonale étant par contre différente des souches clonales des autres périodes de production de la ferme.
- Chaque période de production possède généralement une unique souche clonale qui lui est propre et qui n'est pas isolée dans les autres périodes de la production québécoise.
- Comme pour les autres régions du globe, la diversité génétique et phénotypique des campylobacters d'origines aviaire et humaine est très élevée au Québec.
- Une proportion significative des cas sporadiques de diarrhée à *C. jejuni* chez l'humain est associée aux poulets à griller.
- Les isolats de cas sporadiques d'entérites à *Campylobacter* chez l'humain démontrent des propriétés de virulence différentes que les isolats provenant de poulets à griller.

- Les isolats de *C. jejuni* biotypes 3 et 4 constituent une sous-population de *C. jejuni* possédant des propriétés de virulence particulières, dont une activité cytotoxique associée à la GGT d'*H. pylori*.

Les résultats de ces travaux ouvrent maintenant la voie à plusieurs avenues de recherche. Puisque l'expression et l'activité des GGT bactériennes sont très peu caractérisées, toute étude approfondissant les connaissances quant à la structure ou la fonction de cet enzyme potentiel chez *Campylobacter* serait une contribution importante pour l'étude de la virulence de plusieurs genres bactériens.

Il serait intéressant de confirmer le lien entre la GGT hypothétique de *C. jejuni* et la cytotoxicité à l'aide d'inhibiteur de la GGT, d'antisérums contre la protéine de 42 kDa ou anti-GGT, et de mutants. Des études sur les rôles de la GGT dans le cycle de la catalyse du glutathion ainsi que dans la production de pro-oxydants et de H<sub>2</sub>S permettraient d'approfondir le lien potentiel entre la GGT et la cytotoxicité. La délétion du gène et la création de mutants pour chacune des sous-unités de la GGT hypothétique de *C. jejuni* apporteraient des outils importants dans l'étude de ce facteur de virulence hypothétique. Tous comme il est fait pour *H. pylori*, il serait possible d'évaluer la présence d'une activité GGT chez les isolats de *C. jejuni* en question et confirmer la présence de l'enzyme. Il serait d'ailleurs intéressant d'évaluer la distribution du locus associé à la GGT et de la protéine de 42 kDa dans une plus grande population de *Campylobacter* d'origine humaine dont l'historique médical est connu, dans différentes populations animales, ainsi que pour d'autres espèces de *Campylobacter*.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Aarts H.J., van Lith L.A., et W.F. Jacobs-Reitsma. 1995. Discrepancy between Penner serotyping and polymerase chain reaction fingerprinting of *Campylobacter* isolated from poultry and other animal sources. *Lett. Appl. Microbiol.* 20:371-374.
- Abeyta, C., Deeter, F.G., Kaysner, C.A., Stott, R.F., et M.M. Wekell. 1993. *Campylobacter jejuni* in a Washington state shellfish growing bed associated with illness. *J. Food Prot.* 56:323-325.
- Aeschbacher, M., et J.C. Piffaretti. 1989. Population genetics of human and animal enteric *Campylobacter* strains. *Infect. Immun.* 57:1432-1437.
- Agulla, A., Merino, F.J., Villasante, P.A., Saz, J.V., Diaz, A., et A.C. Velasco. 1987. Evaluation of four enrichment media for isolation of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 25:174-175.
- Ahmed, I.H., Manning, G., Wassenaar, T.M., Cawthraw, S., et D.G. Newell. 2002. Identification of genetic differences between two *Campylobacters jejuni* strains with different colonization potentials. *Microbiology.* 148: 1203-1212.
- Akhtar, S.Q., et F. Huq. 1989. Effect of *Campylobacter jejuni* extracts and culture supernatants on cell culture. *J. Trop. Med. Hyg.* 92:80-85.
- Allos, B.M., et M.J. Blaser. 1995. *Campylobacter jejuni* and the expanding spectrum of related infections. *Clin. Infect. Dis.* 20:1092-1099.
- Alm, R.A., et P. Guerry. 1993. The *Campylobacter* sigma 54 flaB flagellin promoter is subject to environmental regulation. *J. Bacteriol.* 175:4448-4455.
- Altekruse, S.F., Hunt, J.M., Tollefson, L.K., et J.M. Madden. 1994. Food and animal sources of human *Campylobacter jejuni* infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204:57-61.

- Annah-Prah, A., et M. Janc. 1988. Chicken to human infection with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Biotype and serotype correlation. J. Food. Protect. 51:562-564.
- Aquino, M.H.C., Franco, R.M., et A. Tibana. 1995. *Campylobacter jejuni* na avicultura: importância e método de control. e. Hig. Alim. 36: 17-19.
- Atabay, H.I., et J.E. Corry. 1997. The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. J. Appl. Microbiol. 83:619-626.
- Atanassova, V., et C. Ring. 1999. Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry and poultry meat in Germany. Int. J. Food Microbiol. 51:187-190.
- Babakhani, F.K., et L.A. Joens. 1993. Primary swine intestinal cells as a model for studying *Campylobacter jejuni* invasiveness. Infect. Immun. 61:2723-2726.
- Bacon, D.J., Alm, R.A., Burr, D.H., Hu, L., Kopecko, D.J., Ewing, C.P., Trust, T.J., et P. Guerry. 2000. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. Infect. Immun. 2000 68:4384-4390.
- Bacon, D.J., Johnson, W.M., et F.G. Rodgers. 1999. Identification and characterisation of a cytotoxic porin-lipopolysaccharide complex from *Campylobacter jejuni*. J. Med. Microbiol. 48:139-148.
- Baig, B.H., Wachsmuth, I.K., Morris, G.K., et W.E. Hill. 1986. Probing of *Campylobacter jejuni* with DNA coding for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. J. Infect. Dis. 154:542

- Bang, D.D., Scheutz, F., Ahrens, P., Pedersen, K., Blom, J., et M. Madsen. 2001. Prevalence of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. isolated from Danish broilers. *J. Med. Microbiol.* 50:1087-1094.
- Barrow, P.A., et K. Page. 2000. Inhibition of colonisation of the alimentary tract in young chickens with *Campylobacter jejuni* by pre-colonisation with strains of *C. jejuni*. *FEMS Microbiol. Lett.* 182:87-91.
- Beery, J.T., Hugdahl, M.B., et M.P. Doyle. 1988. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2365-2370.
- Benjamin, J., Leaper, S., Owen, R.J., et M.B. Skirrow. 1983. Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group. *Curr. Microbiol.* 8:231-238.
- Berndston, E. 1996. *Campylobacter* in broiler chickens. Ph.D. thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Beumer, R.R., Cruysen, J.J., et I.R. Birtantie. 1988. The occurrence of *Campylobacter jejuni* in raw cows' milk. *J. Appl. Bacteriol.* 65:93-96.
- Biswas, D., Itoh, K., et C. Sasakawa. 2000. Uptake pathways of clinical and healthy animal isolates of *Campylobacter jejuni* into INT-407 cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29:203-211.
- Black, R.E., Levine, M.M., Clements, M.L., Hughes, T.P., et M.J. Blaser. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.* 157:472-479.

- Blaser, M.J. 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J. Infect. Dis.* 176:S103-105.
- Blaser, M.J., Black, R.E., Duncan, D.J., et J. Amer. 1985. *Campylobacter jejuni*-specific serum antibodies are elevated in healthy Bangladeshi children. *J. Clin. Microbiol.* 21:164-7.
- Blaser, M.J., et W.L. Wang. 1979. *Campylobacter enteritis*. *Med. J. Aust.* 2:260.
- Boer, P., Wagenaar, J.A., Achterberg, R.P., Putten, J.P., Schouls, L.M., et B. Duim. 2002. Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity in vivo. *Mol. Microbiol.* 44:351-359.
- Bok, H.E., Greeff, A.S., et H.H. Crewe-Brown. 1991. Incidence of toxigenic *Campylobacter* strains in South Africa. *J. Clin. Microbiol.* 29:1262-1264.
- Bokkenheuser, V.D., Richardson, N.J., Bryner, J.H., Roux, D.J., Schutte, A.B., Koornhof, H.J., Freiman, I., et E. Hartman. 1979. Detection of enteric campylobacteriosis in children. *J. Clin. Microbiol.* 9:227-232.
- Bolla, J.M., Loret, E., Zalewski, M., et J.M. Pages. 1995. Conformational analysis of the *Campylobacter jejuni* porin. *J. Bacteriol.* 177:4266-4271.
- Bolton, F.J., Holt, A.V., et D.N. Hutchinson. 1984. *Campylobacter* biotyping scheme of epidemiological value. *J. Clin. Pathol.* 37:677-681.
- Bolton, F.J., et L. Robertson. 1982. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *J. Clin. Pathol.* 35:462-467.
- Bras, A.M., et J.M. Ketley. 1999. Transcellular translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarised epithelial monolayers. *FEMS Microbiol. Lett.* 179:209-215.

- Brennhovd, O., Kapperud, G., et G. Langeland. 1992. Survey of thermotolerant *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in three surface water sources in Norway. *Int. J. Food Microbiol.* 15:327-438.
- Buck, G.E., et M.T. Kelly. 1981. Effect of moisture content of the medium on colony morphology of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 14:585-586.
- Bukholm, G., et G. Kapperud. 1987. Expression of *Campylobacter jejuni* invasiveness in cell cultures coinfecting with other bacteria. *Infect. Immun.* 55:2816-2821.
- Butzler, J.P., Dekeyser, P., Detrain, M., et F. Dehaen. 1973. Related *Vibrio* in stools. *J. Pediatr.* 82:493-495.
- Caldwell, M.B., Guerry, P., Lee, E.C., Burans, J.P., et R.I. Walker. 1985. Reversible expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* 50:941-943.
- Camarda, A., Newell, D.G., Nasti, R., et D. Di Modugno. 2000. Genotyping *Campylobacter jejuni* strains isolated from the gut and oviduct of laying hens. *Avian Dis.* 44:907-912.
- Cappelier, J.M., Minet, J., Magras, C., Colwell, R.R., et M. Federighi. 1999. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5154-5157.
- Carvalho, A.C.T., G.M. Ruiz-Palacios, P. Ramos-Cervantes, L.-E. Cervantes, X. Jiang, et L.K. Pickering. 2001. Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 39:1353-1359.

- Cawthraw, S.A., Lind, L., Kaijser, B., and D.G. Newell. 2000. Antibodies, directed towards *Campylobacter jejuni* antigens, in sera from poultry abattoir workers. *Clin Exp Immunol.* 122:55-60.
- Chan, V.L., Hani, E.K., Joe, A., Lynett, J., Ng, D., et M. Steele. 2000. The hippurate hydrolase gene and other unique genes of *Campylobacter jejuni*, p. 455-463. *In* I. Nachamkin, et M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Chang, N., et D.E. Taylor. 1990. Use of pulsed-field agarose gel electrophoresis to size genomes of *Campylobacter* species and to construct a *Sall* map of *Campylobacter jejuni* UA580. *J. Bacteriol.* 172:5211-5217.
- Chevalier, C., Thiberge, J.M., Ferrero, R.L., et A. Labigne. 1999. Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol. Microbiol.* 31:1359-1372.
- Chu, L., Dong, Z., Xu, X., Cochran, D.L. et J.L. Ebersole. 2002. Role of Glutathione Metabolism of *Treponema denticola* in Bacterial Growth and Virulence Expression. *Infect. Immun.* 70:1113-1120.
- Chuma, T., Ikeda, T., Maeda, T., Niwa, H., et K. Okamoto. 2001. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from broilers in the southern part of Japan from 1995 to 1999. *J. Vet. Med. Sci.* 63:1027-1029.
- Chuma, T., Makino, K., Okamoto, K., et H. Yugi. 1997. Analysis of distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broilers by using restriction fragment length polymorphism of flagellin gene. *J. Vet. Med. Sci.* 59:1011-1015.

- Chuma, T., Yamada, T., Yano, K., Okamoto, K., et H. Yugi. 1994. A survey of *Campylobacter jejuni* in broilers from assignment to slaughter using DNA-DNA hybridization. *J. Vet. Med. Sci.* 56:697-700.
- Clark, A.G., et D.H. Bueschkens. 1985. Laboratory infection of chicken eggs with *Campylobacter jejuni* by using temperature or pressure differentials. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1467-1471.
- Clark, A.G., et D.H. Bueschkens. 1986. Effect of egg storage upon the survival of *Campylobacter jejuni* in laboratory-infected fertile poultry eggs. *Avian Dis.* 30:76-80.
- CPA (Conseil des producteurs animaux du Québec). 1998. Guide aviculture. Québec, Canada.
- Coote, J.G., et T. Arain. 1996. A rapid, colourimetric assay for cytotoxin activity in *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13:65-70.
- Cox, N. A., Stern, N.J., Hiatt, K.L. et M. E. Berrang, 1999. Transmission of *Campylobacter jejuni* from breeders to commercial broiler chickens. Proceedings of the 10th Annual Meeting of *Campylobacter, Helibacter* and Related Organisms. Baltimore, Maryland, September.
- Daikoku, T., Suzuki, S., Oka, S., et K. Takama. 1989. Profiles of enterotoxin and cytotoxin production in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 49:33-36.
- Daugelavicius, R., Bakiene, E., et D.H. Bamford. 2000. Stages of polymyxin B interaction with the *Escherichia coli* cell envelope. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44:2969-2978.

- Deming, M.S., Tauxe, R.V., Blake, P.A., Dixon, S.E., Fowler, B.S., Jones, T.S., Lockamy, E.A., Patton, C.M., and R.O. Sikes. 1987. *Campylobacter enteritis* at a university: transmission from eating chicken and from cats. *Am. J. Epidemiol.* 126:1220.
- de Melo, M.A., Gabbiani, G., et J.C. Pechere. 1989. Cellular events and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of HEp-2 cells. *Infect Immun.* 57:2214-22.
- de Melo, M.A., et J.C. Pechere. 1988. Effect of mucin on *Campylobacter jejuni* association and invasion on HEp-2 cells. *Microb. Pathog.* 5:71-76.
- de Melo, M.A., et J.C. Pechere. 1990. Identification of *Campylobacter jejuni* surface proteins that bind to Eucaryotic cells *in vitro*. *Infect Immun.* 58:1749-1756.
- Dingle, K.E., Colles, F.M., Wareing, D.R., Ure, R., Fox, A.J., Bolton, F.E., Bootsma, H.J., Willems, R.J., Urwin, R., et M.C. Maiden. 2001. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 39:14-23.
- Doig, P., Kinsella, N., Guerry, P., et T.J. Trust. 1996. Characterization of a post-translational modification of *Campylobacter* flagellin: identification of a sero-specific glycosyl moiety. *Mol. Microbiol.* 19:379-387.
- Dorrell, N., Mangan, J.A., Laing, K.G., Hinds, J., Linton, D., Al-Ghusein, H., Barrell, B.G., Parkhill, J., Stoker, N.G., Karlyshev, A.V., Butcher, P.D., et B.W. Wren. 2001. Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Res.* 11:1706-1715.

- Duim, B., Vandamme, P.A., Rigter, A., Laevens, S., Dijkstra, J.R., et J.A. Wagenaar. 2001. Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. *Microbiology*. 147:2729-2737.
- Dworkin, J., et M.J. 1997. Blaser. Molecular mechanisms of *Campylobacter fetus* surface layer protein expression. 1997. *Mol. Microbiol.* 26:433-440.
- Endtz, H.P., Ruijs, G.J.H.M., Zwinderman, A.H., van der Reijden, T., Biever, M. et R.P. Mouton. 1991. Comparaison of six media, including a semisolid agar, for the isolation of various *Campylobacter* species from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1007-1010.
- Engberg, J. On, S.L., Harrington, C.S., et P. Gerner-Smidt. 2000. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for Campylobacters. *J. Clin. Microbiol.* 38:286-291.
- Engvall, A., Bergqvist, A., Sandstedt, K., et M.L. Danielsson-Tham. 1986. Colonization of broilers with *Campylobacter* in conventional broiler-chicken flocks. *Acta Vet. Scand.* 27:540-547.
- Evans, S.J. 1992. Introduction and spread of thermophilic campylobacters in broiler flocks. *Vet. Rec.* 131: 574-576.
- Evans, S.J., et A.R. Sayers. 2000. A longitudinal study of campylobacter infection of broiler flocks in Great Britain. *Prev. Vet. Med.* 46:209-223.
- Everest, P.H., Goossens, H., Butzler, J.P., Lloyd, D., Knutton, S., Ketley, J.M., et P.H. Williams. 1992. Differentiated Caco-2 cells as a model for enteric invasion by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *J. Med. Microbiol.* 37:319-325.

- Everest, P.H., Goossens, H., Sibbons, P., Lloyd, D.R., Knutton, S., Leece, R., Ketley, J.M., et P.H. Williams. 1993. Pathological changes in the rabbit ileal loop model caused by *Campylobacter jejuni* from human colitis. *J. Med. Microbiol.* 38:316-321.
- Eyigor, A., Dawson, K.A., Langlois, B.E. et C.L. Pickett. 1999. Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Campylobacter* spp. isolated from chicken carcasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1501-1505.
- Falk, P.G., Hooper, L.V., Midtvedt, T. et J.I. Gordon. 1998. Creating and Maintaining the Gastrointestinal Ecosystem: What We Know and Need To Know from Gnotobiology *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1157-1170.
- Fauchere, J.L., Rosenau, A., Veron, M., Moyen, E.N., Richard, S., et A. Pfister. 1986. Association with HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. *Infect Immun.* 54:283-287.
- Fernandez, H., Vivanco, T., et G. Eller. 2000. Expression of invasiveness of *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* after serial intraperitoneal passages in mice. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 47:635-639.
- Field, L.H., Underwood, J.L., Payne, S.M., et L.J. Berry. 1991. Virulence of *Campylobacter jejuni* for chicken embryos is associated with decreased bloodstream clearance and resistance to phagocytosis. *Infect. Immun.* 59:1448-1456.
- Finlay, B.B., et S. Falkow. 1990. *Salmonella* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 162:1096-1106.
- Finlay, B.B., et S. Falkow. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:136-169.

- Fitzgerald, C., Helsel, L.O., Nicholson, M.A., Olsen, S.J., Swerdlow, D.L., Flahart, R., Sexton, J., et P.I. Fields. 2001. Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler. *J. Clin. Microbiol.* 39:2386-2390.
- Florin, I., et F. Antillon. 1992. Production of enterotoxin and cytotoxin in *Campylobacter jejuni* strains isolated in Costa Rica. *J. Med. Microbiol.* 37: 22-9.
- Friedman, C.R., Neimann, J., Wegener, H.C. et Tauxe, R.V. 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the united states and other industrialized nations, p. 121-138. *In* I. Nachamkin, et M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Frost, J.A., Kramer, J.M., et S.A. Gillanders. 1999 Phage typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and its use as an adjunct to serotyping. *Epidemiol. Infect.* 123:47-55.
- Garcia, M.M., Lior, H., Stewart, R.B., Ruckerbauer, G.M., Trudel, J.R., et A. Skljarevski. 1985. Isolation, characterization, and serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from slaughter cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:667-672.
- Gaynor, E.C., Ghori, N., et S. Falkow. 2001. Bile-induced 'pili' in *Campylobacter jejuni* are bacteria-independent artifacts of the culture medium. *Mol. Microbiol.* 39:1546-1549.
- Geilhausen, B., Schutt-Gerowitt, H., Aleksic, S., Koenen, R., Mauff, G., et G. Pulverer. 1996. *Campylobacter* and *Salmonella* contaminating fresh chicken meat. *Zentralbl. Bakteriol.* 284:241-245.

- Genigeorgis, C., Hassuneh, M. et P. Collins. 1986. *Campylobacter jejuni* infection in poultry farms and its effect on poultry meat contamination during slaughter. J. Food Prot. 49:895-903.
- Georges-Courbot, M.C., Gouandjika, I., Martin, P.M., et A.J. Georges. 1989. Biotype and Lior serogroup distribution of enteric *Campylobacter* isolated from children in Bangui (Central African Republic), and comparison with Penner serotypes. Res. Microbiol. 140:489-497.
- Gibson, J.R., Fitzgerald, C., et R.J. Owen. 1995. Comparison of PFGE, ribotyping and phage-typing in the epidemiological analysis of *Campylobacter jejuni* serotype HS2 infections. Epidemiol. Infect. 115:215-225.
- Gibson, J.R., Sutherland, K. et R.J. Owen. 1994. Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. Lett. Appl. Microbiol. 19:357-358.
- Golden, N.J., et D.W. Acheson. 2002. Identification of motility and autoagglutination *Campylobacter jejuni* mutants by random transposon mutagenesis. Infect. Immun. 70:1761-1771.
- Goossens, H. et J.P. Butzler. 1992. Isolation and identification of *Campylobacter* spp., p. 93-120. In: I. Nachamkin, M.J. Blase, et L.S. Thomplins (eds.), *Campylobacter jejuni*: Current Status and Future Trends. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
- Goossens, H., De Boeck, M., Coignau, H., Vlaes, L., Van den Borre, C., et J.P. Butzler. 1986. Modified selective medium for isolation of *Campylobacter* spp. from feces: comparison with Preston medium, a blood-free medium, and a filtration system. J. Clin. Microbiol. 24:840-843.

- Goossens, H., Rummens, E., Cadranel, S., Butzler, J.P., et Y. Takeda. 1985. Cytotoxic activity on Chinese hamster ovary cells in culture filtrates of *Campylobacter jejuni/coli*. Lancet. 2:511.
- Goossens, H., Vlaes, L., Galand, I., Van den Borre, C., et J.P. Butzler. 1989. Semisolid blood-free selective-motility medium for the isolation of campylobacters from stool specimens. J. Clin. Microbiol. 27:1077-1080.
- Granlund-Edstedt, M., Johansson, E., Claesson, R., et J. Carlsson. 1991. Effect of sulfide ions on complement factor C3. Infect. Immun. 59:696-699.
- Granlund-Edstedt, M., Johansson, E., Claesson, R., et J. Carlsson. 1993. Effect of anaerobiosis and sulfide on killing of bacteria by polymorphonuclear leukocytes. J. Periodontal Res. 28:346-353.
- Grant, C.C.R., Konkel, M.E., Cieplak, W. Jr. et L.S. Tompkins. 1993. Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. Infect. Immun. 61:1764-1771.
- Gregory, E., Barnhart, H., Dreesen, D.W., Stern, N. et J.L. Corn. 1997. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in Broilers: source, time of colonization, and prevalence. Avian Dis. 41: 890-898.
- Griffiths, P.L., et R.W. Park. 1990. Campylobacters associated with human diarrhoeal disease. J. Appl. Bacteriol. 69: 281-301.
- Guerrant, R.L., Wanke, C.A., Pennie, R.A., Barrett, L.J., Lima, A.A., et A.D. O'Brien. 1987. Production of a unique cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. 55:2526-2530.

- Guerry, P., Alm, R.A., Power, M.E., Logan, S.M., et T.J. Trust. 1991. Role of two flagellin genes in *Campylobacter* motility. *J. Bacteriol.* 173:4757-4764.
- Guerry, P., Logan, S.M., Thornton, S., et T.J. 1990. Genomic organization and expression of *Campylobacter* flagellin genes. *J. Bacteriol.* 172:1853-1860.
- Guévremont, È., Higgins, R., et S. Quessy. 2004. Characterization of *campylobacter* isolates recovered from clinically healthy pigs and from sporadic cases of campylobacteriosis in humans. *J. Food Prot.* 67: Article sous presse.
- Guévremont, È., Nadeau, È., Sirois, M., et S. Quessy. 2003. Antimicrobial susceptibilities of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, swine, and poultry. Article soumis.
- Hald, B., Rattenborg, E., et M. Madsen. 2001. Role of batch depletion of broiler houses on the occurrence of *Campylobacter* spp. in chicken flocks. *Lett. Appl. Microbiol.* 32:253-256.
- Hanel, I., Schulze, F., Hotzel, H., et E. Schubert. 1998. Detection and characterization of two cytotoxins produced by *Campylobacter jejuni* strains. *Zentralbl. Bakteriol.* 288:131-143.
- Hanninen, M.L., Hakkinen, M., et H. Rautelin. 1999. Stability of related human and chicken *Campylobacter jejuni* genotypes after passage through chick intestine studied by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2272-2275.
- Hanninen, M.L., Pajarre, S., Klossner, M.L., and H. Rautelin. 1998. Typing of human *Campylobacter jejuni* isolates in Finland by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 36:1787-1789.

- Hanninen, M.L., Perko-Makela, P., Pitkala, A., and H. Rautelin. 2000. A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in humans with domestically acquired infections and in chicken samples from the Helsinki area. *J. Clin. Microbiol.* 38:1998-2000.
- Hanninen, M.L., Perko-Makela, P., Rautelin, H., Duim, B., et J.A. Wagenaar. 2001. Genomic relatedness within five common Finnish *Campylobacter jejuni* pulsed-field gel electrophoresis genotypes studied by amplified fragment length polymorphism analysis, ribotyping, and serotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1581-1586.
- Harrington, C.S., Thomson-Carter, F.M., et P.E. Carter. 1997. Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni*: implications for the flagellin gene typing scheme. *J. Clin. Microbiol.* 35:2386-2392.
- Harris, L.A., Logan, S.M., Guerry, P., et T.J. Trust. 1987. Antigenic variation of *Campylobacter* flagella. *J. Bacteriol.* 169:5066-5071.
- Harris, N.V., Weiss, N.S. et C.M. Nolan. 1986. The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* enteritis. *Am. J. Public Health.* 76: 407-411.
- Harvey, P., et S. Leach. 1998. Analysis of coccal cell formation by *Campylobacter jejuni* using continuous culture techniques, and the importance of oxidative stress. *J. Appl. Microbiol.* 85:398-404.
- Hickey, T.E., McVeigh, A.L., Scott, D.A., Michielutti, R.E., Bixby, A., Carroll, S.A., Bourgeois, A.L., et P. Guerry. 2000. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 68:6535-6541.

- Hiatt, K.L., Cox, N.A., Buhr, R.J., et N.J. Stern. 2002. Genotype analyses of *Campylobacter* isolated from distinct segments of the reproductive tracts of broiler breeder hens. *Curr. Microbiol.* 45:400-404.
- Ho, T.W., Mishu, B., Li, C.Y., Gao, C.Y., Cornblath, D.R., Griffin, J.W., Asbury, A.K., Blaser, M.J., et G.M. McKhann. 1995. Guillain-Barre syndrome in northern China. Relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain.* 118:597-605.
- Hodinka, R.L., et P.H. Gilligan. 1988. Evaluation of the campyslide agglutination test for confirmatory identification of selected *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 26:47-49.
- Howey, R.T., Lock, C.M., et L.V.H. Moore. 1990. Subspecies names automatically created by Rule 46. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:317-319.
- Hu, L., et D.J. Kopecko. 1999. *Campylobacter jejuni* 81-176 associates with microtubules and dynein during invasion of human intestinal cells. *Infect. Immun.* 67:4171-4182.
- Hu, L., et D.J. Kopecko. 2000. Interactions of *Campylobacter* with eukaryotic cells: gut luminal colonization and mucosal invasion mechanisms, p. 191-215. *In* I. Nachamkin, et M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Hudson, J.A., Nicol, C., Wright, J., Whyte, R., et S.K. Hasell. 1999. Seasonal variation of *Campylobacter* types from human cases, veterinary cases, raw chicken, milk and water. *J. Appl. Microbiol.* 87:115-124.
- Hugdahl, M.B., Beery, J.T., et M.P. Doyle. 1988. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 56:1560-1566.

- Humphrey, T.J., Henley, A. et D.G. Lanning. 1993. The colonization of broiler chickens with *Campylobacter jejuni*: some epidemiological investigations. *Epidemiol. Infect.* 110: 601-607.
- Hutchinson, D.N., et F.J. Bolton. 1984. Improved blood free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. *J. Clin. Pathol.* 37:956-957.
- Huysmans, M.B., Turnidge, J.D., et J.H. Williams. 1995. Evaluation of API Campy in comparison with conventional methods for identification of thermophilic campylobacters. *J. Clin. Microbiol.* 33:3345-3346.
- Ishiye, M., Yamashita, M., et M. Niwa. 1993. Molecular cloning of the gamma-glutamyl transpeptidase gene from a *Pseudomonas* strain. *Biotechnol. Prog.* 9:323-331.
- Jacobs-Reitsma, W.F. 1997. Aspect of epidemiology of *Campylobacter* in poultry. *Vet. Q.* 19:113-117.
- Jacobs-Reitsma, W.F., Bolder, N.M. et R.W. Mulder. 1994. Cecal carriage of *Campylobacter* and *Salmonella* in Dutch broiler flocks at slaughter: a one-year study. *Poult. Sci.* 73:1260-1266.
- Jacobs-Reitsma, W.F., van de Giessen, A.W., Bolder, N.M., et R.W. Mulder. 1995. Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. *Epidemiol. Infect.* 114:413-421.
- Jiang, Q., Hiratsuka, K., et D.E. Taylor. 1996. Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol. Microbiol.* 20:833-842.

- Jin, S., Joe, A., Lynett, J., Hani, E.K., Sherman, P., et V.L. Chan. 2001. JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 39:1225-1236.
- Johnson, W.M., et H. Lior. 1984. Toxins produced by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Lancet.* 28:229-230.
- Johnson, W.M., et H. Lior. 1986. Cytotoxic and cytotoxic factors produced by *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter laridis*. *J. Clin. Microbiol.* 24:275-281.
- Johnson, W.M., et H. Lior. 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.* 4:115-126.
- Jones, D.M., Abbott, J.D., Painter, M.J., et E.M. Sutcliffe. 1984. A comparison of biotypes and serotypes of *Campylobacter* sp. isolated from patients with enteritis and from animal and environmental sources. *J. Infect.* 9:51-58.
- Jones, K., Betaieb, M., et D.R. Telford. 1990. Correlation between environmental monitoring of thermophilic campylobacters in sewage effluent and the incidence of *Campylobacter* infection in the community. *J. Appl. Bacteriol.* 69:235-240.
- Jones, D.M., Sutcliffe, E.M., et A. Curry. 1991. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.* 137:2477-2482.
- Kapperud, G., Skjerve, E., Vik, L., Hauge, K., Lysaker, A., Aalmen, I., Ostroff, S.M. et M. Potter. 1993. Epidemiological investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidemiol. Infect.* 111:245-255.

- Karlyshev, A.V., McCrossan, M.V., et B.W. Wren. 2001. Demonstration of polysaccharide capsule in *Campylobacter jejuni* using electron microscopy. *Infect. Immun.* 69:5921-5924.
- Karmali, M.A., Simor, A.E., Roscoe, M., Fleming, P.C., Smith, S.S., et J. Lane. 1986. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J. Clin. Microbiol.* 23:456-459.
- Kazwala, R.R., Collins, J.D., Hannan, J., Crinion, R.A., et H. O'Mahony. 1990. Factors responsible for the introduction and spread of *Campylobacter jejuni* infection in commercial poultry production. *Vet. Rec.* 26:305-306.
- Kelly, D.J. 2001. The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 30:16S-24S.
- Kervella, M., Pages, J.M., Pei, Z., Grollier, G., Blaser, M.J., et J.L. Fauchere. 1993. Isolation and characterization of two *Campylobacter* glycine-extracted proteins that bind to HeLa cell membranes. *Infect. Immun.* 61:3440-3448.
- Ketley, J.M. 1995. The 16th C. L. Oakley Lecture. Virulence of *Campylobacter* species: a molecular genetic approach. *J. Med. Microbiol.* 42:312-327.
- Ketley, J.M. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology.* 143:5-21.
- Khakhria, R., et H. Lior. 1992. Extended phage-typing scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Epidemiol Infect.* 108:403-414.
- Khoury, C.A., et R.J. Meinersmann. 1995. A genetic hybrid of the *Campylobacter jejuni flaA* gene with LT-B of *Escherichia coli* and assessment of the efficacy of the hybrid protein as an oral chicken vaccine. *Avian Dis.* 39:812-820.

- Kimura, H., Sawada, N., Tobioka, H., Isomura, H., Kokai, Y., Hirata, K., et M. Mori. 1997. Bacterial lipopolysaccharide reduced intestinal barrier function and altered localization of 7H6 antigen in IEC-6 rat intestinal crypt cells. *J. Cell. Physiol.* 171:284-290.
- Klipstein, F.A., et R.F. Engert. 1985. Immunological relationship of the B subunits of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Infect. Immun.* 48:629-633.
- Klipstein, F.A., Engert, R.F., Short, H. et E.A. Schenk. 1985b. Pathogenic properties of *Campylobacter jejuni*: assay and correlation with clinical manifestations. *Infect. Immun.* 50:43-49.
- Kokotovic, B., et S.L. On. 1999. High-resolution genomic fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by analysis of amplified fragment length polymorphisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 173:77-84.
- Konkel, M.E., Babakhani, F., et L.A. Joens. 1990. Invasion-related antigens of *Campylobacter jejuni*. *J. Infect. Dis.* 162:888-895.
- Konkel, M.E., et W.Jr. Cieplak. 1992. Altered synthetic response of *Campylobacter jejuni* to cocultivation with human epithelial cells is associated with enhanced internalization. *Infect. Immun.* 60:4945-4949.
- Konkel, M.E., Corwin, M.D., Joens, L.A. et W. Cieplak. 1992b. Factors that influence the interaction of *Campylobacter jejuni* with cultured mammalian cells. *J. Med. Microbiol.* 37:30-37.

- Konkel, M.E., Garvis, S.G., Tipton, S.L., Anderson, D.E.Jr., et W.Jr. Cieplak. 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* 24:953-963.
- Konkel, M.E., Hayes, S.F., Joens, L.A., et W.Jr. Cieplak. 1992c. Characteristics of the internalization and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human epithelial cell cultures. *Microb. Pathog.* 13:357-370.
- Konkel, M.E., et L.A. Joens LA. 1989. Adhesion to and invasion of HEp-2 cells by *Campylobacter* spp. *Infect. Immun.* 57:2984-2990.
- Konkel, M.E., L.A. Joens, et P.F. Mixer. 2000. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* virulence determinants, p. 217-240. *In* I. Nachamkin, et M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Konkel, M.E., Kim, B.J., Rivera-Amill, V., et S.G. Garvis. 1999. Identification of proteins required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 473:215-224.
- Konkel, M.E., Mead, D.J., et W.Jr. Cieplak. 1993. Kinetic and antigenic characterization of altered protein synthesis by *Campylobacter jejuni* during cultivation with human epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 168:948-954.
- Konkel, M.E., Mead, D.J., Hayes, S.F., et W.Jr. Cieplak. 1992d. Translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarized epithelial cell monolayer cultures. *J. Infect. Dis.* 166:308-315.
- Kopecko, D.J., Hu, L., et K.J. Zaal. 2001. *Campylobacter jejuni*-microtubule-dependent invasion. *Trends Microbiol.* 9:389-396.

- Korolik, V., Alderton, M.R., Smith, S.C., Chang, J., et P.J. Coloe. 1998. Isolation and molecular analysis of colonising and non-colonising strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* following experimental infection of young chickens. *Vet. Microbiol.* 60:239-249.
- Korolik, V., Moorthy, L., et P.J. Coloe. 1995. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains by using restriction endonuclease DNA profiles and DNA fragment polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 33:1136-1140.
- Kramer, J.M., Frost, J.A., Bolton, F.J., et D.R. Wareing. 2000. *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infection. *J. Food Prot.* 63:1654-1659.
- Lancero, H., Niu, J., et P.W. Johnson. 1996. Exposure of periodontal ligament cells to methyl mercaptan reduces intracellular pH and inhibits cell migration. *J. Dent. Res.* 75:1994-2002.
- Lee, L.H., Burg, E. 3rd, Baqar, S., Bourgeois, A.L., Burr, D.H., Ewing, C.P., Trust, T.J., et P. Guerry. 1999. Evaluation of a truncated recombinant flagellin subunit vaccine against *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 67:5799-5805.
- Lee, A., Carrick, J., et T.J. Borody. 1986. *Campylobacter pyloridis* infection as possible complication of weight loss therapy. *Lancet.* 1986 2:1343.
- Lee, A., Smith, S.C., et P.J. Coloe. 2000. Detection of a novel *Campylobacter* cytotoxin. *J. Appl. Microbiol.* 89:719-725.
- Lindblom, G.-B., et B. Kaijser. 1995. *In vitro* studies of *Campylobacter jejuni/coli* strains from hens and humans regarding adherence, invasiveness, and toxigenicity. *Avian dis.* 39:718-722.

- Lior, H. 1984. New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and "*Campylobacter laridis*". J. Clin. Microbiol. 20: 636-640.
- Lior, H., et A. Patel. 1987. Improved toluidine blue-DNA agar for detection of DNA hydrolysis by campylobacters. J. Clin. Microbiol. 25:2030-2031.
- Lior, H., Woodward, D.L., Edgar, J.A., Laroche, L.J., et P. Gill. 1982. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. J. Clin. Microbiol. 15:761-768.
- Liu, S.L., et K.E. Sanderson. 1995. Rearrangements in the genome of the bacterium *Salmonella typhi*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1995 92:1018-1022.
- Manning, G., Duim, B., Wassenaar, T., Wagenaar, J.A., Ridley, A., et D.G. Newell. 2001. Evidence for a genetically stable strain of *Campylobacter jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 67:1185-1189.
- Martin, W.T., Patton, C.M., Morris, G.K., Potter, M.E., et N.D. Pühr. 1983. Selective enrichment broth medium for isolation of *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 17:853-855.
- Maruyama, S., et Y. Katsube. 1990. Isolation of *Campylobacter jejuni* from the eggs and organs in experimentally infected laying Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). Nippon. Juigaku .Zasshi. 52:671-674.
- McFadyean, J., et S. Stockman. 1913. Great Britain. Board of Agriculture and Fisheries. Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Part III. Abortion in sheep. Appendix. 1913:1-29.

- McFarland, B.A., et S.D. Neill. 1992. Profiles of toxin production by thermophilic *Campylobacter* of animal origin. *Vet. Microbiol.* 30:257-266.
- McGovern, K.J., Blanchard, T.G., Gutierrez, J.A., Czinn, S.J., Krakowka, S., et P. Youngman. 2001. Gamma-Glutamyltransferase is a *Helicobacter pylori* virulence factor but is not essential for colonization. *Infect. Immun.* 69:4168-4173.
- McSweegan, E., Burr, D.H., et R.I. Walker. 1987. Intestinal mucus gel and secretory antibody are barriers to *Campylobacter jejuni* adherence to INT-407 cells. *Infect. Immun.* 55:1431-1435.
- McSweegan, E., et R.I. Walker RI. 1986. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infect. Immun.* 53:141-148.
- Mead, G.C., Hudson, W.R., et M.H. Hinton. 1995. Effect of changes in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with *Campylobacter*. *Epidemiol. Infect.* 115:495-500.
- Megraud, F., Gavinet, A.M., et C. Camou-Junca. 1987. Serogroups and biotypes of human strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated in France. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6:641-645.
- Meinersmann, R.J. 2000. Population genetics and genealogy of *Campylobacter jejuni*. p. 351-368. *In* I. Nachamkin, et M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Meister, A., et M.E. Anderson. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 1983. 52:711-60.

- Michaud, S., Ménard, S., Gaudreau, C., et R.D. Arbeit. 2001. Comparison of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Kpn*I: a population-based study. *J. Med. Microbiol.* 50:1075-1081.
- Milkman, R., et M.M. Bridges. 1990. Molecular evolution of the *Escherichia coli* chromosome. III. Clonal Frames. *Genetics.* 126:505-517.
- Misawa, N., et M.J. Blaser. 2000. Detection and characterization of autoagglutination activity by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 68:6168-6175.
- Misawa, N., Ohnishi, T., Itoh, K., et E. Takahashi. 1994. Development of a tissue culture assay system for *Campylobacter jejuni* cytotoxin and the influence of culture conditions on cytotoxin production. *J. Med. Microbiol.* 41:224-30.
- Misawa, N., Ohnishi, T., Itoh, K., et E. Takahashi E. 1995. Cytotoxin detection in *Campylobacter jejuni* strains of human and animal origin with three tissue culture assay systems. *J. Med. Microbiol.* 43:354-359.
- Morgan, G., Chadwick, P., Lander, K.P., et K.P. Gill. 1985. *Campylobacter jejuni* mastitis in a cow: a zoonosis-related incident. *Vet. Rec.* 116:111.
- Moser, I., Schroeder, W., et J. Salnikow. 1997. *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein and a 59-kDa protein are involved in binding to fibronectin and INT-407 cell membranes. *FEMS Microbiol. Lett.* 157:233-238.
- Mulder, R.W. 1997. Safe poultry meat production in the next century. *Acta Vet. Hung.* 45:307-315.
- Nachamkin, I. 1995. *Campylobacter* and *Arcobacter*. p. 483-491. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, et R.H. Tenover (eds.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed., American Society of Microbiology, Washington, D.C.

- Nachamkin, I., Allos, B.M. et T.W. Ho. 2000. *Campylobacter jejuni* infection and the association with Guillain-Barré syndrome, p. 155-175. In I. Nachamkin, et M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Nachamkin, I. et S. Barbagallo. 1990. Culture confirmation of *Campylobacter* spp. by latex agglutination. *J. Clin. Microbiol.* 28: 817-818.
- Nachamkin, I., Engberg, J., et F.M. Aarestrup. 2000b. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species, p. 45-66. In I. Nachamkin, et M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Nachamkin, I., Yang, X.H., et N.J. Stern. 1993. Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1269-1273.
- Newell, D.G., Frost, J.A., Duim, F.B., Wagenaar, J.A., Madden, R.H., van der Plas, J. et S.L.W. On. 2000. New developments in the subtyping of *Campylobacter* species, p. 27-44. In I. Nachamkin, et M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Newell, D.G., McBride, H., et A.D. Pearson. 1984. The identification of outer membrane proteins and flagella of *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.* 130:1201-1208.
- Newell, D.G., McBride, H., Saunders, F., Dehele, Y., et A.D. Pearson. 1985. The virulence of clinical and environmental isolates of *Campylobacter jejuni*. *J. Hyg. (Lond).* 94:45-54.

- Newell, D.G., et A. Pearson. 1984. The invasion of epithelial cell lines and the intestinal epithelium of infant mice by *Campylobacter jejuni/coli*. J. Diarrhoeal Dis. Res. 2:19-26.
- Newell, D.G., et J.A. Wagenaar. 2000. Poultry infections and their control at the farm level. p. 497-509. In I. Nachamkin, et M.J. Blaser (eds.), *Campylobacter*, 2nd ed., ASM Press, Washington, D.C.
- Nicholson, M.A., et C.M. Patton. 1993. Evaluation of commercial antisera for serotyping heat-labile antigens of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J. Clin. Microbiol. 31:900-903.
- Nicholson, M.A., et C.M. Patton. 1995. Evaluation of disk method for hippurate hydrolysis by *Campylobacter* species. J. Clin. Microbiol. 33:1341-1343.
- Nielsen, E.M., Engberg, J., et V. Fussing. 2001. Genotypic and serotypic stability of *Campylobacter jejuni* strains during in vitro and in vivo passage. Int. J. Med. Microbiol. 291:379-385.
- Nielsen, E.M., Engberg, J., Fussing, V., Petersen, L., Brogren, C.H., et S.L. On. 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. J. Clin. Microbiol. 38:3800-3810.
- Nuijten, P.J., van Asten, F.J., Gaastra, W., et B.A. van der Zeijst. 1990. Structural and functional analysis of two *Campylobacter jejuni* flagellin genes. J. Biol. Chem. 265:17798-17804.
- Oberhelman, R.A., et D.N. Taylor. 2000. *Campylobacter* infections in developing countries, p. 139-153. In I. Nachamkin, et M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- On, S.L. 1998. *In vitro* genotypic variation of *Campylobacter coli* documented by pulsed-field gel electrophoretic DNA profiling: implications for epidemiological studies. FEMS Microbiol. Lett. 165:341-346.
- On, S.L. 2001. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 30:1S-15S.
- On, S.L., Nielsen, E.M., Engberg, J, et M. Madsen. 1998. Validity of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Sal*I, *Kpn*I, and *Bam*HI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. Epidemiol. Infect. 12:231-237.
- Oosterom, J., den Uyl, C.H., Banffer, J.R., and J. Huisman. 1984. Epidemiological investigations on *Campylobacter jejuni* in households with a primary infection. J Hyg (Lond). 93:325-332.
- Oosterom, J., De Wilde, G.J.A., De Boer, E., De Blaauw, L.H., et H. Karman. 1983. Survival of *Campylobacter jejuni* during poultry processing and pig slaughtering. J. Food Prot. 46:702-706.
- Owen, R.J., Slater, E., Telford, D., Donovan, T., et M. Barnham. 1997. Subtypes of *Campylobacter jejuni* from sporadic cases of diarrhoeal disease at different locations in England are highly diverse. Eur. J. Epidemiol. 13:837-840.
- Pang, T., Wong, P.Y., Puthucheary, S.D., Sihotang, K., et W.K. Chang. 1987. *In-vitro* and *in-vivo* studies of a cytotoxin from *Campylobacter jejuni*. J. Med. Microbiol. 23:193-198.
- Paolicchi, A., Dominici, S., Pieri, L., Maellaro, E., et A. Pompella. 2002. Glutathione catabolism as a signaling mechanism. Biochem. Pharmacol. 64:1027-1035.

- Park, C.H., Hixon, D.L., Polhemus, A.S., Ferguson, C.B., Hall, S.L., Risheim, C.C., et C.B. Cook. 1983. A rapid diagnosis of *Campylobacter* enteritis by direct smear examination. *Am. J. Clin. Pathol.* 80:388-390.
- Park, C.E., et G.W. Sanders. 1992. Occurrence of thermotolerant campylobacters in fresh vegetables sold at farmers' outdoor markets and supermarkets. *Can. J. Microbiol.* 38:313-316.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Pallen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., van Vliet, A.H., Whitehead, S., et B.G. Barrell. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature.* 403:665-668.
- Pavlovskis, O.R., Rollins, D.M., Haberberger, R.L., Green, A.E., Habash, L., Strocko, S., and R.I. Walker. 1991. Significance of flagella in colonization resistance of rabbits immunized with *Campylobacter* spp. *Infect. Immun.* 59:2259-2264.
- Payne, R.E., Lee, M.D., Dreesen, D.W., et H.M. Barnhart. 1999. Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in broiler flocks using randomly amplified polymorphic DNA-PCR and 23S rRNA-PCR and role of litter in its transmission. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:260-263.
- Pearson, A.D., Greenwood, M.H., Feltham, R.K., Healing, T.D., Donaldson, J., Jones, D.M., et R.R. Colwell. 1996. Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission, and amplification by flock propagation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4614-4620.

- Pearson, A.D., Greenwood, M., Healing, T.D., Rollins, D., Shahamat, M., Donaldson, J., et R.R. Colwell. 1993. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:987-996.
- Pei, Z., Burucoa, C., Grignon, B., Baqar, S., Huang, X.Z., Kopecko, D.J., Bourgeois, A.L., Fauchere, J.L., et M.J. Blaser. 1998. Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect. Immun.* 66:938-943.
- Pei, Z.H., Ellison, R.T. 3rd, et M.J. Blaser. 1991. Identification, purification, and characterization of major antigenic proteins of *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem.* 266:16363-16369.
- Penner, J.L., Hennessy, J.N., et R.V. Congi. 1983. Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2:378-383.
- Perez-Perez, G.I., Cohn, D.L., Guerrant, R.L., Patton, C.M., Reller, L.B., et M.J. Blaser. 1989. Clinical and immunologic significance of cholera-like toxin and cytotoxin production by *Campylobacter* species in patients with acute inflammatory diarrhea in the USA. *J. Infect. Dis.* 160:460-468.
- Petersen, L., Nielsen, E.M., Engberg, J., On, S.L., et H.H. Dietz. 2001. Comparison of genotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from Danish wild mammals and birds and from broiler flocks and humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3115-3121.
- Petersen, L., et A. Wedderkopp. 2001. Evidence that certain clones of *Campylobacter jejuni* persist during successive broiler flock rotations. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2739-2745.

- Pickett, C.L. 2000. *Campylobacter* toxins and their role in pathogenesis, p. 179-190. In I. Nachamkin, et M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Pickett, C.L., Pesci, E.C., Cottle, D.L., Russell, G., Erdem, A.N., et H. Zeytin. 1996. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene. *Infect. Immun.* 64:2070-2078.
- Pitcher, M.C., Beatty, E.R., et J.H. Cummings. 2000. The contribution of sulphate reducing bacteria and 5-aminosalicylic acid to faecal sulphide in patients with ulcerative colitis. *Gut.* 46:64-72.
- Pokamunski, S., Kass, N. Borochoovich, E. Marantz, B. et M. Rogol. 1986. Incidence of *Campylobacter* spp.in broiler flocks monitored from hatching to slaughter. *Avian Pathol.* 15:83-92.
- Prasad, K.N., Dhole, T.N., et A. Ayyagari. 1996. Adherence, invasion and cytotoxin assay of *Campylobacter jejuni* in HeLa and Hep-2 cells. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 14:255-259.
- Prescott, J.F., et O.S. Gellner. 1984. Intestinal carriage of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* by chicken flocks at slaughter. *Can. J. Comp. Med.* 48:329-31.
- Purdy, D., Buswell, C.M., Hodgson, A.E., McAlpine, K., Henderson, I., et S.A. Leach. 2000. Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. *J. Med. Microbiol.* 49:473-479.
- Quessy, S., Dubreuil, J.D., Jacques, M., Malouin, F., et R. Higgins. 1994. Increase of capsular material thickness following in vivo growth of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 115:19-26.

- Ratcliff, P.A., et P.W. Johnson. 1999. The relationship between oral malodor, gingivitis, and periodontitis. A review. *J. Periodontol.* 70:485-9.
- Ratkay, L.G., Waterfield, J.D., et J. Tonzetich. 1995. Stimulation of enzyme and cytokine production by methyl mercaptan in human gingival fibroblast and monocyte cell cultures. *Arch. Oral Biol.* 40:337-344.
- Refregier-Petton, J., Rose, N., Denis, M., et G. Salvat. 2001. Risk factors for *Campylobacter* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Prev. Vet. Med.* 50:89-100.
- Ribot, E.M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B., et T.J. Barrett. 2001. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 39:1889-1894.
- Rivera-Amill, V., Kim, B.J., Seshu, J., et M.E. Konkel. 2001. Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *J. Infect. Dis.* 183:1607-1616.
- Rivoal, K., Denis, M., Salvat, G., Colin, P., et G. Ermel. 1999. Molecular characterization of the diversity of *Campylobacter* spp. isolates collected from a poultry slaughterhouse: analysis of cross-contamination. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:370-374.
- Roediger, W.E., Moore, J., et W. Babidge. 1997. Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 42:1571-1579.
- Rosef, O., Gondrosen, B., Kapperud, G., et B. Underdal. 1983. Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from domestic and wild mammals in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:855-859.

- Ruiz-Palacios, G.M., Cervantes, L.E., Newburg, D.S., López-Vidal, Y., et J. Calva. 1992. *In vitro* models for studying *Campylobacter* infections. pp 176-183. In: Nachamkin I, Blaser MJ, et Tompkins LS (eds). *Campylobacter jejuni*: current status and future trends. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Russell, R.G. 1993. *Campylobacter jejuni* colitis. In: Jones T.C. et al. (eds). Monographs on pathology of laboratory animals: Nonhuman primates II. Springer-Verlag. pp 71-75.
- Saha, S.K., Saha, S., et S.C. Sanyal. 1991. Recovery of injured *Campylobacter jejuni* cells after animal passage. Appl. Environ. Microbiol. 57:3388-3389.
- Sails, A.D., Swaminathan, B., and P.I. Fields. 2003. Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* identified by multilocus sequence typing correlate with strain associations identified by multilocus enzyme electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 41:4058-4067.
- Santé-Canada. 2003. Rapport sur la surveillance canadienne intégrée *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* pathogène et *Shigella*, de 1996 à 1999. [http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ccdr-rmtc/03vol29/29s1/index\\_f.html](http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ccdr-rmtc/03vol29/29s1/index_f.html).
- Schouls, L.M., Reulen, S., Duim, B., Wagenaar, J.A., Willems, R.B.L., Dingle, K.E., Colles, F.M., and J.D.A. Van Embden. 2003. Comparative Genotyping of *Campylobacter jejuni* by Amplified Fragment Length Polymorphism, Multilocus Sequence Typing, and Short Repeat Sequencing: Strain Diversity, Host Range, and Recombination. J. Clin. Microbiol. 41:15-16.
- Schulze, .F., Hanel, I., et E. Borrmann. 1998. Formation of cytotoxins by enteric *Campylobacter* in humans and animals. Zentralbl. Bakteriologie. 288:225-236.

- Scott, D.A. 1997. Vaccines against *Campylobacter jejuni*. J. Infect. Dis. 176:S183-188.
- Sebald, M., et M. Véron. 1963. Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. J. Ann. Inst. Pasteur (Paris). 105:897-910.
- Shane, S.M. 2000. *Campylobacter* infection of commercial poultry. Rev. Sci. Tech. 19:376-395.
- Shane, S.M., Gifford, D.H., et K. Yogasundram. 1986. *Campylobacter jejuni* contamination of eggs. Vet. Res. Commun. 10:487-492.
- Shanker, S., Lee, A., et T.C. Sorrell. 1986. *Campylobacter jejuni* in broilers: the role of vertical transmission. J. Hyg. (Lond). 96:153-159.
- Shanker, S., Lee, A., et T.C. Sorrell. 1990. Horizontal transmission of *Campylobacter jejuni* amongst broiler chicks: experimental studies. Epidemiol. Infect. 104:101-110.
- Shi, Z.Y., Liu, P.Y., Lau, Y.J., Lin, Y.H., et B.S. Hu. 1996. Comparison of polymerase chain reaction and pulsed-field gel electrophoresis for the epidemiological typing of *Campylobacter jejuni*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 26:103-108.
- Shibayama, K, Kamachi, K, Nagata, N, Yagi, T, Nada, T, Doi, Y, Shibata, N, Yokoyama, K, Yamane, K, Kato, H, Iinuma, Y, et Y. Arakawa. 2003. A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol. 47:443-451.
- Shreeve, J.E., Toszeghy, M., Pattison, M., et D.G. Newell. 2000. Sequential spread of *Campylobacter* infection in a multipen broiler house. Avian Dis. 44:983-988.

- Shreeve, J.E., Toszeghy, M., Ridley, A., et D.G. Newell. 2002. The carry-over of *Campylobacter* isolates between sequential poultry flocks. *Avian Dis.* 46:378-385.
- :  
Skerman, V.B.D., McGowan, V. et P.H.A. Sneath. 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:225-420.
- Skirrow, M.B. 1977. *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. *Br. Med. J.* 2:9-11.
- Skirrow, M.B., et J. Benjamin. 1980. '1001' *Campylobacters*: cultural characteristics of intestinal *campylobacters* from man and animals. *J. Hyg. (Lond).* 85:427-442.
- Skirrow, M.B., et M.J. Blaser. 2000. Clinical aspects of *Campylobacter* infection, p. 69-88. In I. Nachamkin, et M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Smibert, R.M. 1974. *Campylobacter*. In Buchanan R.E. et N.E. Gibbons (eds), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore. p. 207-211.
- Smith, M.V. 2nd, et P.J. Muldoon. 1974. *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni* (*Vibrio fetus*) from commercially processed poultry. *Appl. Microbiol.* 27:995-996.
- Spratt, B.G. 1999. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:312-316.
- Steele, M., McNab, B., Fruhner, L., DeGrandis, S., Woodward, D., et J.A. Odumeru. 1998. Epidemiological typing of *Campylobacter* isolates from meat processing plants by pulsed-field gel electrophoresis, fatty acid profile typing, serotyping, and biotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2346-2349.

- Steele, T. W., et R.J. Owen. 1988. *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* subsp. nov., a subspecies of nitrate-negative campylobacters isolated from human clinical specimens. J. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:316-318.
- Steinbrueckner, B., Ruberg, F., et M. Kist. 2001. Bacterial genetic fingerprint: a reliable factor in the study of the epidemiology of human *Campylobacter* enteritis? J. Clin. Microbiol. 39:4155-419.
- Stephens, C.P., On, S.L., et J.A. Gibson. 1998. An outbreak of infectious hepatitis in commercially reared ostriches associated with *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. Vet. Microbiol. 61:183-190.
- Stern, N.J. 1992. Reservoirs for *Campylobacter jejuni* and approaches for intervention in poultry, p. 49-60. In: I. Nachamkin, M.J. Blase, et L.S. Thomplins (eds.). *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*. American Society of Microbiology, Washington, D.C.:
- Stern, N.J., Clavero, M.R., Bailey, J.S., Cox, N.A., et M.C. Robach. 1995. *Campylobacter* spp. in broilers on the farm and after transport. Poult Sci. 74:937-941.
- Stern, N.J., Cox, N.A., Bailey, J.S., Berrang, M.E., et M.T. Musgrove. 2001. Comparison of mucosal competitive exclusion and competitive exclusion treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* spp. colonization in broiler chickens. Poult. Sci. 80:156-160.
- Struelens, M.J. 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin. Microbiol. Infect. 2:2-11.

- Studer, E., Luthy, J., et P. Hubner. 1999. Study of the presence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in sand samples from four Swiss chicken farms. *Res. Microbiol.* 150:213-219.
- Suarez, F.L., Furne, J.K., Springfield, J., et M.D. Levitt. 1998. Bismuth subsalicylate markedly decreases hydrogen sulfide release in the human colon. *Gastroenterology.* 114:923-929.
- Suzuki, Y., Ishihara, M., Saito, M., Ishikawa, N., et T. Yokochi. 1994. Discrimination by means of pulsed-field gel electrophoresis between strains of *Campylobacter jejuni* Lior type 4 derived from sporadic cases and from outbreaks of infection. *J. Infect.* 29:183-187.
- Suzuki, H., Kumagai, H., Echigo, T., et T. Tochikura. 1989. DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 gamma-glutamyl transpeptidase gene, *ggt*. *J. Bacteriol.* 171:5169-5172.
- Suzuki, H., Kumagai, H., et T. Tochikura. 1986. gamma-glutamyl transpeptidase from *Escherichia coli* K-12: formation and localization. *J. Bacteriol.* 168:1332-1335.
- Takata, T., Fujimoto, S., et K. Amako. 1992. Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. *Infect. Immun.* 60:3596-3600.
- Tauxe, R.V. 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. p. 9-19. *In* I. Nachamkin, M.J. Blaser, et L.S. Tompkins (eds.), *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Tay, S.T., Devi, S., Puthucheary, S. et I. Kautner. 1996. *In vitro* demonstration of the invasive ability of Campylobacters. *Zentralbl. Bakteriologie.* 283:306-313.

- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. et B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239.
- Thompson, J.S., Cahoon, F.E., et D.S. Hodge. 1985. Rate of *Campylobacter* spp. isolation in three regions of Ontario, Canada, from 1978 to 1985. *J. Clin. Microbiol.* 24:876-878.
- Vandamme, P. 2000. Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*, p. 3-26. In I. Nachamkin, et M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., et J. De Ley. 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:88-103.
- van de Giessen, A.W., Bloemberg, B.P., Ritmeester, W.S. et J.J. Tilburg. 1996. Epidemiological study on risk factors and risk reducing measures for campylobacter infections in Dutch broiler flocks. *Epidemiol. Infect.* 117:245-250.
- van de Giessen, A., Mazurier, S.I., Jacobs-Reitsma, W., Jansen, W., Berkers, P., Ritmeester, W., et K. Wernars. 1992. Study on the epidemiology and control of *Campylobacter jejuni* in poultry broiler flocks. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1913-1917.
- van de Giessen, A.W., Tilburg, J.J., Ritmeester, W.S., et J. van der Plas. 1998. Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by application of hygiene measures. *Epidemiol. Infect.* 121:57-66.

- van Spreeuwel, J.P., Duursma, G.C., Meijer, C.J., Bax, R., Rosekrans, P.C., et J. Lindeman. 1985. *Campylobacter* colitis: histological immunohistochemical and ultrastructural findings. *Gut*.26:945-951.
- van Vliet, A.H., et J.M. Ketley. 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 30:45S-56S.
- Vazquez-Torres, A., et F.C. Fang. 2000. Cellular routes of invasion by enteropathogens. *Cur. Opin. Microbiol.* 3: 54-59
- Wallis, M.R. 1994. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*. *Br. J. Biomed. Sci.* 51:57-64.
- Wang, Y., et D.E. Taylor. 1990. Natural transformation in *Campylobacter* species. *J. Bacteriol.* 172:949-955.
- Wareing, D.R., Bolton, F.J., Fox, A.J., Wright, P.A., et D.L. Greenway. 2002. Phenotypic diversity of *Campylobacter* isolates from sporadic cases of human enteritis in the UK. *J. Appl. Microbiol.* 92:502-509.
- Wassenaar, T.M. 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:466-476.
- Wassenaar, T.M., et M.J. Blaser. 1999. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes Infect.* 1:1023-1033.
- Wassenaar, T.M., Bleumink-Pluym, N.M., et B.A. van der Zeijst. 1991. Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that flaA but not flaB is required for invasion. *EMBO J.* 10:2055-2061.

- Wassenaar, T.M., Geilhausen, B., et D.G. Newell. 1998. Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1816-1821.
- Wassenaar, T.M., et D.G. Newell. 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. 2000. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1-9.
- Wassenaar, T.M., On, S.L.W., et Meinersmann, R.J. 2000. Genotyping and the consequences of genetic instability, p. 369-380. *In* I. Nachamkin, et M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Wassenaar, T.M., van der Zeijst, B.A., Ayling, R., et D.G. Newell. 1993. Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. *J. Gen. Microbiol.* 139:1171-1175.
- Wedderkopp, A., Gradel, K.O., Jorgensen, J.C., et M. Madsen. 2001. Pre-harvest surveillance of *Campylobacter* and *Salmonella* in Danish broiler flocks: a 2-year study. *Int. J. Food Microbiol.* 68:53-59.
- Wedderkopp, A., Rattenborg, E., et M. Madsen. 2000. National surveillance of *Campylobacter* in broilers at slaughter in Denmark in 1998. *Avian Dis.* 44:993-999.
- Whitehouse, C.A., Balbo, P.B., Pesci, E.C., Cottle, D.L., Mirabito, P.M., et C.L. Pickett. 1998. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infect. Immun.* 66:1934-1940.
- Whyte, P., Collins, J.D., McGill, K., Monahan, C., et H. O'Mahony. 2001. The effect of transportation stress on excretion rates of campylobacters in market-age broilers. *Poult. Sci.* 80:817-820.

- Wiese, A., Munstermann, M., Gutschmann, T., Lindner, B., Kawahara, K., Zahringer, U. et U. Seydel. 1998. Molecular mechanisms of polymyxin B-membrane interactions: direct correlation between surface charge density and self-promoted transport. *J. Membr. Biol.* 162:127-138.
- Wooldridge, K.G., et J.M. Ketley. 1997. *Campylobacter*-host cell interactions. *Trends Microbiol.* 5:96-102.
- Wooldridge, K.G., Williams, P.H., et J.M. Ketley. 1996. Host signal transduction and endocytosis of *Campylobacter jejuni*. *Microb. Pathog.* 21:299-305.
- Wu, S.J., Pacheco, N.D., Oprandy, J.J., et F.M. Rollwagen. 1991. Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* antigens with mucosal and systemic antibodies. *Infect. Immun.* 59:2555-2559.
- Xu, K., et M.A. Strauch. 1996. Identification, sequence, and expression of the gene encoding gamma-glutamyl transpeptidase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178:4319-4322.
- Yao, R., Burr, D.H., Doig, P., Trust, T.J., Niu, H., et P. Guerry. 1994. Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* 14:883-893.
- Young, V.B., Schauer, D.B. et J.G. Fox. 2000. Animal models of *Campylobacter* infection, p. 287-301. *In* I. Nachamkin, et M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Yuki, N., Taki, T., Inagaki, F., Kasama, T., Takahashi, M., Saito, K., Handa, S., et T. Miyatake. 1993. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J. Exp. Med.* 178:1771-1775.

Ziprin, R.L., Young, C.R., Stanker, L.H., Hume, M.E., et M.E. Konkel. 1999. The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. Avian Dis. 43:586-589.

## ANNEXE I

## ANNEXE 1

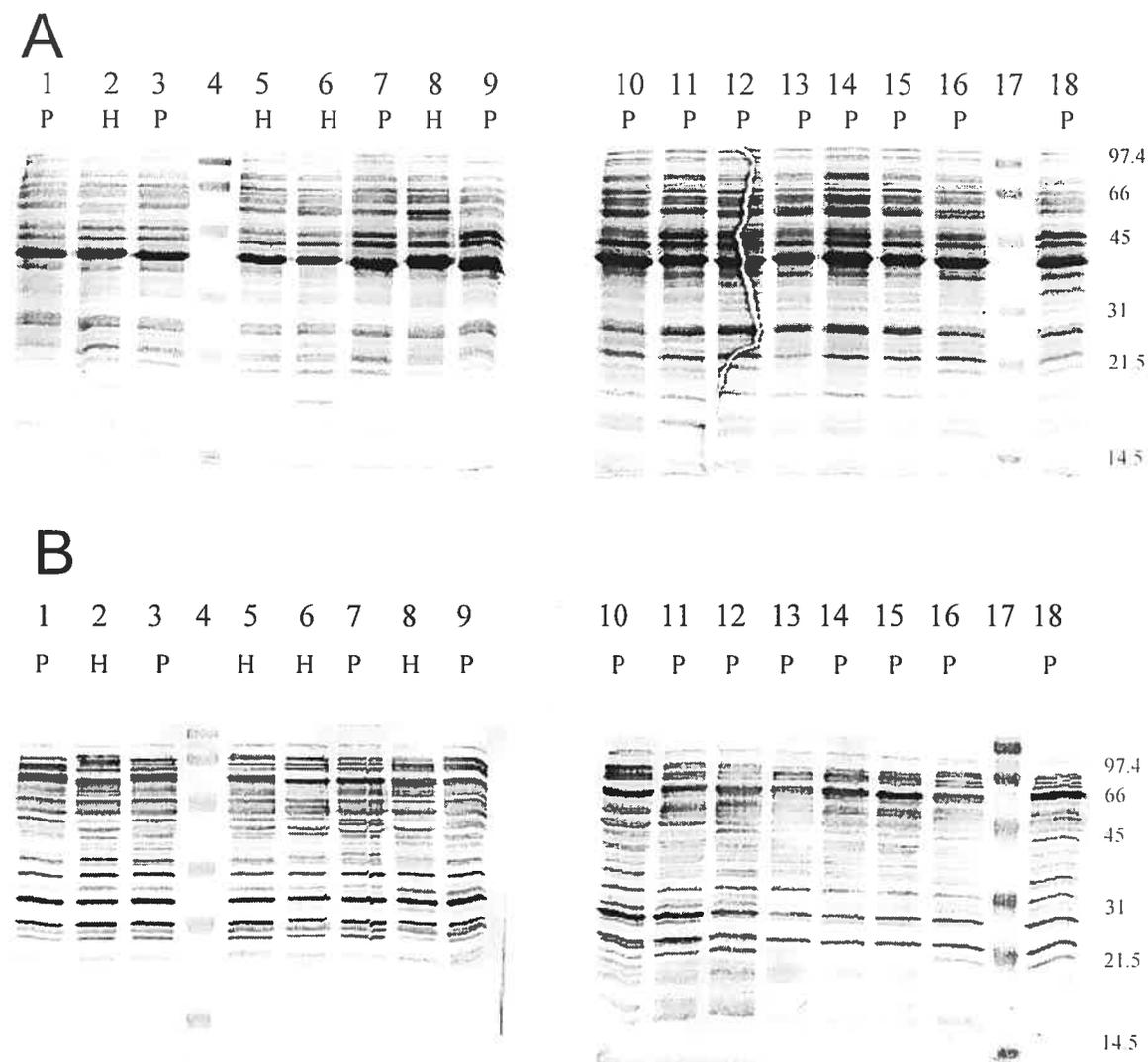
### Essai 1 : **Diversité des profils de SDS-PAGE et de Western blot des isolats de *Campylobacter* d'origines aviaire et humaine.**

**Objectif.** Comparer les profils protéiques, par SDS-PAGE et Western blot, des isolats de *Campylobacter* préalablement caractérisés par PFGE, biotypage et pour les propriétés *in vitro* de virulence afin d'associer une ou plusieurs protéines à une propriété de virulence.

**Matériels et méthodes.** Les 195 isolats de *Campylobacter* d'origines humaine et aviaire décrits dans le chapitre 3 ont été caractérisés par SDS-PAGE et Western blot. Le SDS-PAGE a été effectué tel que décrit dans le chapitre 5. Pour le Western blot, un antisérum créé chez le lapin, avec des sonicats de bactéries totales de *C. jejuni* provenant de cas humains, a été utilisé. Une suspension bactérienne de 3 isolats de *C. jejuni* (H1, H8 et H23) a été sonicquée sur glace, 2 X 1 minute, avec un repos de 5 minutes entre les sonications. L'antisérum a été préparé tel que décrit dans le chapitre 5. Les analyses par Western blot ont été effectuées, telles que décrites au chapitre 5, excepté qu'une suspension bactérienne de 1,9 à 625<sub>nm</sub> de densité optique, diluée de moitié par du PBS, fut utilisée pour la séparation des protéines par SDS-PAGE et que des dilutions de 1:700 et 1:3000 furent utilisées pour l'antisérum anti-*C. jejuni* et le conjugué anti-lapin, respectivement.

**Résultats.** Hormis la protéine de 42 kDa associée à la cytotoxicité (chapitre 5), les analyses par SDS-PAGE et Western blot n'ont pas permis d'associer une protéine à une propriété *in vitro* de virulence. Par contre, une diversité dans les profils protéiques a été observée avec l'aide des deux techniques, quoique plusieurs protéines majeures semblent être présentes pour tous les isolats (Figure 1).

Figure I : SDS-PAGE (A) Western blots (B) représentatifs démontrant la diversité des profils de protéines totales observés pour les isolats de *Campylobacter* d'origines aviaire et humaine.



Lignes 1, 2, 3, 16 et 18, isolats cytotoxiques; lignes 4 et 17, marqueur moléculaire « low range »; lignes 5, 6, 7, et 12 à 15, isolats invasifs; lignes 8 à 11, isolats non cytotoxiques et non invasifs. « H »: isolat d'origine humaine. « P »: isolat d'origine aviaire. À droite des gels ou des membranes: Poids moléculaire (en kilo Daltons) des marqueurs « low range ».

## Essai 2 : Expression des protéines à la suite d'une incubation des bactéries dans un milieu de culture cellulaire en présence de cellules INT-407.

**Objectif.** Évaluer l'expression des protéines d'un isolat invasif de *C. jejuni* à la suite d'une co-incubation avec des cellules INT-407.

**Matériels et méthodes.** L'isolat 1429, un *C. jejuni* invasif d'origine aviaire, fut utilisé pour cette expérience. Les microchambres à diffusion ont été préparées tel que décrit par Quessy *et al.* (1994). Brièvement, des portions de barillet de seringue (5 ml) d'environ 1 cm de long furent coupées à l'aide d'un scalpel chauffé à la flamme. Les extrémités ont été chauffées sur une plaque chauffante et scellées avec un filtre de 0,22 µm. Les microchambres ont par la suite été autoclavées. Les bactéries d'une gélose Mueller-Hinton incubée 24 heures à 37°C en microaérobiose ont été récoltées et une suspension bactérienne a été préparée avec du PBS. Cette suspension a été administrée stérilement dans les microchambres au travers du barillet à l'aide d'une seringue dont l'aiguille a été chauffée à la flamme. Le trou a ensuite été obturé à l'aide d'une spatule chauffée. Trois microchambres ont été insérées dans un flacon de culture cellulaire contenant une culture de 24 heures de cellules INT-407 (préparée tel que décrit dans le chapitre 4) et 3 microchambres ont été insérées dans un autre flacon de culture cellulaire contenant le milieu de culture cellulaire fraîchement préparé mais sans cellules. Les flacons, fortement visés, ont par la suite été incubés à 37°C. Une microchambre a été retirée de chacun des flacons à temps 0, 1 et 18 heures post-incubation. Pour chaque temps, la suspension bactérienne a été ponctionnée stérilement à l'aide d'une aiguille chauffée. La morphologie et la mobilité des bactéries ont été évaluées par coloration de Gram et microscopie à fond noir. Le SDS-PAGE a été préparé tel que décrit dans le chapitre 5.

**Résultats.** Aucune différence dans la morphologie, la mobilité, et le profil protéique n'a été observée lors d'une incubation des bactéries avec et sans cellules INT-407 (tableau I et figure II). Plusieurs nouvelles protéines ont été observées, mais indépendamment de la présence ou non des cellules INT-407, notamment après 18

heures d'incubation. Ces protéines proviendraient probablement du sérum fœtal bovin utilisé dans le milieu de culture cellulaire puisque le profil protéique obtenu après 60 minutes d'incubation était identique à celui obtenu après 18 heures lors de la rupture d'une microchambre dans le milieu de culture cellulaire (données non présentées).

Tableau I. Morphologie et mobilité de l'isolat d'origine aviaire 1429 à la suite d'une incubation dans un milieu de culture cellulaire en présence ou non de cellules INT-407.

Présence de cellules *1		Temps d'incubation (heure)		
		0	1	18
Non	Gram	100% spiralés *2	100% spiralés	60% spiralés
	Mobilité	+++ *3	++++	+
Oui	Gram	NA *4	100% spiralés	75% spiralés
	Mobilité	NA	++++	++

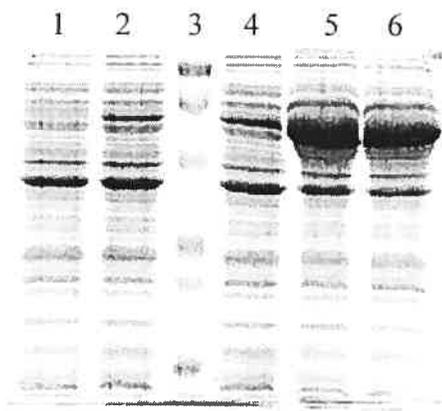
\*1 : Incubation dans le milieu de culture cellulaire en présence ou non d'une culture de 24 heures de cellules INT-407

\*2 : Proportion des bactéries ayant une morphologie spiralée

\*3 : Mobilité : (+), faible; (++) , moyenne; (+++) , forte; (++++), très forte.

\*4 : Non applicable

Figure II. Profils de protéines totales par SDS-PAGE de l'isolat de *C. jejuni* invasif d'origine aviaire 1429 incubé dans un milieu de culture cellulaire en présence ou non de cellules INT-407.



Lignes 1, avant incubation avec le milieu de culture cellulaire; lignes 2 et 4, après 1 heure d'incubation dans le milieu de culture cellulaire en présence ou pas de cellules INT-407, respectivement; ligne 3, marqueur moléculaire « low range »; lignes 5 et 6, après 18 heures d'incubation avec milieu de culture cellulaire en présence ou pas de cellules INT-407, respectivement.

**Essai 3 : Expression des protéines des isolats de *C. jejuni* d'origines aviaire et humaine à la suite d'un passage *in vivo* à l'aide de microchambres à diffusion intra-péritonéales chez le porc.**

**Objectif.** Évaluer l'impact d'un passage *in vivo* chez le porc à l'aide de microchambres à diffusion intra-péritonéales sur la morphologie, l'expression de protéines et les propriétés *in vitro* de virulence d'isolats de *C. jejuni* d'origines aviaire et humaine.

**Matériels, méthodes et résultats.** Pour cet essai, 10 isolats de *C. jejuni* démontrant différentes propriétés *in vitro* de virulence ont été sélectionnés (tableau II). Pour chacun des isolats, 10 microchambres à diffusion (tel que décrites à l'essai 2) ont été implantées dans l'abdomen d'un porc par une ouverture d'environ 2 cm effectuée stérilement sur la ligne blanche de l'animal, sous anesthésie générale. De plus, ces isolats ont été ensemencés sur géloses Mueller-Hinton et incubés à 37°C en microaérobiose. Après une incubation de 24 h, les porcs ont été euthanasiés, les microchambres retirées de l'abdomen, et les suspensions bactériennes ponctionnées des microchambres tel que décrit dans l'essai 2. Les bactéries ayant eu un passage *in vivo* devaient être comparées aux bactéries qui avaient été cultivées sur gélose. La morphologie des bactéries a été évaluée par coloration de Gram et par coloration négative en microscopie électronique (Centre de recherche et de développement des aliments, CRDA, Saint-Hyacinthe). L'adhésion et l'invasion des cellules INT-407, la production d'activité cytotoxique pour les cellules CHO et les profils protéiques générés par SDS-PAGE n'ont pas été évalués puisque la majorité des bactéries observées pour chacun des isolats après le passage *in vivo* présentaient une morphologie coccoïde à la coloration de Gram (tableau II) et à la microscopie électronique (figure III).

Tableau II. Morphologie des isolats de *C. jejuni* évaluée à la coloration de Gram à la suite d'un passage *in vivo* dans des microchambres à diffusion intra-péritonéales chez le porc.

Isolat <sup>*1</sup>	Pathotype <sup>*2</sup>	Morphologie <sup>*3</sup>
P1257	CHO+/Vero+/Inv-	10% spiralés
H176	CHO+/Vero+/Inv-	10% spiralés
H1	CHO+/Vero+/Inv-	10% spiralés
P2150	CHO+/Vero-/Inv-	50% spiralés
H41	CHO+/Vero-/Inv-	25% spiralés
P1727	CHO+/Vero-/Inv-	10% spiralés
P2055	CHO-/Vero-/Inv+	10% spiralés
H39	CHO-/Vero-/Inv+	50% spiralés
P1929	CHO-/Vero-/Inv-	25% spiralés
P2131	CHO-/Vero-/Inv-	50% spiralés

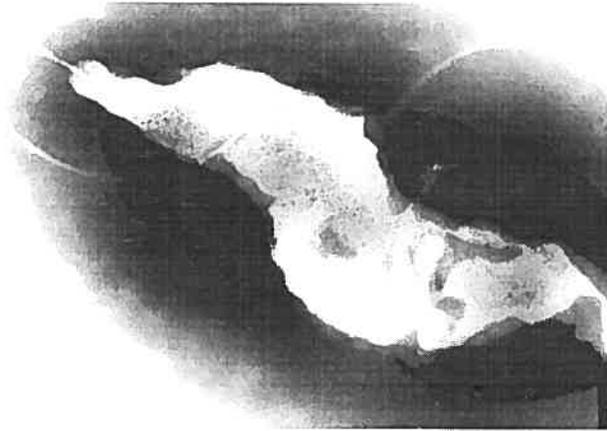
\*1: "P", isolat d'origine aviaire; "H" isolat d'origine humaine

\*2: Pathotype identifié préalablement (chapitre 4). CHO, cytotoxique pour les cellules CHO ; Vero, cytotoxique pour les cellules Vero ; Inv, invasive pour les cellules INT-407.

\*3 : Morphologie évaluée par la coloration de Gram.

Figure III. Coloration négative en microscopie électronique démontrant la morphologie bactérienne avant (A) et après (B) un passage *in vivo* de 24 h dans des microchambres à diffusion intra-péritonéales chez le porc.

A



B

