

Université de Montréal

**Caractérisation phénotypique et génotypique de
Campylobacter jejuni et évaluation d'une stratégie de
contrôle de la colonisation du poulet de chair par ce
pathogène alimentaire**

par

Alexandre Thibodeau

Université de Montréal

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de Philosophae Doctor (Ph. D.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Juin 2013

© Alexandre Thibodeau, 2013

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée :

Caractérisation phénotypique et génotypique de *Campylobacter jejuni* et évaluation de stratégies de contrôle de la colonisation du poulet de chair par ce pathogène alimentaire

Présentée par :
Alexandre Thibodeau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Mariela Segura, présidente-rapporteuse
Ann Letellier, directrice de recherche
Sylvain Quessy, codirecteur
Evelyne Guévremont, codirectrice
John M. Fairbrother, membre du jury
François Malouin, examinateur externe

Résumé

Campylobacter jejuni est l'agent causal de la campylobactériose, infection bactérienne importante en santé publique. Un des vecteurs de transmission de *C. jejuni* pour l'humain est le poulet via la chaîne alimentaire. Les mécanismes impliqués dans la colonisation caecale commensale des oiseaux par *C. jejuni* sont toujours peu caractérisés, bien qu'une meilleure compréhension de ces mécanismes puisse apporter des solutions pour le contrôle du pathogène à la ferme. Cette étude avait pour but de caractériser les propriétés phénotypiques et les facteurs génétiques impliqués dans la colonisation du poulet par *C. jejuni* et d'identifier de nouveaux mécanismes impliqués dans cette association.

Des souches, issues d'élevages conventionnels échantillonnées en 2003 et en 2008 ainsi que d'élevages biologiques, ont été caractérisées afin d'obtenir leur profil de résistance aux antibiotiques, leur autoagglutination et leur chimiotactisme. Les souches des élevages conventionnels ont de plus été caractérisées pour leur capacité à adhérer et envahir une culture primaire de cellules caecales de poulet. Une puce à ADN a été développée pour détecter la présence de 254 gènes et variants associés à la colonisation des poulets ainsi qu'à la résistance aux antibiotiques chez les souches issues d'élevages conventionnels. Les propriétés phénotypiques et la présence de certains gènes chez les souches ont par la suite été comparées. Finalement, des souches ayant des caractéristiques différentes ont été utilisées dans un modèle de colonisation du poulet pour évaluer l'efficacité d'un nouvel additif alimentaire à base d'acides organiques et d'huiles essentielles sur le contrôle de *C. jejuni*.

Les propriétés phénotypiques des souches étaient très variées et n'étaient pas corrélées entre elles, à l'exception de l'adhésion et de l'invasion. L'analyse génétique a révélé que le contenu en gènes des souches était variable, notamment au niveau des gènes de l'enveloppe bactérienne, au flagelle, aux récepteurs du chimiotactisme et à la résistance à l'arsenic. Les souches de 2003 et de 2008 étaient semblables lorsque leur contenu en gènes ainsi que leurs propriétés phénotypiques étaient comparés. Des gènes possiblement associés à un fort ou un faible potentiel de colonisation ont été identifiés. L'additif

alimentaire a diminué la contamination des carcasses bien qu'une augmentation de la colonisation intestinale ait été observée pour certaines souches. La moitié des lots de poulets d'origine biologique étaient positifs pour *C. jejuni*. Les souches issues de ce type d'élevage étaient peu résistantes aux antibiotiques et possédaient des phénotypes variés.

Cette étude a permis de mieux définir les caractéristiques importantes de *C. jejuni* qui sont associées à la colonisation intestinale du poulet. Elle a établi pour la première fois au Canada la présence du pathogène dans les élevages de poulets biologiques. Cette étude fait partie des quelques études qui décrivent la présence des gènes de colonisation et de résistance aux antibiotiques dans une collection de souches issues uniquement du poulet. Elle a également remis en doute l'importance de certains gènes dans la colonisation. La caractérisation exhaustive des souches a également permis d'identifier de nouveaux gènes possiblement associés à la colonisation de poulet par *C. jejuni*. Finalement, elle a indiqué que l'utilisation d'un mélange d'huiles essentielles et d'acide organique encapsulés pouvait être efficace pour réduire la contamination des carcasses de poulet par *C. jejuni* et que son effet était souche-dépendant.

Mots-clés: *Campylobacter jejuni*; poulet; puce à ADN; biologique; contrôle; huiles essentielles; acides organiques; colonisation; potentiel.

Abstract

Campylobacter jejuni is the bacterium responsible for campylobacteriosis. It is a human pathogen of concern for public health. One of the transmission routes of this bacteria to humans is by the food chain through poultry meat products. The mechanisms involved in the commensal caecum chicken colonization by *C. jejuni* are poorly characterized, despite that increasing the knowledge on these mechanisms would allow a better control of the pathogen at the farm. The objectives of this study were to characterize the phenotypic and genetic factors affecting chicken colonization by *C. jejuni* and to identify news mechanisms involved in this process.

Isolates, recovered from chicken caecal content sampled from conventional farms in 2003 and in 2008 as well as originating from organic farms sampled in 2009, were used. All strains were characterized for their antibiotic resistance profiles (AMR), autoagglutination and chemotaxis properties. Strains originating from conventional farms were further characterized for adhesion/invasion of primary chicken caecal cells. A new microarray was created to detect the presence of 254 genes and variants, all associated with chicken colonization or AMR. An association was made between the strains phenotypic properties and their gene content. Finally, strains possessing different phenotypic and genetic properties were used in a chicken colonization model to assess the efficacy of a novel feed additive to control chicken colonization by *C. jejuni*.

Strains had variable phenotypic properties and these properties were not correlated, with the exception of adhesion and invasion. The microarray analysis revealed that gene presence was highly variable among the strains, especially for genes involved in the bacterial envelope, the flagella, the chemotaxis receptors and arsenic resistance. The 2003 and 2008 strains had similar phenotypic and genetic properties. Some genes, present in strains possessing higher or lower chicken colonization potentials, were identified. The feed additive was successful in reducing chicken carcass contamination but it increased bacterial caecal counts for some strains. *C. jejuni* was isolated from half of the sampled organic

farms and strains originating from this type of production had low AMR and variable phenotypic properties.

Keywords: *Campylobacter jejuni*; chicken; colonization; microarray; organic; essential oils; organic acids; potential; control.

Table des matières

Liste des tableaux	xi
Liste des figures.....	xiii
Liste des sigles et des abréviations.....	xv
Remerciements	xviii
Introduction.....	1
Chapitre 1: Recensement de la littérature	4
1.1 <i>Campylobacter jejuni</i>	4
1.1.1 Historique.....	4
1.1.2 Caractéristiques phénotypiques	4
1.1.3 Caractéristiques génétiques.....	8
1.1.4 Analyse du génome par puce à ADN	10
1.1.5 Vecteurs de <i>Campylobacter jejuni</i>	12
1.1.6 Isolement de <i>Campylobacter jejuni</i>	13
1.1.7 Identification des <i>Campylobacter</i>	20
1.1.8 Typage.....	22
1.1.9 Infections causées par <i>C. jejuni</i>	24
1.1.10 Susceptibilité aux antibiotiques	25
1.2 Le poulet.....	38
1.2.1 Industrie avicole au Canada	38
1.2.2 Physiologie générale du poulet.....	41
1.2.3 <i>Campylobacter jejuni</i> en élevage de poulet.....	42
1.2.4 Facteurs de risque associés à la contamination de la ferme.....	46
1.3 Facteurs bactériens de colonisation du poulet.....	48
1.3.1 Pompes à efflux, transport des nutriments et métabolisme.....	48
1.3.2 Lipooligosaccharide et capsule.....	50
1.3.3 Glycosylation.....	51
1.3.4 Adhésines.....	51

1.3.5	Résistance au stress	53
1.3.6	Système de régulation	54
1.3.7	Motilité et chimiotactisme	54
1.3.8	Autoagglutination	58
1.3.9	Adhésion et invasion de culture cellulaire	60
1.3.10	Résumé des facteurs de colonisation.....	62
1.4	Contrôle de <i>Campylobacter jejuni</i> à la ferme	62
1.4.1	Mesures de contrôle de l'environnement de la ferme	62
1.4.2	Vaccination	63
1.4.3	Phages.....	64
1.4.4	Bactériocines.....	65
1.4.5	Probiotiques et microflores de compétition	66
1.4.6	Additifs alimentaires	67
1.4.7	Résumé des mesures de contrôle à la ferme	69
Chapitre 2: Presence and characterization of <i>Campylobacter jejuni</i> in organically raised chickens in Quebec.....		71
2.1	Abstract.....	73
2.2	Introduction	73
2.3	Materials and methods.....	75
2.3.1	Sampling and recovery of <i>Campylobacter jejuni</i>	75
2.3.2	Antimicrobial resistance of <i>Campylobacter jejuni</i>	76
2.3.3	Autoagglutination	77
2.3.4	Chemotaxis.....	77
2.3.5	Phenotyping	78
2.3.6	Statistical analysis.....	79
2.4	Results.....	79
2.4.1	Recovery of <i>Campylobacter jejuni</i>	79
2.4.2	Antimicrobial resistance.....	79
2.4.3	Autoagglutination	80

2.4.4 Chemotaxis.....	80
2.4.5 Dendrogram analysis.....	81
2.5 Discussion.....	82
2.6 Acknowledgments.....	86
2.7 References.....	87
2.8 Tables.....	93
2.9 Figures.....	94
Chapitre 3: Distribution of colonization and antimicrobial resistance genes in <i>Campylobacter jejuni</i> isolated from chicken.....	99
3.1 Abstract.....	101
3.2 Introduction.....	102
3.3 Materials and methods.....	103
3.3.1 Strains and media.....	103
3.4.2 Microarray gene selection and probe design.....	104
3.3.3 Microarray construction.....	105
3.3.4 DNA extraction, labelling and hybridization.....	105
3.3.5 Microarray analysis and validation.....	105
3.3.6 Statistical analysis.....	106
3.4 Results.....	106
3.4.1 Gene distribution and correlation.....	106
3.4.2 Strains comparison.....	107
3.5 Discussion.....	107
3.5.1 Microarray.....	107
3.5.2 Distribution of genes with heterogeneous occurrence.....	108
3.5.3 Distribution of genes conserved in all strains.....	110
3.5.4 Field strain comparison.....	111
3.6 Conclusion.....	111
3.7 Supplementary data.....	112
3.8 Acknowledgements.....	112

3.9 References	112
3.10 Tables.....	118
3.11 Figures	123
Chapitre 4: Association between phenotypic and genetic colonization factors of <i>Campylobacter jejuni</i> chicken field strains	125
4.1 Abstract.....	127
4.2 Introduction	128
4.3 Materials and Methods	130
4.3.1 Strains and media.....	130
4.3.2 <i>In vitro</i> characterization	130
4.3.5 Chicken colonization and competition assays	133
4.3.6 Detection of challenge strains by PCR.....	133
4.3.7 Gene association with phenotypic properties	134
4.3.8 Statistical analysis.....	134
4.4 Results.....	135
4.4.1 Phenotypic properties of the strains	135
4.4.2 Chicken colonisation competition experiment	136
4.4.3 Strains comparison	136
4.5 Discussion.....	136
4.6 Conclusions	141
4.7 Acknowledgements.....	141
4.8 References	141
4.9 Tables.....	148
4.10 Figures	154
Chapitre 5: Modification of <i>Campylobacter jejuni</i> Broiler Colonization through an Experimental Blend of Encapsulated Organic Acids and Essential Oils Used as Feed Additive.....	159
5.1 Abstract.....	161
5.2 Introduction	162

5.3 Material and Methods	163
5.3.1 Experimental Design	163
5.3.2 Sample Processing	165
5.3.3 DNA Extraction	166
5.3.4 HRM- <i>flaA</i> Typing	166
5.3.5 Statistical Analysis	166
5.4 Results.....	167
5.4.1 Caecal <i>Campylobacter</i> Levels	167
5.4.2 Carcass <i>Campylobacter</i> Levels.....	168
5.4.3 Total Aerobic Bacterial Counts and <i>Campylobacter</i> Organ Occurrence.....	168
5.4.4 HRM- <i>flaA</i> Profiles	169
5.5 Discussion.....	169
5.5.1 <i>Campylobacter jejuni</i> Broiler Chicken Colonization Model	169
5.5.2 Feed Additive Effect on <i>Campylobacter</i> Caecal Colonization.....	170
5.5.3 Feed Additive Effect on Carcass <i>Campylobacter</i> Contamination.....	172
5.5.4 Feed Additive Effect on Organs Positivity	173
5.7 Acknowledgements.....	174
5.8 References	174
5.9 Tables.....	181
5.10 Figures	185
Chapitre 6: Discussion	187
6.1 Échantillonnage.....	188
6.1.1 Échantillonnage des élevages conventionnels	189
6.1.2 Échantillonnage des élevages biologiques	191
6.2 Caractérisation phénotypique	192
6.2.2 Caractérisation de la résistance aux antibiotiques	193
6.2.3 Autoagglutination	196
6.2.4 Chimiotactisme	197
6.2.4 Adhésion et invasion des cellules caecales primaires	197

6.2.5 Conclusions sur la caractérisation phénotypique.....	199
6.3 Puce à ADN.....	201
6.3.1 Dessin de la puce à ADN	201
6.3.2 Gènes toujours présents ou absents dans les souches hybridées	202
6.3.3 Gènes variables.....	203
6.3.4 Analyse phénotypique et génotypique des souches.....	204
6.4 Contrôle de <i>Campylobacter jejuni</i> en élevage	208
6.4.1 Choix de la méthode de contrôle utilisée	208
6.4.2 Choix du modèle de colonisation	210
6.4.3 Effet des acides organiques et des huiles essentielles sur la colonisation caecale de <i>Campylobacter jejuni</i>	210
6.4.3 Effet des acides organiques et des huiles essentielles sur la contamination des carcasses par <i>Campylobacter jejuni</i>	212
6.4.4 Effet des acides organiques et des huiles essentielles sur la présence de <i>Campylobacter jejuni</i> dans le foie et la rate des poulets	213
Conclusions.....	214
Bibliographie	216
Annexe 1: Lack of correlation between <i>Campylobacter jejuni in vitro</i> phenotypic properties in field isolates.....	i
Annexe 2: Caractérisation d'isolats de <i>Campylobacter jejuni</i> isolés de poulets du Québec.....	iii
Annexe 3: Résultats supplémentaires.....	vi
Annexe 4: Accords des coauteurs et permissions des éditeurs.....	viii

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau I: Épreuves biochimiques pour l'identification de <i>Campylobacter</i>	21
Tableau II: Résistance aux aminoglycosides chez <i>Campylobacter</i> spp.....	31
Tableau III: Antibiotiques homologués pour l'élevage du poulet.....	36
Tableau IV: Études de prévalence d'élevages positifs pour <i>Campylobacter</i> sp.	45
Tableau V: Facteurs de risque associés à la contamination des fermes de poulet par <i>Campylobacter</i> sp.	46

Chapitre 2

Table I. Distribution of minimum inhibitory concentration (MIC) and resistance of <i>C. jejuni</i> isolated from organic chicken lots	93
--	----

Chapitre 3

Table 1: Variable gene occurrence of <i>C. jejuni</i> poultry strains recovered from Québec flocks.....	118
Table 2: Genes differentiating two major populations of <i>C. jejuni</i> identified by clustering	122

Chapitre 4

Table 1: Colonization potential and inoculated dose of the strains used in the <i>in vivo</i> chicken colonization competition assay	148
Table 2: PCR conditions for the detection of the genes specific to the strains used in the <i>in</i> <i>vivo</i> chicken colonization competition assay	149
Table 3: Identification of the dominant <i>C. jejuni</i> strain in the <i>in vivo</i> chicken colonization competition assay by the PCR detection of relevant genes.....	150
Table 4: Genes associated with <i>C. jejuni</i> strains possessing high phenotypic properties related to chicken colonization.....	151

Table 5: Genes associated with <i>C. jejuni</i> strains possessing lower phenotypic properties related to chicken colonization.....	152
---	-----

Chapitre 5

Table 1: Phenotypical Properties of the Strains used in the Chicken Colonization Model.	181
Table 2: OA/EO Supplementation Effects on Mean Caecal <i>C. jejuni</i> Counts at different time post-strain inoculation.....	182
Table 3: OA/EO Supplementation Effects on Mean Carcass <i>C. jejuni</i> Counts at different time post-strain inoculation.....	183
Table 4: OA/EO Supplementation Effects on <i>Campylobacter</i> -positive Organs.....	184

Chapitre 6

Tableau VI: Comparaison des caractéristiques phénotypiques des souches issues des élevages biologiques et conventionnels.....	199
Tableau VII: Comparaison des propriétés phénotypiques des souches contenues dans les deux groupes majeurs de <i>C. jejuni</i> identifiés par la puce à ADN.....	204

Annexes

Tableau 1: Résistance aux antibiotiques des souches d'élevage conventionnel	v
Tableau 2: CMI pour la bacitracine et le ceftiofur, antibiotiques pour lesquels <i>C. jejuni</i> est considéré comme résistant naturellement.....	v
Tableau IX: Antibiotiques et désinfectants utilisés sur les fermes positives pour <i>C. jejuni</i> en 2008 et résistance aux antibiotiques observée chez les souches issues de ces fermes ..	vi
Tableau VIII: Gènes uniques retrouvés dans les souches co-inoculées dans la salle 1	vii

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1: Épidémiologie de <i>C. jejuni</i>	12
---	----

Chapitre 2

Figure 1. Autoagglutination of <i>C. jejuni</i> isolated from organic chicken lots (N = 54 isolates), sorted by ascending values.....	94
Figure 2. Mean autoagglutination value of <i>C. jejuni</i> isolates per organic lot. Isolates per lots.....	95
Figure 3. Chemotaxis of <i>C. jejuni</i> isolated from organic chicken lots (N = 54), sorted by ascending values.	96
Figure 4. Mean chemotaxis values of <i>C. jejuni</i> isolated from organic chickens according to lots. Isolates per lots..	97
Figure 5. Phenotypical clustering of <i>C. jejuni</i> isolates recovered from organic chicken lots.	98

Chapitre 3

Fig. 1. Hybridization of the NCTC11168 strain to the custom microarray.....	123
Fig. 2. Strain comparisons based on differential gene presence..	124

Chapitre 4

Figure 1: Autoagglutination capacities of the <i>C. jejuni</i> strains	154
Figure 2: Chemotaxis properties of the <i>C. jejuni</i> strains	155
Figure 3: Adhesion to primary caecal chicken cells by the <i>C. jejuni</i> strains.....	156
Figure 4: Invasion of primary caecal chicken cells by the <i>C. jejuni</i> strains	157
Figure 5: Strains ranking based on their phenotyping properties.....	158

Chapitre 5

Fig 1: OA/EO effect on HRM-*flaA* feces profiles of broilers at 21PI 185
Fig 2: HRM-*flaA* profiles of Inoculated *C. jejuni* Strains obtained *in vitro*..... 186

Liste des sigles et des abréviations

- ACIA: Agence canadienne d'inspection des aliments
- ADN: Acide désoxyribonucléique
- AMR: *Antimicrobial resistance* (résistance aux antibiotiques)
- ARN/RNA: Acide ribonucléique/*ribonucleic acid*
- ARS: *Agricultural Research Service*
- Asn: Asparagine
- Asp: Acide aspartique
- ASPC: Agence de la santé publique du Canada
- ASR: *Anaerobic sulfite-reducing bacteria* (bactéries anaérobiques sulfite-réductrices)
- BCCA: *Brilliance CampyCount Agar*
- CARTV: Conseil des appellations réservées et des termes valorisants
- CASA: *Campylobacter Selective Agar*
- CEUA: Comité d'éthique sur l'utilisation des animaux
- CFA: *CampyFood ID Agar*
- CFU: *Colony forming unit* (Unité formant des colonies)
- CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CMI/MIC: Concentration minimale inhibitrice/*minimal inhibitory concentration*
- CRISPR: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
- DMEM: *Dubecco's Modified Eagle Medium*
- EFSA: *European food safety authority* (Agence européenne de la sécurité des aliments)
- Etest: *Epsilometer-test*
- EVQ: Les éleveurs de volaille du Québec
- FBP: Ferro sulfate, sodium métabisulfite, sodium pyruvate
- FBS: *Fetal bovine serum* (Sérum de bovin fœtal)
- FDA: *Food and Drug Administration*
- FISIS: *Food Safety and Inspection Service*
- g: Gramme

GADH : gluconate déshydrogénase

GBS: *Guillain-Barré Syndrome* (Syndrome de Guillain-Barré)

h: Heures

HBSS: *Hank's Buffered Salt Solution*

Ile: Isoleucine

INSPQ: Institut de santé publique du Québec

kg: Kilogramme

L: Litre

LOS: Lipooligosaccharide

MAPAQ: Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec

MATE: *Multidrug and toxic compound extrusion*

mCCDA: *Charcoal cefoperazone deoxycholate Agar*

MFS: *Major facilitator superfamily*

mg: Milligramme

min: Minute

ml: Millilitre

MLST: *Multilocus sequence typing* (Typage par séquençage multilocus)

mm: Millimètre

mM: Millimolaire

MOS: mannoooligosaccharides

NAC: *National antimicrobial compendiumm* (Compendium canadien des produits vétérinaires)

NARMS: *National Antimicrobials Monitoring System*

ng: Nanogramme

nm: Nanomètre

nmol: Nanomole

OD/DO: *Optic density*/Densité optique ou occupation double :)

OIE: Organisation mondiale de la santé animale

PBS: *Phosphate buffered saline* (tampon phosphate salin)

PCR: *Polymerase chain reaction* (réaction en chaîne par polymérase)

PFGE: *Pulse field gel electrophoresis* (électrophorèse en gel en champs pulsés)

PICRA: Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antibiotiques

QPCR: *Quantitative polymerase chain reaction* (réaction en chaîne par polymérase quantitative)

QRDR: *Quinolone resistance determining region* (région déterminant la résistance aux quinolones))

RND: Resistance-nodulation-division

s: Seconde

SEM: *Standard error of the mean* (erreur standard à la moyenne)

SMR: *Small multidrug resistance*

Thr: Thréonine

TSA: *Trypticase soy Agar*

U: Unité internationale

UMDDE: Utilisation des médicaments en dérogation des directives de l'étiquette

USDA: *US Department of Agriculture*

V/V: Volume / volume

W/V: Masse / volume

WHO: *World Health Organisation* (organisation mondiale de la santé)

x g: Force g

%: Pourcentage

°C: Degré Celsius

µg: Microgramme

µl; Microlitre

µm: Micromètre

Remerciements

Je voudrais premièrement remercier le Dr Ann Letellier de m'avoir accueilli sous sa tutelle pour ce projet de doctorat et de m'avoir soutenu et fait de moi le chercheur que je suis devenu. Merci également à mes 2 codirecteurs, Dr Sylvain Quessy et Dr Évelyne Guévremont de m'avoir guidé à travers cette folle aventure. Merci également à tous les membres de mes comités de thèse : Dr Harel, Dr Fravalo et Dr Laurent avec un merci tout spécial pour le Dr Fravalo pour toutes les discussions sérieuses et non, les heures de travail partagées sous d'autres projets et les quelques bières savourées devant les parties de hockey.

Merci à tous les membres du laboratoire de la CRSV, présents et passés. Merci spécialement à Guillaume pour les périodes d'échantillonnage en abattoir, Louis-Alex et Ulysse pour enfin, vous savez pourquoi! Et aussi à Sophie, Hélène et Christine pour les pauses sucrées.

Merci aux autres membres du CRIP et GREMIP et aux autres vieux loups du PhD, hein Cindy! Merci également aux autres étudiants rencontrés à la fac avec une pensée spéciale pour Alex et Anouk.

Un immense merci au personnel de soutien de la faculté. Merci à Normand et son équipe de nous permettre de réaliser nos expérimentations animales dans les meilleures conditions possibles. Merci également aux adjointes administratives du secrétariat étudiant tellement efficaces que 10 personnes seraient nécessaires à les remplacer si elles devaient partir!

Merci aux organismes subventionnaires d'avoir financé ce projet. Merci également à tous les industriels qui ont non seulement participé financièrement à l'étude, mais aussi pour les échanges et discussions que nous avons eus.

Enfin et non les moindres, merci à toute ma famille, mes parents et amis qui souvent m'écoutaient parler de choses et d'un monde qui leur étaient totalement incompréhensibles. Merci à toi Zachu et à toi ma petite Jolianne, vous êtes mes rayons de Soleil qui m'attendent chaque jour à la maison, papa vous adore! Merci à toi mon magnifique roux, mon épouse adorée Sophie, je t'adore plus que tout.

Et merci à vous, chers lecteurs, j'espère que le contenu de cette thèse vous plaira!

Introduction

C. jejuni est à l'échelle mondiale responsable, chaque année, d'environ 400 à 500 millions d'infections humaines (Ruiz-Palacios, 2007). Il est l'agent causal de 5 % à 14 % de toutes les diarrhées d'origine bactérienne (ASPC, 2003). La diarrhée est la deuxième cause de mortalité infantile dans le monde (WHO, 2009) ce qui fait de *C. jejuni* un pathogène d'envergure internationale.

Les infections par *Campylobacter* sont sporadiques et non épidémiques (Gardner et coll., 2011). Au Canada, près de 30 cas furent déclarés par 100 000 habitants en 2004, dernière année pour laquelle les statistiques sont disponibles à l'Agence de la santé publique du Canada (ASPC) (ASPC, 2006). Aux États-Unis, on a rapporté en 2010, un taux de 13 cas confirmés en laboratoire par 100 000 habitants (Kirkpatrick et Tribble, 2011). En Europe, l'European Food Safety Authority (EFSA, 2011) rapporte qu'en 2010, dans 27 états membres, environ 200 000 cas de campylobactériose ont été déclarés (EFSA, 2011). Au Québec, d'avril 2010 à mars 2011, le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ, 2012) a reçu 1 366 déclarations de toxi-infections alimentaires touchant plus de 3 000 personnes. Ce nombre était en hausse de 20 % comparativement aux 5 dernières années de surveillance (MAPAQ, 2012). En 2011, parmi ces événements, les pathogènes bactériens les plus incriminés furent *Salmonella* (155 cas) et *Campylobacter* (72 cas). Le nombre de cas par année peut apparaître faible, mais il ne faut pas oublier que seule une faible proportion des cas réels est rapportée. Au Canada en 2006, on estimait que pour chaque cas de campylobactériose, environ 29 à 43 cas ne sont pas rapportés (Thomas et coll., 2006).

Il apparaît donc évident, malgré les normes élevées de salubrité déjà existantes en Amérique du Nord, que les toxi-infections alimentaires sont toujours présentes, voire en augmentation; *Campylobacter* occupe une place prépondérante de ces cas. Ces toxi-infections sont coûteuses tant pour l'individu affecté que pour la société. Par exemple, au Canada, il est estimé que chaque année, chaque personne souffrira en moyenne de 1,3 épisode de maladie entérique et que chaque cas coûte à l'économie du pays environ 115 \$ (Thomas et coll., 2008). Aux États-Unis, il est estimé que 21 % des cas confirmés

d'infections par *Campylobacter* étaient associés à des hospitalisations (Kirkpatrick et Tribble, 2011). De plus, l'infection par *C. jejuni* peut laisser des séquelles importantes, comme par exemple le syndrome de Guillain-Barré, ce qui contribue à accroître significativement la facture des soins de santé dispensés pour traiter les patients affligés par le pathogène.

Le nombre important de cas humains, la gravité des conséquences et les coûts engendrés par les infections font de *C. jejuni* un ennemi important de la santé publique, nécessitant des investissements monétaires et humains majeurs en recherche afin d'augmenter les connaissances relatives à ce pathogène. La nécessité et la pertinence de la recherche portant sur les facteurs favorisant la colonisation intestinale des poulets par *C. jejuni* dans le but de mettre au point des stratégies de contrôle efficaces du pathogène à la ferme sont plus qu'évidente puisque la volaille est un vecteur très important de *C. jejuni* pour l'humain (Hermans et coll., 2012).

En effet, les facteurs affectant la capacité de coloniser l'intestin du poulet, tels la capacité de *C. jejuni* à remodeler sa surface et le pouvoir d'invasion relatif des souches, pourraient également affecter la virulence d'une souche chez l'humain (Pope et coll., 2007). La grande quantité de *C. jejuni* pouvant être retrouvée dans l'intestin des oiseaux, en moyenne 10^6 CFU/g de matières fécales (Allen et coll., 2011), font de *C. jejuni* non seulement un agent de toxi-infection alimentaire important via les produits de volaille, mais aussi une source de contamination de l'environnement, particulièrement l'eau (Taboada et coll., 2004, EFSA, 2011). De plus, de nouvelles normes liées au taux de contamination des carcasses de volailles sont maintenant appliquées aux États-Unis (FSIS, 2012), ce qui force les industriels à considérer le contrôle de ce pathogène dans l'ensemble des étapes de la production avicole. Plusieurs auteurs soulignent l'importance des interventions contre *C. jejuni* à la ferme (Nauta et coll., 2009, Hermans et coll., 2011c). Tous ces facteurs démontrent bien l'importance de la recherche portant sur la colonisation des poulets par *C. jejuni*.

Cette thèse de doctorat s'inscrit dans cette perspective. Elle a comme hypothèse qu'une meilleure compréhension du lien existant entre les facteurs phénotypiques et génétiques associés à colonisation du poulet à griller par *C. jejuni* pourrait permettre la mise au point de moyens de contrôle efficaces de ce pathogène à la ferme. Les objectifs spécifiques de l'étude étaient : de recueillir des souches de *C. jejuni* d'origines diverses, de les caractériser phénotypiquement en évaluant divers paramètres liés à la colonisation intestinale des poulets pour apprécier *in vitro* leur capacité à s'établir chez un oiseau, de mettre au point une puce à ADN pour effectuer la détection de gènes liés à la colonisation des poulets, d'établir chez les souches caractérisées quels gènes semblaient les plus importants pour la colonisation et d'évaluer l'application d'une méthode de contrôle de la colonisation intestinale de *C. jejuni* par la mise au point d'un modèle de colonisation expérimental similaire à la réalité commerciale qui emploie des souches affichant des propriétés variées et représentatives de l'ensemble des souches caractérisées.

Chapitre 1: Recensement de la littérature

1.1 *Campylobacter jejuni*

1.1.1 Historique

Campylobacter a probablement été observé au microscope pour la première fois en 1866 par Escherich, ce même chercheur à qui l'on doit la découverte du célèbre *Escherichia coli*. En 1906, *Campylobacter fetus* a été la première espèce de *Campylobacter* identifiée par McFadyean et Stockman. La souche avait été isolée de mucus utérin provenant d'un avortement de brebis. Ce n'est qu'en 1938 que le premier cas humain de campylobactériose a été répertorié lors d'épisodes dont la source d'infection était du lait. En 1963, le genre *Campylobacter* fut proposé par Sebald et Véron. Jusqu'alors, le pathogène appartenait au genre *Vibrio*. Malgré que l'on connaisse la bactérie et son association à l'humain depuis près de 40 ans, ce ne fut qu'en 1972 qu'elle a été isolée pour la première fois par Dekyser et Butzler à partir d'un échantillon de fèces recueilli d'un humain avec une entérite hémorragique. Par la suite, le développement progressif des méthodes de culture adéquates a permis aux chercheurs de travailler activement sur ce pathogène. En 2000, utilisant les nouvelles technologies dans le domaine de la génétique, le génome complet de *C. jejuni* a été séquencé et assemblé. Lors de cette percée remarquable, toute la communauté scientifique étudiant *C. jejuni* y vit la révolution qui permettrait de percer les secrets de ce microorganisme fastidieux au comportement atypique. Aujourd'hui, malgré 50 ans de recherche active sur *Campylobacter* et les dernières avancées technologiques, on ne connaît toujours pas exactement comment le pathogène génère les gastroentérites chez l'humain et encore moins comment il colonise ses réservoirs (Altekruse et coll., 1998, Snelling et coll., 2005, Zilbauer et coll., 2008).

1.1.2 Caractéristiques phénotypiques

Campylobacter fait partie de la famille des *Campylobacteriaceae*, laquelle inclue également *Arcobacter* et *Bacteroides ureolyticus*. Le genre *Campylobacter* est divisé en 25

espèces, 2 espèces provisoires et 8 sous-espèces (Man, 2011). Les deux espèces principales sont *C. coli* et *C. jejuni*. *C. jejuni* se divise en deux sous-espèces: *doylei* et *jejuni*. La sous-espèce *jejuni* est la plus souvent retrouvée dans les cas d'infections entériques. L'appellation *C. jejuni* réfère donc à *Campylobacter jejuni jejuni*. Elle cause environ 90 % des campylobactérioses humaines (Gillespie et coll., 2008). Le pouvoir pathogène de la sous-espèce *doylei* est encore méconnu. Les caractéristiques biologiques peu communes de *C. jejuni* en font un microorganisme dont l'étude est complexe et fastidieuse. Certaines de ces caractéristiques, importantes pour la colonisation du poulet, seront détaillées plus loin dans une section réservée aux facteurs de colonisation intestinale des oiseaux.

C. jejuni est une bactérie à Gram négatif. Elle a la forme d'un bâtonnet en « s » et mesure de 0,2 à 0,8 µm d'épaisseur et 0,5 à 5 µm de longueur. La plupart des souches de *C. jejuni* hydrolysent l'hippurate, ce que les autres espèces de *Campylobacter* ne peuvent faire. Par contre, certaines souches n'ont pas cette activité biochimique bien qu'elles possèdent le gène *hipO* codant pour l'hippurate hydrolase, ce qui peut causer de faux négatifs lors de l'identification des souches par l'utilisation d'épreuves biochimiques (Caner et coll., 2008).

C. jejuni est mobile et est pourvu d'un ou plusieurs flagelles polaires (Grant et coll., 1993). Sa motilité, couplée à des récepteurs spécifiques, permet le chimiotactisme (Hugdahl et coll., 1988). Le flagelle de *C. jejuni* est utilisé non seulement pour la motilité, mais aussi pour la sécrétion d'effecteurs importants pour la colonisation des poulets (Konkel et coll., 1999). Le flagelle est également impliqué lors de l'autoagglutination (Jeon et coll., 2003) et la formation de biofilm (Joshua et coll., 2006). Ce flagelle est par conséquent essentiel à la colonisation des oiseaux (Guerry, 2007).

C. jejuni est microaérophile. La bactérie nécessite une atmosphère composée entre 3 % et 15 % d'O₂ et 24 % de CO₂ (Park, 2002). La sensibilité à l'oxygène est due à la toxicité de cet élément pour plusieurs enzymes de la bactérie (Jeon et coll., 2010). *C. jejuni* utilise de nombreux accepteurs d'électrons pour sa respiration, notamment les sulfites, molécules amplement employées pour la conservation de la viande (Myers et Kelly, 2005). Certaines

enzymes de respiration sont également des facteurs de colonisation des oiseaux, telle la gluconate déshydrogénase (GADH) (Pajaniappan et coll., 2008). Le métabolisme de *C. jejuni* peut-être aérobique et anaérobique. Lorsque la respiration aérobique est bloquée dans une souche, celle-ci est moins apte à coloniser le poulet. Cette respiration serait très importante pour maximiser la croissance de *C. jejuni* dès qu'il y a trace d'oxygène (Weingarten et coll., 2008). La respiration anaérobique est assurée par des peroxydases du cytochrome C (Tareen et coll., 2011), qui ont été démontrées comme étant importantes lors de la colonisation des poulets (Hendrixson et DiRita, 2004). Plus de détails sont disponibles dans la section traitant des facteurs de colonisation du poulet.

C. jejuni est thermotolérant et ne se multiplie pas dans l'environnement ni dans les aliments. Le pathogène croît à une température minimale de 30 °C et à un optimal de croissance situé entre 37 °C et 42 °C (Line et coll., 2011). L'exposition de *C. jejuni* à une température de 60 °C est létale (Sagarzazu et coll., 2010). La faible résistance à la chaleur de *C. jejuni* rend son élimination par la cuisson très aisée. À l'opposé, le pathogène survit très bien à 4 °C pour des périodes pouvant atteindre jusqu'à 7 mois. *C. jejuni* survit mieux à 4 °C qu'à température pièce (Sampers et coll., 2010). Le métabolisme de la bactérie reste actif à 4 °C (Moen et coll., 2005). La résistance à la température est souche dépendante (Garenaux et coll., 2008) et cette variabilité entre souches reste peu étudiée. *C. jejuni* est très sensible à la dessiccation. La dessiccation diminue la résistance de la bactérie aux stress environnementaux (Kusumaningrum et coll., 2004).

Le pH optimal de croissance de *C. jejuni* est situé entre 6,5 et 7,5. La bactérie peut survivre à un pH situé entre 4 et 9 (Chaveerach et coll., 2003). Par contre, pour la survie à long terme, un pH neutre est requis (Kelana et Griffiths, 2003). *C. jejuni* est plus sensible au choc alcalin qu'au choc acide (Kelana et Griffiths, 2003). Le pathogène peut uniquement croître dans des conditions où la salinité est faible (0,5 à 1,5 % NaCl). La bactérie peut survivre jusqu'à 4,5 % de NaCl et cette survie est favorisée à 4 °C (Kelana et Griffiths, 2003). Les propriétés de résistance de *C. jejuni* au choc acide, au froid et au sel sont décuplées par l'addition de matières organiques qui tamponnent ces effets (Bjorkroth,

2005). La bactérie peut alors survivre à la marinade des viandes avec une perte de viabilité minimale ($-1 \log$ CFU) (Bjorkroth, 2005), ce qui peut augmenter l'exposition du consommateur au pathogène.

Lorsqu'en situation de stress, certains gènes de *C. jejuni* sont régulés à la hausse pour permettre la survie de la bactérie. Ces gènes sont aussi associés à la virulence (Gaynor et coll., 2005). Un *Campylobacter* stressé est donc un *Campylobacter* « fâché », plus que prêt à se disséminer dans un nouvel hôte.

Du côté métabolique, *C. jejuni* tire son énergie des acides organiques et aminés à partir d'intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques. Le pathogène est incapable d'utiliser les sucres (Jeon et coll., 2010), mis à part le L-fucose. Certaines souches de *C. jejuni* sont capables de métaboliser le L-fucose (constituant de la mucine), ce qui pourrait leur donner un avantage compétitif dans un modèle d'infection chez le porc, mais pas dans un modèle de colonisation aviaire. Les auteurs avancent que ceci serait dû à une différence entre les microflore intestinales du poulet et du porc: la microflore intestinale du poulet compétitionnerait fortement pour le L-fucose alors que le L-fucose serait plus accessible chez le porcelet (Stahl et coll., 2011). Par contre, il est également possible que cette différence d'utilisation du fucose soit due à la variabilité qui existe entre les 2 espèces au niveau des sucres composant les mucines et donc de l'accessibilité du fucose (Kilcoyne et coll., 2012).

C. jejuni possède un cycle complet de l'acide citrique, mais est dépourvu de l'enzyme 6-phosphofructokinase (Parkhill et coll., 2000), ce qui l'empêche d'utiliser le glucose exogène comme source d'énergie (Jeon et coll., 2010). La formation de pyruvate, élément clef du cycle de l'acide citrique, est assurée par le catabolisme d'acides aminés (Guccione et coll., 2008), ce qui en fait des éléments essentiels pour la bactérie. L'utilisation de certains acides aminés, tels la L-asparagine et le glutathionne, est souche spécifique (Hofreuter et coll., 2008). *C. jejuni* métabolise préférentiellement l'aspartate, le glutamate, la sérine et la proline (Guccione et coll., 2008). La bactérie est capable d'utiliser

le pyruvate, le L-lactate, le fumarate, le bromosuccinate, le méthylpyruvate, le succinate, le D-malate, le L-malate, l' α -hydroxybutyrate, le α -ketoglutarate et le citrate (Line et coll., 2010). La capacité à utiliser et transporter les acides aminés et organiques peut influencer la colonisation intestinale des oiseaux (Hendrixson et DiRita, 2004, Hofreuter et coll., 2008).

La glycosylation des protéines est présente autant chez les eucaryotes que les procaryotes. Chez les eucaryotes, ces modifications sont importantes pour la communication entre cellules et pour le système immunitaire. Chez les bactéries, les fonctions exactes de la glycosylation demeurent à déterminer (Hitchen et Dell, 2006). Elles jouent cependant un rôle important pour l'assemblage de structures protéiques et pour la virulence des bactéries. Fait exceptionnel, deux systèmes de glycosylation des protéines sont exploités par *C. jejuni*: la N-glycosylation et la O-glycosylation (Szymanski et Wren, 2005). La N-glycosylation était jusqu'à tout récemment l'apanage des cellules eucaryotes (Jeon et coll., 2010). La N-glycosylation des protéines est effectuée sur une asparagine alors que la O-glycosylation sur une sérine ou une thréonine. Seule la flagelline chez *C. jejuni* est O-glycosylée (Thibault et coll., 2001) et les enzymes responsables de cette modification diffèrent entre les souches (Karlyshev et coll., 2005). La glycosylation du flagelle est essentielle à la virulence de la bactérie (Guerry et coll., 2006). Elle est assurée par les gènes *pgl* chez *C. jejuni* (Szymanski et coll., 1999). La N-glycosylation et la O-glycosylation sont également des facteurs de colonisation des oiseaux (Hendrixson et DiRita, 2004).

1.1.3 Caractéristiques génétiques

La souche NCTC11168 a été la première souche séquencée en 2000. Son génome est circulaire, de 1,6 Mb, constitué de 30,6 % de G + C et 92 % contient des séquences codantes (Parkhill et coll., 2000). Le génome de ce microorganisme est relativement petit, par opposition à *E. coli* qui a un génome de 4,6 Mb (Blattner et coll., 1997). Il est estimé, à partir de 13 souches séquencées, que le pan génome de *C. jejuni* comprend environ 2 400 gènes dont environ 1 300 appartiennent au noyau génétique de *C. jejuni*. La majorité des

gènes pouvant être présent dans une souche de *C. jejuni* sont donc accessoires. On estime que pour une souche donnée, au moins le tiers de son génome est constitué de gènes accessoires (Friis et coll., 2010).

Le génome de *C. jejuni* contient beaucoup de régions hypervariables (12 régions) dont les gènes codent entre-autre pour la capsule, les lipooligosaccharides de surface (LOS), le flagelle et les systèmes d'enzymes de restriction. La grande variabilité génétique de *C. jejuni* est due à des événements intragénomiques (variation de phase, recombinaison, mutations ponctuelles) et lors d'échanges de matériel génétique entre différentes souches. Cette instabilité génétique est expliquée en partie par l'absence d'un système complet de réparation de l'ADN mis apparié (Jeon et coll., 2010). En plus du système de réparation imparfait, *C. jejuni* est capable de variation de phase. La variation de phase, soit le changement de phénotype à une fréquence plus élevée qu'une simple mutation ponctuelle, est due à « slipped-strand mispairing » qui cause des mutations du cadre de lecture et qui peut influencer des propriétés phénotypiques telles la motilité et l'autoagglutination (Hendrixson, 2006, Bayliss et coll., 2012). Ces événements ont lieu dans les zones riches en A/T (Jeon et coll., 2010). Cette forte propension à la variation génétique confère au microorganisme une plus grande capacité d'adaptation et donc influence indirectement leur capacité à coloniser des oiseaux (Bayliss et coll., 2012, Kim et coll., 2012).

La conjugaison et la transduction sont des mécanismes présents chez *C. jejuni* qui permettent d'échanger et acquérir de nouveaux éléments génétiques. Le pathogène est également naturellement compétent ce qui en fait un pathogène facilement transformable (Jeon et coll., 2009). La transformation semble s'effectuer activement lors de la colonisation du poulet et contribue à la capacité de colonisation des souches (de Boer et coll., 2002, Ridley et coll., 2008). L'ADN utilisé est préférentiellement celui provenant d'autres souches de *C. jejuni* en opposition à de l'ADN exogène (Wang et Taylor, 1990).

1.1.4 Analyse du génome par puce à ADN

Le séquençage complet d'un génome est sans doute le meilleur moyen possible pour étudier l'ensemble des gènes d'une souche bactérienne donnée. Cependant, cette technique reste très onéreuse lorsque l'on désire étudier de nombreuses souches, en plus de nécessiter des analyses bio-informatiques qui ne sont pas à la portée de tout chercheur. La puce à ADN est donc un outil de choix pour ce type d'analyse.

C'est en 1995 que Schena et ses collaborateurs ont introduit le terme « microarray » pour décrire la technologie de la puce à ADN (Schena et coll., 1995). Une puce à ADN consiste en l'hybridation d'un mélange d'acides nucléiques (cible) avec des milliers de petites séquences d'ADN individuelles (sondes) dessinées pour reconnaître l'ADN complémentaire de gènes présents dans l'échantillon cible. Chaque sonde occupe une position prédéterminée sur un support physique, ce qui permet son identification selon sa localisation. Une puce à ADN peut contenir des milliers de sondes. L'ADN de l'échantillon cible est marqué d'une molécule fluorescente permettant de suivre son hybridation sur la puce et ainsi détecter les sondes pour lesquelles il est positif.

Les puces à ADN peuvent être utilisées pour détecter la présence d'un gène autant que pour quantifier l'expression génique. Le dessin des sondes est très flexible. Des puces commerciales existent, avec des sondes prédéfinies, mais il est également possible pour chaque laboratoire de créer ses propres sondes et ses propres puces pour les adapter à des situations particulières. Les sondes peuvent être synthétisées et ensuite imprimées sur la puce ou synthétisées directement sur la puce. Elles peuvent être générées à partir de produits PCR ou à partir de séquences oligonucléotidiques. Plus la sonde est longue, plus le signal de fluorescence lors d'une hybridation positive est fort (Letowski et coll., 2004).

Les études utilisant les puces à ADN sont toujours dispendieuses à réaliser, mais de faible coût lorsque comparées avec le séquençage complet d'une collection de souches. Les études par puces à ADN génèrent des quantités impressionnantes de données parfois difficiles à interpréter (Ehrenreich, 2006). Les puces sont imprimées généralement sur des

lames de verre. Ce matériel génère peu de bruit de fond. Le verre permet l'impression d'une haute densité de sondes, est résistant à la chaleur et aux conditions de lavage des puces. La synthèse directe sur les lames de verre offre une haute densité de sondes, jusqu'à 400 000 par puces (Ehrenreich, 2006).

Le marquage de la cible se fait généralement en utilisant les molécules Cy3 ou Cy5. Ces molécules offrent une forte fluorescence, des propriétés chimiques semblables, un spectre de fluorescence distinct et adhèrent peu à la surface de verre de la puce (Ehrenreich, 2006). Le marquage direct utilise des nucléotides auxquels est attaché le fluorochrome. Ces nucléotides sont ensuite incorporés à l'ADN cible lors d'une réaction PCR utilisant des amorces aléatoires et le fragment Klenow de l'ADN polymérase (Bruant et coll., 2006, Ehrenreich, 2006). Le marquage indirect utilise une molécule tierce pour attacher le fluorochrome à l'ADN cible, par exemple la biotine (Ehrenreich, 2006).

Les puces à ADN ont été utilisées massivement pour étudier *C. jejuni*. Elles ont été employées pour détecter le pathogène (Kostic et coll., 2007, Quinones et coll., 2007, Suo et coll., 2010, Donhauser et coll., 2011, Marotta et coll., 2012), pour étudier l'expression de gènes de virulence (Malik-Kale et coll., 2007, Corcionivoschi et coll., 2009, Flint et coll., 2010, Xue et coll., 2012), pour le typage et l'épidémiologie (Quinones et coll., 2007, Rodin et coll., 2008, Taboada et coll., 2008, Hannon et coll., 2009, Marotta et coll., 2012), pour observer l'adaptation de *C. jejuni* à des conditions de stress ou de culture (Malik-Kale et coll., 2008, Pajaniappan et coll., 2008, Reid et coll., 2008, Line et coll., 2010, Wosten et coll., 2010, Gundogdu et coll., 2011, John et coll., 2011, Riedel et coll., 2012), pour identifier les gènes essentiels (Stahl et coll., 2011), pour comparer le contenu génétique de souches aux propriétés différentes (Quinones et coll., 2008, Wilson et coll., 2010), pour étudier la résistance aux antibiotiques (Frye et coll., 2010) et pour étudier la régulation génique (Kamal et coll., 2007, Guo et coll., 2008, He et coll., 2008, Holmes et coll., 2009).

1.1.5 Vecteurs de *Campylobacter jejuni*

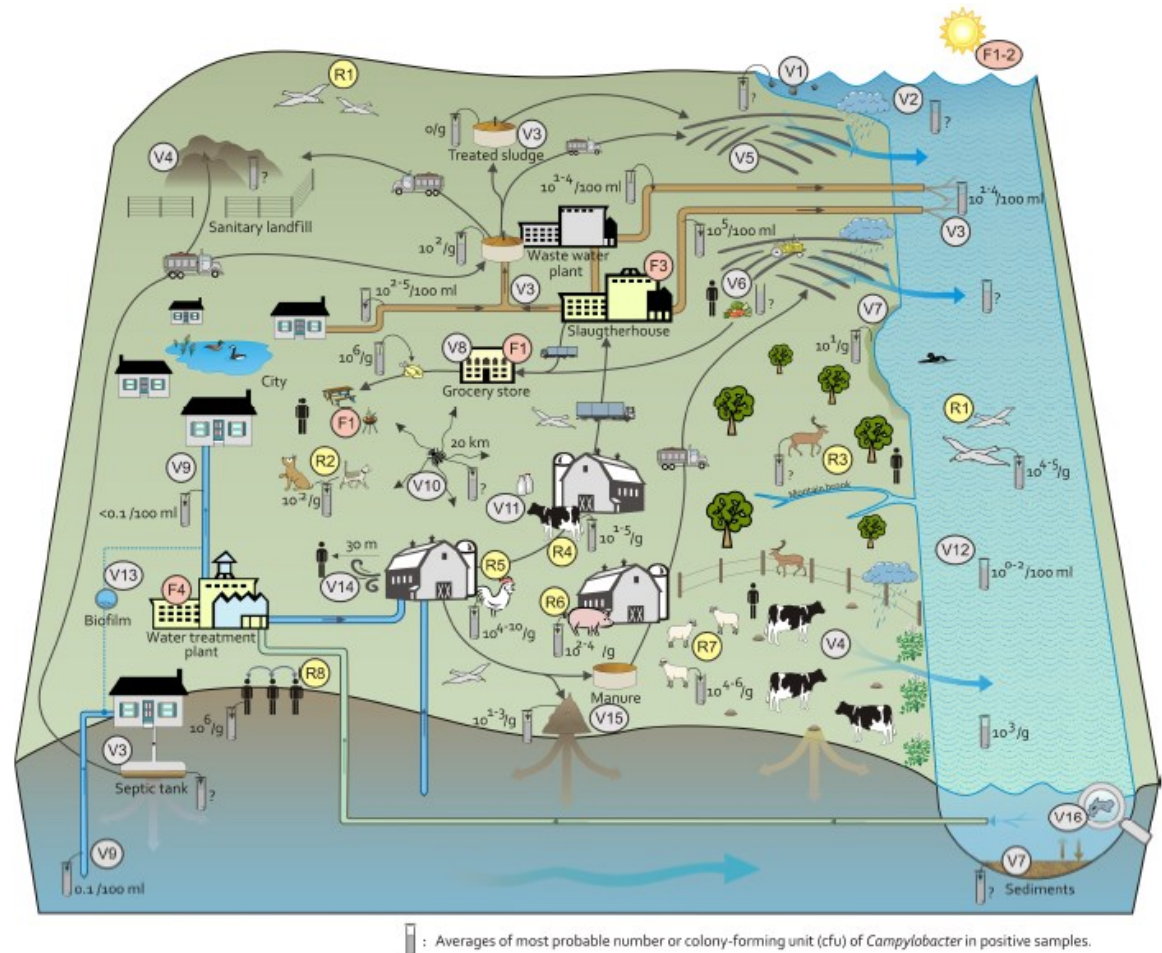


Figure 2: Épidémiologie de *C. jejuni*, tirée de (Arsenault, 2010)

Réservoirs (R) et vecteurs (V) de *C. jejuni*.

C. jejuni est retrouvé dans le tractus intestinal de la plupart des animaux à sang chaud. Il a été isolé de canards, de moutons, de chèvres, de singes et même d'éléphants de mer (Man, 2011). *C. jejuni* a aussi été récupéré d'échantillons de bœuf (12 % d'échantillons de viande positifs), mais à de très faibles concentrations (1.1 CFU/g) (Abley et coll., 2012). *C. jejuni* est omniprésent dans l'environnement, notamment véhiculé par l'eau et les

oiseaux (St-Pierre et coll., 2009). Son écologie est complexe, telle qu'illustrée par la Figure 1, tirée de la thèse de Arsenault (Arsenault, 2010). Le pathogène peut être transmis aux humains par de nombreux vecteurs dont les principaux sont les suivants: animaux de compagnie, eau, contact direct avec les animaux de la ferme, consommation de lait non pasteurisé et consommation de produits de volaille (Young et coll., 2007).

1.1.6 Isolement de *Campylobacter jejuni*

Il existe plusieurs méthodes pour l'isolement de *C. jejuni*. Plusieurs études n'utilisent pas les mêmes protocoles, ce qui rend difficile la comparaison des résultats entre laboratoires. Les méthodes présentées sont celles qui sont pertinentes pour l'isolement de *C. jejuni* à partir d'échantillons de poulet.

1.1.6.1 Méthodes officielles

Au Canada, il existe une méthode officielle de détection de *C. jejuni* dans les aliments, soit la méthode MFLP-46 qui est inscrite dans le compendium des méthodes analytiques de Santé Canada, dont la dernière mise à jour a été effectuée en 2002. Aucune méthode officielle n'existe pour la recherche de *C. jejuni* dans les matières fécales de poulet. Il est recommandé d'utiliser 25 g d'échantillon dans 100 ml de bouillon sélectif Park and Sanders et d'incuber à 37 °C en microaérobie durant 3 h à 4 h avant de transférer l'incubation à 42 °C durant 24 h à 48 h et ce avec une agitation constante. Pour la génération de l'atmosphère, on recommande l'utilisation d'un mélange de gaz constitué de 5 % de O₂, 10 % de CO₂ et 85 % de N₂, l'utilisation de sachets catalytiques commerciaux ou une incubation dans un incubateur générant une atmosphère concentrée à 10 % en CO₂. Le bouillon enrichi est ensuite ensemencé sur gélose sélective qui est incubée à 37 °C en microaérobie jusqu'à 72 h; on recommande l'utilisation des milieux CCDA (charcoal cefoperazone deoxycholate Agar) et de Preston. Sur chaque Pétri, on examine trois colonies typiques décrites comme: lisses, convexes, translucides, incolores ou couleur crème, très petites, de 2 mm à 4 mm de diamètre ou étalées. On vérifie également l'apparence des

bactéries au microscope: Gram négatif, motilité, minuscules bactéries en forme de « s ». Les colonies répondant à ces critères sont ensuite purifiées sur CCDA ou Mueller-Hinton additionné de 5 % de sang avant d'être soumises à des tests biochimiques. *C. jejuni* est catalase positive, oxydase positive, sensible à l'acide nalidixique, résistant à la céphalotine et hydrolyse l'hippurate (ASPC, 2002).

Aux États-Unis, deux instances gouvernementales principales font l'isolement de *C. jejuni*. Tout d'abord, la US Food and Drug Administration (FDA) utilise le protocole du chapitre 7 du Bacteriological Analytical Manual pour effectuer l'isolement et l'identification du pathogène à partir d'échantillon de nourriture. De manière générale, un échantillon de 25 g est incubé dans 100 ml de bouillon Bolton qui est pré-enrichi à 37 °C pendant 4 h à 5 h avant d'être enrichi à 42 °C pendant 24 h à 48 h avec agitation et en microaérobie. La microaérobie peut être générée à l'aide d'un mélange de gaz ou des systèmes commerciaux. Ensuite, l'enrichissement est dilué au centième dans 0,1 % de bouillon peptone. Les bouillons enrichis et dilués sont ensuiteensemencés sur le milieu Abeyta-Hunt-Bark ou sur le milieu CCDA modifié (mCCDA) et incubés entre 37 °C et 42 °C pendant 24 h à 48 h. Après examen microscopique selon les mêmes critères que l'Agence de santé publique du Canada (ASPC), les colonies typiques sont purifiées sur les mêmes géloses sélectives avant identification par les épreuves biochimiques (FDA, 2011).

Un autre organisme aux États-Unis fait l'isolement de *C. jejuni*. Il s'agit du Food Safety and Inspection Service (FSIS) et utilise la méthode 40.01 du Laboratory Guidebook. Il existe deux méthodes d'analyses: une qualitative et l'autre quantitative. Pour le volet qualitatif, les échantillons de lavage de carcasse ou des écouvillonnages par éponges sont incubés dans 30 ml et 25 ml respectivement de bouillon Bolton double force, libre de sang. Le tout est incubé 48 h à 42 °C en conditions microaérobiques générées tel que décrit pour la FDA. Quatre à cinq gouttes de l'enrichissement sont ensuiteensemencées sur milieu Campy-Cefex et incubées pour 48 h en microaérobie à 42 °C. Les colonies typiques (translucides ou mucoïdes, roses et scintillantes, légèrement bombées ou non, de grandeur variable) et mobiles sont ensuite soumises à un test immunologique d'agglutination

utilisant les trousseaux commerciales des compagnies « ScimedX corp » ou « Microgen Bioproduct ». Les colonies positives sont confirmées par le « Agricultural Research Service » (USDA/ARS). La méthode quantitative utilise la même procédure, mais sans enrichissement (FSIS, 2011).

L'OIE quant à elle recommande l'utilisation du mCCDA pour l'isolement à partir de matières fécales. Si les échantillons contiennent peu de *C. jejuni* (écouvillons, petite quantité de matière fécale), il est recommandé d'utiliser un milieu de transport pour éviter le contact avec l'oxygène et la dessiccation qui sont létaux pour *C. jejuni* (OIE, 2008).

1.1.6.2 Comparaison de méthodes

Différentes instances n'utilisent pas tous les mêmes protocoles de culture pour l'isolement de *C. jejuni*. Autre exemple, une étude du réseau Foodnet, regroupant 411 centres de recherche des États-Unis (USA), a déterminé que les procédures pour l'isolement et l'identification de *Campylobacter* étaient différentes entre les laboratoires à l'étude et ce malgré la présence de lignes directrices claires et de protocoles officiels (Hurd et coll., 2012). Étant donné cette disparité, il est difficile de déterminer le protocole optimal pour faire la détection et l'isolement de *C. jejuni* à partir de différentes matrices. Dans le but d'améliorer les protocoles existants, plusieurs études ont comparé l'efficacité de certains milieux de culture pour l'isolement et la détection de *C. jejuni* à partir de matières fécales, d'échantillon de carcasse ou de produits de viande finis.

1.1.6.2.1 Isolement à partir de fèces

La détection dans les matières fécales de poulet est généralement obtenue par ensemencement direct puisque *C. jejuni* est présent en grande quantité dans les matières fécales de poulet (Rodgers et coll., 2012). L'enrichissement des fèces est moins sensible que la culture directe (Rodgers et coll., 2012).

Une étude a comparé l'utilisation des milieux de culture mCCDA, Skirrow et Preston pour la détection et l'isolement de *C. jejuni* à partir de fèces de poulet. Le milieu

optimal a été déterminé comme étant le mCCDA. De plus, cette étude a comparé l'utilisation de la PCR en temps réel (détection des gènes *mapA* et *ceuE* (Best et coll., 2003)) avec les résultats de culture pour la détection de *C. jejuni* et a déterminé que les deux méthodes étaient équivalentes (Rodgers et coll., 2012).

Les milieux mCCDA, Karmali et Preston ont aussi été comparés pour l'isolement direct des *Campylobacter* à partir de matières fécales. Le milieu mCCDA a été une fois de plus le plus performant tant au niveau de la sensibilité qu'au niveau de la spécificité. De plus, les échantillons de matières fécales de poulet, entreposés à 4 °C, se sont avérés positifs jusqu'à 6 jours (Rodgers et coll., 2010).

Les milieux *Campylobacter* Agar base, *Campylobacter*, Campy-Line, Campy-Cefex modifié et mCCDA ont été comparés pour l'isolement par culture directe. Le Campy-Cefex modifié a donné de meilleurs résultats pour l'isolement à partir des fientes. Pour l'isolement de contenus caecaux, ce milieu a performé aussi bien que le mCCDA (Potturi-Venkata et coll., 2007). Le milieu Campy-Cefex est un milieu chromogénique qui rend plus facile le repérage des colonies de *C. jejuni* et limite donc le nombre de colonies à repiquer et à confirmer.

Une étude a comparé la spécificité des milieux Campy-Cefex, Cape Town, mCCDA, Campy-Line Agar et Campy-CVA Agar. Les auteurs ont comparé par pyroséquençage la proportion de séquences de non-*Campylobacter* par rapport au nombre de séquences de *Campylobacter* qui étaient retrouvées après une extraction d'ADN de tout le contenu en bactérie se retrouvant sur les géloses sélectives après ensemencement direct de matières fécales de poulet. Il semblerait que l'incubation des milieux de culture à 42 °C comparativement à 37 °C ait donné lieu à l'isolement plus important de bactéries autre que *Campylobacter*. Cependant, les auteurs sont prudents avec cette conclusion et ne recommandent pas d'adopter 37 °C pour la culture de routine. Les auteurs ont observé que le milieu mCCDA était le plus sélectif (Oakley et coll., 2012).

Finalement, une autre étude a comparé les milieux de culture Campy-Line Agar, Campy-Cefex Agar, mCCDA et *Campylobacter* Agar plate pour l'isolement de *Campylobacter* à partir d'échantillons de litière de poulet. L'enrichissement des échantillons n'a pas permis une meilleure détection de *C. jejuni*. Tous les milieux ont obtenu le même degré de sensibilité. Par contre, les milieux Campy-Line et *Campylobacter* Agar ont été ceux sur lesquels la flore de compétition a été la plus inhibée (Kiess et coll., 2010).

1.1.6.2.2 Isolement et détection à partir de carcasses ou de produits finis

Une étude a comparé l'utilisation des milieux de culture Karmali Agar, CampyFood Id Agar et mCCDA pour l'ensemencement direct d'échantillons de produits finis. Ici, le milieu de culture ayant le mieux performé fut le mCCDA (Habid, 2008). Une autre étude a comparé l'efficacité des milieux *Campylobacter* Selective Agar (CASA), Brilliance CampyCount Agar (BCCA), CampyFood ID Agar (CFA), mCCDA et Campy-Cefex Agar lors de l'énumération de *C. jejuni* à partir d'échantillons de carcasses. Les comptes bactériens étaient plus élevés sur le milieu BCCA. Cependant, moins de faux positifs furent constatés sur le milieu CASA, dont la performance était équivalente au milieu mCCDA (Ahmed et coll., 2012). Par contre, dans une autre étude semblable, les milieux mCCDA, CFA et BCCA étaient aussi sensibles et sélectifs. Par contre, l'utilisation de milieux chromogéniques (CFA et BCC) a permis un décompte et une identification des colonies typiques plus rapide que le mCCDA (Habib et coll., 2011).

Lorsque la recherche de *C. jejuni* dans un échantillon de produits finis ou sur une carcasse est nécessaire, un protocole précédé d'une étape d'enrichissement est normalement utilisé. La combinaison d'un enrichissement en bouillon Bolton, suivi d'une culture sur CampyFood Agar donne de meilleurs résultats que d'autres combinaisons de bouillons d'enrichissement (Bolton, Preston, CampyFood) et milieux de culture en Agar (mCCDA, CFA et BCCA) (Habib et coll., 2011). Le bouillon Bolton semble plus efficace comme milieu d'enrichissement que les milieux Preston, Tran sans sang et Tran sans sang modifié

lorsque suivi d'une culture sur Campy-Cefex Agar (Baylis et coll., 2000, Solis-Soto et coll., 2011). Cependant, le milieu Preston s'est avéré plus efficace que le milieu Bolton lorsque le milieu mCCDA était utilisé après enrichissement (Habib et coll., 2011, Ugarte-Ruiz et coll., 2012).

Le protocole recommandant l'enrichissement pendant 24 h n'a pas amélioré la détection de *C. jejuni* comparativement à un enrichissement de 48 h (Odongo et coll., 2009, Williams et coll., 2009). Il y a aussi contradiction à ce sujet: un enrichissement de 48 h en Bolton a donné des résultats supérieurs à un enrichissement de 24 h lorsque couplé au système de détection miniVidas (immunodétection) (Liu et coll., 2009).

Les bouillons Bolton et Preston contiennent du sang ce qui augmente la sensibilité du milieu de culture pour l'enrichissement de *C. jejuni* d'échantillons de carcasses. Le sang neutralise les composés toxiques de l'oxygène. Lorsque le sang est retiré de la formulation du bouillon Bolton, la limite de détection du milieu modifié augmente (Williams et coll., 2009). Le charbon activé, l'hémine et le FBP (ferrosulfate, sodium métabisulfite, sodium pyruvate) neutralisent aussi les dérivés toxiques de l'oxygène (Rodgers et coll., 2012).

Il est également possible d'améliorer les milieux de culture déjà existants. En effet, l'ajout de polymixine B (100 000 UI / l) au milieu mCCDA augmente la sélectivité et le taux d'isolement de *C. jejuni* à partir d'échantillons de carcasses. De plus, ce nouveau milieu était plus performant que le CFA (Chon et coll., 2012). Le bouillon Bolton peut être additionné d'acide clavulanique potassique pour empêcher la croissance des *E. coli* résistant aux céphalosporines (positives pour les β -lactamases à spectre élargi qui peuvent inactiver la céfopérazone utilisée comme agent de sélection dans le bouillon Bolton) pouvant contaminer les échantillons de volaille, améliorant du même coup la sélectivité du bouillon original (Moran et coll., 2011).

Il est également possible de combiner plusieurs méthodes pour effectuer la détection de *C. jejuni*. Par exemple, une incubation de 24 h en aérobie à 42 °C de 25 g de produit dans 100 ml de bouillon Preston sans sang, suivi d'un ensemencement de ce bouillon dans

une proportion 1:9 dans du bouillon Preston avec sang incubé en aérobie à 42 °C pendant 24 h et finalement couplé à une détection immunochromatographique (NH Immunochromato *Campylobacter*, Nippon Meat Packers inc.) a permis la détection de *C. jejuni* plus rapidement que la méthode traditionnelle de culture (Preston ou Bolton) et avec la même sensibilité (Kawatsu et coll., 2010). Il est également possible d'effectuer une détection par PCR immédiatement suivant l'enrichissement. Ceci a permis la détection d'échantillons positifs sans utiliser un milieu solide comme intermédiaire. Cependant, l'efficacité de la PCR dépendait de la souche et du milieu de culture utilisés (Solis-Soto et coll., 2011).

Il est aussi important de souligner que le milieu de culture utilisé pour l'enrichissement semble influencer la diversité génétique des bactéries isolées d'un échantillon. Pour des échantillons environnementaux, les bactéries retrouvées après incubation des échantillons dans du bouillon mExter (bouillon nutritif numéro 2, 5% sang de cheval, pyruvate de sodium, sulfate ferreux, métabisulfite de sodium, triméthoprim, rifampicine, Polymixine B, céfopérazone et amphotéricine B) étaient génétiquement plus diversifiées que celles des échantillons incubés dans du bouillon Preston ou Bolton (incubation en conditions aérobiques dans des contenants fermés avec peu d'espace sans bouillon), après culture sur mCCDA (Williams et coll., 2012). L'utilisation de sang ou non dans le milieu Bolton n'a pas influencé la diversité génétique des souches isolées (Liu et coll., 2009).

1.1.6.3 Résumé des méthodes pour l'isolement et la détection de *C. jejuni*

En conclusion, il existe de nombreuses méthodes de culture de *C. jejuni* ce qui crée une quasi-infinité de combinaisons possibles pour son isolement à partir de diverses matrices. Ceci, ajouté à la variété d'échantillons pouvant être contaminés par le pathogène, au type d'incubation en microaérobie disponible et à la variation des microflore de compétition de ces échantillons dont le niveau de résistance aux antibiotiques varie également, rend la comparaison de méthodes pour l'isolement de *C. jejuni* très difficile. Les

nouveaux milieux de culture semblent plus aptes à isoler *C. jejuni* que les anciens, grâce à leur capacité chromogénique. Cependant, modifier les milieux de culture utilisés entre des études subséquentes rendrait la comparaison des résultats obtenus quasiment impossible. Quant aux techniques moléculaires, leurs avantages en termes d'économie de temps et d'argent sont indéniables. Par contre, les techniques moléculaires ne permettent pas de récupérer les souches pour les typer ou pour les analyser phénotypiquement.

1.1.7 Identification des *Campylobacter*

Lorsqu'une souche est isolée par culture, il est nécessaire de l'identifier. Pour ce faire, il est possible d'utiliser des épreuves biochimiques, immunologiques et moléculaires.

Les tests biochimiques sont utilisés dans les méthodes officielles pour l'identification des *Campylobacter*. Ils sont résumés dans le Tableau I. L'épreuve la plus discriminante pour l'identification de *C. jejuni* est l'hydrolyse de l'hippurate. Cependant, tel que mentionné précédemment, certaines souches de *C. jejuni* possèdent le gène codant pour l'hippurate hydrolase, mais ne l'expriment pas. Ceci peut engendrer des faux négatifs (Caner et coll., 2008). Les épreuves biochimiques requièrent souvent plusieurs jours de mise en culture et d'analyse; l'identification est donc longue et nécessite beaucoup de temps.

Tableau I: Épreuves biochimiques pour l'identification de *Campylobacter*, tiré de (FDA, 2011).

Characteristic	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	<i>coli lari</i>		<i>fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	<i>hyo-</i> <i>intestinalis</i>	<i>upsaliensis</i>
Growth at 25°C	-	±	-	-	+	D	-
Growth at 35-37°C	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 42°C	+	±	+	+	D	+	+
Nitrate reduction	+	-	+	+	+	+	+
3.5% NaCl	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S, lead acetate strip	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S, TSI	-	-	D	-	-	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
MacConkey's Agar	+	+	+	+	+	+	-
Motility (wet mount)	+(81%)	+	+	+	+	+	+
Growth in 1% glycine	+	+	+	+	+	+	+
Glucose utilization	-	-	-	-	-	-	-
Hippurate hydrolysis	+	+	-	-	-	-	-
Resistance to naladixic acid	S	S	S	R	R	R	S
Resistance to cephalothin	R	R	R	R	S	S	S

Symbols: +, 90% or more of strains are positive; -, 90% or more of strains are negative; D, 11-89% of strains are positive; R, resistant; S, susceptible.

Les épreuves immunologiques sont habituellement rapides et simples. Une colonie typique et purifiée est mise en contact avec des anticorps qui reconnaissent spécifiquement les différents antigènes des espèces de *Campylobacter*. La formation d'un complexe immun et subséquent agglutination, démontre que les anticorps ont reconnu les bactéries comme étant du *Campylobacter*. Des épreuves commerciales existent, ce qui simplifie et

uniformise l'identification. Cependant, toutes les troussees commerciales ne semblent pas equivalentes et generent des faux positifs et des faux negatifs (Miller et coll., 2008).

Les techniques moléculaires sont largement utilisées pour l'identification des *Campylobacter*. Les méthodes mises au point ciblent soit des gènes spécifiques (Inglis et Kalischuk, 2003, Yamazaki-Matsune et coll., 2007, Asakura et coll., 2008, Mayr et coll., 2010, Leblanc-Maridor et coll., 2011, Solis-Soto et coll., 2011), soit des séquences codantes de l'ARN ribosomal (Inglis et Kalischuk, 2003, Yamazaki-Matsune et coll., 2007) ou des séquences qui codent pour la protéine cpn60 (Chaban et coll., 2009). De plus, ces protocoles peuvent être adaptés pour faire la quantification et l'identification de *Campylobacter* dans un échantillon en utilisant la PCR en temps réel.

1.1.8 Typage

Dans les études épidémiologiques, il est toujours utile de typer les souches identifiées pour en définir leur degré de parenté. Pour *C. jejuni*, plusieurs méthodes ont été mises au point. Les plus utilisées sont le sérotypage, le typage de la flagelline A, le typage par séquençage de multiples locis (multilocus sequence typing ou MLST) et l'électrophorèse en champ pulsée (pulsed field gel electrophoresis ou PFGE).

Le sérotypage consiste en la détection de combinaisons d'antigènes situés à la surface d'une bactérie. Moran et Penner ont créé un système de sérotypage basé sur les antigènes résistant à la chaleur (Penner et Hennessy, 1980, Moran et Penner, 1999) alors que Lior et collaborateurs ont développé un système parallèle basé sur les antigènes sensibles à la chaleur (Lior et coll., 1982). Ces méthodes, utilisées seules, possèdent un degré de discrimination très faible (McKay et coll., 2001). De plus, les réactifs employés sont dispendieux et la caractérisation est longue (Eberle et Kiess, 2012).

La flagelline A est une protéine variable du flagelle de *C. jejuni* (Wassenaar et coll., 2009). Son gène peut être amplifié par PCR et l'amplicon digéré par des enzymes de restrictions. Les fragments digérés sont ensuite séparés sur gel d'agarose. Un type est

ensuite associé à chacun des patrons de migration (Fitzgerald et coll., 2001). Le gène codant pour la flagelline A peut également être séquencé et chaque séquence attribuée à un type (Wassenaar et Newell, 2000).

Le MLST (Maiden et coll., 1998) consiste en l'amplification et le séquençage de sept gènes de ménages de *C. jejuni*, soit les gènes *aspA*, *atpA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm* et *tkt* (Miller et coll., 2005). Ensuite, pour chacun des gènes séquencés, un numéro de séquence est donné. Le type du MLST est le résultat de la combinaison des numéros attribués à chaque gène de ménage. Le MLST est très discriminant et hautement reproductible (Eberle et Kiess, 2012). Cependant, vu le nombre de réactions PCR et de séquençage requis pour une seule souche, cette technique est dispendieuse, quoique de plus en plus abordable grâce aux techniques de biologie moléculaire à haut débit.

Le PFGE est basé sur des patrons de migration de fragments d'ADN de haut poids moléculaire obtenus par la digestion du génome entier d'une bactérie par des enzymes de restrictions. Il a été mis au point par Swartz en 1984. Les fragments d'ADN obtenus après la digestion sont d'un haut poids moléculaire et nécessitent un gradient électrique dont l'orientation est variable pour être correctement séparés. Le PFGE est la méthode ayant le pouvoir de discrimination le plus grand pour le typage de *C. jejuni*. Cependant, le niveau technique nécessaire pour bien réaliser le typage (et donc pour que la méthode soit reproductible entre laboratoires), les coûts en temps et en réactifs sont très élevés (Eberle et Kiess, 2012).

Si l'on classe les méthodes de typage par ordre décroissant de pouvoir de discrimination croissant, nous obtenons le classement suivant: sérotypage, typage de la flagelline A, MLST et PFGE. Ultiment, toutes les méthodes de typages sont utiles. Elles doivent être utilisées selon ce qu'exige la situation d'analyse des souches et selon les ressources disponibles dans les laboratoires (Clark et coll., 2012).

1.1.9 Infections causées par *C. jejuni*

Chez l'humain, *C. jejuni* infecte le petit intestin et le côlon pour causer la campylobactériose, une gastroentérite aiguë (Blaser, 1997). Les personnes immunodéprimées, les jeunes enfants et les personnes âgées sont les populations les plus susceptibles aux infections (Young et coll., 2007). Les symptômes de la campylobactériose sont: une diarrhée pouvant être sanglante, de la fièvre et des crampes abdominales (Jeon et coll., 2010). La dose infectieuse reconnue est de 500 CFU, mais elle pourrait être aussi faible que 10 CFU chez certains individus (Riordan et coll., 1993). Normalement, les infections sont auto-limitantes et d'une durée de 1 à 10 jours. Elles ne requièrent qu'une bonne réhydratation et un apport constant en électrolytes, nécessaires pour combattre la déshydratation. Un traitement par antibiotique est recommandé uniquement lors d'infections causant de la fièvre, une diarrhée sanglante, des diarrhées abondantes, lors d'infection chez les personnes immunosupprimées et lorsque les symptômes de la maladie persistent plus d'une semaine (Kirkpatrick et Tribble, 2011). Le traitement de choix est l'antibiothérapie qui malheureusement peut être compromise par la résistance des souches à certains antibiotiques (Kirkpatrick et Tribble, 2011); ceci sera traité un peu plus loin dans la thèse. Le traitement antibiotique de choix pour la campylobactériose est l'utilisation de macrolides (érythromycine et azithromycine) suivit de l'utilisation de fluoroquinolones (ciprofloxacine). Les infections à *C. jejuni* peuvent laisser des séquelles tel le syndrome de Guillain-Barré, de l'arthrite réactive et le syndrome de l'intestin irritable. Malgré ces complications, peu de gens décèdent d'une infection par *C. jejuni* (Ruiz-Palacios, 2007).

On estime que dans 1 cas sur 1000, la campylobactériose déclenche le syndrome de Guillain-Barré (GBS). Cette maladie est caractérisée par une paralysie neuromusculaire causée par une attaque auto-immune des nerfs périphériques (Allos, 1998). Elle laisse 20 % des gens qui en souffrent avec des séquelles. Le taux de mortalité associé au GBS est de 5 % (Poropatich et coll., 2010). Cette réaction auto-immune est causée par le mimétisme moléculaire des sucres du lipooligosaccharide de surface de *C. jejuni*, lesquels ressemblent beaucoup aux gangliosides du système nerveux chez l'humain (Koga et coll., 2006).

Une campylobactériose peut aussi dégénérer en syndrome de Reither. Il s'agit d'une arthropathie réactive. On estime que 4,3 cas de campylobactériose sur 100 000 peuvent mener à une forme d'arthrite réactive (Kirkpatrick et Tribble, 2011). Cette maladie peut affecter plusieurs articulations, mais semble toucher plus particulièrement le genou. La maladie cause des douleurs articulaires intenses et peut devenir chronique (Kirkpatrick et Tribble, 2011).

Quant au syndrome de l'intestin irritable et au syndrome de l'intestin irritable post-infectieux, on estime que 4 à 32 % de ceux-ci sont associées à une campylobactériose. Peu de littérature scientifique existe sur ce lien. Par contre, il est reconnu que le syndrome de l'intestin irritable est lié à la durée de la diarrhée; il est plus fréquent lorsque la campylobactériose persiste plus de 7 jours (Kirkpatrick et Tribble, 2011).

Du côté de la santé animale, *C. jejuni* pourrait causer des avortements chez les bovins, caprins et canins (Sahin et coll., 2008). Les moutons peuvent être porteurs sains de *Campylobacter* (Sahin et coll., 2008). Chez la volaille, le pathogène serait associé à des hépatites, mais n'en serait pas l'agent causal (Boukraa et coll., 1991, Jennings et coll., 2011). Les chiens et chats sont aussi susceptibles de développer des gastroentérites suite à une infection par *C. jejuni* (Suchodolski, 2011). Le porc, le furet et la souris (déficiente en IL-10) sont utilisés comme modèle de campylobactériose étant donné la similarité entre les signes cliniques de ces animaux et ceux de l'humain (Law et coll., 2009, Nemelka et coll., 2009, Stahl et coll., 2011, Kim et coll., 2012).

1.1.10 Susceptibilité aux antibiotiques

Les infections sévères à *C. jejuni* sont traitées avec des antibiotiques de la classe des macrolides, quinolones/fluoroquinolones et aminoglycosides. Malheureusement, certains de ces traitements perdent de leur efficacité à cause du développement de l'antibiorésistance de certaines souches. Ces dernières sont de plus en plus résistantes aux macrolides, aux β -lactamines, au triméthoprime, aux sulfonamides, aux tétracyclines, aux aminoglycosides et au chloramphénicol (Alfredson et Korolik, 2007, Aarestrup, 2006).

1.1.10.1 Méthodes pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques

Les méthodes utilisées pour vérifier le niveau d'antibiorésistance de *C. jejuni* sont: la diffusion de disque en agar, la méthode des dilutions successives en bouillon ou en agar et l'Epsilon-test (Etest). Elles permettent d'évaluer si une souche est résistante ou sensible (diffusion de disque) à un antibiotique donné ou de déterminer qu'elle est la plus faible concentration d'antibiotique requise pour inhiber (CMI) la croissance d'une souche donnée (dilution et Etest). La diffusion de disque en agar, l'Etest et la dilution sériée en agar se font sur gélose Mueller-Hinton supplémentée de 5 % de sang de mouton (CLSI, 2004).

Il existe un système commercial, le Sensititretm (méthode de dilution en bouillon automatisée), qui permet de rapidement donner les profils de résistances aux antibiotiques de nombreuses souches simultanément. Les antibiotiques contenus dans ce test pour *C. jejuni* sont: l'azithromycine (macrolide), le ciprofloxacine (fluoroquinolone), l'érythromycine (macrolide) la gentamicine (aminoglycoside), la tétracycline (tétracycline), le florphénicole (phénicole), l'acide nalidixique (quinolone), la télithromycine (kétolide, dérivé de l'érythromycine) et la clindamycine (lincosamide). Les concentrations en antibiotiques du système varient de 2 µg/ml à 64 µ/ml pour chacun des antibiotiques (Biocentric, 2012).

Le CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, est chargé de normaliser les méthodes servant à évaluer la résistance aux antibiotiques d'une souche bactérienne donnée (CLSI, 2011). Le CLSI recommande d'utiliser la diffusion de disque en agar uniquement pour le criblage de la résistance aux macrolides et au ciprofloxacine (Lehtopolku et coll., 2012).

Lorsque la diffusion de disque en agar et la dilution sériée en agar sont comparées, la diffusion de disque tend à donner des résultats beaucoup plus variables que les dilutions sériées, ce qui en fait une méthode à utiliser uniquement dans un premier criblage (Lehtopolku et coll., 2012). L'Etest et la diffusion sur agar sont deux épreuves quasi

équivalentes sauf pour l'érythromycine et l'ampicilline dont le taux de souches résistantes est plus élevé en diffusion sur agar qu'avec l'Etest (McGill et coll., 2009). Quant au système Sensititretm, il possède la même sensibilité que l'Etest et que la diffusion sur agar pour la détermination du taux de souches résistantes aux antibiotiques, mais est plus sensible pour la détermination de la CMI (Luber et coll., 2003).

1.1.10.2 Résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques, selon leur nature, emploient des voies différentes pour pénétrer dans les bactéries. Les petites molécules hydrophiles peuvent traverser la paroi de la membrane en utilisant des porines alors que les antibiotiques hydrophobes peuvent diffuser librement à travers cette même membrane (Nikaido, 2003).

De manière générale, on retrouve chez *C. jejuni* un lipooligosaccharide de surface (LOS) et une capsule, ce qui rend la bactérie hydrophile. Ceci réduit la diffusion des antibiotiques hydrophobes à travers la membrane bactérienne (Jeon et coll., 2009). Les porines du pathogène sont également non permissives à certains antibiotiques, notamment ceux de la classe des β -lactamines (Tajada et coll., 1996). Si les antibiotiques réussissent à pénétrer la bactérie, ils peuvent être rejetés à l'extérieur par des pompes à efflux (Pumbway 2002). Un autre mécanisme pour protéger *C. jejuni* de l'action des antibiotiques est la modification de la cible de ces antibiotiques, ce qui inhibe leur liaison et du même coup leur action. Finalement, la bactérie peut aussi inactiver l'antibiotique avant qu'il n'atteigne sa cible grâce à des enzymes (Jeon et coll., 2010). Ces mécanismes sont traités plus en détails dans les prochaines sections.

La résistance aux antibiotiques peut être transférée entre deux souches via transformation naturelle (Jeon et coll., 2008) ou par conjugaison (Oyarzabal et coll., 2007). La résistance peut également être transférée entre *Helicobacter jejuni* et *C. jejuni* (Oyarzabal et coll., 2007).

1.1.10.2.1 Résistance aux macrolides

1.1.10.2.1.1 Description générale et mécanisme d'action

Les macrolides se lient irréversiblement au ribosome ce qui inhibe la synthèse polypeptidique. Ces antibiotiques peuvent aussi bloquer l'activité de la peptidyl-transférase (Aarestrup, 2006).

1.1.10.2.1.2 Mécanismes de résistance chez *C. jejuni*

Des souches mutantes de *C. jejuni*, résistantes aux macrolides, peuvent être générées *in vitro* en utilisant des concentrations croissantes d'érythromycine et de tylosine (Caldwell et coll., 2008). La résistance aux macrolides est généralement engendrée par une mutation de l'ADN codant pour la région 23S de l'ARN ribosomal, aux positions 2074 et 2075. Deux copies sur les trois de l'ADN ribosomal doivent être minimalement mutées pour qu'il y ait résistance (Aarestrup, 2006). Cette mutation peut également conférer à *C. jejuni* une résistance aux lincosamides (Harada et coll., 2006). La résistance est aussi engendrée par la mutation ponctuelle des gènes codant pour les protéines ribosomales L22 et L44. Toutes ces mutations peuvent se retrouver en synergie avec une pompe à efflux, *cmeABC*, conférant alors aux souches une résistance aux macrolides très élevée (Cagliero et coll., 2006).

Lorsque des souches résistantes aux macrolides sont mises en compétition avec des souches sensibles dans un modèle de colonisation des poulets et sans présence d'antibiotiques, les souches résistantes sont rapidement éliminées. La résistance aux macrolides diminue le fitness des souches, c'est à dire leur compétitivité pour l'occupation d'une même niche écologique (Luangtongkum et coll., 2012). La résistance aux macrolides peut être sélectionnée par l'emploi de cet antibiotique en élevage (Ladely et coll., 2007). Les souches résistantes aux macrolides se divisent moins rapidement *in vitro*, sont moins mobiles et présentent des défauts dans leur flagelline (Almofiti et coll., 2011).

1.1.10.2.2 Résistance aux quinolones

1.1.10.2.2.1 Description générale et mécanisme d'action

Les quinolones ciblent l'ADN de la bactérie. Elles agissent contre deux enzymes essentielles à la réplication de l'ADN: la topoisomérase II (gyrase) codée par les gènes *gyrA* et *gyrB* ainsi que la topoisomérase IV codée par les gènes *parC* et *parE*. Les quinolones interagissent avec le lien topoisomérase-ADN. Ce lien est plus fort que le lien enzyme-ADN, ce qui cause une accumulation du complexe (Aarestrup, 2006).

1.1.10.2.2.2 Mécanismes de résistance chez *C. jejuni*

La résistance aux quinolones est principalement causée par une mutation dans le QRDR (quinolone resistance determining region) du gène *gyrA* (Thr86→Ile). Cette mutation est surtout retrouvée chez les souches isolées de cas cliniques. Cependant, d'autres mutations conférant la résistance aux quinolones via une modification de la gyrase ont été observées en laboratoire en position 90 (Asp →Asn), 70, 85 (Asp →Tyr), 86 (Thr →Ala) et 104 du gène *gyrA*. Ces mutants de laboratoire sont moins résistants que les mutants possédant la mutation Thr86→Ile (McIver et coll., 2004, Kinana et coll., 2007). Des souches possédant de multiples mutations sont généralement peu isolées (McIver et coll., 2004, Kinana et coll., 2007).

Chez *E. coli*, la résistance aux quinolones peut être également causée par une mutation du gène *gyrB* et de la topoisomérase IV (gènes *parC* et *parE*). Ces mécanismes n'ont pas été observés chez *C. jejuni* (Kinana et coll., 2007). Fait controversé, certains auteurs ont avancé que les souches résistantes aux quinolones causent des campylobactérioses plus sévères que les souches sensibles (Nelson et coll., 2004, Helms et coll., 2005) et possèderaient donc des mécanismes supplémentaires de virulence. Cette virulence accrue est toujours discutée (Kirkpatrick et Tribble, 2011). Une large analyse des cas cliniques de campylobactériose répertoriés principalement aux États-Unis et au Royaume-Uni a démontré que les cas causés par *C. jejuni* résistants aux fluoroquinolones

n'étaient pas plus sévères et ne duraient pas plus longtemps que ceux causés par des pathogènes sensibles à ces mêmes antibiotiques (Wassenaar et coll., 2007).

Les mutations entraînant la résistance aux quinolones sont très stables et ne semblent pas diminuer le fitness (aptitudes biologiques) des souches (Luangtongkum et coll., 2009). Des souches contenant ces mutations sont sélectionnées positivement par l'emploi de cet antibiotique en élevage (Stapleton et coll., 2010). Par exemple, la résistance aux fluoroquinolones chez *C. jejuni* n'était pas présente avant 1995 aux États-Unis, date à laquelle cet antibiotique a reçu son approbation pour utilisation en médecine vétérinaire (Gupta et coll., 2004).

1.1.10.2.3 Résistance aux aminoglycosides

1.1.10.2.3.1 Description générale et mécanisme d'action

Les aminoglycosides sont des antibiotiques bactéricides qui lient le ribosome et qui inhibent la synthèse des protéines. Cette classe d'antibiotique cause des erreurs de traduction ou de translocation (Aarestrup, 2006).

1.1.10.2.3.2 Mécanismes de résistance chez C. jejuni

Chez *C. jejuni*, la résistance aux aminoglycosides est possible grâce à la présence d'enzyme inactivant l'antibiotique. Ces enzymes viennent modifier le domaine actif de l'antibiotique, ce qui l'empêche de se lier à sa cible. Pour les aminoglycosides, il existe trois modes d'inactivation possible de l'antibiotique: l'acétylation, la phosphorylation et la nucléotidation (Tableau II).

Tableau II: Résistance aux aminoglycosides chez *Campylobacter* spp. (Irving Nachamkin, 2008, Aarestrup, 2006)

Groupe	Gène	Antibiotique	Localisation
Acétylation	<i>sat4</i>	Streptothricine	Intégon
	<i>aacA4</i>	Tobramycine	Intégon
		Kanamycine	
		Néomycine	
	<i>aacA4</i> muté Thr-102	Tobramycine	Intégon
		Kanamycine	
Néomycine			
Phosphorylation	<i>aphA-3</i>	Kanamycine	Plasmides
		Néomycine	Chromosome
	<i>aphA-7</i>	Kanamycine	Plasmides
		Néomycine	
	<i>aphA-1</i>	Kanamycine	Chromosome
		Néomycine	
Nucléotidation	<i>aadA</i>	Streptomycine	Chromosome
		Spectinomycine	Intégon
	<i>aadE</i>	Streptomycine	Chromosome
			Intégon

1.1.10.2.4 Résistance aux β -lactamines

1.1.10.2.4.1 Description générale et mécanisme d'action

Les β -lactamines sont subdivisées en quatre classes: pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames. Ces antibiotiques ciblent la synthèse de la paroi bactérienne ce qui entraîne la lyse de la bactérie. *C. jejuni* est naturellement résistant à la céfoxitine, au ceftiofur, au céfémandole et au céfopérazone. Une majorité de souches est résistante à la céphalotine et à la céfazoline. Par contre, le pathogène est sensible jusqu'à un certain degré à l'imipénème, la combinaison amoxicilline et acide clavulanique, le céfépime, l'amoxicilline, l'ampicilline et le céfotaxime (Irving Nachamkin, 2008, Aarestrup, 2006).

1.1.10.2.4.2 Mécanismes de résistance chez *C. jejuni*

La résistance naturelle de *C. jejuni* à cette classe d'antibiotiques est causée par l'imperméabilité de la membrane bactérienne (Tajada et coll., 1996). Les protéines liant la pénicilline (PBP) de *C. jejuni* ont aussi une faible affinité pour cette classe d'antibiotiques (Aarestrup, 2006).

Les souches de *C. jejuni* peuvent sécréter des β -lactamases qui s'attaquent aux antibiotiques de la classe des β -lactamines. Une de ces enzymes, codée par le gène $bla_{\text{oxa-61}}$, est une oxacillinase peu inhibée par l'acide clavulanique. Le gène est fréquemment retrouvé sur des éléments mobiles et sur une cassette de gènes située sur un intégron de classe 1. Le gène peut également être chromosomal chez *C. jejuni* (Alfredson et Korolik, 2005). En plus de $bla_{\text{oxa-61}}$, *C. jejuni* possède de nombreuses β -lactamases chromosomales (Griggs et coll., 2009). La résistance aux β -lactamines est peu étudiée chez *C. jejuni*. L'administration d'amoxicilline lors de l'élevage de poulet a peu d'effet sur l'émergence de souches résistantes (Elviss et coll., 2009).

1.1.10.2.5 Multirésistance

Plusieurs pompes à efflux contribuent à la résistance générale aux antibiotiques chez *C. jejuni*. Les pompes à efflux peuvent être classées en deux groupes: celles qui utilisent l'ATP (transporteur ABC) et les transporteurs secondaires qui profitent du potentiel électrochimique transmembranaire de protons ou d'ion sodium. Les transporteurs secondaires sont aussi subdivisés: superfamille des facilitateurs majeurs (major facilitator superfamily (MFS)) qui ont 12 à 14 domaines transmembranaires, famille résistance-nodulation-division (resistance-nodulation-division (RND)) composée de 3 protéines situées à la membrane interne, à la membrane externe et dans le périplasme, la famille multidrogue et composés toxiques d'extrusion (multidrug and toxic compound extrusion (MATE)) dont les protéines sont formées de 12 domaines transmembranaires différents des MFS et la famille des petites résistances multidrogues (small multidrug resistance (SMR)) dont les protéines n'ont que 4 domaines transmembranaires (Jeon et coll., 2011). D'après l'annotation du génome de la souche NCTC11168, *C. jejuni* posséderait environ 14 pompes à efflux putatives dont plusieurs restent encore à caractériser (Ge et coll., 2005).

Deux pompes à efflux majeures, de la classe des RND (resistance nodulation-cell division), sont présentes chez *C. jejuni*, soit les pompes *cmeABC* et *cmeDEF*. D'une manière générale, l'utilisation de composés inhibant les pompes à efflux diminue la capacité de colonisation des oiseaux (Lin et Martinez, 2006).

La séquence de l'opéron *cmeABC* est variable, principalement à cause d'une variété de séquences de la sous-unité *cmeB*. Les différents variants ont tous jusqu'à présent le même niveau de résistance aux antibiotiques (Cagliero et coll., 2006). *CmeA* est une protéine périplasmique tandis que *cmeB* est située à la membrane externe et que *cmeC* à la membrane interne (Lin et Martinez, 2006). La pompe *cmeABC* confère à *C. jejuni* une résistance à de nombreux agents: sels biliaires (acide chénodésoxycholique, cholique, désoxycholique, taurocholique), antibiotiques (aminoglycosides, β -lactamines, chloramphénicol, macrolides, quinolones, rifampicine, tétracycline), métaux lourds (CoCl_2 ,

CuCl₂) et plusieurs autres antimicrobiens (orange acridine, bromure d'éthidium, protamine, sodium dodécyl sulfate) (Aarestrup, 2006). La pompe *cmeABC* est régulée par le répresseur transcriptionnel *cmeR* (Lin et coll., 2005).

Un autre système de pompes à efflux RND a également été identifié chez *Campylobacter*, soit le système *cmeDEF*. Cette pompe est capable de transporter l'ampicilline, le bromure d'éthidium, l'acridine et le dodécylsulfate de sodium. Une autre pompe, codée par *cmeGH* (*cj1375* et *cj1376*), de la famille des MFS, est impliquée dans la résistance aux antibiotiques et la résistance au stress oxydatif. La protéine *cmeH* ne semble pas être présente chez toutes les souches de *C. jejuni* ce qui pourrait affecter la capacité d'efflux de ces souches (Jeon et coll., 2011).

1.1.10.3 Prévalence de la résistance aux antibiotiques

Plusieurs agences gouvernementales sont chargées de surveiller l'émergence de la résistance aux antibiotiques autant chez l'humain qu'en production animale. Au Canada, cette surveillance est assurée par l'agence de santé publique du Canada (ASPC) via le programme intégré de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA). La résistance des isolats de *C. jejuni* issus de la production avicole n'est surveillée que pour les produits de volailles vendus au détail. Les dernières données disponibles sont les résultats préliminaires pour l'année 2009.

En 2009, les isolats *C. jejuni* était résistant au ciprofloxacine (quinolone, 10 %), à la télithromycine (macrolide, 5 %), à l'azithromycine (macrolide, 5 %), à la clindamycine (lincosamide, 2 %), à l'érythromycine (macrolide, 5 %), à l'acide nalidixique (quinolone, 10 %) et à la tétracycline (55 %). Des différences existent entre les provinces canadiennes; par exemple, la résistance à l'acide nalidixique est absente au Québec, mais présente en Colombie-Britannique. Depuis 2003, au Québec, la résistance aux antibiotiques pour *Campylobacter* sp. est stable ou en déclin (exception de la tétracycline), alors qu'elle est en hausse dans certaines autres provinces (PICRA, 2010).

En Europe, l'EFSA est, entre autres, en charge de compiler les informations mise à sa disposition par les pays membres sur la résistance aux antibiotiques. En 2010, derniers résultats accessibles, les souches de *C. jejuni* isolées de viande de volaille étaient résistantes au ciprofloxacine (50 %), à l'érythromycine (2 %), à la gentamicine (0,7 %), à l'acide nalidixique (48 %) et à la tétracycline (22 %). Ces taux de résistance sont variables d'un état membre à l'autre. Au total, des données étaient disponibles pour sept états membres de l'EFSA (ESFA, 2012).

Aux États-Unis, la surveillance de la résistance aux antibiotiques est réalisée via le National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). En 2010, derniers résultats disponibles, les souches de *C. jejuni* isolées de la viande de volaille étaient résistantes à la gentamicine (0,5 %), au ciprofloxacine (23 %), à l'acide nalidixique (23 %) et à la tétracycline (48 %) (NARMS, 2012).

1.1.10.4 Antibiotiques utilisés en production avicole au Canada

Au Canada, plusieurs antibiotiques sont homologués et utilisés chez le poulet. Ils peuvent être administrés en prophylaxie, en traitement ou comme promoteur de croissance. Le compendium canadien des produits vétérinaires (NAC) contient la liste complète des substances médicamenteuses pouvant être utilisées chez le poulet, leurs appellations commerciales ainsi que leur notice (Tableau III). Il existe aussi plusieurs antibiotiques utilisés hors homologation (utilisation de doses supérieures de ce qui est indiqué sur l'étiquette et utilisation de produits homologués pour d'autres espèces animales) en production avicole, tel le ceftiofur (β -lactame) et le ciprofloxacine (fluoroquinolone) (Rebecca Erwin, Canadian Meat Council 2011) qui sont beaucoup plus difficile à répertorier. Cette pratique est légale et régie par Santé Canada via la Politique sur l'utilisation des médicaments en dérogation des directives de l'étiquette (UMDDE) chez les animaux destinés à l'alimentation (Santé Canada, 2011). Il est notamment recommandé de ne pas utiliser d'antibiotiques cruciaux en médecine humaine telles les céphalosporines de troisième ou quatrième génération et les fluoroquinolones.

Tableau III: Antibiotiques homologués pour l'élevage du poulet (NAC, 2012)

Antibiotique	Classe	Utilisation
Amoxicilline	β -lactame	Traitement des infections à <i>E. coli</i> et <i>Salmonella enterica</i>
Bacitracine	polypeptide	Promotion de croissance, prévention de l'entérite nécrotique causée par <i>Clostridium perfringens</i>
Bambermycine	glycolipide	Promotion de croissance
Chlortétracycline	tétracycline	Promotion de croissance, aide au traitement d'épisodes de maladies chroniques respiratoires complexes
Érythromycine	macrolide	Promotion de croissance, aide au traitement d'épisodes de maladies chronique respiratoire complexes
Florfénicol	phénicole	Traitement et contrôle des aérosacculites à <i>E. coli</i>
Gentamicine	aminoglycoside	Administration au poulet de 1 jour d'âge, traitement des infections dont l'agent a été diagnostiqué en laboratoire (toxique pour l'animal à hautes doses)
Lincomycine	lincosamide	Traitement de l'entérite nécrotique causée par <i>C. perfringens</i>
Lincomycine	lincosamide	Prévention et traitement des maladies chroniques respiratoires associées à <i>Mycoplasma</i> et aux coliformes
Spectinomycine	aminocyclitole	
Néomycine	aminoglycoside	Aide dans le traitement du « Bluecomb », des entérites, des maladies chroniques respiratoires et toutes autres infections dont l'agent est sensible à la néomycine
Néomycine	aminoglycoside	Aide dans le traitement des maladies chroniques respiratoires
Oxytétracycline	tétracycline	
Néomycine	aminoglycoside	Aide à la prévention et au traitement des maladies chroniques respiratoires
Tétracycline	tétracycline	
Oxytétracycline	tétracycline	Prévention de croissance lors de maladies chroniques respiratoires, pour la prévention et le

		traitement de la synovite et des entérites
Pénicilline	β -lactame	Promotion de croissance lors d'épisode ou non
Streptomycine	aminoglycoside	de maladies chroniques respiratoires
Pénicilline G potassique	β -lactame	Aide pour réduire les symptômes de l'entérite nécrotique au début de l'infection
Pénicilline G procaïne	β -lactame	Promotion de croissance
Sulfaméthazine	sulfonamide	Aide au traitement des coccidioses caecales
Sulfaquinoxaline	sulfonamide	Traitement des coccidioses caecales, du choléra et de la fièvre typhoïde de la volaille.
Tétracycline	tétracycline	Aide au traitement des infections dont les agents sont susceptibles à la tétracycline
Tylosine	macrolide	Prévention et aide au traitement de l'entérite nécrotique et des maladies chroniques respiratoires
Virginiamycine	streptogramine	Promotion de croissance, prévention de l'entérite nécrotique

1.1.10.5 Résistance aux antibiotiques: résumé et conclusion

En résumé, la résistance de *C. jejuni* aux antibiotiques utilisés pour le traitement des campylobactérioses est souvent causée par des mutations ponctuelles et peu par des résistances acquises par des éléments mobiles, mis à part la résistance aux aminoglycosides. Cette résistance peut être sélectionnée par l'utilisation des antibiotiques en élevage; l'utilisation de quinolones sélectionne des souches dont la résistance est stable alors que l'utilisation de macrolides favorise l'émergence de souches résistantes, mais dont la compétitivité pour la colonisation de la volaille est diminuée. Il est donc important, pour gérer l'antibiorésistance de *C. jejuni*, de bien régir les antibiotiques donnés à la ferme, d'où l'importance de limiter les applications hors étiquette de certaines molécules, voir les remplacer par d'autres molécules. Les souches de *C. jejuni* provenant d'élevages biologiques, dans lesquels les antibiotiques sont proscrits, sont moins résistantes aux antibiotiques que celles isolées de productions conventionnelles (Luangtongkum et coll.,

2006, Young et coll., 2009). Toutefois, il est important d'être prudent dans l'interprétation des résultats, car les différents protocoles employés peuvent influencer les résultats obtenus d'une étude à l'autre.

1.2 Le poulet

1.2.1 Industrie avicole au Canada

Un des hôtes naturels de *C. jejuni* est le poulet. Il est donc important de comprendre la situation de l'élevage du poulet au Canada, de connaître comment se déroule l'élevage d'un poulet, de comprendre les normes régissant l'élevage biologique du poulet, de connaître un minimum d'éléments de la physiologie de l'oiseau et de connaître les pratiques d'élevage favorisant la colonisation.

1.2.1.1 Élevage conventionnel

Au Québec, l'élevage de la volaille se fait principalement en conditions industrielles. La densité de poulets recommandée est d'environ 12 poulets par mètre carré. Les poulets à griller atteignent leur âge d'abattage entre 5 et 6 semaines d'âge. En trente ans, au Québec, le temps requis pour atteindre un poids éviscéré de 1,5 kg (poulet à griller) est passé de 90 jours à 40 jours (Canada, 1991, EVQ, 2012).

Les poulets sont élevés sur copeaux de bois exempt d'agents de préservations et ont un accès libre à la moulée et l'eau. Au début de l'élevage, la température du bâtiment pour les poussins doit être de 35 °C; elle sera diminuée progressivement jusqu'à 20 °C vers la fin de la période d'élevage. Les oiseaux étant très sensibles aux variations de température, il est essentiel d'avoir une température uniforme dans tout le bâtiment d'élevage. La température est étroitement liée aux performances des oiseaux (Canada, 1991, EVQ, 2012).

L'alimentation doit être ajustée à la période de croissance si bien que minimalement deux régimes différents sont administrés aux oiseaux: un régime de départ plus riche en protéines et un régime de fin d'engraissement plus riche en énergie. Le régime de départ

couvre les 21 premiers jours d'élevage. Au Canada, la moulée est normalement à base de maïs. Le rendement des aliments granulés, pour les poulets, est supérieur à celui des farines. On incorpore aux aliments des anticoccidiens et des antibiotiques promoteurs de croissance, destinés à améliorer les performances zootechniques des animaux et à les protéger des maladies. Au Canada, ces substances sont régies par le règlement sur les aliments du bétail dans lequel est retrouvée la liste des antimicrobiens dont l'utilisation comme additif alimentaire est homologuée (ACIA, 2012, Agriculture et agroalimentaire Canada, 1991, EVQ, 2012).

Les mâles et les femelles sont élevés en parquets distincts car ils n'ont pas le même taux de croissance; ceci uniformise la production. Une biosécurité stricte est importante sur les sites d'élevage pour éviter la propagation des maladies (Agriculture et agroalimentaire Canada, 1991).

En 2011, au Québec, 760 producteurs ont produit 1,7 milliard de poulets totalisant 380 millions de kg de viande. Au Canada, il a été consommé, en moyenne durant les 5 dernières années, 31,1 kg de poulet par personne. Un poulet entier au Canada coûte en moyenne 6,64 \$ le kg (EVQ, 2012).

En 2009, au Canada, on comptait 2 768 producteurs de poulet enregistrés qui ont produit 1,01 milliard de kg de viande, dont 60 % ont été produits en Ontario et au Québec. La même année, 147 millions de kg ont été exportés vers 100 pays dont les États-Unis, les Philippines et Hong Kong (Canada, 2012). Aux États-Unis, une nouvelle réglementation est entrée en vigueur en 2011, établissant la contamination maximale par *C. jejuni* des carcasses d'un lot de poulet à 10,4% (8 carcasses positives sur 51) (FSIS, 2011). Étant donné le haut volume de production, chaque économie sur les coûts de production, aussi minime soit-elle, engendre des profits importants. Par exemple, au Québec, une économie de 0,01 \$ le kg engendrerait une économie globale de 0,01 \$ X 380 millions de kg soit 3,8 millions \$.

1.2.1.2 Élevage biologique

En plus de l'élevage commercial conventionnel, il est possible d'élever du poulet biologique. Le terme « biologique » est une appellation contrôlée régie par le Conseil des appellations réservées et des termes valorisants du Québec (CARTV). Le CARTV est chargé d'accréditer les organismes responsables de la certification biologique. Au Québec, six organismes sont accrédités. Le CARTV répertorie également toutes les productions biologiques du Québec. Au Québec, l'élevage biologique du poulet est marginal: en 2012, 11 producteurs étaient certifiés (CARTV, 2012).

Au Canada, l'élevage biologique comporte des normes strictes, dont la dernière mise à jour a été effectuée en 2011. Sept principes généraux s'appliquent à toute agriculture biologique: 1) protéger l'environnement, minimiser la dégradation et l'érosion du sol, réduire la pollution, optimiser la productivité biologique et promouvoir un bon état de santé, 2) maintenir la fertilité du sol à long terme en favorisant les conditions propices à son activité biologique, 3) maintenir la diversité biologique à l'intérieur d'un écosystème, 4) recycler les matériaux et les ressources le plus possible à l'intérieur de l'écosystème, 5) soigner adéquatement les animaux d'élevage de manière à promouvoir leur santé et répondre à leur besoin comportemental, 6) préparer les produits biologiques, en étant attentif aux méthodes de transformation et de manipulation, afin de maintenir l'intégrité biologique et les qualités essentielles du produit à tous les stades de production et 7) s'appuyer sur des ressources renouvelables dans les systèmes agricoles organisés localement.

Certaines normes particulières s'appliquent aux élevages biologiques d'animaux. Entre autres, tous les animaux doivent avoir accès à l'extérieur lorsque les conditions climatiques le permettent. La gestion des animaux doit faire appel à des méthodes d'élevage naturelles, doit minimiser le stress, prévenir les maladies, éliminer progressivement le recours aux médicaments allopathiques chimiques d'usage vétérinaire (y compris les antibiotiques) et préserver la santé et le bien-être des animaux.

L'alimentation des poulets biologiques doit être elle aussi biologique. En cas de maladie ou de traumatismes, les animaux doivent être traités rapidement, mais sans antibiotiques. La vaccination est possible si elle est le seul moyen efficace de protéger les animaux. Dans le cas où les méthodes de traitements biologiques échouent, un traitement avec des antibiotiques doit être réalisé et l'animal identifié comme « non biologique » puis mis en quarantaine. Lors d'usage d'antibiotiques, la période de retrait doit être doublée. Tout comme pour l'élevage conventionnel, il est interdit d'envoyer des animaux malades à l'abattoir pour consommation humaine. Les bâtiments doivent être vidés, nettoyés, désinfectés et les aires d'exercices laissées vacantes pour permettre à la végétation de repousser entre les élevages successifs. La description complète des normes d'élevage biologique au Canada est accessible au: <http://www.tpsgc-pwgsc.gc.ca/ongc-cgsb/programme-program/norms-standards/internet/bio-org/documents/032-0310-2008-fra.pdf>.

1.2.2 Physiologie générale du poulet

C. jejuni colonise principalement le caecum des poulets. Afin de bien comprendre les mécanismes de colonisation de l'oiseau par *C. jejuni*, il est important de posséder un minimum de connaissances sur la physiologie digestive de cet hôte. Le caecum est un organe en forme de poches situées à la fin du tractus digestif. Il se remplit de matières fécales de manière rétrograde à partir du cloaque. Le transit intestinal total chez la poule est d'environ 4 h à 12 h. Le caecum sert à la digestion finale de certains sucres complexes, possède des fonctions immunologiques (amygdales à l'entrée du caecum) et participe à l'équilibre hydrique et minéral du poulet.

Le caecum est divisé en trois parties: proximale, médiane et distale. L'absorption du glucose est possible dans le caecum et la cellulose y est digérée à 17 %. On y retrouve également des protéines de faible digestibilité qui y sont brisées par de l'acide urique et des protéases. Les acides aminés qui y sont absorbés sont principalement la proline, leucine, phénylalanine, glycyl-sarcosine et la méthionine. La microflore locale y synthétise les

vitamines du groupe B. On retrouve dans le caecum des acides gras à courte chaîne (prédominance de l'acide acétique) concentrés de 70 à 100 nmol/ml qui y sont également absorbés. On y voit une absorption de l'eau, des ions sodium et de l'acétate. Il y a aussi la sécrétion d'ions potassium. Le pH du caecum est variable entre 6 à 8.

Plusieurs organes assurent la réponse immunologique chez le poulet. Le thymus est l'organe d'origine des cellules T, des macrophages et des cellules dendritiques avant l'éclosion de l'œuf. Après l'éclosion, le thymus est colonisé par les lymphocytes B et les plasmocytes. Il se gorge de graisse avec le temps jusqu'à la maturation sexuelle pour ensuite disparaître. La bourse de Fabricius est une poche dorsale près du cloaque. Elle est composée de cellules épithéliales associées à des follicules lymphoïdes. Cet organe régresse également avec l'âge. Les tissus lymphoïdes associés au tube digestif (GALT) sont bien développés chez les oiseaux. Le GALT comprend les amygdales caecales, le diverticule de Meckel, les plaques de Peyer, les nodules pariétaux et viscéraux de l'intestin grêle et de la bourse de Fabricius. Les amygdales caecales sont des sacs ovoïdes situés dans la région proximale du caecum. Leur diamètre est d'environ 4 mm à 18 mm. C'est l'organe le plus concentré en lymphocytes T et B, lesquels se développent selon la stimulation antigénique. Les amygdales sont constamment exposées au contenu intestinal. Il ne faut pas non plus négliger les anticorps maternels de la poule, soit des IgY (dans les publications, on emploie souvent IgG pour parler de IgY) acquis par le poussin via le vitellus. Ils sont retrouvés dans la circulation sanguine jusqu'à trois semaines d'âge (Metcalfé et Bell, 1971).

1.2.3 *Campylobacter jejuni* en élevage de poulet

C. jejuni ne cause pas de symptômes chez les poulets colonisés (Ahmed et coll., 2002, Dhillon et coll., 2006). Le pathogène alimentaire est isolé des poulets rarement avant deux semaines d'âge. Selon certaines hypothèses, ceci pourrait être dû à la présence d'anticorps maternels (Sahin et coll., 2001) ou à la microflore immature des poussins (Laisney et coll., 2004). Les anticorps maternels peuvent reconnaître certaines protéines de *C. jejuni* (Cawthraw et Newell, 2010). À trois semaines d'âge, des anticorps dirigés

principalement contre le flagelle du pathogène sont présents dans le sérum des oiseaux colonisés (Coward et coll., 2008, Stern, 2008).

Il a été démontré qu'aussi peu que 35 UFC/animal (Stern et coll., 1988) sont requises pour coloniser un oiseau et que la colonisation est complétée en moins de 24 heures (Coward et coll., 2008). La bactérie peut être retrouvée dans les organes internes et le caeca d'oiseaux de un jour d'âge une heure après l'ingestion de 10^6 UFC de *C. jejuni* (Cox et coll., 2005). En moyenne, 10^6 *C. jejuni* sont retrouvées par g de matière fécale lors de la colonisation de la muqueuse des cryptes du caecum des poulets. La majorité des poulets d'un lot colonisé sont positifs pour *C. jejuni* et peuvent l'être jusqu'à l'abattage (Coward et coll., 2008, Stern, 2008). L'état de santé général des oiseaux peut jouer un rôle sur la colonisation des poulets. En effet, dans une étude, des lots positifs pour *C. jejuni* ont été associés avec des niveaux de rejet des carcasses à l'abattoir dus à des infections plus élevés que la moyenne (Bull et coll., 2008).

Dans un même élevage, *C. jejuni* est hautement clonal avec peu de génotypes présents (Nadeau et coll., 2002, Normand et coll., 2008, Gripp et coll., 2011). Il existe des différences relatives de pouvoir de colonisation du poulet de diverses souches de *C. jejuni* (Konkel et coll., 2007, Calderon-Gomez et coll., 2009). Le passage de certaines souches dans le poulet peut accroître leur potentiel de colonisation et contribuer à l'augmentation de la diversité génétique de la population de *C. jejuni* (Stern et coll., 1988, Sang et coll., 1989, Cawthraw et coll., 1996, Ringoir et Korolik, 2003, Ridley et coll., 2008, Hanel et coll., 2009). De plus, des variants d'un même clone (obtenus lors de la congélation d'une souche) peuvent posséder une capacité différente de colonisation des oiseaux (Ridley et coll., 2008). La contamination d'un élevage peut être faite par une souche persistante dans l'environnement de la ferme (Kudirkiene et coll., 2010), mais ceci n'est pas toujours le cas puisque plusieurs études démontrent le contraire (Ellerbroek et coll., 2010, Elvers et coll., 2011, Perez-Boto et coll., 2012a).

Les souches présentes dans un élevage peuvent se retrouver sur les carcasses et dans les produits finis (Ellerbroek et coll., 2010). La prévalence des élevages positifs peut dépendre de la région où ils sont situés (EFSA, 2011). Au Canada, peu de données sont disponibles sur la prévalence des élevages positifs pour *C. jejuni*. Une étude est en cours de réalisation pour pallier ce manque d'informations (ACIA, communication personnelle). Au Québec, en 2007, une étude a évalué que 35 % des lots de poulets échantillonnés à l'abattoir étaient porteurs de *Campylobacter* (Arsenault et coll., 2007). En Europe, en 2008, l'EFSA (26 états membres et 2 non-membres) rapporte qu'en moyenne 40 % des élevages de poulets sont positifs pour *C. jejuni*. Selon les états, la prévalence variait de 2 % (Estonie) à 100 % (Luxembourg) (EFSA, 2011). Quelques autres études de prévalence sont résumées dans le Tableau IV.

Tableau IV: Études de prévalence d'élevages positifs pour *Campylobacter* sp.

Pays	Années	Type d'échantillons	Prévalence (%)	Référence
Pays-Bas	2002	Caecum abattoir	25	(van Asselt et coll., 2008)
	2003	Caecum abattoir	20	
	2004	Caecum abattoir	23	
	2005	Caecum abattoir	31	
Canada (Québec)	2007	Caecum abattoir	35	(Arsenault et coll., 2007)
France	2000	Fientes fraîches	43	(Refregier-Petton et coll., 2001)
Tanzanie	2003-2004	Écouvillons cloacaux	70	(Mdegela et coll., 2006)
Islande	2001-2004	Échantillons composites caecaux	27	(Guerin et coll., 2007)
	1997-2000	Échantillons composites caecaux	26	
République tchèque	2006	Écouvillons cloacaux	49	(Bardon et coll., 2009)
	2007	Écouvillons cloacaux	45	
Île de la Réunion	2007-2009	Fientes fraîches	54 (30 % <i>C. coli</i> , 17 % <i>C. jejuni</i> , 7% <i>C. coli</i> + <i>jejuni</i>)	(Henry et coll., 2011)
Sénégal	2000-2001	Fientes fraîches	63	(Cardinale et coll., 2004)
Royaume-Uni	2007-2009		79	(Lawes et coll., 2012)

1.2.4 Facteurs de risque associés à la contamination de la ferme

La colonisation des poulets par *C. jejuni* peut être favorisée par certaines pratiques ou certains facteurs reliés à l'élevage. De nombreuses études ont observé différents facteurs pouvant affecter la présence de *C. jejuni* à la ferme. Leurs observations sont compilées et résumées dans le tableau suivant.

Tableau V: Facteurs de risque associés à la contamination des fermes de poulet par *Campylobacter* sp.

Facteur de risque	Références
Densité d'oiseau élevée	(Barrios et coll., 2006, Arsenault et coll., 2007, Nather et coll., 2009)
Âge des oiseaux élevé	(Evans et Sayers, 2000, Barrios et coll., 2006, Arsenault et coll., 2007, McDowell et coll., 2008, EFSA, 2011, Lawes et coll., 2012)
Courte distance de la fosse à lisier	(Arsenault et coll., 2007)
Précipitations moyennes élevée dans le mois d'abattage	(Rushton et coll., 2009)
Température moyenne élevée du mois d'abattage	(Rushton et coll., 2009)
Grand nombre de bâtiments sur la ferme	(Bouwknegt et coll., 2004, Lyngstad et coll., 2008, McDowell et coll., 2008, Henry et coll., 2011)
Autre production animale sur la ferme	(Bouwknegt et coll., 2004, Cardinale et coll., 2004, EFSA, 2011)
Pauvre biosécurité/hygiène	(Cardinale et coll., 2004, Guerin et coll., 2007, McDowell et coll., 2008), (Evans et Sayers,

	2000, EFSA, 2011, Henry et coll., 2011)
Présence de vermine	(McDowell et coll., 2008, EFSA, 2011)
Présence d'une ferme porcine à moins de 2 km	(Bouwknegt et coll., 2004, Lyngstad et coll., 2008)
Saison (été-automne)	(Bouwknegt et coll., 2004, McDowell et coll., 2008, Lawes et coll., 2012), (EFSA, 2011)
Ventilation verticale de la ferme	(Guerin et coll., 2007, Rushton et coll., 2009)
Source de l'eau: puits de surface, puits privés	(Guerin et coll., 2007, Lyngstad et coll., 2008, Nather et coll., 2009, EFSA, 2011)
Association à des travailleurs sur la ferme	(Arsenault et coll., 2007, Lyngstad et coll., 2008, EFSA, 2011)
Ferme biologique ou poulets ayant accès à l'extérieur	(Nather et coll., 2009)
Dépeuplement	(EFSA, 2011, Lawes et coll., 2012)
Mortalité élevée des poulets	(Lawes et coll., 2012)

Les insectes sont des vecteurs potentiels de *Campylobacter* dans les élevages commerciaux. La colonisation d'oiseaux suite à l'exposition d'insectes porteurs de *C. jejuni* a été observé (Hazeleger et coll., 2008). Les mouches domestiques ont été identifiées comme vecteurs de *C. jejuni* sur de courtes distances (Skovgard et coll., 2011). *C. jejuni* est également capable de survivre à l'intérieur des cellules de *Galleria mellonella* (Fausse teigne de la cire). Ces larves pourraient être utilisées pour étudier la virulence des souches de *C. jejuni* (Senior et coll., 2011). Les protozoaires pourraient jouer un rôle important dans l'introduction de *C. jejuni* dans les élevages. Il a été observé que *C. jejuni* pouvait être ingéré et survivre à l'intérieur de *Amoeba* (Axelsson-Olsson et coll., 2005), que ceci augmenterait sa tolérance au stress (chloration, pH, dessiccation) (Axelsson-Olsson et coll., 2010). De plus, des amibes infectées par *C. jejuni* pourraient servir de vecteurs et transmettre la bactérie au poulet (Snelling et coll., 2008).

Les oiseaux ayant accès à l'extérieur sont plus susceptibles d'être colonisés par *C. jejuni*. Les poulets élevés sous l'appellation contrôlée « biologiques » sont souvent colonisés; jusqu'à 100 % des élevages peuvent être positifs (Heuer et coll., 2001). Ceci est plus élevé que ce qui est observé dans les levages conventionnels (Young et coll., 2009). Par contre, le taux de contamination des carcasses de poulets biologiques serait le même que celui des carcasses de poulets conventionnels (Van Overbeke et coll., Young et coll., 2009).

1.3 Facteurs bactériens de colonisation du poulet

En plus des pratiques d'élevage, plusieurs facteurs bactériens contribuent à la colonisation des oiseaux par *C. jejuni*. Les facteurs de colonisation les plus importants sont répertoriés dans les pages suivantes. La compréhension des mécanismes d'implantation et de persistance des diverses souches de *C. jejuni* dans le poulet est essentielle au développement d'une stratégie de contrôle durable de ce pathogène à la ferme.

1.3.1 Pompes à efflux, transport des nutriments et métabolisme

Les pompes à efflux de *C. jejuni* ont déjà été abordées dans le chapitre sur l'antibiorésistance. Telles que mentionné, ces dernières peuvent rejeter à l'extérieur de la bactérie non seulement les antibiotiques, mais également des composés biocides tels les sels biliaries.

Des études ont démontré que l'inhibition de la pompe *cmeABC* chez *C. jejuni* a diminué sa capacité de colonisation des oiseaux (Lin et Martinez, 2006, Quinn et coll., 2007). Cette pompe est régulée par la protéine *CmeR* (Lin et coll., 2002) dont la mutation a également atténué la colonisation (Guo et coll., 2008). Chez *E. coli*, le zinc est utilisé en quantité infime comme cofacteur pour plus de 300 enzymes. Cet apport est assuré par une pompe ABC. Un orthologue de la protéine *ZnuA* d'*E. coli* (chaperonne périplasmique) est retrouvé chez *C. jejuni*. Dans un modèle expérimental de colonisation, les souches de *C.*

jejuni mutantes pour le gène *znuA* n'ont pas été isolées 7 jours post-inoculation de poussins nouvellement éclos (Davis et coll., 2009).

Certains gènes ayant une fonction métabolique chez *C. jejuni* semblent également importants pour la colonisation des poulets. La protéine Cj0415 possède une activité GADH (gluconate déshydrogénase) dont l'expression est plus élevée à 41 °C qu'à 37 °C. Un mutant pour ce gène était déficient pour la colonisation des oiseaux, 5 jours après inoculation de poulets d'un jour d'âge, tandis qu'il s'implantait bien chez la souris (Pajaniappan et coll., 2008). Une enzyme, la γ -glutamyltranspeptidase, codée par le gène *ggt*, est non-essentielle pour la croissance *in vitro*, mais essentielle pour la colonisation persistante des oiseaux par *C. jejuni*. Lorsque cette enzyme n'était pas exprimée chez la souche 81116, les bactéries colonisaient normalement le caecum des poulets (après 5 jours), mais disparaissaient après 3 semaines d'élevage. De plus, cette protéine causerait l'apoptose chez les cellules épithéliales CCD 841 CoN. Cette enzyme n'est toutefois pas présente chez tous les isolats de *C. jejuni* (Barnes et coll., 2007).

L'oxydation du succinate en fumarate dans le cycle des acides tricarboxyliques est assurée par la succinate déshydrogénase (*Frd*), laquelle est importante pour la colonisation des oiseaux chez *C. jejuni* (Weingarten et coll., 2008). Plusieurs enzymes associées au transport d'électron et donc à la respiration sont également importantes pour la colonisation du poulet: hydrogénase (*Hyd*), formate déshydrogénase (*Fdh*), nitrate réductase, nitrite réductase, *cbb3*-type cytochrome c oxydoréductase et un homologue de la gluconate déshydrogénase non impliquée dans le métabolisme du glucose, mais plutôt dans l'utilisation du gluconate comme donneur d'électron (Pajaniappan et coll., 2008, Weingarten et coll., 2008, Weerakoon et coll., 2009).

Le fer est un élément essentiel au métabolisme microbien. Les noyaux hème fer-porphyrines sont impliqués dans les mécanismes de la respiration aérobie, du transport des électrons et de la réduction des peroxydes. Les protéines fer-souffre sont impliquées dans le transport des électrons, dans la respiration anaérobie, dans le métabolisme des

acides aminés et dans le métabolisme énergétique en général. Le fer est aussi utilisé lors de la synthèse d'ADN et dans la protection contre les radicaux superoxydes. Le fer en trop grande quantité dans les cellules bactériennes peut générer des molécules toxiques telles que des ROS, O_2^- , RO_2 et radicaux OH. L'acquisition du fer doit donc être très bien régulée. Le fer ferreux, Fe^{2+} , est déjà accessible aux bactéries et est incorporé facilement par des systèmes de transport du fer. Le fer ferrique, Fe^{3+} , est insoluble et donc non disponible pour les microorganismes. Ces derniers doivent employer d'autres stratégies pour tirer parti de cette source de fer (van Vliet et coll., 2002). Chez *C. jejuni*, des souches contenant des mutations dans le régulateur de l'acquisition du Fe^{3+} (*fur*), des gènes *cfrA* et *cfrB* (récepteurs membranaires pour l'entérobactine), du gène *cj0178* (récepteur transferrine possible) et du gène *ceuE* (protéine périplasmique liant l'entérobactine) étaient déficients pour la colonisation du poulet (Palyada et coll., 2004, Xu et coll., 2010).

1.3.2 Lipooligosaccharide et capsule

Le lipopolysaccharide des bactéries Gram négatif est composé d'un antigène O (polysaccharide) rattaché à un cœur oligosaccharidique et au lipide A. *C. jejuni* possède un LPS modifié: le polysaccharide n'y est pas attaché, mais forme plutôt une capsule. Le LPS de *C. jejuni* est donc plutôt un lipooligosaccharide (LOS) (Karlyshev et coll., 2000). Le LOS est codé par des gènes hypervariables (Parkhill et coll., 2000). La perte de la protéine Cj1136 crée un LOS tronqué. Cette dernière protéine est importante pour la colonisation des oiseaux (Javed et coll., 2012). Les souches mutantes pour les gènes *kpsE* et *kpsM* ne sont pas capsulées. La mutation de *kpsM* a abolit la colonisation (Jones et coll., 2004) alors que la mutation de *kpsE* n'a fait que la diminuer (Bachtiar et coll., 2007). La capsule est également importante pour la résistance aux phages. Par exemple, la co-inoculation de la souche NCTC1168 et du phage F336 permet la sélection de variants de la souche NCTC11168 résistant au phage dont la capsule est légèrement modifiée (Sorensen et coll., 2011).

1.3.3 Glycosylation

La glycosylation a été abordée dans un chapitre précédent. Les protéines glycosylées jouent un rôle important dans la colonisation des poulets. Dans le modèle de colonisation à 1 jour d'âge, la perte de la protéine glycosylée Cj1496c a diminué la capacité de colonisation de *C. jejuni* d'environ 1,5 log et a augmenté la dose nécessaire de 1 log (10^3 CFU pour la souche mutante comparativement à 10^4 CFU pour la souche mère) pour établir la colonisation et ceci 7 jours post-inoculation. Ceci pourrait être dû à un chimiotactisme modifié ou à une mauvaise adhésion des cellules épithéliales caecales (Kakuda et DiRita, 2006). Le système de glycosylation, codé dans l'opéron *pgl*, est également crucial pour la colonisation des poulets (Hendrixson et DiRita, 2004, Karlyshev et coll., 2004). Lorsque cet opéron est non fonctionnel, la dose minimale de *C. jejuni* nécessaire pour la colonisation d'un poulet (6 jours post inoculation) est plus grande d'environ 1 log. À haute dose, la colonisation est 4 à 6 fois moins efficace lorsque l'opéron *pgl* est non fonctionnel. La glycosylation serait important pour l'attachement des bactéries aux cellules intestinales aviaires ou au mucus lors de l'initiation de la colonisation (Karlyshev et coll., 2004). La glycosylation du flagelle est aussi importante pour la colonisation des oiseaux. En effet, la perte du gène *Cj1324*, compris dans un locus chargé de la O-glycosylation de la flagelline A et identifié comme étant plus prévalent chez les souches de *C. jejuni* isolées de poulets, diminue la capacité de *C. jejuni* à coloniser les oiseaux d'environ 1 log après 4 semaines de colonisation dans le modèle de 14 jours d'âge. La perte de cette protéine modifie la composition en acide legionaminique de la flagelline et diminue la capacité de *C. jejuni* d'autoagglutination ainsi que la charge électrique de la souche (Howard et coll., 2009)

1.3.4 Adhésines

Les adhésines sont des protéines responsables de la médiation de la première étape de la colonisation des poulets: soit l'adhésion aux cellules intestinales. La lipoprotéine capA, un auto-transporteur, fut identifiée *in silico* dans le génome séquencé de la souche NCTC11168. Lorsqu'absente, les souches ont un phénotype d'adhésion et d'invasion aux

cellules Caco-2 diminué. Lorsqu'utilisées dans un modèle d'infection de poulets de 1 jour d'âge, les bactéries déficientes en cette protéine ne colonisaient pas les poulets 3 semaines après l'infection. De plus, cette protéine ne semble pas se retrouver chez tous les *C. jejuni* (Ashgar et coll., 2007). Cependant, le rôle de la protéine CapA semble controversé puisqu'une autre étude a observé le contraire (Flanagan et coll., 2009). L'étude de Flanagan a utilisé une souche de terrain hyper invasive alors qu'Ashgar et coll., 2007 ont utilisés la souche contrôle séquencée NCTC11168 au pouvoir de colonisation du poulet limité, ce qui pourrait expliquer la divergence entre les résultats obtenus par les deux auteurs.

La protéine CadF lie la fibronectine et est essentielle pour la colonisation des poulets (Ziprin et coll., 1999). La protéine PldA, une phospholipase, est également importante pour la colonisation de poulet (Ziprin et coll., 2001a) bien qu'elle ne soit pas retrouvée chez toutes les souches de *C. jejuni* (Hanning et coll., 2010). La protéine PorA, précédemment identifiée comme MOMP (major outer membrane protein), est une porine également associée à la colonisation du poulet (Hiatt et coll., 2008). Le gène codant pour cette porine est très variable; 196 variants peptidiques sur 576 souches séquencées ont déjà été identifiés chez *C. jejuni* et *C. coli* (Cody et coll., 2009).

Malgré leur rôle suggéré comme adhésine, les protéines PorA, JlpA (lipoprotéine A de surface) et Peb1 (Peb 1 est une adhésine impliquée dans la colonisation de la souris et aussi associée au transport du glutamate et de l'aspartate (Leon-Kempis Mdel et coll., Pei et Blaser, 1993)) ne semblaient pas influencer l'adhésion de *C. jejuni* aux cellules épithéliales LMH hépatocellulaire de carcinome (LMH hepatocellular carcinoma epithelial cells). Dans cette même étude, les protéines CapA, JlpA, PorA et Cj1349c (Cj1349 est une adhésine potentielle contenant un domaine de liaison à la fibronectine (Flanagan et coll., 2009)) n'avaient pas d'influence dans la colonisation de poulets de 1 jour d'âge. Seule la protéine Cj1279 (FlpA) était importante dans les deux modèles (Flanagan et coll., 2009). Les flagellines (voir section 1.3.7) sont également impliquées dans l'adhésion (Hendrixson et DiRita, 2004).

1.3.5 Résistance au stress

La résistance au stress permet à *C. jejuni* de survivre dans des conditions adverses. *C. jejuni* peut rencontrer des molécules oxydatives très puissantes (H_2O_2 , O_2^- et radical OH), soit par le résultat de son propre métabolisme ou via le système immunitaire de son hôte. Chez *C. jejuni*, des protéines sont chargées de la détoxification de ces molécules.

La résistance au stress oxydatif est assurée chez *C. jejuni* par KatA (catalase), AhpC (alkyl-hydroperoxyde réductase), SodB (superoxyde dismutase), Cft (ferritine), FdxA (ferrédoxine) et Dps (DNA-binding protein from starved cells) (van Vliet et coll., 2002). Les protéines KatA, SodB et AhpC sont importantes pour la colonisation de l'intestin des poulets (Palyada et coll., 2009). Normalement, la résistance au peroxyde est aussi médiée par les oxydases du cytochrome c. Certaines protéines, DocA et Cj0382, appartenant à cette famille, ne semblent pas responsables directement de la résistance au peroxyde chez *C. jejuni*, mais sont importantes pour la colonisation du poulet (Bingham-Ramos et Hendrixson, 2008). La résistance au stress oxydatif est régulée par *perR* qui est aussi important pour la colonisation (Palyada et coll., 2009).

Les polyphosphates jouent des rôles clefs dans le métabolisme bactérien: réservoir de phosphate et d'énergie, chélateur de métaux, capsule et tampon. Les polyphosphates kinases sont responsables de leur formation. Ces protéines sont retrouvées chez la majorité des bactéries. Pour *C. jejuni*, elles sont impliquées dans la réponse au stress et la colonisation des poulets (Gangaiah et coll., 2010).

Le système TAT (twin arginine translocase, *tatABC*) est un complexe protéique périplasmidique qui transporte les protéines possédant une séquence signal d'arginine jumelle en N-terminale (N-terminal twin-arginine translocase signal sequence) à travers la membrane bactérienne et qui possède aussi ses propres chaperonnes. Le système TAT est impliqué dans la respiration (intégration des enzymes du système de transport des électrons à la membrane cytoplasmique), la genèse de la membrane bactérienne, la formation de biofilm et l'homéostasie des métaux (Hitchcock et coll., 2010). Chez *C. jejuni*, ce système

est important pour la respiration, la réponse au stress créé par les dérivés actifs d'azote (Hitchcock et coll., 2010) la formation de biofilm, la motilité/flagelle, la susceptibilité aux antimicrobiens, le stress oxydatif, le stress osmotique et la colonisation des oiseaux (Rajashekara et coll., 2009).

La protéine DnaJ appartient à la famille des protéines du choc à la chaleur (heat shock protein). La perte de cette protéine a diminué drastiquement la colonisation des poussins (Konkel et coll., 1998, Ziprin et coll., 2001b).

1.3.6 Système de régulation

Un système de régulation à deux composantes est constitué de protéines capables de détecter certaines modifications environnementales et par la suite de relayer ce signal pour permettre une adaptation de la bactérie (Hermans et coll., 2011b). Le signal est capté par une histidine kinase qui phosphoryle un régulateur liant l'ADN (Svensson et coll., 2009).

Plusieurs systèmes de régulation à deux composantes ont été identifiés chez *C. jejuni* et ils sont tous importants pour la colonisation intestinale du poulet: le système RacRS (reduce ability to colonise) qui est température dépendante (Bras et coll., 1999), CbrR (*Campylobacter* bile resistance regulator) qui semble associé à la résistance aux sels biliaires (Raphael et coll., 2005), FlgRS qui régule l'appareil flagellaire (Wosten et coll., 2004, Joslin et Hendrixson, 2009), DccRS (diminished capacity to colonize) qui influence la présence de plusieurs protéines cytoplasmiques et périplasmiques (MacKichan et coll., 2004) et CprRS (*Campylobacter* planktonic growth regulation) qui influence la formation de biofilms et la tolérance au stress (Svensson et coll., 2009).

1.3.7 Motilité et chimiotactisme

C. jejuni est uni-flagellé ou possède un flagelle à chacun de ses pôles. Les flagelles sont vitaux pour *C. jejuni*: colonisation, virulence, sécrétion, adhésion et invasion.

Deux flagellines majeures sont présentes chez *C. jejuni*: FlaA et FlaB. La protéine FlaA est essentielle pour la colonisation des oiseaux (Wassenaar et coll., 1993, Jones et coll., 2004). L'appareil flagellaire est régulé par deux facteurs sigma: σ^{54} , codé par le gène *rpoN* et σ^{28} , codé par le gène *fliA*. L'expression du facteur σ^{28} régule le gène *flaA* tandis que le facteur σ^{54} régule *flaB* (Hendrixson et coll., 2001). La mutation des deux facteurs sigma retrouvés chez *C. jejuni* a diminué la colonisation des oiseaux après 7 jours d'infection de poulets de 1 jour d'âge (Fernando et coll., 2007). Un système à deux composantes hypervariable, FlgRS, est également impliqué dans la régulation de l'appareil flagellaire et la colonisation des oiseaux (Young et coll., 2007). Le flagelle possède des glycoprotéines fortement reconnues par la réponse immunitaire (Zilbauer et coll., 2008). La glycosylation du flagelle (ajout de sucres: acide pseudaminique, acide legionaminique forme acétadiminé et leurs dérivés) est différente de souches en souches (Logan et coll., 2002, Logan et coll., 2009) et joue un rôle important pour la filamentation du flagelle et le maintien de son intégrité (Thibault et coll., 2001, Guerry et coll., 2006). Les gènes codant pour cette glycosylation (Pse) sont situés près de ceux codant pour les composantes du flagelle, dans une région hypervariable du génome de *C. jejuni* (Taboada et coll., 2004). La glycosylation du flagelle est indépendante de sa synthèse malgré la proximité des gènes impliqués dans chacun des systèmes respectifs (Ewing et coll., 2009). Cette O-glycosylation est importante pour la motilité, l'autoagglutination et la colonisation du poulet (Ewing et coll., 2009, Howard et coll., 2009).

L'appareil flagellaire est responsable de la sécrétion de plusieurs protéines, dont les protéines Cia (Zilbauer et coll., 2008). Ces dernières sont impliquées au niveau de l'invasion des cellules épithéliales par les bactéries (Christensen et coll., 2009). Elles semblent directement sécrétées à l'intérieur du cytoplasme des cellules cibles, malgré qu'aucun système de sécrétion de type 3 n'a été identifié chez *C. jejuni* (Biswas et coll., 2007, Young et coll., 2007). Les souches délétées du gène *flaA* ne sécrétaient pas les protéines Cia et colonisaient moins bien le poulet (Biswas et coll., 2007). *In vitro*, les protéines Cia (environ 14) sont sécrétées par certaines souches de *C. jejuni* lorsqu'elles sont

en contact avec du mucus de poulet, du sérum de poulet ou du sérum de bœuf (Biswas et coll., 2007).

Le chimiotactisme se manifeste par la capacité d'une bactérie de reconnaître un gradient de concentration d'une molécule pour ensuite se diriger vers la source ou s'en éloigner. Plusieurs molécules sont chimioattractantes pour *C. jejuni*: L-glutamate, L-glutamine, L-sérine, L-aspartate, L-cystéine, α -kétoglutamate, pyruvate, succinate, fumarate, citrate, malate, L-fucose, L-asparagine, formate, D-lactate, la mucine et le mucus (Hugdahl et coll., 1988, Vegge et coll., 2009).

Le transfert du signal de reconnaissance d'une molécule par les récepteurs du système de chimiotactisme est relayé au flagelle d'une manière similaire à ce qui est décrit pour *E. coli*. En l'absence de signal, la protéine CheY est liée au récepteur via une histidine kinase, CheA, elle-même reliée au récepteur par un complexe CheV-CheW. Lorsque le récepteur est modulé, CheA ajoute un phosphate à CheY. L'affinité de CheY pour CheA diminue, ce qui libère CheY. L'affinité de CheY pour la protéine de l'interrupteur du moteur flagellaire, FliM, augmente. Le lien CheY-FliM, change l'orientation de la rotation du flagelle. Après un certain délai, CheY lie CheZ qui enlève le phosphate de CheY, ce qui termine le signal. CheY se dissocie de FliM ce qui recharge l'orientation du mouvement du flagelle. CheB, méthyl estérase, diminue l'activation du récepteur alors que CheR (méthyl transférase) l'augmente (Hazelbauer et coll., 2008, Irving Nachamkin, 2008, Kanungpean et coll., 2011b). Le chimiotactisme est essentiel pour la colonisation des oiseaux (Hendrixson et DiRita, 2004).

Dans une étude récente, la mutation de *cheB* diminuait la capacité d'adhésion et d'invasion de *C. jejuni* aux cellules épithéliales tandis que la mutation de *cheR* avait l'effet inverse. La délétion des deux protéines a diminué grandement la capacité des souches de coloniser les oiseaux (Kanungpean et coll., 2011b). Le chimiotactisme est influencé par le gène *luxS* du quorum sensing. La mutation de ce gène a diminué l'autoagglutination et la motilité des souches sans toutefois changer la quantité totale de flagelline A et la structure

du flagelle (Jeon et coll., 2003). Il a été démontré que cette protéine contribuait à la colonisation des poulets (Quinones et coll., 2009).

Il existe plusieurs récepteurs pour le chimiotactisme chez *C. jejuni*; 10 classiques et 2 aéro-tactiques (CetA et CetB). Ces récepteurs sont nommés tlp (transducer-like protein). Le groupe A est formé des récepteurs 1 (CJ1506), 2 (cj0144), 4 (CJ0262 ou DocC), 7 et 10 (CJ0019 ou DocB) qui lient les molécules à l'extérieur de la bactérie grâce à leur domaine périplasmique et transmembranaire. Le groupe B comprend uniquement un récepteur, CetA, qui interagit avec CetB. CetA participe à l'invasion des cellules épithéliales par *C. jejuni* alors que CetB n'y est pas impliqué (Elliott et Dirita, 2008). Le groupe C comprend 3 récepteurs (5, 6 et 8) chargés de la détection de signaux cytoplasmiques (Marchant et coll., 2002). Le récepteur pour l'aspartate se nomme Cj1506c ou CcaA. Sa mutation entraîne une augmentation de l'adhésion et de l'invasion. Les gènes Cj0951c et Cj0952c forment le récepteur 7 liant l'acide formique. Ce récepteur est important pour l'invasion des cellules et la motilité de *C. jejuni*. Leur perte modifie la réponse chimiotactique de *C. jejuni* envers l'acide formique (Tareen et coll., 2010). Tlp1 lie l'aspartate (Hartley-Tassell et coll., 2010), son absence entraîne une augmentation de l'adhésion des bactéries *in vitro*, mais une diminution de leur capacité à coloniser le poulet (Hartley-Tassell et coll., 2010). La mutation des gènes codant pour Tlp1, 3 (Cj15564), 4 et 10 ne modifie pas le chimiotactisme, mais diminue l'invasion des cellules humaines épithéliales. La plupart des molécules pour lesquelles un chimiotactisme positif a été observé sont aussi utilisés comme source d'énergie par *C. jejuni*. Conséquemment, le blocage de la respiration des bactéries diminue grandement le chimiotactisme. Le chimiotactisme de *C. jejuni* serait donc principalement lié à la demande en énergie de la bactérie guidant la bactérie vers la niche la plus confortable pour son établissement (Vegge et coll., 2009).

Le chimiotactisme peut également être utilisé pour augmenter le taux d'isolement de *C. jejuni*. Brièvement, un échantillon contenant les bactéries est concentré et déposé sur une membrane de 0,45 µm qui est déposée sur un milieu de culture sélectif contenant un

attractant pour *C. jejuni*. L'utilisation de bile et de mucine est efficace dans ce protocole (Wisessombat et coll., 2010).

La vérification de la capacité de chimiotactisme pour *C. jejuni* se fait principalement en incorporant une suspension de bactéries dans de l'agar mou qui est immédiatement mise dans un Pétri auquel on ajoute à la surface, avant que l'agar ne fige, des morceaux d'agar durs ou des disques de papier contenant les molécules dont le pouvoir chimiotactique est à analyser. Après incubation, le diamètre de migration des bactéries autour des disques est mesuré pour apprécier le chimiotactisme. Dernièrement, il a été suggéré que ce test, dont la lecture est très ardue, pouvait donner des résultats faussement positifs (Kanungpean et coll., 2011a).

1.3.8 Autoagglutination

L'autoagglutination est la capacité qu'ont les bactéries à former des agrégats à l'aide de liaisons bactéries-bactéries (Misawa et Blaser, 2000). Les *C. jejuni* déficients pour l'autoagglutination peuvent l'être également pour l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales (Golden, 2002, Guerry et coll., 2006). La flagelline A du flagelle semble être nécessaire mais non suffisante pour ce phénotype (Golden, 2002).

Les premiers essais d'autoagglutination pour *C. jejuni* ont démontré une variabilité entre souches, optimale après 24 h de croissance des bactéries, indépendante de la température de croissance des souches et optimale lorsque mesurée dans du PBS. L'autoagglutination est sensible à la chaleur, à l'activité de la pronase et au traitement acide-glycine. L'autoagglutination n'est pas affectée par un traitement à la lipase. La motilité ne semble pas non plus nécessaire à l'autoagglutination bien que des mutants aflagellés ne sont pas capables d'autoagglutination (Misawa et Blaser, 2000). Au contraire, une très forte autoagglutination pourrait nuire à l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales (Hu et Kopecko, 1999).

La glycosylation du flagelle peut influencer l'autoagglutination. Certaines mutations qui modifient les acides aminés des protéines glycosylées diminuent l'autoagglutination (417A, S436A, S440A, S457A et T481A) sans toutefois affecter la motilité alors que d'autres (S425A, S454A et S460A) diminuent la motilité. Ces mutations ont un effet sur la création d'extensions filamenteuses du flagelle, les rendant plus fragiles ou créant une flagelline coupée (Ewing et coll., 2009). Lorsqu'on mute également les gènes responsables de la O-glycosylation, on obtient des mutants déficients pour l'autoagglutination (Guerry et coll., 2006).

Le locus de glycosylation du flagelle contient également des gènes riches en séquences homopolymériques (G-track) sujettes au « slip-strand mispairing ». Ceci permet à ces gènes d'être sujets à la variation de phase. Ces gènes sont nommés « maf » (Guerry et coll., 2006). Un de ces gènes, maf4, a été étudié plus en profondeur. Sa mutation n'entraîne pas de modification de l'assemblage du flagelle ni de la motilité. Par contre, un mutant pour ce gène contient un acide pseudaminique modifié et est retardé pour l'autoagglutination, mais ne l'est pas pour l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales (van Alphen et coll., 2008a).

L'autoagglutination implique des interactions protéines-protéines. Ainsi, tout facteur qui régule l'intégrité et le bon repliement des protéines peut également influencer l'autoagglutination. C'est le cas pour deux protéases régulatrices, Lon et ClpP, qui lorsqu'absente, diminuent l'autoagglutination ainsi que le chimiotactisme et l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales (Cohn et coll., 2007).

Les souches déficientes ou atténuées pour la colonisation du poulet le sont pour les phénotypes extrêmes (perte complète de l'autoagglutination et souvent de la motilité) réalisés par mutation en laboratoire. Aucune étude n'existe sur les souches atténuées qui proviennent d'isolats de champ.

1.3.9 Adhésion et invasion de culture cellulaire

Pour *C. jejuni*, la capacité d'invasion d'une monocouche de cellules est associée à sa capacité de coloniser les poulets; plus une souche est invasive, plus elle colonise le poulet (Pope et coll., 2007). Par contre, il est possible que les souches possédant des niveaux d'invasion *in vitro* différents colonisent au même niveau le caecum des poulets, mais ne soient pas retrouvées en même quantité dans le foie des oiseaux (Van Deun et coll., 2008b). De plus, si une souche hautement invasive est utilisée, en compétition avec une souche moins invasive, lors d'essais de colonisation du poulet, la souche plus invasive dominera l'autre (Pope et coll., 2007). Les phénotypes d'invasion et d'adhésion ne sont pas nécessairement corrélés (Hanel et coll., 2004, Zheng et coll., 2006, Hanel et coll., 2009, Poli et coll., 2012). La motilité est requise pour l'invasion (Novik et coll., 2010). La toxine CDT (cytolethal distending toxin) de *C. jejuni* n'est pas requise pour l'adhésion aux cellules épithéliales. Cependant, elle est associée à l'invasion des cellules HELA, mais pas à celle des cellules HD-11. La toxine CDT n'est pas impliquée dans la colonisation du poulet (Biwas 2006). Il y a corrélation entre le pouvoir cytotoxique d'une souche et sa capacité à envahir les cellules (Coote et coll., 2007).

L'adhésion permet à *C. jejuni* de former des microcolonies sur des tissus intestinaux prélevés d'humains, en présence de mucus. *C. jejuni* semble tout d'abord adhérer aux zones des tissus couverts de mucus. Les bactéries adhèrent ensuite les unes aux autres par ce qui semble être des interactions flagelle-flagelle. Le flagelle semble aussi impliqué au niveau du contact entre les cellules épithéliales et *C. jejuni*. Les microcolonies évoluent ensuite en biofilm. Ce phénomène semble plus important pour les tissus issus de l'iléon comparativement à ceux issus du colon (Haddock et coll., 2010). L'adhésion se ferait grâce à des interactions entre le flagelle de la bactérie et les microvillosités des cellules (Hu et coll., 2008).

Certaines souches de *C. jejuni* semblent incapables d'envahir des cultures cellulaires. Dans une étude, une souche de poulet était déficiente pour l'invasion de cellules

Caco-2 alors que deux autres souches isolées de cas humaines ont été envahissantes (Poli et coll., 2012). Les souches de champs, provenant de différents hôtes, n'ont pas toutes les mêmes capacités à adhérer ou envahir les cultures cellulaires (Hanel et coll., 2009).

Le pourcentage de *C. jejuni* adhérant à une culture cellulaire est généralement bas (environ 1 bactérie par cellule peu importe la multiplicité d'infection) et ce pourcentage est encore plus bas pour l'invasion (Hanel et coll., 2009). L'adhésion et l'invasion sont souche dépendante (Verhoeff-Bakkenes et coll., 2009). Les microtubules et la dynéine sont impliqués dans l'invasion (Hu et Kopecko, 1999, Kopecko et coll., 2001, Hu et coll., 2006). *C. jejuni* est capable d'envahir des cultures primaires de cellules intestinales humaines d'une manière dépendante des microtubules, des microfilaments et de la cavéoline (Byrne et coll., 2007). Le pathogène est également capable d'envahir et d'adhérer aux cellules primaires caecales de poulet dans un processus dépendant des microtubules. *C. jejuni* ne se réplique pas à l'intérieur des cellules (Van Deun et coll., 2008b).

Le mucus de poulet diminue la capacité de *C. jejuni* à infecter une culture de cellules épithéliales alors que le mucus d'origine humaine permet l'infection (Byrne et coll., 2007). Les mucines de poulet diminuent l'attachement de *C. jejuni* aux cellules HCT-8 selon la région intestinale d'où provient le mucus: le mucus récolté de l'iléon bloque l'adhésion à un niveau supérieur au mucus isolé du caecum (Alemka et coll., 2010).

L'absence d'une lignée cellulaire immortelle de cellules intestinales de poulet est un obstacle majeur pour la caractérisation des interactions entre *C. jejuni* et l'intestin du poulet (Hermans et coll., 2011b). Les essais d'adhésion et d'invasion recensés dans cette revue de la littérature ont été réalisés avec les lignées cellulaires suivantes: Int407, Caco-2, HT-29, fibroblastes de poulet, cellules primaires d'origine humaine ou d'origine aviaire, VERO, COS-7, T84, HCT-8, E12 et « chicken LMH hepatocellular carcinoma epithelial cells ».

1.3.10 Résumé des facteurs de colonisation

Il existe de nombreux facteurs de colonisation du poulet, mais pour l'instant, aucun facteur d'une importance absolue, donnant un avantage indéniable aux souches qui le possède, n'a été identifié. La distribution des gènes associés à la colonisation et leur variabilité génétique, dans les souches isolées de poulet, sont peu connues, si bien qu'il est difficile de définir quels gènes confèrent un avantage net aux souches qui les possèdent.

L'étude et la comparaison des facteurs de colonisation de *C. jejuni* sont ardues. Premièrement, l'absence de modèle de culture de cellules épithéliales intestinales de poulet force les expérimentateurs à utiliser des lignées cellulaires d'autres espèces. De plus, les résultats obtenus sur une lignée cellulaire ne se transposent pas toujours sur une autre. Plusieurs auteurs utilisent des souches différentes pour leurs études portant sur les facteurs de colonisation. Ces souches possèdent sans doute des capacités de colonisation des poulets différentes. La perte d'un gène peut alors être compensée par d'autres gènes chez une souche, mais pas chez une autre. Finalement, les modèles de colonisation du poulet utilisés entre les études sont souvent différents. La majorité emploie le modèle de 1 jour d'âge qui a l'avantage d'être rapide et peu coûteux. Cependant, ce modèle ne permet pas de voir la persistance d'une souche en élevage et surtout force la colonisation du poulet à un stade de développement auquel, sur le terrain, les poulets ne sont pas colonisés par la bactérie.

1.4 Contrôle de *Campylobacter jejuni* à la ferme

1.4.1 Mesures de contrôle de l'environnement de la ferme

L'application de mesures de biosécurité sévères, telles que le changement de survêtements et de bottes, le lavage des mains, l'accès limité aux bâtiments et la désinfection des bâtiments d'élevages, est un moyen de contrôle efficace contre *C. jejuni*. Ces mesures bloquent également l'entrée des autres pathogènes alimentaires en plus de protéger le troupeau contre l'introduction de maladies propres à l'oiseau (van de Giessen et coll., 1998, Evans et Sayers, 2000). L'utilisation de moustiquaire peut également limiter

l'introduction de mouches domestiques, ce qui contribue à diminuer la prévalence des élevages positifs à *C. jejuni* (Hald et coll., 2008).

Une méta-analyse a permis d'identifier dans la littérature quelles mesures semblaient les plus efficaces pour contrôler l'entrée de *C. jejuni* dans les fermes au Royaume-Uni. En utilisant 159 articles scientifiques, les auteurs ont observé que l'emploi de barrières hygiéniques, l'accompagnement à la ferme des enfants par un parent et la saison de production des poulets influençaient à la baisse la possibilité de colonisation des lots de poulets par le pathogène alimentaire (Adkin et coll., 2006). Malheureusement, une étude réalisée au Royaume-Uni a démontré que les producteurs étaient favorables à mettre en application des mesures de biosécurité lorsque nécessaires, mais que cette volonté diminuait proportionnellement aux coûts engendrés par ces mêmes mesures (Fraser et coll., 2010).

1.4.2 Vaccination

À ce jour, il n'existe aucun vaccin commercial disponible pour contrôler *C. jejuni* chez les poulets (Wassenaar, 2011). Par contre, certaines études démontrent que la vaccination est possible malgré la variabilité génétique de ce pathogène hautement variable génétiquement. Une réponse immunitaire peut être observée chez le poulet après immunisation avec certains antigènes de *C. jejuni*.

La flagelline de *C. jejuni* est reconnue par des sérums immuns ainsi que par les anticorps sécrétés dans le contenu intestinal chez des oiseaux naturellement colonisés. La vaccination avec la flagelline semblait diminuer le portage du pathogène alimentaire d'environ 2 log CFU/g matières fécales (Widders et coll., 1998, Fernando et coll., 2008, Huang et coll., 2010). Une autre structure fortement antigénique de *C. jejuni* est la MOMP (major outer membrane protein, PorA). Lorsque sous sa forme native, cette protéine est reconnue par des sérums d'oiseaux naturellement infectés par *C. jejuni* (Huang et coll., 2007). Dernièrement, cette protéine a été utilisée comme vaccin chez la souris. Cette vaccination a créé une protection partielle des rongeurs face à une infection par des souches

hétérologues de *C. jejuni* (Islam et coll., 2010). Dans une autre étude, il a été démontré que des anticorps purifiés contre la protéine cfrA abolissent sa fonction de récepteur pour l'acquisition de fer. De plus, cette protéine est reconnue par des anticorps recueillis de sérums de poulets infectés (Zeng et coll., 2009) ce qui suggère que cette protéine est en fait une bonne candidate vaccinale.

Lors de la vaccination, il est important d'utiliser un bon véhicule de livraison des antigènes pour créer une réponse immunitaire protectrice. Il est possible d'utiliser comme véhicule de livraison des souches de *Salmonella* non virulentes recombinantes. L'emploi de ce véhicule permettrait la création d'un vaccin bivalent protégeant contre *Salmonella* et *Campylobacter*. Plusieurs protéines ont été utilisées dans ce véhicule. La protéine cjaA (immunologique et conservée) a été employée et semblait diminuer la colonisation des oiseaux par *C. jejuni* (Wyszynska et coll., 2004, Buckley et coll., 2010). La protéine CJ0113 a également été employée dans des souches de *Salmonella* avirulentes. Elle a produit une réaction immunitaire humorale (IgG et IgA) en plus de protéger complètement les poulets de la colonisation par *C. jejuni* (Layton et coll., 2011).

1.4.3 Phages

Les bactériophages sont des virus spécifiques à certaines espèces de bactéries. Ils peuvent s'intégrer dans le génome bactérien ou être lytiques (Burrowes et coll., 2011). Les bactériophages ont été utilisés comme moyen de contrôle de plusieurs pathogènes. *Campylobacter* n'y fait pas exception. L'utilisation de phages a permis de réduire la charge totale en *Campylobacter* dans le tractus digestif des oiseaux, mais non son élimination. De plus, la diminution de la charge en *C. jejuni* est temporaire, si bien qu'après une semaine les niveaux de colonisation des oiseaux traités sont souvent égaux à ceux des animaux non traités (Wagenaar et coll., 2005, El-Shibiny et coll., 2009b, Carvalho et coll., 2010b). Son emploi pourrait donc être utile en fin de production, tout juste avant l'abattage.

Campylobacter possède une cassette *cas*, qui coderait pour des protéines du système CRISPRs (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Ce système confère

aux bactéries une forme de système immunitaire pour se défendre contre les phages et les éléments génétiques invasifs (El-Shibiny et coll., 2009b, Barrangou et Horvath, 2012). Lorsque de l'ADN étranger pénètre dans la bactérie, les protéines Cas lie des fragments de cet ADN et l'incorpore à l'intérieur de la zone codant pour les CRISPRS. Ensuite, une ARN interférant est produit et vient lier l'ADN étranger et le séquestrer. Ceci guide précisément les protéines Cas pour permettre la séquestration et la digestion rapide du matériel génétique étranger (Fineran et coll., 2012). La résistance de différentes souches de *C. jejuni* aux phages est donc possible (dans une étude, 13 % de souches étaient toujours présentes après utilisation des phages) et augmente lorsque les souches sont soumises à des traitements successifs de phages (Carvalho et coll., 2010a).

1.4.4 Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides synthétisés par des bactéries et qui ont la capacité de lyser précisément certaines autres espèces de bactéries (Svetoch et Stern, 2010). Plusieurs bactériocines ayant un effet contre *C. jejuni* ont été caractérisées (Stern et coll., 2005, Cole et coll., 2006, Stern et coll., 2006, Svetoch et Stern, 2010). L'administration orale de bactériocine encapsulée a éliminé la colonisation des oiseaux (Stern et coll., 2005, Cole et coll., 2006) ou a diminué considérablement le niveau de colonisation des oiseaux (Stern et coll., 2006). Cet effet peut également être observé pour des oiseaux près de l'âge d'abattage et pourrait donc être utilisé thérapeutiquement (Line et coll., 2008, Svetoch et Stern, 2010).

Malheureusement, une résistance peut s'y développer *in vitro*. La fréquence d'apparition de cette résistance pour *C. jejuni* est de $9,2 \times 10^{-9}$. Cette résistance peu fréquente peut être transférée par transformation naturelle entre différentes souches et espèces de *Campylobacter* (Hoang et coll., 2011). Le mécanisme précis reste encore à définir.

1.4.5 Probiotiques et microflores de compétition

L'intestin est une niche écologique complexe. Chaque microorganisme qui le colonise y est adapté. Modifier cet équilibre en y introduisant artificiellement d'autres bactéries peut alors devenir intéressant afin d'empêcher l'implantation de *C. jejuni*.

Par exemple, il a été démontré que l'utilisation du probiotique Primalac (composé de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium thermophilus*, *Enterococcus faecium*) réduisait la prévalence d'oiseaux contaminés naturellement de 66 % à 33 % à 21 jour d'âge dans un contexte d'élevage industriel (Willis et Reid, 2008). L'utilisation de probiotiques apparaît surtout efficace pour réduire la charge totale en *C. jejuni* des oiseaux, mais pour l'instant elle ne permet pas d'inhiber complètement la colonisation. Cependant, un nouveau probiotique (composition : *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus salivarius* et *Lactobacillus reuteri*) semble être en mesure d'éliminer la colonisation des oiseaux dans le modèle de 1 jour d'âge (Ghareeb et coll., 2012).

Il est également possible d'utiliser un mélange non défini de bactéries pour établir une flore microbienne de compétition efficace dans le tube gastro-intestinal des oiseaux (Zhang et coll., 2007). Ces bactéries peuvent être isolées à partir d'extraits de matières fécales ou de muqueuse (cryptes intestinales) provenant d'oiseaux qui sont exempts et résistants à la colonisation (Stern et coll., 2001). Différents oiseaux peuvent fournir des flores de compétition possédant une activité inhibitrice variée.

Fait intéressant, une étude a démontré que les poulets qui étaient issus de fermes familiales ou biologiques semblaient plus aptes à fournir des flores de compétition inhibitrices de *C. jejuni* (Zhang et coll., 2007). Il a également été prouvé qu'une même flore de compétition administrée à différentes races d'oiseaux peut avoir des effets variables (Laisney et coll., 2004). La protection contre la colonisation pourrait varier également selon que les bactéries composant la flore de compétition soient originaires de la muqueuse intestinale ou des matières fécales. L'utilisation de la flore bactérienne mucosale serait plus

efficace que l'utilisation de la microflore des fèces (Stern et coll., 2001). Malheureusement, il n'est pas possible d'introduire n'importe quelles souches bactériennes pour faire compétition à *C. jejuni*. Par exemple, *Lactobacillus salivarius* semblait inefficace pour lutter contre la colonisation des oiseaux par *C. jejuni* dans un modèle d'infection d'oiseaux de 1 jour d'âge avec administration orale du probiotique (Kizerwetter-Swida et Binek, 2009).

1.4.6 Additifs alimentaires

Une des méthodes de prévention facile d'application pour les éleveurs serait le contrôle de *C. jejuni* via l'ajout de molécules inhibitrices de la colonisation dans l'alimentation des animaux. Plusieurs additifs alimentaires sont déjà utilisés pour augmenter les performances zootechniques et la santé globale des oiseaux. Cette stratégie de contrôle permettrait de lutter contre un pathogène alimentaire d'augmenter la productivité par un impact positif sur les performances zootechniques des oiseaux. Le producteur ne verrait pas la lutte contre *C. jejuni* uniquement que comme une dépense, mais comme une stratégie supplémentaire d'amélioration du statut sanitaire de son troupeau.

Les additifs alimentaires les plus utilisés sont les huiles essentielles et les acides organiques. *In vitro*, ces molécules sont bactéricides à très faibles doses et efficaces contre *C. jejuni*. De plus, ces molécules modifient le tractus digestif des animaux. Par exemple, l'utilisation de thymol et de cinnamaldehyde a augmenté les populations de *E. coli* et de *Lactobacillus* de l'iléon des oiseaux (Tiihonen et coll., 2010). L'utilisation de ces molécules a fait varier les proportions d'acides organiques naturellement présents dans le caecum des oiseaux: butyrate, acide isobutyrique, acide propionique et acide isovalérique (Tiihonen et coll., 2010). L'administration de formate et d'huiles essentielles extraites de plantes ont également augmenté l'épaisseur de la muqueuse intestinale ainsi que le nombre de microvillosités des cellules intestinales (Garcia et coll., 2007) ce qui impacte sur la santé intestinale des oiseaux. Une modulation du système immunitaire par le butyrate a

également été observée: cet acide organique semble augmenter la synthèse systémique de peptides antimicrobiens chez les poulets (Sunkara et coll., 2011).

Les additifs alimentaires les plus étudiés sont l'acide caprylique et l'acide caproïque (acide gras à moyenne chaîne). Ces molécules sont très efficaces *in vitro* pour détruire *C. jejuni*. Leur CMI est basse, soit de 0,25 mM. L'efficacité de ces acides est cependant pH dépendant (Hermans et coll., 2010). Leur co-administration dans les aliments, dans un véhicule encapsulé, pour la durée complète d'un élevage, a diminué les comptes caecaux de *C. jejuni* jusqu'à 4 log et ce 4 jours après inoculation de *C. jejuni* (Molatova et coll., 2010). Par contre, l'utilisation de ces acides gras à une dose de 1%, directement dans la moulée, n'a pas permis le contrôle de *C. jejuni* (Hermans et coll., 2010). Cette perte d'efficacité serait due à la présence de mucus. Le mucus, *in vitro*, a diminué considérablement l'effet bactéricide des acides gras (Hermans et coll., 2010). Par contre, ces acides gras à moyenne chaîne ont augmenté la performance des oiseaux (gain supérieur de 49g à l'âge d'abattage) et ont élevé la dose de *C. jejuni* requise pour la colonisation des oiseaux (van Gerwe et coll., 2010). Cependant, les souches utilisées semblent posséder un pouvoir de colonisation faible puisque tous les oiseaux n'ont pas été colonisés dans le groupe contrôle après 14 jours d'élevage. Cet effet pourrait être renversé avec des souches plus colonisatrices des oiseaux.

L'inhibition complète de la colonisation des poulets par *C. jejuni* a pu être atteinte en utilisant des acides organiques (mélange de 2 % d'acide formique et 0,5 % de sorbate) couplés à de la narasine (anticoccidien). Malheureusement, cette dose a diminué les performances des poulets, rendant cette solution peu attrayante pour une utilisation commerciale (Skanseng et coll., 2010). L'administration continue de mannooligosaccharides (MOS) concentrés à 0,2 %, ainsi que 15 ppm de virginiamycine et 55 ppm de bacitracine a également abaissé les comptes de *Campylobacter* dans un contexte de colonisation naturelle (Baurhoo et coll., 2009).

Le butyrate possède une activité lytique sur *Campylobacter in vitro*; cette activité diminue avec la présence de mucus intestinal de poulet. Lorsqu'encapsulé et administré à des oiseaux dans le modèle de colonisation à deux semaines d'âge, le butyrate n'a toutefois pas modifié la colonisation des oiseaux par *C. jejuni* (Van Deun et coll., 2008a).

La simple acidification de la moulée avec de l'acide lactique (5,7%) et acétique (0,75) a affecté modestement à la baisse la colonisation par *C. jejuni*. Cette méthode a également diminué le nombre d'oiseau porteur de la bactérie (Heres et coll., 2004).

Les huiles essentielles (Eucalyptus occidentalis, orange Valencia, tans-cinnamaldéhyde, eugénol, carvacrol, thymol) sont aussi bactéricides pour *C. jejuni* et ce à faibles doses *in vitro* (Nannapaneni et coll., 2009, Johny et coll., 2010, Kurekci et coll., 2012). Les huiles essentielles sont efficaces, même *in vitro*, en présence de matières fécales (Johny et coll., 2010). Par contre, les huiles essentielles perdent souvent leur efficacité lorsqu'administrées aux oiseaux via l'aliment (Hermans et coll., 2011a).

L'utilisation de molécules acidifiantes dans l'eau d'abreuvement des oiseaux a également été utilisée comme mesure de contrôle. L'utilisation d'acide lactique (0,44 %) lors du retrait de la nourriture avant l'abattage a diminué la prévalence des oiseaux porteurs de *C. jejuni* sur certaines fermes commerciales (Byrd et coll., 2001). L'effet non universel de l'acide lactique serait peut-être dû à un effet dépendant des souches de *C. jejuni* présentes sur les fermes. L'administration d'acide caprylique dans l'eau d'abreuvement n'a pas diminué la colonisation des oiseaux par *C. jejuni* (Metcalf et coll., 2011). L'utilisation de chlore dans l'eau d'abreuvement a cependant augmenté la colonisation des oiseaux par *C. jejuni* (Stern et coll., 2002).

1.4.7 Résumé des mesures de contrôle à la ferme

En conclusion, à la lumière des données scientifiques disponibles, il y a deux voies préconisées pour contrôler *C. jejuni* à la ferme: en traitement curatif, c'est-à-dire par l'utilisation de la méthode de contrôle chez des oiseaux déjà colonisés pour réduire ou

éliminer le pathogène avant l'abattage, ou en prophylaxie, c'est-à-dire par l'utilisation de la naissance à la mort de l'oiseau. Ces méthodes mènent soit à une protection complète ou partielle contre la colonisation, soit à une augmentation de la dose de bactéries nécessaires à la colonisation de l'oiseau ou soit à une modulation du niveau de colonisation dans le temps avec des réductions significatives des comptes caecaux à l'âge d'abattage.

La biosécurité permet globalement de réduire le risque d'introduction des pathogènes de la volaille et des pathogènes alimentaires dans les élevages. Cependant, cette mesure ne semble pas suffisante pour les éliminer. Pour ce qui est des autres mesures de contrôle, peu permettent l'inhibition complète de la colonisation. Plus d'études sont donc nécessaires pour vérifier l'effet de ces stratégies de contrôle de *C. jejuni* et éventuellement leur application sur le terrain où les mesures de biosécurité sont très variables de ferme en ferme (Racicot et coll., 2011, Racicot et coll., 2012). Il est également important de mentionner que l'efficacité des mesures de contrôle mises au point est mesurée principalement sur le caecum des oiseaux alors que l'effet sur la carcasse à l'abattoir, laquelle entre directement en contact avec le consommateur, n'est pas mesurée. Finalement, l'encapsulation de molécules qui utilisent la voie alimentaire est essentielle pour assurer une action ciblée à l'intestin des oiseaux (Molatova et coll., 2011). Il semble aussi crucial, étant donné la variabilité dans le potentiel de colonisation existant entre les souches de *C. jejuni*, de vérifier l'effet d'une mesure de contrôle sur de multiples souches.

Chapitre 2: Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Quebec

Cet article a été publié dans le Canadian Journal of Veterinary Research. Octobre 2011, volume 75, numéro 4, pages 298-307.

Thibodeau, A., Fravalo, P., Laurent-Lewandowski, S., Guevremont, E., Quessy, S. & Letellier, A. 2011. Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Quebec. Can J Vet Res, 75, 298-307.

Contribution du candidat:

J'ai participé à l'élaboration du protocole de recherche en proportion équivalente de celle des autres coauteurs. J'ai effectué les collectes des échantillons et effectué toutes les analyses de laboratoire. J'ai analysé les résultats en proportion équivalente de celle des autres coauteurs. J'ai rédigé l'article conformément aux exigences de la revue et intégré les commentaires faits par les coauteurs ainsi que ceux formulés par les réviseurs de l'article.

Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Quebec

Alexandre Thibodeau, Philippe Fravalo, Sylvette Laurent-Lewandowski, Evelyne Guévremont, Sylvain Quessy, Ann Letellier

Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, département de microbiologie et de pathologie, St-Hyacinthe, Québec J2S 2M2 (Thibodeau, Laurent-Lewandowski, Quessy, Letellier); AFSSA French Agency for Food Safety, 22440 Ploufragan, France (Fravalo); Agriculture and Agri-Food Canada, Food Research and Development Centre, St-Hyacinthe, Quebec J2S 8E3 (Guévremont).

Address all correspondence to Dr. Ann Letellier; telephone: (450) 773-8521, ext. 8640; fax: (450) 778-8157; e-mail:

Received September 28, 2010. Accepted February 7, 2011.

2.1 Abstract

The objective of this study was to estimate the presence of the important foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in the province of Quebec. The recovered isolates were further characterized for their antimicrobial resistance profile, autoagglutination property and chemotaxis. Antimicrobial resistance was evaluated using Agar dilution for: tetracycline, erythromycin, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, nalidixic acid, clindamycin, ampicillin, azithromycin, bacitracin and ceftiofur. Autoagglutination was measured by monitoring optical density changes in a bacterial suspension after 3 h of incubation at room temperature. Chemotaxis was evaluated after a contact time of 3 h between isolates and mucin, using a quantitative protocol. A total of 10 lots of chickens was sampled in August and September 2009; half of them were positive for the presence of *C. jejuni*. Antimicrobial resistance was found only for tetracycline (44%), erythromycin (6%), azithromycin (6%) and clindamycin (2%). Variation was observed in the minimum inhibitory concentrations (MICs) for ceftiofur and bacitracin, for which *C. jejuni* possess intrinsic resistance. Autoagglutination and chemotaxis varied among isolates and lot-level differences in these were observed. Autoagglutination and chemotaxis levels appeared as independent isolate properties. Further monitoring and characterization of isolates originating from organic chickens is of interest since this type of production might represent another source of exposure of consumers to a variety of the foodborne pathogen *C. jejuni*.

2.2 Introduction

Campylobacter jejuni is recognized as a frequent bacterial foodborne agent in developed countries (1). Data on declared human cases of campylobacteriosis in 2009 in Quebec, Canada indicated a prevalence of 23.6 per 100 000 inhabitants, which has remained stable since the year 2000 (2). Risk factor studies (3) and investigations (4) of outbreaks of *C. jejuni* infections have identified consumption of chicken and handling of raw chicken as important risk factors for campylobacteriosis. Similar conclusions have

been reached by attribution studies comparing clinical and food isolates of *Campylobacter* (5) using different typing strategies (5, 6).

A market is emerging for organically raised chickens due to a growing concern among consumers about bird welfare and use of antimicrobials on the farms (7). Some practices on organic farms, such as providing chickens with access to outdoor fields, probably expose birds to potential environmental sources of *Campylobacter* (8). As part of Quebec's organic reference standards (9), producers must provide chickens with access to the outside for at least 3 years before being eligible to obtain "organic" certification from the Conseil des appellations réservées et des termes valorisants (CARTV).

As observed in other studies, the status of assessment of organic chickens for *Campylobacter* is important because it has been shown that these chickens are colonized by *C. jejuni* (10–14). To our knowledge, no such studies so far have evaluated this topic in Quebec's organic production units. The importance of characterizing these isolates has been outlined in a recent study (15).

In the present study, isolate characterization was conducted by evaluating the following phenotypes: antimicrobial resistance, autoagglutination, and chemotaxis. Antimicrobial resistance is an important public health concern and is monitored in Canada by the Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS). This monitoring program is already well-implemented in conventional chicken production, but not in organic chicken production. Assessment of antimicrobial resistance in organic production is of interest as it could provide information on the impact of suspending the use of antibiotics in conventional chicken production (16). In *C. jejuni*, autoagglutination has been demonstrated in isolates from chicken, as well as in biofilm formation and adhesion to, or invasion of, epithelial cells. It involves flagellin, mobility, and flagella glycosylation (17–20). Chemotaxis is also known as a factor in the virulence of *C. jejuni* (21, 22). It is also associated with intestinal colonization in chickens (23) as well as with human infection (24). Identified attractants include amino acids, organic acids, chicken or bovine mucus, and constituents of mucus (mucins), which seem to favor chicken colonization (25,26).

As well as estimating the prevalence of *C. jejuni* in Quebec's organic chicken farms, this study obtained baseline information on the characterization of this biological hazard, in terms of its antimicrobial resistance, autoagglutination, and chemotaxis properties. The prevalence and characteristics of *C. jejuni* on Quebec's organic chicken farms are currently not known.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Sampling and recovery of *Campylobacter jejuni*

Sampling took place in August and September 2009. The contact information of the producers asked to participate in the study was obtained from the CARTV Web site (9). The project was explained to producers in a telephone interview. During the sampling period, all available lots were sampled from those producers who agreed to participate. A lot was defined as a group of chickens originating from the same hatchery, at the same geographical address, raised during the same period of time and under the same conditions, and slaughtered on the same day. The birds were acquired from hatcheries that also supply conventional chicken farms. Half of the certified organic production units available at the time of the study participated (6 out of 12) and 10 production lots were sampled from those.

At the slaughterhouse, approximately 1 bird out of 10 was taken from each lot for sample analysis purposes 5 min after the slaughter process began. Ceacum was taken from 30 chickens from each lot and transported on ice to the laboratory. For each lot, 3 samples of 10 g of fecal matter (1 g of fecal material per chicken) were constituted. The samples were mixed 1:1 (w/v) in buffered peptone water (AES Laboratory, Montreal, Quebec), directly plated on modified charcoal cefoperazone desoxycholate Agar (mCCDA) Preston (Oxoid, Nepean, Ontario), and incubated at 42°C for 48 h in a microaerobic atmosphere using Oxoid's Atmosphere Generation System with the *Campylobacter* gas generation kit. Typical colonies were purified on mCCDA Preston (Oxoid) and then plated on blood Agar (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario). Each isolate was initially identified as *Campylobacter* based on motility under light microscopy (corkscrew motility) and Gram staining (spiral

small gram-negative). Typical bacteria were further identified to the species level by polymerase chain reaction (PCR) as described in a previous report (27). Isolates that were confirmed as *C. jejuni* were then frozen in multiple aliquots at -80°C. For all negative samples by direct plating, samples were enriched in Bolton Broth (Oxoid) and *C. jejuni* was further isolated on mCCDA Agar. All recovered isolates were used for further characterization.

2.3.2 Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni*

Antimicrobial resistance was determined by Agar dilution using Mueller-Hinton Agar plates (AES Laboratory) containing 5% (v/v) of defibrinated sheep blood (Oxoid), as defined by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (28). The following antimicrobial agents (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) were tested: tetracycline (Tet), erythromycin (Ery), chloramphenicol (Chl), ciprofloxacin (Cip), gentamicin (Gen), nalidixic acid (Nal), clindamycin (Cli), ampicillin (AMP), azithromycin (Azi), bacitracin (Bac), and ceftiofur (Cef). These were chosen because they are considered important for treating human campylobacteriosis (Ery, Cip, Nal, and Azi) and because analog molecules are used in conventional poultry production (Tet, Chl, Gen, Cli, Bac, and Cef). Concentrations of antimicrobial agents tested ranged from 2 to 256 µg/mL. The minimum inhibitory concentration (MIC) breakpoints adopted were based on values used by CIPARS (29), with the exception of chloramphenicol and ampicillin, for which breakpoints were taken respectively from the 2006 report of the National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) (30) and a report by the European Food Safety Agency (EFSA) (31). *Campylobacter jejuni* is naturally (or intrinsically) resistant to bacitracin and ceftiofur (32, 33). No breakpoint exists for these resistances as no antimicrobial resistance study has included them in their antimicrobial panels; our analysis will therefore focus on the distribution of MICs.

Fresh bacterial cultures were suspended in phosphate-buffered saline (PBS) (Oxoid) in a concentration equivalent to 0.5 McFarland standards. Isolates were put down on Mueller-Hinton Agar plates (AES Laboratory) containing 5% (v/v) of defibrinated sheep

blood (Oxoid) and on the corresponding plates containing each of the tested antimicrobial concentrations. Agar plates were then incubated at 42°C in a microaerobic atmosphere for 24 h. For each of the recovered isolates, the MIC recorded corresponded to the lowest concentration of antimicrobial inhibiting the growth of the isolates. The *C. jejuni* sequenced strain RM1221 (34) (ATCC BAA-1062) (Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario) and *E. coli* ATCC 25922 were used as control.

2.3.3 Autoagglutination

Autoagglutination was assessed based on previous studies with some modifications (20). Isolates were taken from single -80°C storage, plated on mCCDA Preston, and incubated at 42°C for 24 h in a microaerobic atmosphere. Isolates were then put on blood Agar for another 24 h. Isolates were suspended in PBS to an optical density (OD) of 1.0, measured at 630 nm in a cuvette containing 1 mL of the initial suspension. Bacterial suspensions in this cuvette were maintained without disturbance at room temperature for 3 h; OD was then remeasured using the same cuvette. Autoagglutination was expressed as follows: $(OD_{\text{initial}} - OD_{3\text{h}}) / OD_{\text{initial}} * 100$. For each isolate, the autoagglutination experiment was produced in a technical triplicate. All isolates recovered from organic chickens were tested. Sequenced strains rm1221, nctc 11168 (ATCC 700819, Cedarlane), and 81-116 and 81-176 were also tested as controls. Previous studies established that strains 81-176 (17), nctc 11168 (35), and 81116 (36) were proven autoagglutinating.

2.3.4 Chemotaxis

The chemotaxis assay was adapted by combining a cell culture assay (37) and a classical assay (26), creating a new experimental approach to evaluate this phenotype for *C. jejuni*. Fresh isolates were suspended in PBS to an OD of 1.0 (630 nm), as for autoagglutination. From this suspension, 200 µL were centrifuged at 3000× g for 10 min. The supernatant was then discarded, replaced with 0.125% (w/v) Agar (BD, Mississauga, Ontario) in PBS, and the bacterial pellet was resuspended. The soft Agar containing the bacteria was then poured into a transwell insert (BD) of 1-µm pore size and maintained at

4°C for 5 min. The insert was placed in a 24-well microplate (BD) containing either PBS (negative control) or a 2 mg/mL bovine gastric mucin solution (Sigma-Aldrich) in PBS. The plates were incubated at 42°C for 3 h in a microaerobic atmosphere.

After incubation, the inserts were removed and the concentration of bacteria found in the mucins or PBS solution, as well as the concentration of the initial bacterial suspension, were determined by serial dilution and plating on Mueller-Hinton Agar incubated at 42°C for 48 h in a microaerobic atmosphere. The chemotaxis potential, at 3 h, of each isolate was determined as a ratio (R) defined as the number of bacteria found in the mucins solution (B) with the number of bacteria contained in the negative PBS control (C) subtracted and divided by the number of bacteria initially contained in the soft Agar transwell insert (A). The chemotaxis ratio is therefore expressed as: $R = (B-C)/A$. To facilitate graphical representation and statistical analysis, this ratio was transformed as follows:

$$1/ -\log(R)$$

Each chemotaxis isolate experiment was conducted in a technical triplicate. All isolates recovered from organic chickens were tested, as well as the following strains: rm1221, nctc 11168, 81-116, and 81-176. Chemotaxis of strains nctc 11168 and 81-176 was previously described (21–23; 26). Only strain nctc11168 had previously been shown to be attracted by mucin (26).

2.3.5 Phenotyping

To qualify the overall phenotype similarity of the isolates (antimicrobial resistance profile, autoagglutination, and chemotaxis), a dendrogram (Bionumerics 6.1; Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium) was generated using phenotypic values for each isolate (expressed as dichotomic or quantitative as presented in the legend for Figure 5) and using Rank correlation similarity coefficient and complete linkage for clustering.

2.3.6 Statistical analysis

All statistics were calculated using the NCSS/Statistical & Power Analysis Software (PASS) with an alpha level of 0.05. The chi-squared test was used to evaluate the link between antimicrobial resistance and the lot origin of the isolates. The Kruskal-Wallis test was used to compare autoagglutination or chemotaxis among the lots, the Fisher exact test was used to compare pairs of lots with different phenotypes, and the Kolmogorov *t*-test was used to compare the mean chemotaxis between the 2 autoagglutination groups.

2.4 Results

2.4.1 Recovery of *Campylobacter jejuni*

A total of 54 *C. jejuni* isolates was successfully recovered from the sampled lots from a total of 10 lots. The lots came from 6 organic chicken producers (out of 12 available on the CARTV web site) and were located in 4 of Quebec's administrative regions. All negative pooled samples by direct plating were also negative when using enrichment broth. *C. jejuni* was isolated in 50% of the lots [95% confidence interval (CI), 19-81].

2.4.2 Antimicrobial resistance

It was found that the *C. jejuni* isolates were resistant to tetracycline, erythromycin, azithromycin, and clindamycin (Table I). One isolate was resistant to 3 antimicrobial agents (azithromycin, clindamycin, and erythromycin). The MIC distribution for bacitracin appears bimodal, with concentrations of either 64 µg/mL or 256 µg/mL and higher. For ceftiofur, the MICs of isolates were found to be centered on 64 µg/mL. The presence of resistance to tetracycline in isolates was found to vary depending on the origin of the lot ($P < 0.0001$). Lots 1 and 5 presented a high proportion of isolates that were resistant to tetracycline, which was the opposite of Lot 2 ($P < 0.0001$).

2.4.3 Autoagglutination

Autoagglutination varied depending on the different isolates (Figure 1). Graphical analysis of the distribution of autoagglutination values of the isolates after 3 h suggests that there are 2 defined groups. In the first group, 21 out of 54 isolates (39%) could be considered as autoagglutinating and the recorded values varied from 42% to 90%. On the other hand, a high proportion of isolates (23 out of 54) showed the opposite phenotype, with values not higher than 8%.

Considering this distribution, the autoagglutination values were investigated according to lot origin (Figure 2). Lots were found that had different isolate autoagglutination ($P < 0.0001$). Two lots presented opposite profiles: 1 with exclusively low autoagglutination (Lot 1, $n = 19$) and the other (Lot 2, $n = 16$) with all isolates presenting high values (mean 78%). The 3 other lots presented intra-lot variability of autoagglutination with high mean values and large confidence intervals (CI). Isolates from Lot 1 had a lower autoagglutination mean than all other lots (versus Lot 2, $P < 0.0001$; versus Lot 3, $P = 0.0011$; versus Lot 4, $P = 0.0098$; and versus Lot 5, $P = 0.0022$). Autoagglutination was as follows for the 81-176, 81116, nctc11168, and rm1221 strains: 50.37 ± 0.26 , 48.79 ± 1.21 , 74.67 ± 0.56 , and 51.43 ± 7.6 , respectively.

2.4.4 Chemotaxis

The chemotaxis distribution of *C. jejuni* showed a variation between a minimum value of 0 and a maximum of 1.1 (Figure 3). No distinct groups seemed to emerge based on the distribution analysis. Chemotaxis was also investigated according to the lot of origin (Figure 4). It was found that lots had different isolate chemotaxis ($P = 0.0314$). Isolates from Lot 3 and Lot 5 presented a higher attraction mean toward mucin than Lot 2 ($P = 0.006$ and $P = 0.0287$, respectively), which presented isolates with lower chemotaxis. The protocol used allowed for a quantitative characterization of the isolates regarding chemotaxis. Chemotaxis of strains rm1221, nctc11168, 81-116, and 81-176 were 0.14 ± 0.12 , 0.14 ± 0.12 , 0.20 ± 0.17 , and 0.46 ± 0.18 respectively.

Based on the groups defined by autoagglutination, mean chemotaxis of isolates from group A (autoagglutination < 40%) and group B (autoagglutination > 40%) were 0.26 ± 0.24 and 0.19 ± 0.14 , respectively. The 2 means were not found to be different (*t*-test, Kolmogorov, $P > 0.05$).

2.4.5 Dendrogram analysis

The lots seemed to be composed of isolates that presented different antimicrobial resistance profiles, autoagglutination, and chemotaxis. In this study, these phenotypes were associated to some degree with the lot origin of the isolate. By gathering phenotypical information, it might be possible to evaluate the similarity of phenotypes among the isolates and to test the question of the variety of isolates according to the sampled lot of chickens. For this reason, a dendrogram was generated using the phenotypical data gathered (Figure 5).

At first glance, 2 large clusters were easily identified: 1 composed principally of tetracycline-resistant isolates with lower autoagglutination capacities and another composed of isolates sensitive to tetracycline and having high autoagglutination capabilities. Based on a graphical analysis, 8 clusters of isolates were further defined. Cluster 1 (3 isolates) was characterized by isolates with multiple antimicrobial resistances and high autoagglutination. Cluster 2 (5 isolates) regrouped isolates having low bacitracin MIC and high autoagglutination. Cluster 3 (16 isolates) was formed by isolates with higher bacitracin MIC and high autoagglutination. Cluster 4 (3 isolates) was made up of isolates showing high bacitracin MIC, high autoagglutination, and low chemotaxis. For cluster 5 (11 isolates), it could be observed that the isolates possessed low bacitracin MIC and tetracycline resistance with moderate MICs. Cluster 6 (8 isolates) was similar to cluster 5, except that there was higher tetracycline resistance MIC and autoagglutination. Cluster 7 (3 isolates) regrouped isolates based on their high bacitracin MIC, no tetracycline resistance, low autoagglutination, and low chemotaxis. Finally, cluster 8 (5 isolates) presented isolates with equally low chemotaxis and moderate to low bacitracin and tetracycline MIC. Lots 1 to 5 contained the following number of clusters: 4, 3, 3, 1, and 2 respectively.

2.5 Discussion

In this study, data were gathered that would allow us to assess the prevalence and characteristics of *C. jejuni* in organically raised chickens in Quebec. This is the first time, to our knowledge, that the prevalence, antibiotic resistance, and specific phenotypes for organic chicken production in Quebec have been reported.

Previous studies have reported that the prevalence of *C. jejuni* can be as high as 100% in organic chicken lots (12). In this study, 50% of the lots sampled were positive. The prevalence of organic lots that tested positive to *C. jejuni* appeared to be higher in value than in Quebec in 2003 (50% versus 35%), when the ceacal prevalence of *C. jejuni* in conventional chicken lots was last reported (38). This presence suggests that consumption of organic chickens might increase the exposure of consumers in Quebec to *C. jejuni*. The presence of this foodborne pathogen in the gut of slaughtered animals is in fact associated with its presence on the carcasses (39). Moreover, isolates from free-range chickens (birds with access to an outdoor field) were found to be similar to those retrieved on retail meat and in cases of human campylobacteriosis (14). A recent study also found that isolates identified in organic chickens were similar before and after slaughter (15). In this study, the observed presence of the pathogen at slaughter suggests that the end product might also be contaminated by *C. jejuni*. More studies are needed, however, to establish that isolates found in Quebec's organic chickens can be linked to human campylobacteriosis. The isolates were sampled at the slaughterhouse. Although it cannot be completely ruled out that the isolates were the result of contamination of the birds during transport, the level of caecal colonization observed strongly suggests that the contamination was acquired on the farm.

Previous studies of organic chicken production showed a low level of antimicrobial resistance isolated from organic or free-range production (10,12,16). Antimicrobial resistance in Canada is monitored each year by CIPARS. In 2009, CIPARS reported partial data on antimicrobial resistance, which showed that *C. jejuni* isolated from retail meat from conventional farms in Quebec were found to be resistant to azythromycin (4 isolates out of

48), clindamycin (1 isolate out of 48), erythromycin (4 isolates out of 48), and tetracycline (30 isolates out of 48) (40). For these antimicrobials, with the exception of telithromycin, which was not covered in our study, and clindamycin for which the resistance level seems to be the same between the CIPARS and our study, resistance appeared slightly lower in values in the organic chicken isolates sampled in 2009 compared to the CIPARS data. This might be because organic farms in Quebec do not use antimicrobials for a minimum period of 3 y before certification. Antimicrobials used in broiler chickens can be selected for resistance to *C. jejuni* (41). If their use is stopped at the farm, the antimicrobial resistance of the associated bacteria is reduced (42,43). Isolates recovered from organic chicken farms also have lower antimicrobial resistance levels for *C. jejuni* than those from conventional farms (10, 11).

In this study, tetracycline resistance was observed in *C. jejuni* even though this antimicrobial has not been used on organic chicken farms for at least 3 years. Tetracycline resistance was also reported in other studies of organic chickens, with prevalence ranging from low (0.05%) (12) to high (79%) (13). Even without antimicrobial pressure, some isolates in our study remained resistant to erythromycin, azithromycin, and clindamycin. Such resistance was also found in isolates originating from other organic productions (12,13,16). In *C. jejuni*, the same mechanism of resistance may be observed for clindamycin (lincosamine), erythromycin, and azithromycin (both macrolide). Resistance in *C. jejuni* can be caused by efflux or by modification of the antimicrobial target by punctual mutation of the genes, or by both (44).

The level of resistance to bacitracin and ceftiofur, antimicrobials for which no breakpoints are defined, was also investigated. A range of MICs (64 to over 256 µg/mL and 32 to over 256 µg/mL) was observed in this study for both these antimicrobials, respectively. These differences in susceptibility may indicate that the isolates harboured different mechanisms for resisting these antimicrobials. Since it was found that some isolates were not sensitive to the highest concentration of bacitracin and ceftiofur used, in further studies, dilution series for these antimicrobials should go beyond concentrations of

256 µg/mL. This observation for intrinsic resistance was also previously reported for streptogramin in *Enterococcus* (45). Resistance to ceftiofur (β-lactame) is caused by a reduced affinity of *C. jejuni* porins to the antibiotic or low-level production of β-lactamase (33). The exact resistance mechanism to bacitracin for *C. jejuni* still needs to be clearly characterized (32). These antimicrobial susceptibilities could be continuously monitored in order to follow the evolution of the situation over time in the organic environment where no antimicrobial pressure is applied to the isolates.

Autoagglutination is caused by interactions between bacteria that create aggregates. This phenotype is involved in the pathogenesis of enteropathogens such as *Yersinia* (46), *Enterococcus* (47), and *E. coli* (48). *Campylobacter* autoagglutination has previously been studied after a 24 h incubation period at room temperature (17,22,35). We chose to use a 3-h incubation, based on preliminary assays showing that agglutination was more variable in our isolate population at this time. Also, in this preliminary work, previously characterized strains (81-176, nctc1116, and 81116) remained positive for autoagglutination at 3 h, which shows that this timeframe allows autoagglutinating isolates to be detected.

Autoagglutination of the tested *C. jejuni* at 3 h showed variability between isolates and allowed for their differentiation. Flagellum is important for *C. jejuni* autoagglutination (17–19). The *C. jejuni* flagella apparatus varies considerably from isolate to isolate (49). The observed variability shown in the field isolates was expected, but the association of lots with this *Campylobacter* property is original and described for the first time.

Chemotaxis is the ability of motile bacteria to move toward or against a concentration of a specific molecule. It is also an important virulence factor for different pathogenic bacteria such as *Salmonella* sp. (50). The protocol developed in this study is based on bacterial enumeration rather than a migration diameter, which is the protocol used in most studies (21,26). The method used in this study allowed the isolates to be classified according to their chemotaxis. Strains for which chemotaxis has previously been characterized (nctc 11168 and 81-176) (21–23,26) were also confirmed positive in our

assay. We also confirmed and quantified chemotaxis towards mucins for 2 other commercially available sequenced strains, rm1221 and 81116.

This approach to characterizing *C. jejuni* in terms of chemotaxis is of interest since it allows the phenotype to be quantified. The great variability observed among isolates in this study, ranging from 0 to 1.1 despite confirmation of motility under light microscopy, requires further study. The presence of the different chemotaxis mechanisms in the farm population of *C. jejuni* has not yet been assessed and should be determined since chemotaxis is a virulence factor for *C. jejuni* and could be used as a target to control the pathogen at the farm.

In the tested field isolates, chemotaxis was not associated with autoagglutination. Both autoagglutination groups had the same chemotaxis mean. This finding highlights that the 2 phenotypes are not necessarily related in field isolates, even though flagella and mobility are important for these 2 bacterial properties. It has been observed that isolates with mutation affecting autoagglutinating may remain mobile and vice versa (17,18,20). Other virulence mechanisms are probably present in our isolates that could influence their properties. Further phenotypic investigation as well as the identification of the gene contents of *C. jejuni* by microarray is of interest in order to better understand the relationship between *C. jejuni* and chickens. In our experimental conditions, evaluation of chemotaxis and autoagglutination of *C. jejuni* was found to be quite fastidious, confirming that these results are susceptible to variation of the environmental conditions of assays. Nevertheless, these first descriptive results on *C. jejuni* isolated from organic chickens in Quebec are of great interest from the perspective of future and complementary studies.

The observations of the present study make it possible to hypothesize that some practices used in organic chicken farming may select for specific phenotypes within a diverse population of *C. jejuni*. The phenotypes identified in this study allowed the isolates to be characterized inter and intra lot. It is worthwhile to monitor the evolution of the organic *C. jejuni* population. It would be interesting to observe whether the antimicrobial-resistant isolates remain or if the autoagglutinating group and the tetracycline-resistance

group expand in proportion. This study provides the basis for parameters that could be followed up in the future.

In conclusion, some organic chicken lots sampled in Quebec were positive for *C. jejuni*, which establishes this presence for the first time and suggests a possible contribution of these types of productions to human campylobacteriosis. More studies are needed to clearly establish this. Observed antimicrobial resistance was low (erythromycin 6%, clindamycin 2%, and azythromycin 6%), with the exception of tetracycline resistance, which was higher (44%). A variation of the MIC for ceftiofur and bacitracin, which are intrinsically resistant in *C. jejuni*, was observed. This suggests that these isolates have different mechanisms of resistance for these 2 antimicrobials. The other evaluated phenotypes, autoagglutination and chemotaxis, were variable. Opposite phenotypes were found in different lots. We also proposed a new way to evaluate chemotaxis, based on bacterial enumeration. Continuous monitoring and characterization of isolates from organically raised chickens in Quebec are of interest as this type of production represents another possible exposure route for consumers to a variety of the foodborne pathogen *C. jejuni*.

2.6 Acknowledgments

The authors thank the Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ) for funding. We also thank the Fédération d'agriculture biologique du Québec for supporting the study, Don McAlpine for reviewing the English manuscript, and Guy Beauchamp for assisting with statistical analysis. Sequenced strains were kindly supplied by Dr. Shaun Cawthraw, Food and Environmental Safety, Veterinary Laboratories Agency, Surrey, UK.

2.7 References

1. Skovgaard N. New trends in emerging pathogens. *Int J Food Microbiol* 2007;120:217–224.
2. Gouvernement du Québec, bureau de surveillance et vigie. Nombre (n) de cas déclarés et taux d'incidence (Ti) annuelle par 100,000 habitants de campylobactériose selon l'espèce, province de Québec, 2000-2009. Institut national de santé publique du Québec (INSPQ), 2010.
3. Wingstrand A, Neimann J, Engberg J, et al. Fresh chicken as main risk factor for Campylobacteriosis, Denmark. *Emerg Infect Dis* 2006;12:280–285.
4. Friedman CR, Hoekstra RM, Samuel M, et al. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in Foodnet sites. *Clin Infect Dis* 2004;38: S285–96.
5. Denis M, Chidaine B, Laisney MJ, et al. Comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry, pig and *Campylobacter* human infections in Brittany, France. *Pathol Biol (Paris)* 2009;57:23–29.
6. Lindmark H, Harbom B, Thebo L, et al. Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from meats, water, and humans in Sweden. *J Clin Microbiol* 2004;42:700–706.
7. Bokkers EAM, de Boer IJM. Economic, ecological, and social performance of conventional and organic broiler production in the Netherlands. *Br Poult Sci* 2009;50:546–557.
8. Näther G, Alter T, Martin A, Ellerbroek L. Analysis of risk factors for *Campylobacter* species infection in broiler flocks. *Poult Sci* 2009;88:1299–1305.
9. Conseil des appellations réservées et des termes valorisants (CARTV) [Web site on the Internet]. Available from <http://www.cartv.gouv.qc.ca/en> Last accessed July 12, 2011.
10. Young I, Rajić A, Wilhelm BJ, Waddell L, Parker S, McEwen SA. Comparison of the prevalence of bacterial enteropathogens, potentially zoonotic bacteria and bacterial

- resistance to antimicrobials in organic and conventional poultry, swine and beef production: A systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Infect* 2009;137:1217–1232.
11. Price LB, Johnson E, Vailes R, Silbergeld E. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* isolates from conventional and antibiotic-free chicken products. *Environ Health Perspect* 2005; 113:557–560.
 12. Heuer OE, Pedersen K, Andersen JS, Madsen M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. *Lett Appl Microbiol* 2001;33:269–274.
 13. Cui S, Ge B, Zheng J, Meng J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in organic chickens from Maryland retail stores. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:4108–4111.
 14. Colles FM, Jones TA, McCarthy ND, et al. *Campylobacter* infection of broiler chickens in a free-range environment. *Environ Microbiol* 2008;10:2042–2050.
 15. Colles FM, McCarthy ND, Sheppard SK, Layton R, Maiden MCJ. Comparison of *Campylobacter* populations isolated from a free-range broiler flock before and after slaughter. *Int J Food Microbiol* 2010;137:259–264.
 16. Luangtongkum T, Morishita TY, Ison AJ, Huang S, McDermott PF, Zhang Q. Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:3600–3607.
 17. Ewing CP, Andreishcheva E, Guerry P. Functional characterization of flagellin glycosylation in *Campylobacter jejuni* 81-176. *J Bacteriol* 2009;191:7086–7093.
 18. Golden NJ, Acheson DWK. Identification of motility and autoagglutination *Campylobacter jejuni* mutants by random transposon mutagenesis. *Infect Immun* 2002;70:1761–1771.
 19. Guerry P. *Campylobacter* flagella: Not just for motility. *Trends Microbiol* 2007;15:456–461.

20. Misawa N, Blaser MJ. Detection and characterization of autoagglutination activity by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 2000;68:6168–6175.
21. Hartley-Tassell LE, Shewell LK, Day CJ, et al. Identification and characterization of the aspartate chemosensory receptor of *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* 2010;75:710–730.
22. van Alphen LB, Bleumink-Pluym NMC, Rochat KD, van Balkom BWM, Wösten MMSM, van Putten JPM. Active migration into the subcellular space precedes *Campylobacter jejuni* invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol* 2008;10:53–66.
23. Hendrixson DR, DiRita VJ. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Mol Microbiol* 2004;52:471–484.
24. Tu QV, McGuckin MA, Mendz GL. *Campylobacter jejuni* response to human mucin muc2: Modulation of colonization and pathogenicity determinants. *J Med Microbiol* 2008;57:795–802.
25. Hugdahl MB, Beery JT, Doyle MP. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 1988;56:1560–1566.
26. Vegge CS, Brøndsted L, Li Y, Bang DD, Ingmer H. Energy taxis drives *Campylobacter jejuni* toward the most favorable conditions for growth. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:5308–5314.
27. Inglis GD, Kalischuk LD, Busz HW. A survey of *Campylobacter* species shed in faeces of beef cattle using polymerase chain reaction. *Can J Microbiol* 2003;49:655–661.
28. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; approved standard M31-S1. Villanova, Pennsylvania, 2004.
29. Public Health Agency of Canada (PHAC) [homepage on the Internet]. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS). Available from <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/analys-eng.php> Last accessed July 12, 2011.

30. United States Department of Health and Human Services. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Final Report, 2006. Atlanta, Georgia, 2009.
31. European Food Safety Agency (EFSA). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. The EFSA Journal;130:2007.
32. Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: Emergence, transmission and persistence. Future Microbiol 2009;4:189–200.
33. Tajada P, Gomez-Graces JL, Alós JI, Balas D, Cogollos R. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12 beta-lactam agents and combinations with beta-lactamase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:1924–1925.
34. Fouts DE, Mongodin EF, Mandrell RE, et al. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. PLoS Biol 2005;3: e15.
35. Cohn MT, Ingmer H, Mulholland F, Jørgensen K, Wells JM, Brøndsted L. Contribution of conserved ATP-dependent proteases of *Campylobacter jejuni* to stress tolerance and virulence. Appl Environ Microbiol 2007;73:7803–7813.
36. Jeon B, Itoh K, Misawa N, Ryu S. Effects of quorum sensing on flaA transcription and autoagglutination in *Campylobacter jejuni*. Microbiol Immunol 2003;47:833–839.
37. Tam KY, Leung JCK, Chan LY, Lam MF, Tang SC, Lai KN. In vitro enhanced chemotaxis of CD25+ mononuclear cells in patients with familial IgAN through glomerulotubular interactions. Am J Physiol Renal Physiol 2010;299:F359–368.
38. Arsenault J, Letellier A, Quessy S, Normand V, Boulianne M. Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. caecal colonization in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. Prev Vet Med 2007;81:250–264.

39. Letellier A, Beauchamp G, Guévremont E, D'Allaire S, Hurnik D, Quessy S. Risk factors at slaughter associated with presence of *Salmonella* on hog carcasses in Canada. *J Food Prot* 2009;72:2326–2331.
40. Public Health Agency of Canada (PHAC) [homepage on the Internet]. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS). Preliminary Results 2009. Available from <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/2009/index-eng.php> Last accessed July 12, 2011.
41. Avrain L, Humbert F, L'Hospitalier R, Sanders P, Vernozy-Rozand C, Kempf I. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from broilers: Association with production type and antimicrobial use. *Vet Microbiol* 2003;96:267–276.
42. Bywater RJ. Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004;51:361–363.
43. Nelson JM, Chiller TM, Powers JH, Angulo FJ. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: A public health success story. *Clin Infect Dis* 2007;44:977–980.
44. Alfredson DA, Korolik V. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2007;277:123–132.
45. Thibodeau A, Quessy S, Guévremont E, et al. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolates from commercial broiler chickens receiving growth-promoting doses of bacitracin or virginiamycin. *Can J Vet Res* 2008;72:129–136.
46. Felek S, Lawrenz MB, Krukonis ES. The *Yersinia pestis* autotransporter yapC mediates host cell binding, autoaggregation and biofilm formation. *Microbiology* 2008;154:1802–1812.
47. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009;155:1749–1757.
48. Charbonneau M, Mourez M. Functional organization of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *J Bacteriol* 2007;189:9020–9029.

49. Merchant-Patel S, Blackall PJ, Templeton J, et al. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genotyping by high-resolution melting analysis of a *flaA* fragment. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:493–499.
50. Josenhans C, Suerbaum S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* 2002;29:605–614.

2.8 Tables

Table I. Distribution of minimum inhibitory concentration (MIC) and resistance of *C. jejuni* isolated from organic chicken lots

Antibiotics	Breakpoint ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$) distribution (%)										Isolate resistance (%)
		< 2	2	4	8	16	32	64	128	256	> 256	
Tetracycline	≥ 16	43	0	0	14	2	27	4	10	0	0	44
Erythromycin	≥ 32	84	0	11	0	0	0	0	0	0	5	6
Chloramphenicol	≥ 32	64	0	27	9	0	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacin	≥ 4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gentamicin	≥ 8	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nalidixic acid	≥ 64	0	2	70	5	23	0	0	0	0	0	0
Clindamycin	> 4	95	0	4	1	0	0	0	0	0	0	2
Ampicillin	> 16	3	0	61	32	4	0	0	0	0	0	0
Azithromycin	≥ 8	95	0	0	0	0	0	0	5	0	0	6
Bacitracin	Undefined	0	0	0	0	0	0	31	5	30	34	nd
Ceftiofur	Undefined	0	0	0	0	0	4	59	28	2	7	nd

N — 54 isolates; nd — not determined.

2.9 Figures

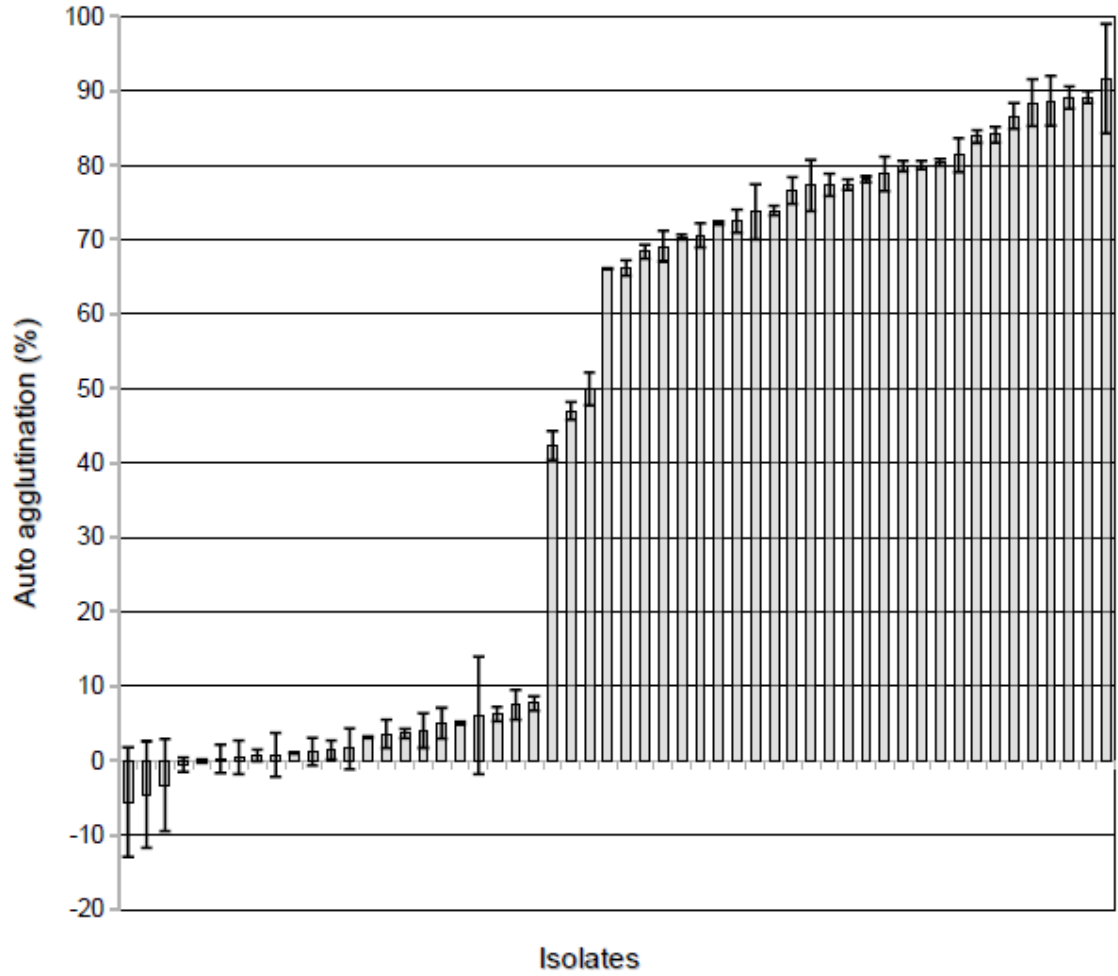


Figure 1. Autoagglutination of *C. jejuni* isolated from organic chicken lots (N = 54 isolates), sorted by ascending values. Errors bars: standard deviation

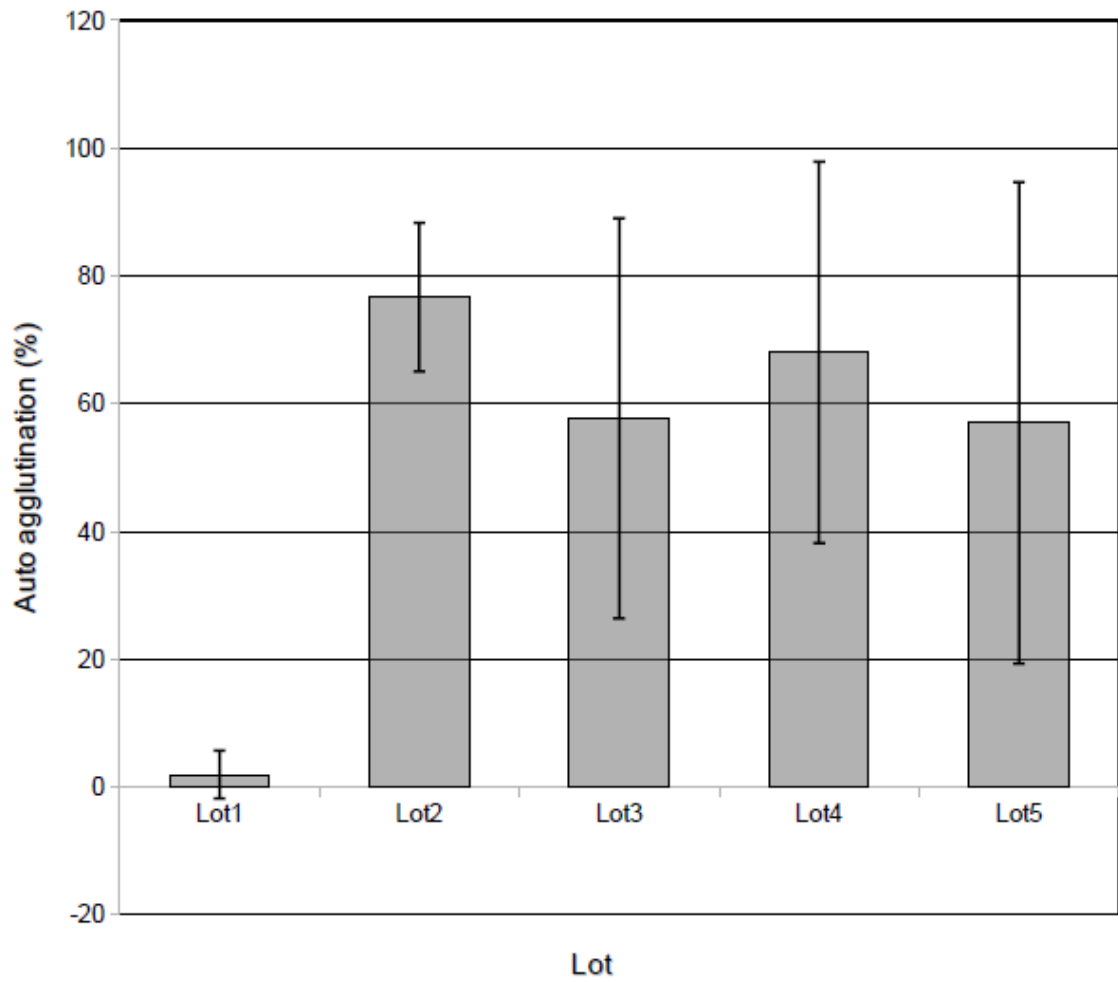


Figure 2. Mean autoagglutination value of *C. jejuni* isolates per organic lot. Isolates per lots (Lot 1, N = 19; Lot 2, N = 16; Lot 3, N = 10; Lot 4, N = 2; and Lot 5, N = 7). Errors bars: standard deviation

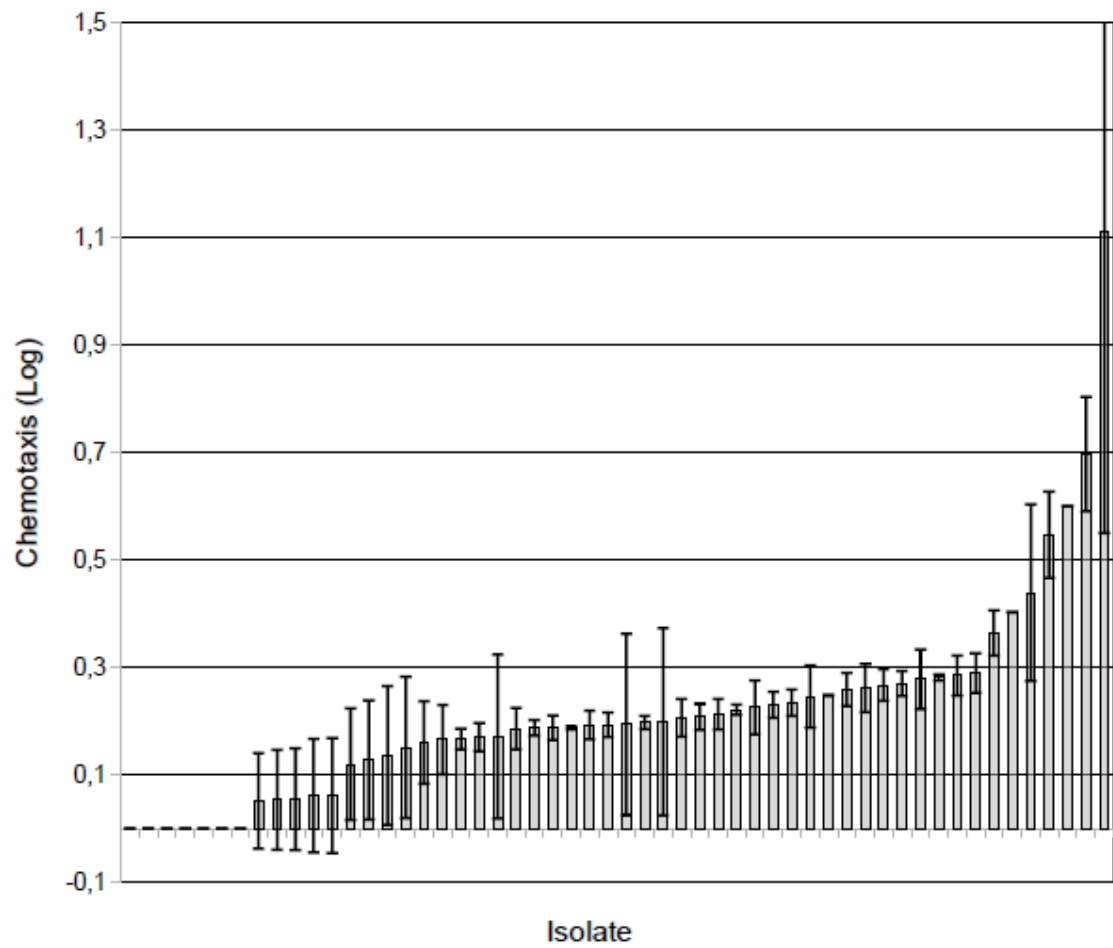


Figure 3. Chemotaxis of *C. jejuni* isolated from organic chicken lots (N = 54), sorted by ascending values. Errors bars: standard deviation

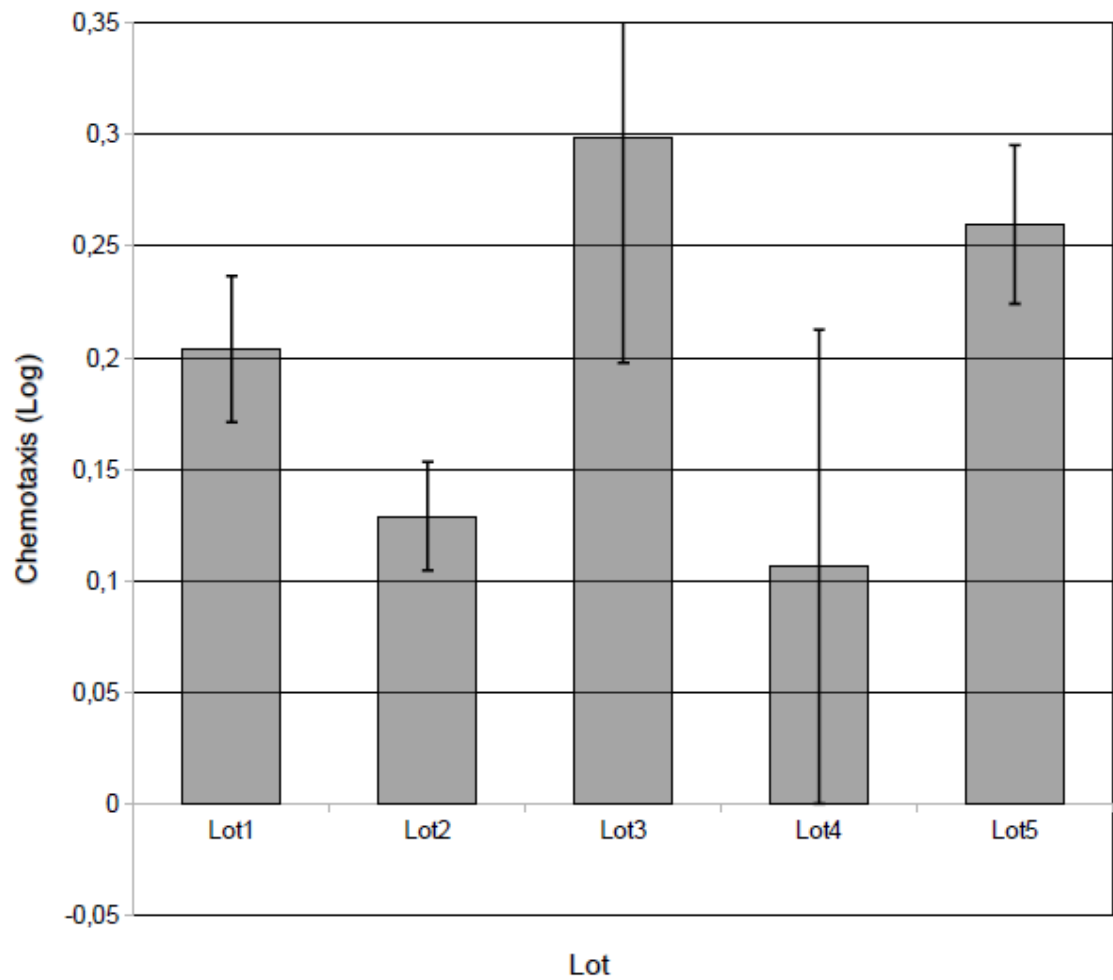


Figure 4. Mean chemotaxis values of *C. jejuni* isolated from organic chickens according to lots. Isolates per lots (Lot 1, N = 19; Lot 2, N = 16; Lot 3, N = 10; Lot 4, N = 2; and Lot 5, N = 7). Errors bars: standard deviation

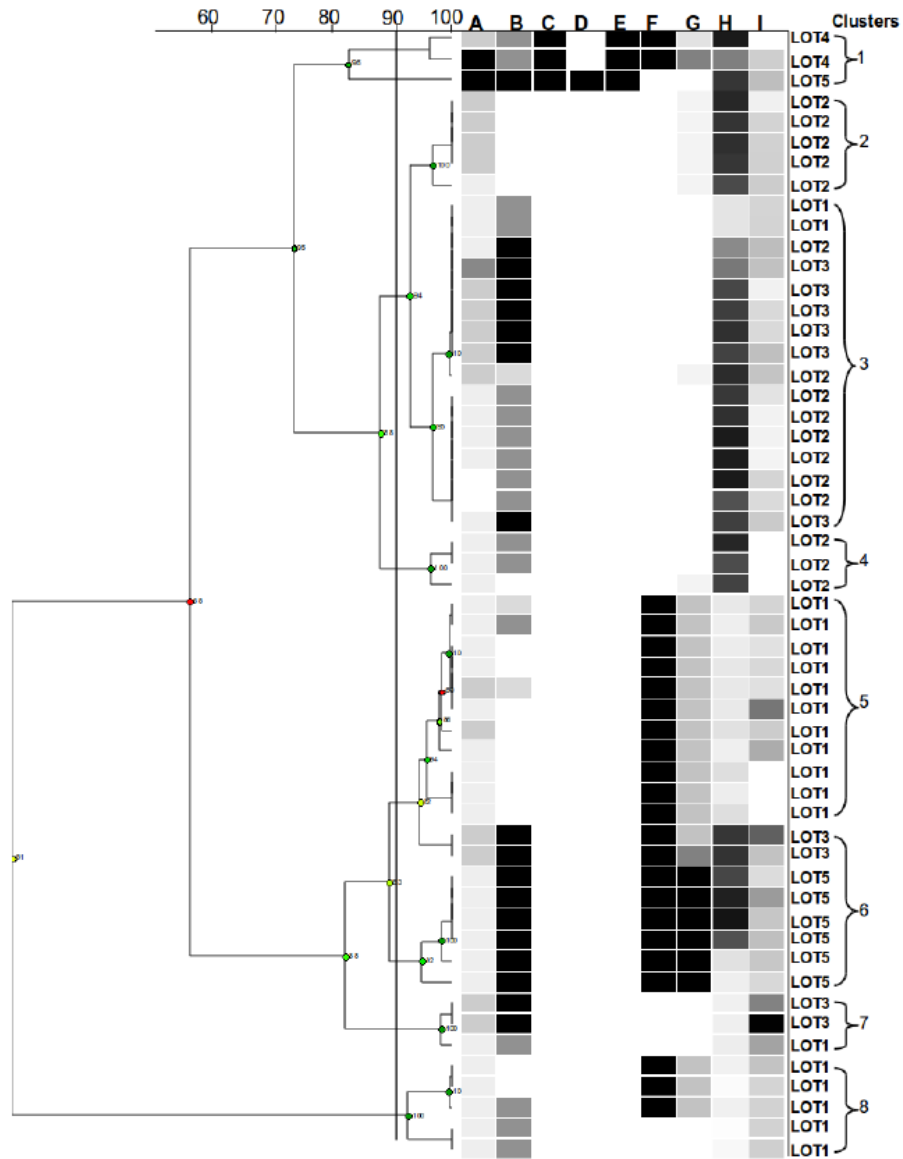


Figure 5. Phenotypical clustering of *C. jejuni* isolates recovered from organic chicken lots. A — ceftiofur minimum inhibitory concentration (MIC). B — bacitracin MIC. C — azithromycin resistance. D — clindamycin resistance. E — erythromycin resistance. F — tetracycline resistance. G — tetracycline MIC. H — autoagglutination. I — chemotaxis.

Chapitre 3: Distribution of colonization and antimicrobial resistance genes in *Campylobacter jejuni* isolated from chicken.

Publié dans Foodborne Pathogens and Diseases. 19 mars 2013. [Epub ahead of print]

Contribution du candidat:

J'ai participé à l'élaboration du protocole de recherche en proportion équivalente de celle des autres coauteurs. J'ai effectué les collectes des échantillons et effectué toutes les analyses de laboratoire à l'exception de l'impression des puces à ADN qui a été réalisée à l'Institut de recherche en biotechnologie. J'ai analysé les résultats en proportion équivalente de celle des autres coauteurs. J'ai rédigé l'article conformément aux exigences de la revue et intégré les commentaires faits par les coauteurs ainsi que ceux formulés par les réviseurs de l'article.

Distribution of colonization and antimicrobial resistance genes in *Campylobacter jejuni*
isolated from chicken.

Alexandre Thibodeau^{a-b-d}, Philippe Fravallo^{a-b-d}, Philippe Garneau^b, Luke Masson^{b-c},
Sylvette Laurent-Lewandowski^a, Sylvain Quessy^{a-b-d}, Josée Harel^{b-d} and Ann Letellier^{a-b-d}.

^a: Industrial-CRSNG Meat Safety Research Chair/ Chaire de recherche industrielle-CRSNG
en salubrité des viandes (CRSV), Université de Montréal, Département de microbiologie et
de pathologie vétérinaire, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe (Québec), Canada, J2S 2M2.

^b: Swine Infectious Disease Research Center/ Centre de recherche en infectiologie porcine
(CRIP), Université de Montréal, Département de microbiologie et de pathologie vétérinaire,
3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe (Québec), Canada, J2S 2M2

^c: National Research Council Canada, 6100 Royalmount avenue, Montréal, (Québec),
Canada, H4P 2R2

^d: Group for research and education in food safety/Groupe de recherche et d'enseignement
en salubrité alimentaire (GRESA), Université de Montréal, Département de microbiologie
et de pathologie vétérinaire, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, (Québec), Canada, J2S 2M2

Corresponding authors: tel: 450-773-8521 # 8672, FAX number: 450-778-8157

Running Title: Chicken *Campylobacter jejuni* genes occurrence

3.1 Abstract

Campylobacter jejuni is an important worldwide foodborne pathogen commonly found as a commensal organism in poultry that can reach high numbers within the gut after colonization. Although information regarding some genes involved in colonization is available, little is known about their distribution in strains isolated specifically from chickens and if there is a linkage between antimicrobial resistance (AMR) and colonization genes. To assess the distribution and relevance of genes associated with chicken colonization and AMR, a *C. jejuni* microarray was created to detect 254 genes of interest in colonization and AMR including variants. DNA derived from chicken-specific *Campylobacter* isolates collected in 2003 (n = 29) and 2008 (n = 28) was hybridized to the microarray and compared. Hybridization results showed variable colonization-associated gene presence. Acquired AMR genes were low in prevalence while chemotaxis receptors, arsenic resistance genes as well as genes from the cell envelope and flagella functional groups were highly variable in their presence. Strains clustered into two groups, each linked to different control strains, 81116 and NCTC11168. Clustering was found to be independent of collection time. We also show that AMR weakly associated with the CJ0628 and *arsR* genes. Although other studies have implicated numerous genes associated with *C. jejuni* chicken colonization, our data on chicken-specific isolates suggest the opposite. The enormous variability in presumed colonization gene prevalence in our chicken isolates suggests that many are of lesser importance than previously thought. Alternatively, this also suggests that combinations of genes may be required for natural colonization of chicken intestines.

Keywords: *Campylobacter jejuni* genes, microarray, chicken colonization, antimicrobial resistance

3.2 Introduction

Campylobacter jejuni is a major foodborne pathogen. Human campylobacteriosis has been linked to consumption and mishandling of contaminated poultry (Young et al., 2007). One way to reduce human exposure to *C. jejuni* would be to control pathogen levels at the farm (Nauta et al., 2009). In order to do so, a better understanding of the dynamic existing between *C. jejuni* and its chicken host is needed (Hermans et al., 2011).

Several studies have identified genes that may be associated with chicken colonization (Hermans et al., 2011): flagella/motility/chemotaxis (*fliA*, *pglE*, *pflA*, *motA*, *cheY*, *rpoN*, *fliA*) (Wassenaar et al., 1993; Hendrixson and DiRita, 2004; Fernando et al., 2007), stress tolerance (*katA*, *AhpC*, *sodB*, *ahpC* PKK) (Klancnik et al., 2009; Palyada et al., 2009; Gangaiah et al., 2010), efflux pump (*cmeABC*) (Lin and Martinez, 2006; Quinn et al., 2007), nutrient acquisition and use (*cj1403*, *cj1198*, *cfrA*) (Palyada et al., 2004; Metris et al., 2011), secreted protein (*cia*) (Biswas et al., 2007) and adhesins (*cadF*, *dnaJ*, *pldA*, *porA*) (Ziprin et al., 2001; Hiet et al., 2008; Flanagan et al., 2009). The link existing between genes and chicken colonization is often validated using single strains and transposition mutants (Javed et al., 2010), without comparison of their presence in a large population of field strains. There are still knowledge gaps in their exact distribution and stability over time in chicken strains. Gaining more knowledge on their distribution would be helpful to better understand field strain genetic diversity in regards to chicken colonization and to establish which genes are more important in strains isolated from a commercial setting. Two separate reviews on *Campylobacter* chicken colonization (Dasti et al., 2010; Hermans, Van Deun et al., 2011) have stressed that, more comprehensive studies are necessary to understand the relative importance of colonization factors, which could help in the design of suitable farm control strategies.

Although virulence has been linked with AMR (Pitout, 2012) such linkages are less clear in *C. jejuni* despite that AMR is increasingly recognized as an important public health threat (Alfredson and Korolik, 2007). Monitoring of the association of *C. jejuni*

colonization traits and AMR is important in order to anticipate the emergence of highly adapted strains due to the use of antimicrobial agents during rearing.

Given their inherent parallel processing power, microarrays are useful tools to assess the genetic contents of a bacterial isolate. With regard to *Campylobacter*, they have been successfully used in comparative hybridization studies (Wilson et al., 2010), to measure differential gene expression levels (Malik-Kale et al., 2008), for typing (Rodin et al., 2008), for the detection of *Campylobacter* in various environmental matrices (Suo et al., 2010) and in epidemiological studies (Hepworth et al., 2011; Marotta et al., 2012). To our knowledge, no comprehensive microarray studies have focussed on correlating the distribution of chicken colonization genes and their possible association with AMR in *C. jejuni* strictly isolated from chickens.

The aim of this study was to describe the relative distribution of genes related to chicken colonization and AMR, in strains isolated from caecal contents sampled at slaughter houses, using a custom DNA microarray. This study also assessed the data for any association of the detected genes with the year of isolation as well as correlations between AMR and colonization genes.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Strains and media

Isolates collected in 2003 and 2008 were recovered from chickens at slaughter (average of 37 days of age) using the same method as described elsewhere (Arsenault et al., 2007). Thirty individual 1g caecal samples were taken from different lots and then pooled in three samples of 10g. Samples were mixed 1:1 (w/v) in peptone buffered water (AES Laboratory, Montreal, Québec, Canada), directly streaked on mCCDA Agar (Oxoid, Nepean, Ontario, Canada) and incubated at 42°C for 48 h in a microaerobic atmosphere using Oxoid's Atmosphere Generation System with the *Campylobacter* gas generation kit. Typical colonies (ASPC MFLP-46) were purified on mCCDA Agar (Oxoid) and plated on TSA 5% sheep blood agar (PML Microbiologicals (Quélab), Montréal, Québec, Canada).

Typical isolates (small gram negative spiral shaped bacteria, motile) (Thibodeau et al., 2011) were further identified to the species level by PCR as previously described (Inglis and Kalischuk, 2003). A total of 57 *C. jejuni* confirmed isolates (29 from 16 lots in 2003 and 28 from 9 lots in 2008) were used in this study.

Control strains *C. jejuni* RM1221 (#BAA-1062, chicken carcass origin (Fouts et al., 2005)), *C. jejuni* NCTC11168 (#BAA-33291, human origin (Gundogdu et al., 2007)) and *E. coli* ATCC 25922 were acquired from Cedarlane (Ontario, Canada). Strains *C. jejuni* 81-176 (human origin, (Pearson et al., 2007)) and *C. jejuni* 81116 (human origin, (Hofreuter et al., 2006)) were a kind gift from Dr. Shaun Cawthraw, Veterinary Laboratories Agency, UK. All strains were kept at -80°C in Brucella broth containing 0.1% agar and 25% glycerol. To minimize strain genetic variations, all experiments were started from an aliquot taken from a new -80°C stock thus avoiding potential variations caused by the use of a single colony for starting inoculums. Strains were cultured on mCCDA, Mueller Hinton Agar (Oxoid) or TSA sheep blood agar when needed.

3.4.2 Microarray gene selection and probe design

The *C. jejuni* microarray V1 was composed of 70-mer oligonucleotide probes specific for genes associated with envelope biosynthesis, pathogenesis, chemotaxis/mobility, detoxification, metabolism, transport and nutrient binding, global regulation, hypothetical or unclassified functions and AMR genes. They were chosen based on a literature review of genes or functional groups involved to different degrees in chicken colonization.

Oligonucleotides were designed (Table S1 in the supplemental material) as described previously with some modifications (Bruant et al., 2006). Some AMR probe sequences were derived from a published microarray (Hamelin et al., 2007). The rest of the probes were design using the YODA program (Nordberg, 2005). Probes were based on GenBank sequences including, whenever possible, sequences from the chicken strain RM1221 as a template. The specificity of each oligonucleotide sequence was individually verified through Blastn searches (nr/nt database, *Campylobacter jejuni* taxid 197, word size

of 11) in GenBank. Details on probe specificity are given in the supplemental materials Table S1. Probes were synthesized by Operon (Huntsville, Alabama, USA) and printed at the National Research Council (Montréal, Québec, Canada).

3.3.3 Microarray construction

Positive controls included *groEL* (*cpn60*, designed in this study) (Chaban et al., 2009) for the identification of *Campylobacter* genera as well as *mapA* and *hipO* for the confirmation of *C. jejuni* species (Inglis and Kalischuk, 2003). A universal probe, EUB, able to hybridize to prokaryotic 16S rRNA genes was also added as a positive control (Maynard et al., 2005). The newly designed probe for *Arabidopsis thaliana* chlorophyll synthetase gene (*ara*) was included as a negative control. The complete array was composed of four subarrays, in which each oligonucleotide was printed in duplicate (except EUB which was printed four times) on Corning Ultra GAPS[™] slides (Corning Canada, Whitby, Ontario) (Fig. 1). Three complete independent arrays were printed on the same slide. Some printing spots were left empty (printing buffer only) (Fig. 1).

3.3.4 DNA extraction, labelling and hybridization

C. jejuni isolates were plated on mCCDA agar from a single -80°C storage aliquot. They were incubated 24 h at 42°C then streaked on Mueller-Hinton agar. DNA was extracted using the commercial Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit following the manufacturer's instructions. DNA labelling and hybridization was performed according to the protocol described in another study (Bruant, Maynard et al., 2006). Complete details are provided in supplemental materials.

3.3.5 Microarray analysis and validation

Arrays were read using a ScanArray Lite fluorescent scanner and the resulting images analyzed with ScanArray Express version 1.1. After an initial visual inspection of the image was performed, a numerical analysis of the fluorescence obtained for each probe was carried out. For each hybridized strain, a probe was considered positive if the mean of

the median probe fluorescence of the duplicates was above 1000 fluorescence units and four times higher than the background. The background was determined as the mean fluorescence of the negative control (*ara*) and empty spots (printing buffer). Microarray validation was done by multiple hybridizations of the four control *C. jejuni* strains. *C. coli* LSPQ 3655 (lab strain) and *E. coli* ATCC 25922 were used as negative controls. For each control strain, total DNA was extracted from three distinct fresh cultures, labelled and hybridized to the microarray in three separate experiments, on three separate microarray slides.

3.3.6 Statistical analysis

Microarray results were analyzed with the TMeV 5 program (Hannon et al., 2009); a dendrogram was derived from the presence of all genes (genes and variants) with heterologous hybridization (Euclidian distance and single linkage for clustering). Cluster stability (per cent) was defined by subjecting the chosen clusters to 500 bootstrapping iterations in TMeV 5. The Fisher exact test (S-Plus, v8) and Bonferroni correction were used to assess the association of specific genes to strains clusters or to a recovery time. The relevance network analysis was also carried out using TMeV 5 with a minimal correlation value of 0.9. For all statistical analysis, alpha was fixed at 0.05.

3.4 Results

3.4.1 Gene distribution and correlation

All strains were positive for 94 genes (supplemental materials table S1) which were distributed in the following fashion: 14 AMR, four envelope biosynthesis, seven pathogenesis, 11 chemotaxis/mobility, five detoxification, five metabolism, 32 transport and nutrient binding, three regulation, five hypothetical, and four unclassified genes including four controls. Although all probes on the microarray have been validated, a total of 13 genes were never detected in any of the strains in this study (supplemental materials

table S1) while most probes (147) demonstrated a variable presence, ranging from 2% to 98% (Table 1).

Relevance network analysis identified some co-linked genes (Table S2-S4 in the supplemental material). Among the 2008 strains, the presence of an antibiotic resistance gene (*aphA-3*, coding for resistance to the aminoglycoside kanamycin (Gibreel et al., 2004)) correlated with a variant of a colonization gene (*CJ0628*, a lipoprotein, putative autotransporter, mediating adherence and invasion of epithelial cells (Ashgar et al., 2007)). In the 2003 strains, the presence of *CJE900*, a metallo-beta-lactamase family protein, correlated with the presence of a variant of *arsR*, an arsenic resistance operon repressor.

3.4.2 Strains comparison

Dendrogram analysis, based on the heterogeneous presence of the genes, made it possible to divide the strains into two main groups (Fig. 2). A total of 24 strains were clustered in a group that included strain 81116 and 35 others with strain NCTC11168. These two groups were separated by a total of 37 genes (Table 2). Strain comparisons revealed that they mainly aggregated together according to their origin (lot, i.e. a group of chickens raised on the same farm and processed the same day) rather than the collection time period (Fig. 2), even though strains recovered from a specific sampling year were exclusively positive for some probes (Table 1). Control strains 81-176, RM1221 and *C. coli* were distant to all hybridized strains.

3.5 Discussion

3.5.1 Microarray

This novel study assessed the distribution of chicken colonization-associated genes and their correlation with antimicrobial resistance genes in a chicken-specific strain collection with the use of a newly customized DNA microarray. The microarray was found to be a reliable tool for the evaluation of 254 genes including the detection of gene variants up to a 10% homology divergence. The designed probes were specific, as demonstrated by

the *C. coli* and *E. coli* negative control hybridizations. The design of the microarray, as well as the conservative cut-off criteria used to define positivity for a given probe, possibly resulted in an underestimation of the effective gene presence. However, this approach lowers the likelihood of reporting false positive results and consequently increased the robustness of the hybridization data. As an example, more than 90% of the strains were positive for *cprR*, a gene associated with regulatory functions. This was expected considering the essential roles it plays for all bacterial functions (Raphael et al., 2005). The missing 10% is presumably due to sequence variants not covered by our new probes. It is important to note that our microarray may not be able to detect subtle genomic changes that may have an impact on the *C. jejuni* phenotype (Gaynor et al., 2004). Phenotypic properties of our strains will be determined in a future study.

The *C. jejuni* genome contains 2,427 gene families with an estimated 1,295 gene families found in its core genome (Friis et al., 2010). It has been observed that minor nucleotide sequence variations in its core genome, such as mutations in flagella, LOS or regulation genes, might account for differential *C. jejuni* pathogenicity in strains indistinguishable by comparative genomic hybridization or pulse-field gel electrophoresis (Duong and Konkel, 2009). Consequently, using probes able to detect gene variants became attractive in order to study *C. jejuni* colonization genes.

3.5.2 Distribution of genes with heterogeneous occurrence

Our data showed a large variation in the distribution of genes monitored by our microarray. As already observed, genes coding for the flagella and the cell envelope were the most variable (Taboada et al., 2004) while many genes (37), in the transport and nutrient binding groups, were more conserved. In an independent study (Marotta et al., 2012), the virulence gene content of different *Campylobacter* species isolated from different sources i.e. humans and milk in addition to chicken (carcass and caecum), was also found to be variable. Due to the different sources of isolation, parallels between the two studies are tenuous. However, some important differences were noted. For example, in their paper, *C. jejuni* strains originating from chicken feces, showed variability in the

presence of *cdtA*, B, C unlike our study where they were present in all isolates. Furthermore, *flaB* was never found in *C. jejuni* while it was found in the majority of our isolates (93%). In contrast, *waaM*, *neuC*, *flgK*, *fliM*, *pglE* and *motA* were conserved in all *C. jejuni* isolated from chicken feces while their presence was highly variable in our strain collection. Interestingly, both studies show that genes *cj0903c* and *ciaB* were found in all tested *C. jejuni* strains. Finally, the strains in our study displayed more genetic diversity. These differences were presumably due to the incorporation of gene variants into our microarray design and possible also to the different geographical origins of the strains used by both studies.

In our study, the overall observed variable gene prevalence in our chicken colonizing strains illustrates that genes previously thought important for chicken colonization may be of less relevance when characterizing field strains or alternatively, they may present more genetic diversity than expected. For example, the *ggt* gene, involved in persistence of *C. jejuni* in chicken flocks (Barnes et al., 2007), was only found in 16 % of all our strains, in accordance with another study (Zautner et al., 2011) and only in the 2008 time period. This might be linked to the fact that *ggt* is not absolutely required for strain persistence or alternatively, that the chickens were only recently colonized. Therefore, the exact role of the observed variable genes and their relative importance in natural chicken colonization in many field strains remains to be elucidated.

It was previously reported that arsenic resistance genes differ from strains with different chicken colonization potentials (Ahmed et al., 2002) and that poultry isolates present variable levels of arsenic resistance (Wang et al., 2009; Sapkota et al., 2006). Arsenic compounds are commonly used in poultry for the control of coccidiosis (Li et al., 2011) and their impact on *C. jejuni* chicken colonization has yet to be assessed. In the present study, we noted that arsenic resistance genes had a variable presence among the isolates and that its presence in the 2008 strains correlated with the presence of other genes such as *dmsA*, *fspA* and *rloA* (Table S2). This suggests that arsenic resistance may only have an indirect role in chicken colonization.

Resistance to kanamycin can be mediated by the plasmid-based gene *aphA-3* in *C. jejuni*. (Gibreel, Skold et al., 2004). Kanamycin resistance is rarely monitored in *C. jejuni* as it is not the drug of choice for treatment of severe human campylobacteriosis (drugs of choice, in order of importance, are macrolide, quinolone/fluoroquinolone and tetracycline (Young, Davis et al., 2007)). Monitoring this resistance is of interest since *C. jejuni* can act as a reservoir of the *aphA-3* gene and could transfer this resistance to other bacteria. The *tetO* gene, mediating resistance to tetracycline by target protection, is also located on a plasmid. The *tetO* plasmid may be involved in *C. jejuni* episome plasticity and can be present in strains in the absence of antibiotic pressure (Friis et al., 2007). In the current study, *aphA-3* and *tetO* occurred in 16% and 67% of the isolates respectively.

For some bacteria, it has been demonstrated that AMR genes may co-localize with virulence genes, making the co-selection of virulent AMR strains possible (Rosengren et al., 2009). For *C. jejuni*, involvement of AMR genes in chicken colonization remains to be clarified as the present study was not able to clearly confirm such a link even though some AMR genes weakly correlated with colonization genes.

3.5.3 Distribution of genes conserved in all strains

Among the 254 genes in this study, 94 genes were present in all strains regardless of the isolation year (Table S1). These gene products could be considered as a target of choice for control of *C. jejuni* (e.g. for either vaccination or a novel antimicrobial target). Interesting results were obtained for the chemotaxis gene group where the deletion of the chemotaxis protein *cheY* impaired chicken colonization (Hendrixson and DiRita, 2004) while modification of the regulatory proteins *cheB* and *cheR* (Kanungpean et al., 2011) or chemotactic receptors (Hendrixson and DiRita, 2004; Vegge et al., 2009) increased or lowered the *C. jejuni* virulence associated phenotype. In our study, the presence of genes coding for most chemotaxis receptors was found to be variable as opposed to the consistent detection of *che* genes. This suggests that different chemo-attractant recognition capacities existed in our test strains, potentially leading to different chemotaxis abilities.

3.5.4 Field strain comparison

Chicken colonization is a dynamic process driven by numerous genes. In some cases, strains indistinct by various typing methods presented different phenotypic properties (Malik-Kale et al., 2007). Consequently, the higher resolving power of a DNA microarray makes it attractive as a valuable method to compare closely related strains (Taboada et al., 2008).

In our study, test strains clustered around two different control strains, 81116 and NCTC11168. The strain 81116 was described as more efficient in chicken colonization than strain NCTC11168 (Ahmed, Manning et al., 2002). Previous studies found that virulence phenotypes may correlate with genotypes (On et al., 2006). The fact that these two reference strains were found in different clusters in our study suggests different colonization potentials may exist between the two main *C. jejuni* groups. Confirming chicken colonization potential of strains present in both clusters remains to be done.

As expected, it was observed that strains did not cluster according to the time of sampling but rather to lot origin, suggesting that important genes required for chicken colonization may be stable over time. It was previously observed that *C. jejuni* is highly clonal within the same farm (Normand et al., 2008). In contrast, some strains from different lots in our study also clustered, which could reflect potential contamination by the same *C. jejuni* source.

3.6 Conclusion

Overall, our results illustrate the diversity of gene distribution in field strains over time by detailing the presence of chicken-associated colonization genes in a large chicken-derived *C. jejuni* collection. Our study also raised the possibility to revisit and refine the exact role of some chicken colonization determinants of *C. jejuni* in the context of natural colonization. Despite the genetic diversity of strains collected, clustering indicated the presence of two populations. We propose that this grouping is not associated with the collection time period but that it could correlate with the colonization potential of the

chicken-specific *Campylobacter* isolates. Lastly, our results suggest a weak association between AMR and the studied colonization genes in our strain collection.

3.7 Supplementary data

Table S1 contains information regarding gene presence, probe sequences and hybridization to control strains. Tables S2, S3 and S4 contain information on gene correlations. Supplemental materials also contain the details of DNA labelling and array hybridization. Supplementary data can be accessed online.

3.8 Acknowledgements

We thank the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) as well as the Poultry Industrial Council of Canada (PIC) for funding of the project. We also thank Miria Elias of the NRC microarray lab, the participating chicken processing facilities, the Éleveurs de volailles du Québec and the producers for supporting the project.

3.9 References

- Ahmed, IH, Manning G, Wassenaar TM, et al. Identification of genetic differences between two *Campylobacter jejuni* strains with different colonization potentials. *Microbiol* 2002; 148:1203-1212.
- Alfredson, DA and Korolik V. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 277:123-132.
- Arsenault, J, Letellier A, Quessy S, et al. Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. caecal colonization in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. *Prev Vet Med* 2007; 81:250-264.
- Ashgar, SS, Oldfield NJ, Wooldridge KG, et al. CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. *J Bacteriol* 2007; 189:1856-1865.

- Barnes, IH, Bagnall MC, Browning DD, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase has a role in the persistent colonization of the avian gut by *Campylobacter jejuni*. *Microb Pathog* 2007; 43:198-207.
- Biswas, D, Fernando UM, Reiman CD, et al. Correlation between in vitro secretion of virulence-associated proteins of *Campylobacter jejuni* and colonization of chickens. *Curr Microbiol* 2007; 54:207-212.
- Bruant, G, Maynard C, Bekal S, et al. Development and validation of an oligonucleotide microarray for detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:3780-3784.
- Calderon-Gomez, LI, Hartley LE, McCormack A, et al. Potential use of characterised hyper-colonising strain(s) of *Campylobacter jejuni* to reduce circulation of environmental strains in commercial poultry. *Vet Microbiol* 2009; 134:353-361.
- Chaban, B, Musil KM, Himsworth CG, et al. Development of *cpn60*-based real-time quantitative PCR assays for the detection of 14 *Campylobacter* species and application to screening of canine fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:3055-3061.
- Dasti, JI, Tareen AM, Lugert R, et al. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int J Med Microbiol* 2010; 300:205-211.
- Dorrell, N, Mangan JA, Laing KG, et al. Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Res* 2001; 11:1706-1715.
- Duong, T and Konkel ME. Comparative studies of *Campylobacter jejuni* genomic diversity reveal the importance of core and dispensable genes in the biology of this enigmatic food-borne pathogen. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20:158-165.
- Fernando, U, Biswas, D, Allan, et al. Influence of *Campylobacter jejuni* *fliA*, *rpoN* and *flgK* genes on colonization of the chicken gut. *Int J Food Microbiol* 2007; 118: 194-200.
- Fouts, DE, Mongodin EF, Mandrell RE, et al. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple campylobacter species. *PLoS Biol* 2005; 3:e15.
- Friis, C, Wassenaar TM, Javed MA, et al. Genomic characterization of *Campylobacter jejuni* strain M1. *PLoS One* 2010; 5:e12253.

- Friis, LM, Pin C, Taylor DE, et al. A role for the *tet(O)* plasmid in maintaining *Campylobacter* plasticity. *Plasmid* 2007; 57:18-28.
- Gangaiah, D, Liu Z, Arcos J, et al. Polyphosphate kinase 2: a novel determinant of stress responses and pathogenesis in *Campylobacter jejuni*. *PLoS One* 2010; 5:e12142.
- Gaynor, EC, Cawthraw S, Manning G, et al. The genome-sequenced variant of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 and the original clonal clinical isolate differ markedly in colonization, gene expression, and virulence-associated phenotypes. *J Bacteriol* 2004; 186:503-517.
- Gibreel, A, Skold O and Taylor DE. Characterization of plasmid-mediated *aphA-3* kanamycin resistance in *Campylobacter jejuni*. *Microb Drug Resist* 2004; 10:98-105.
- Gundogdu, O, Bentley SD, Holden MT, et al. Re-annotation and re-analysis of the *Campylobacter jejuni* NCTC11168 genome sequence. *BMC Genomics* 2007; 8:162.
- Hamelin, K, Bruant G, El-Shaarawi A, et al. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:477-484.
- Hannon, SJ, Taboada EN, Russell ML, et al. Genomics-based molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from feedlot cattle and from people in Alberta, Canada. *J Clin Microbiol* 2009; 47:410-420.
- Hendrixson, DR and DiRita VJ. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Mol Microbiol* 2004; 52:471-484.
- Hepworth, PJ, Ashelford KE, Hinds J, et al. Genomic variations define divergence of water/wildlife-associated *Campylobacter jejuni* niche specialists from common clonal complexes. *Environ Microbiol* 2011; 13:1549-1560.
- Hermans, D, Van Deun K, Martel A, et al. Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Vet Res* 2011; 42.
- Hiett, KL, Stinzi, A, Andacht, TM, et al. Genomic differences between *Campylobacter jejuni* isolates identify surface membrane and flagellar function gene products potentially important for colonizing the chicken intestine. *Funct Integr Genomics* 2008; 8: 407-20.

- Hofreuter, D, Tsai J, Watson RO, et al. Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Infect Immun* 2006; 74:4694-4707.
- Inglis, GD and Kalischuk LD. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69:3435-3447.
- Javed, MA, Grant AJ, Bagnall MC, et al. Transposon mutagenesis in a hyper-invasive clinical isolate of *Campylobacter jejuni* reveals a number of genes with potential roles in invasion. *Microbiol* 2010; 156:1134-1143.
- Kanungpean, D, Kakuda T and Takai S. Participation of *CheR* and *CheB* in the chemosensory response of *Campylobacter jejuni*. *Microbiol* 2011; 157:1279-1289.
- Klancnik, A, Guzej B, Jamnik P, et al. Stress response and pathogenic potential of *Campylobacter jejuni* cells exposed to starvation. *Res Microbiol* 2009; 160:345-352.
- Kudirkiene, E, Buneviciene J, Brondsted L, et al. Evidence of broiler meat contamination with post-disinfection strains of *Campylobacter jejuni* from slaughterhouse. *Int J Food Microbiol* 2011; 145 Suppl 1:S116-120.
- Li, C, Wang X, Wang G, et al. Genome-wide expression analysis of roxarsone-stimulated growth of broiler chickens (*Gallus gallus*). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2011; 6:264-270.
- Lin, J and Martinez A. Effect of efflux pump inhibitors on bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:966-972.
- Malik-Kale, P, Parker CT and Konkel ME. Culture of *Campylobacter jejuni* with sodium deoxycholate induces virulence gene expression. *J Bacteriol* 2008; 190:2286-2297.
- Malik-Kale, P, Raphael BH, Parker CT, et al. Characterization of genetically matched isolates of *Campylobacter jejuni* reveals that mutations in genes involved in flagellar biosynthesis alter the organism's virulence potential. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:3123-3136.
- Marotta, F, Zilli K, Tonelli A, et al. Detection and Genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Use of DNA Oligonucleotide Arrays. *Mol Biotechnol* 2012. Epub ahead of print.
- Maynard, C, Berthiaume F, Lemarchand K, et al. Waterborne pathogen detection by use of oligonucleotide-based microarrays. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:8548-8557.

- Metris, A, Reuter M, Gaskin DJ, et al. *In vivo* and *in silico* determination of essential genes of *Campylobacter jejuni*. BMC Genomics 2011; 12:535.
- Nauta, M, Hill A, Rosenquist H, et al. A comparison of risk assessments on *Campylobacter* in broiler meat. Int J Food Microbiol 2009; 129:107-123.
- Nordberg, EK. YODA: selecting signature oligonucleotides. Bioinformatics 2005; 21:1365-1370.
- Normand, V, Boulianne M and Quessy S. Evidence of cross-contamination by *Campylobacter* spp. of broiler carcasses using genetic characterization of isolates. Can J Vet Res 2008; 72:396-402.
- On, SL, Dorrell N, Petersen L, et al. Numerical analysis of DNA microarray data of *Campylobacter jejuni* strains correlated with survival, cytolethal distending toxin and haemolysin analyses. Int J Med Microbiol 2006; 296:353-363.
- Palyada, K, Sun, YQ, Flint, A, et al. Characterization of the oxidative stress stimulon and *PerR* regulon of *Campylobacter jejuni*. BMC Genomics 2009; 10: 481.
- Palyada, K, Threadgill, D, Stinzi, A. Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. J Bacteriol 2004; 186: 4714-29.
- Pearson, BM, Gaskin DJ, Segers RP, et al. The complete genome sequence of *Campylobacter jejuni* strain 81116 (NCTC11828). J Bacteriol 2007; 189:8402-8403.
- Pitout, JD. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. Front Microbiol 2012; 3:9.
- Quinn, T, Bolla, JM, Pages, JM, et al. Antibiotic-resistant *Campylobacter*: could efflux pump inhibitors control infection? J Antimicrob Chemother 2007; 59: 1230-6.
- Raphael, BH, Pereira S, Flom GA, et al. The *Campylobacter jejuni* response regulator, *CbrR*, modulates sodium deoxycholate resistance and chicken colonization. J Bacteriol 2005; 187:3662-3670.
- Rodin, S, Andersson AF, Wirta V, et al. Performance of a 70-mer oligonucleotide microarray for genotyping of *Campylobacter jejuni*. BMC Microbiol 2008; 8:73.
- Rosengren, LB, Waldner CL and Reid-Smith RJ. Associations between antimicrobial resistance phenotypes, antimicrobial resistance genes, and virulence genes of fecal

- Escherichia coli* isolates from healthy grow-finish pigs. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:1373-1380.
- Sapkota, AR, Price LB, Silbergeld EK, et al. Arsenic resistance in *Campylobacter* spp. isolated from retail poultry products. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:3069-3071.
- Suo, B, He Y, Paoli G, et al. Development of an oligonucleotide-based microarray to detect multiple foodborne pathogens. *Mol Cell Probes* 2010; 24:77-86.
- Taboada, EN, Mackinnon JM, Luebbert CC, et al. Comparative genomic assessment of Multi-Locus Sequence Typing: rapid accumulation of genomic heterogeneity among clonal isolates of *Campylobacter jejuni*. *BMC Evol Biol* 2008; 8:229.
- Thibodeau, A, Fravallo, P, Laurent-Lewandowski, S, et al. Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Quebec. *Can J Vet Res* 2011; 75: 298-307.
- Vegge, CS, Brondsted L, Li YP, et al. Energy taxis drives *Campylobacter jejuni* toward the most favorable conditions for growth. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:5308-5314.
- Wang, L, Jeon B, Sahin O, et al. Identification of an arsenic resistance and arsenic-sensing system in *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:5064-5073.
- Wassenaar, TM, van Der Zeijst, BA, Ayling, R, et al. Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. *J Gen Microbiol* 1993; 139 Pt 6: 1171-5.
- Wilson, DL, Rathinam VA, Qi W, et al. Genetic diversity in *Campylobacter jejuni* is associated with differential colonization of broiler chickens and C57BL/6J IL10-deficient mice. *Microbiol* 2010; 156:2046-2057.
- Young, KT, Davis LM and Dirita VJ. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:665-679.
- Zautner, AE, Herrmann S, Corso J, et al. Epidemiological association of different *Campylobacter jejuni* groups with metabolism-associated genetic markers. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77:2359-2365.
- Ziprin, RL, Young CR, Byrd JA, et al. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. *Avian Diseases* 2001; 45:549-557.

3.10 Tables

Table 1: Variable gene occurrence of *C. jejuni* poultry strains recovered from Québec flocks

Classification	Gene	Occurrence			Gene description
		Total (%)	2003 (%)	2008 (%)	
Antimicrobial resistance	aadE	2	0	4	Streptomycin resistance protein
	aphA-3	16	0	32	Aminoglycosidase
	omp50	17	30 ^(a)	4 ^(b)	50 kda outer membrane protein
	CJE0900v1	28	17	39	Metallo-beta-lactamase family protein variant
	tetO	67	77	57	Tetracycline resistance
	CJE0900	74	87 ^(a)	61 ^(b)	Metallo-beta-lactamase family protein
	CJE0175	84	79	90	Antibiotic transport protein, putative
	CJE1885	93	100 ^(a)	86 ^(b)	Acetyltransferase, GNAT family
	bla-oxa61	97	100	93	Beta-lactamase
	uppP	97	100	93	Undecaprenyl-diphosphatase
	CJ1173	97	97	96	Multidrug resistance protein, SMR family
	cmeE	98	100	96	Multidrug efflux system CmeDEF
	macA	98	100	96	Macrolide-specific efflux protein macA
Cell envelope	glf	2	3	0	UDP-galactopyranose mutase
	CJE1515	3	0	7	Formyltransferase putative
	waaFv1	5	10	0	ADP-heptose--LPS heptosyltransferase II variant
	CJE1278	9	0	17	Lipooligosaccharide biosynthesis galactosyltransferase
	CJ1677nter	10	13	7	Putative lipoprotein autotransporter n-terminal
	CJ1677	10	13	7	Putative lipoprotein autotransporter
	wcbK v1	16	20	11	GDP-mannose 4,6-dehydratase, capsular biosynthesis
	CJ0628	26	40 ^(a)	11 ^(b)	Putative lipoprotein autotransporter
	CJ0628v2	29	26	32	Putative lipoprotein autotransporter variant 2
	C8J_1083	38	36	39	Hypothetical, lipooligosaccharide biosynthesis
	CJ0628v1	41	40	43	Putative lipoprotein autotransporter variant 1
	CJ0628nter	50	56	43	Putative lipoprotein autotransporter n-terminal
	CJE1277	52	53	50	Lipooligosaccharide biosynthesis glycosyltransferase
	pgIE(2)	69	80	57	UDP-4-keto-6-deoxy-GlcNAc C4 aminotransferase variant
	ptmC	81	97 ^(a)	64 ^(b)	N-acetylneuraminic acid synthetase
	CJ1321	81	86	75	Probable transferase
	pgIF	90	96	82	UDP-GlcNAc C4,6 dehydratase
	CJE0821	93	90	96	Putative integral membrane protein
	neuC	95	100	89	DP-N-acetylglucosamine 2-epimerase
	acpP2v1	95	100	89	Putative Acyl carrier protein
	waaF	98	97	100	ADP-heptose--LPS heptosyltransferase II
waaM	98	100	97	Lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	
Chemotaxis	mafI ^(c)	12	0 ^(a)	25 ^(b)	Motility accessory factor
and motility	CJE0312	26	16	36	Methyl-accepting chemotaxis protein

	CJE0140	31	53 ^(a)	7 ^(b)	Methyl-accepting chemotaxis protein
	maf3	33	40	25	Motility accessory factor
	CJE0314	34	43	23	Methyl-accepting chemotaxis protein
	CJE03112	43	60 ^(a)	25 ^(b)	Methyl-accepting chemotaxis protein
	motA	59	60	57	Putative flagellar motor proton channel
	maf5	71	80	61	Motility accessory factor
	cetA	81	87	75	Methyl-accepting chemotaxis protein
	maf4	84	97 ^(a)	71 ^(b)	Motility accessory factor
	CJE1679	86	96 ^(a)	75 ^(b)	Methyl-accepting chemotaxis protein
	docBv1	90	100 ^(a)	79 ^(b)	Methyl-accepting chemotaxis protein variant 1
	CJ1564	91	87	96	Methyl-accepting chemotaxis protein
	maf2	93	100 ^(a)	86 ^(b)	Motility accessory factor
	CJE1325	95	97	93	Methyl-accepting chemotaxis protein
	flaC	97	93	100	Flagellin C
	fliM	97	100	93	Flagellar motor switch protein m
	cheR	98	100	96	Chemotaxis protein methyltransferase CheR
	flgK	98	100	96	Flagellar hook associated protein
	flgE2	98	100	96	Flagellar hook subunit protein
Detoxification	arsC	47	50	43	Arsenate reductase
	arsC2	47	50	43	Arsenate reductase probe 2
	arsRv1	71	80	61	Arsenical resistance operon repressor variant 1
	arsR	90	96	82	Arsenical resistance operon repressor
Hypothetical proteins	C8J_0065 ^(c)	9	0 ^(a)	18 ^(b)	Hypothetical protein
	C8J_0035	9	10	7	Hypothetical protein
	CJJ81176_063	9	0 ^(a)	18 ^(b)	Conserved hypothetical protein
	C8J_0035v1	10	3	18	Hypothetical protein variant 1
	C8J_0140	11	7	15	Hypothetical protein
	C8J_0267	28	43 ^(a)	11 ^(b)	Hypothetical protein
	C8J_1456	43	43	43	Hypothetical protein
	C8J_0988	52	60	43	Hypothetical protein
	CJE1893	52	60	43	Hypothetical protein
	CJ1325c	57	60	54	Putative methyltransferase
	CJ0223	67	76	57	Pseudogene putative IgA protease family protein
	CJ1322	71	80	61	Hypothetical protein
	CJ1323	74	87 ^(a)	61 ^(b)	Hypothetical protein
	CJ1324	83	87	79	Hypothetical protein
	CJE0147	95	97	93	Hypothetical protein
	CJ1417c	97	100	93	Putative amidotransferase
	CJ1420c	97	93	100	Putative methyltransferase
	lolA	98	97	100	Outer-membrane lipoprotein carrier protein precursor
	CJE0469	98	100	96	Putative periplasmic protein
Metabolism	hsdsv1	5	10	0	Hypothetical protein, Hsds gene variant 1
	CJEIv1	7	13	0	Type II restriction-modification enzyme variant 1
	Ggt ^(c)	9	0 ^(a)	18 ^(b)	Gamma-glutamyltransferase
	dns	16	7	23	Extracellular deoxyribonuclease
	CJEIv2	16	23	7	Type II restriction-modification enzyme variant 2
	dmsA	43	43	43	Anaerobic dimethyl sulfoxide reductase chain A

	hsds	45	50	32	Hypothetical protein, Hsds gene
	hsdsv2	45	46	43	Hypothetical protein, Hsds gene variant 2
	met	52	60	43	Homoserine O-acetyltransferase
	CJEI	74	63	86	Type II restriction-modification enzyme
	trxB	95	100	89	Thioredoxin-disulfide reductase
	ccpA-1	95	100	89	Cytochrome c551 peroxidase
	ctpA	98	100	96	Carboxyl-terminal protease
Pathogenesis	flav2	5	0	11	Flagellin (A and B) 81176 and 81116
	flaBv1	5	0	11	Flagellin B 81176 and 81116
	flaA	5	0	11	Flagellin A 81176 and 81116
	virB11 ^(c)	9	0 ^(a)	18 ^(b)	Putative type IV secretion system
	flav1 ^(c)	10	20 ^(a)	0 ^(b)	Flagellin (A and B) RM1221
	CJE1470	38	27	50	Toxin-antitoxin protein, putative
	porA	40	30	50	Major outer membrane protein
	fspA	40	36	43	Hypothetical protein
	fla	50	37	64	Flagellin (A and B) NCTC11168
	porAv1	52	73 ^(a)	29 ^(b)	Major outer membrane protein variant 1
	CJ1371	66	53	79	Putative lipoprotein vaCJ homologue
	pflA	78	100	54	Paralysed flagellum protein
	flaBv2	79	97 ^(a)	61 ^(b)	Flagellin B NCTC11168
	ptmB	90	100 ^(a)	79 ^(b)	Flagellin modification protein B
	ptma	91	100	82	Flagellin modification protein A
	flaAv1	93	100 ^(a)	86 ^(b)	Flagellin A RM1221
	flaAv2	93	100 ^(a)	86 ^(b)	Flagellin A
	flaB	93	100 ^(a)	86 ^(b)	Flagellin B RM1221 and NCTC11168
	cjaA	98	97	100	Surface antigen CJaA
Plasmid	pCJ419_p4 ^(c)	9	0 ^(a)	18 ^(b)	Plasmid putative protein
Regulatory functions	cprR	90	80 ^(a)	100 ^(b)	DNA-binding response regulator
	racR	98	97	100	Two-component regulator
Transport and nutrient binding	cfrAv1	2	3	0	Ferric receptor CfrA variant 1
	CJE1754	10	17	4	Peptide ABC transporter, permease protein
	CJ1584v1	16	20	11	Putative peptide ABC-transport system periplasmic peptide-binding protein variant 1
	CJE0534	38	36	39	Tartrate transporter, putative
	CJE1730	53	50	57	Permease, putative
	lctP	55	66	43	L-lactate permease
	CJE0171	55	53	57	Putative TonB-dependent outer membrane receptor
	cfrA	57	57	57	Ferric receptor CfrA, enterobactin uptake receptor
	CJE1728	57	73 ^(a)	39 ^(b)	Permease putative
	CJE1820	65	73	54	ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein, putative
	CJE1193	81	83	79	Transporter, LysE family
	CJE0830	84	87	82	ABC transporter, permease protein
	CJE0827	88	93	82	ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein
	CJE0831	88	93	82	ABC transporter, permease protein
	CJ1584	90	100 ^(a)	79 ^(b)	Putative peptide ABC-transport system periplasmic peptide-binding protein
	CJE0937	91	100 ^(a)	82 ^(b)	Major facilitator family protein

	cjaC	93	100	86	Histidine transporter
	kgtP	95	100	89	Alpha-ketoglutarate permease
	dcuB	97	93	100	Anaerobic C4-dicarboxylate membrane transporter
	CJE0138	98	100	97	Cation ABC transporter periplasmic cation-binding protein
	CJE0289	98	100	96	Mechanosensitive ion channel family protein
	CJE1833	98	97	100	ABC transporter, permease protein
	dtpT	98	97	100	Di-/tripeptide transporter
	CJE0980	98	100	96	Amino acid ABC transporter, His/Glu/Gln/Arg/family
Unknown/ unclassified	pseD ^(c)	5	0	11	Hypothetical protein, pseD (81176)
	rloA	45	47	43	Hypothetical protein rloA
	rloB	45	47	36	Hypothetical protein rloB
	CJE1719	48	40	57	Putative NADP-dependent alcohol dehydrogenase
	CJE1719v1	53	63	43	Putative NADP-dependent alcohol dehydrogenase, variant 1
	CJE1538	83	93 ^(a)	71 ^(b)	Putative fibronectin/fibrinogen-binding protein
	CJE0464	98	97	100	Oxidoreductase, putative, putative GMC oxidoreductase subunit
	CJJ81176_024	98	100	96	Hypothetical protein

Total presence (%) of genes, following the microarray hybridizations, for all 57 strains: 2003 occurrence (%) was on 29 strains and 2008 occurrence (%) was on 28 strains. Genes that were present or absent in all strains are presented in supplemental materials table S1. Complete details on the genes and associated probes are given in supplemental materials table S1. ^(a) Statistically different then ^(b) using Fisher exact test ($p < 0.05$). ^(c) Genes found only in isolates recovered in 2003 or in 2008. In bold, statistically different genes between the collections periods, using Bonferroni correction, are highlighted.

Table 2: Genes differentiating two major populations of *C. jejuni* identified by clustering

Cluster	Cluster strain exclusive gene presence (%)
81116 cluster	CJE0034(20)
NCTC11168 cluster	<i>aphA-3</i> (23), CJE0171(88) , CJE0900v1(43) , <i>motA</i> (94), CJ0628v2(46) , CJ1677(17), CJ1484v1(26), <i>porA</i> (63), CJE1277(83) , CJE0534(60) , CJE0140(51) , CJ0828(43) , CJ0828v3(80) , met(83) , CJE1730(86) , <i>cfrA</i> (91), CJ1325(91) , CJE1893(83) , <i>wcbKv1</i> (26), CJE1470(60) , <i>flav1</i> (17), CJE1719(77) , CJ1677v1(17)

Following hybridization, clustering showed that two main groups were present, each containing a different reference strain. Genes were found in one cluster but not in the other, using Fisher exact test ($p < 0.05$). Genes statistically different using the Fisher exact test with Bonferroni correction are highlighted in bold. Gene details may be found in Table 1 or in supplemental materials Table S1.

3.11 Figures

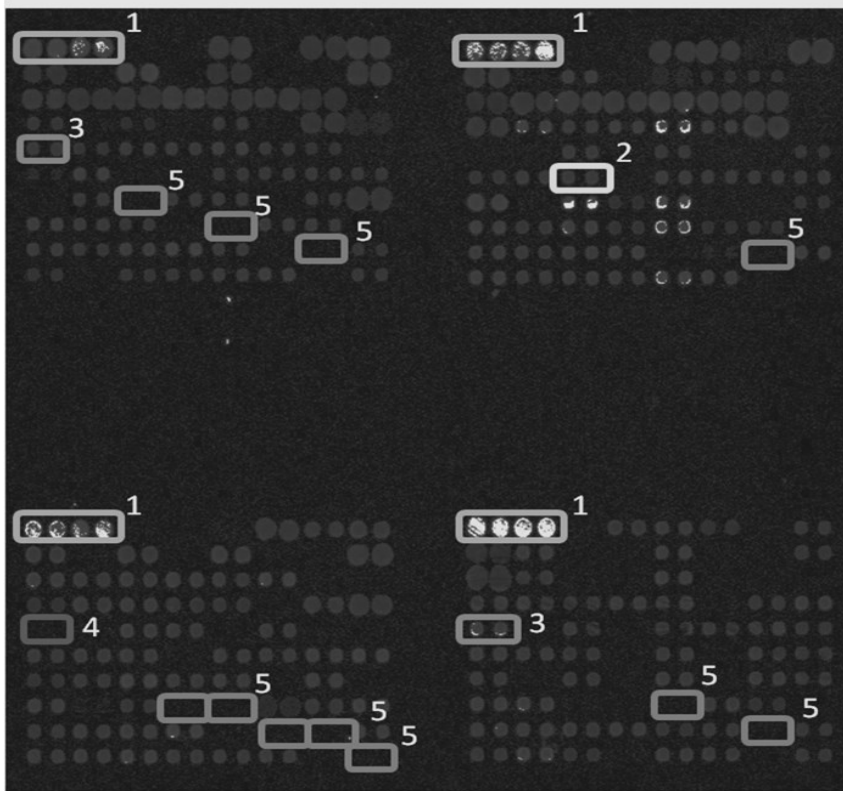


Fig. 1. Hybridization of the NCTC11168 strain to the custom microarray. 1= positive control (EUB), 2 = *Campylobacter* sp. control (GroEL), 3 = *C. jejuni* control (mapA and hipO), 4 = negative control (ara) and 5 = printing buffer (empty). Gray and white spots represent a positive hybridization.

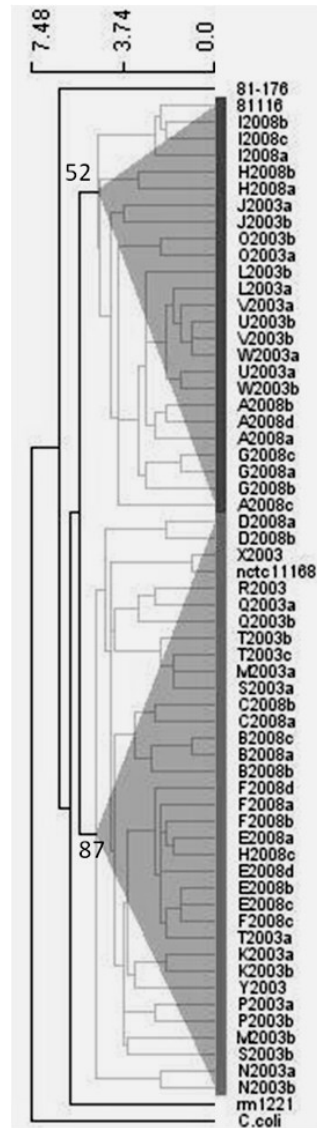


Fig. 2. Strain comparisons based on differential gene presence. Two clusters are resolved: cluster A associated with the 81116 reference strain (Bootstrapping value of 52 %) while cluster B associated with the NCTC11168 strain (Bootstrapping value of 87 %). Strains and Euclidean distance are presented horizontally. The last column lists the strains. Strain identification begins with a letter (example H2008b) representing the lot origin, followed by the year (example H2008b) of sampling and ends with an identification letter (example H2008b) to differentiate between strains isolated from the same lot.

Chapitre 4: Association between phenotypic and genetic colonization factors of *Campylobacter jejuni* chicken field strains

Article en preparation

Contribution du candidat:

J'ai participé à l'élaboration du protocole de recherche en proportion équivalente de celle des autres coauteurs. J'ai effectué les collectes des échantillons et effectué toutes les analyses de laboratoire. J'ai analysé les résultats en proportion équivalente de celle des autres coauteurs. J'ai rédigé l'article conformément aux exigences de la revue et intégré les commentaires faits par les coauteurs ainsi que ceux formulés par les réviseurs de l'article.

Association between phenotypic and genetic colonization factors of *C. jejuni* chicken field isolates

Alexandre Thibodeau^{a-b-c}, Philippe Fravallo^{a-b-c}, Sylvette Laurent-Lewandowski^{a-b}, Evelyne Guévremont^{c-d}, Sylvain Quessy^{a-b-c} and Ann Letellier^{a-b-c}.

^a: Industrial-CRSNG Meat Safety Research Chair (CRSV), University of Montreal, Veterinary Medicine faculty, department of pathology and microbiology, 3200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe (Québec), Canada, J2S 2M2.

^b: Swine and Avian Infectious Disease Research Center (CRIPA), University of Montreal, Veterinary Medicine faculty, department of pathology and microbiology, 3200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe (Québec), Canada, J2S 2M2.

^c: Groupe de recherche et d'enseignement en salubrité alimentaire (GRESA), University of Montreal, Veterinary Medicine faculty, department of pathology and microbiology, 3200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe (Québec), Canada, J2S 2M2.

^d: Agriculture and Agri-Food Canada, Food Research and Development Centre, 3600 Casavant Blvd. West, St-Hyacinthe, Quebec J2S 8E3

Corresponding authors: Alexandre Thibodeau: tel: 450-773-8521 # 8672, FAX number: 450-778-8157

4.1 Abstract

Campylobacter jejuni is the pathogen responsible for numerous bacterial human foodborne enteritis. This bacterium is a commensal colonizer of the chicken digestive tract. The objective of this study was to identify *C. jejuni* genes that could be associated with the capacity of a given strain to colonize a chicken by linking the phenotypic properties of chicken field strains to their gene profile.

C. jejuni chicken strains (n = 41), previously characterized by microarray for the presence of 254 genes associated with chicken colonization and antimicrobial resistance, were further characterized for important phenotypic properties influencing chicken colonization: autoagglutination, chemotaxis, adhesion and invasion of primary chicken caecal cells. This allowed a ranking of the strains according to their potential *in vitro* colonization capacity. This ranking was validated using a chicken colonization assay where competing strains, possessing opposed chicken potential colonization capacities, were tracked by PCR. Finally, the phenotypic profiles of the strains were compared to their gene profiles.

All phenotypical properties were variable among the tested strains, thus permitting their efficient classification. In the *in vivo* assays, the strains possessing the highest phenotypical properties outcompeted the strains possessing the lowest phenotypical properties. When the strains capacities to colonize a chicken and their gene profile were compared, we observed 8 genes that were present in strains with superior chicken colonization capacities. Among these were *arsC*, involved in arsenic resistance, gene variants coding for type I restriction-modification enzymes and a CJE1719, zinc-binding

dehydrogenase family oxydoreductase, gene variant. On the other hand, 11 genes were associated to strains demonstrating lower chicken colonization capacities, where another CJE1719 variant was also present.

The phenotypic characterization allowed an efficient ranking of the strains according to their potential chicken colonization capacities. These results provide additional evidences supporting that arsenic resistance is linked with chicken colonization. For the first time, our results suggest that type I restriction-modification system may be associated with chicken colonization capacities. We also observed a variant of CJE1719 that might be involved in *C. jejuni* chicken colonization.

4.2 Introduction

Campylobacter jejuni is the bacterial agent responsible for campylobacteriosis, a severe gastro-enteritis afflicting humans. Campylobacteriosis may be acquired via the food chain (Young et al., 2007). Important vectors of *C. jejuni* are poultry meat products (Rosenquist et al., 2009). High numbers of *C. jejuni* can colonize the chicken caecum, up to 10^9 CFU/g of caecal matter (Hermans et al., 2012). Despite being present in such quantities, the bacterium causes no harms to its avian host (Hermans et al., 2012). The mechanisms employed by the bacteria to colonize the chicken intestine are still not fully understood.

Many studies have reported the involvement of certain phenotypic properties of *C. jejuni* in chicken colonization (Hermans et al., 2011). Individually, it was reported that the autoagglutination (Guerry et al., 2006), the chemotaxis (Hendrixson et DiRita, 2004), the

adhesion (Hermans et al., 2011) and the invasion (Pope et al., 2007) properties of a given strain influence its capacity to colonize the chicken gut.

It is also reported that genes coding for flagella/motility/chemotaxis (*fliA*, *pglE*, *pflA*, *motA*, *cheY*, *rpoN*, *fliA*) (Wassenaar et al., 1993, Hendrixson et DiRita, 2004, Fernando et al., 2007), stress tolerance (*katA*, *AhpC*, *sodB*, *ahpC* PKK)(Klancnik et al., 2009, Palyada et al., 2009, Gangaiah et al., 2010), efflux (*cmeABC*) (Lin et Martinez, 2006, Quinn et al., 2007), nutrient acquisition and use (*cj1403*, *cj1198*, *cfrA*) (Palyada et al., 2004, Metris et al., 2011), secreted protein (*cia*) (Biswas et al., 2007) and adhesins (*cadF*, *dnaJ*, *pldA*, *porA*)(Ziprin et al., 2001, Hiatt et al., 2008, Flanagan et al., 2009) are as well implicated in colonization. Many of these genes are unequally distributed or present genetic diversity among chicken strains (Thibodeau et al. 2013).

Some studies have compared strains possessing opposite phenotypical properties or colonization capabilities on the basis of their gene profile and have identified genes that might be also relevant to the *C. jejuni*-chicken association (Ahmed et al., 2002, Pope et al., 2007). However, most of these studies used a limited set of strains and therefore may not have completely taken into account the entire genetic and phenotypic diversity of *C. jejuni*.

The aim of this study was to extensively phenotypically characterize multiple chicken *C. jejuni* strains for chicken colonization associated properties and to examine the possible association between these characteristics and the genetic profile of the strains.

4.3 Materials and Methods

4.3.1 Strains and media

Sampling and identification of the isolates were done as previously described (Thibodeau et al., 2011) from chicken caecal content recovered at nearby slaughterhouses. A total of 41 *C. jejuni* isolates were used in this study; 19 were isolated in 2008 and 22 were isolated in 2003. Confirmed *C. jejuni* isolates were frozen in multiple aliquots at -80 °C in Brucella broth (Innovation Diagnostic inc., Montréal, Canada) containing 0.1 % Agar (Innovation Diagnostic inc.) and 25 % (v/v) glycerol. Strain *C. jejuni* 81-176, the positive control, was kindly supplied by Dr. Shaun Cawthraw, Veterinary Laboratories Agency, UK. Strains were cultured on mCCDA (Innovation Diagnostic inc), Mueller Hinton Agar (Oxoid, Nepean, Ontario, Canada) or Trypticase Soy Agar (TSA) supplemented with 5% (v/v) sheep blood (Fisher sci, Ottawa, Ontario, Canada) when needed and incubated in a microaerobic atmosphere using Oxoid gas generating system. For every characterization assay, a new -80 °C aliquot of the strain was used to minimize strain genetic variation due to repetitive passages.

4.3.2 *In vitro* characterization

C. jejuni strains were characterized for their ability to autoagglutinate, to be attracted to mucins and to adhere and invade chicken primary caecal cells. Chemotaxis and autoagglutination experiments were carried out as previously described (Thibodeau et al., 2011). Autoagglutination was expressed as: ((Initial DO 630nm – 3 h DO 630nm)/Initial DO 630nm) X 100. Results of chemotaxis, adhesion and invasion tests were transformed as

follows: $-1/\log$ (number of recovered bacteria after the experiment / number initial bacteria used). For each *in vitro* phenotypic characterization, strains were classified according to their phenotypical properties; the strain possessing the lowest property value (poorest performing strain) was assigned a rank value of 1 and the best one a rank value of 41. The mean rank of the *in vitro* phenotypic properties (autoagglutination, chemotaxis, adhesion and invasion) was then calculated for each strain in order to allow the global appreciation of the potential capacity of a strain to colonize a chicken.

4.3.2.1 Primary chicken caecal cells culture

Primary cells were obtained as follow, adapted from Byrne et al., 2007. Caeca collected at nearby slaughterhouses were emptied of their content and, within an hour, transported to the laboratory in DMEM (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) containing 1% of FBS (v/v) (Hyclone, Fisher sci), 20 000 units of penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) and 50 µg/ml of gentamicin (Sigma-Aldrich). After 5 washes in HBSS (Invitrogen), caeca were cut into small pieces and digested using 375 U/ml of collagenase (Sigma-Aldrich) and 1U/ml of dispase (Sigma-Aldrich) for 3 h at 37 °C in DMEM supplemented with 1 % FBS (v/v), 20 000 units of penicillin/streptomycin and 50 µg/ml of gentamicin. Floating crypts were pelleted by centrifugation at 50 x g for 4 min. The cells were purified by suspending the pellet in HBSS containing 2 % D-Sorbitol (v/v) (Fischer sci) and then centrifuged at 50 x g for 4 min. After 4 purification steps, cells were seeded (3 000 crypts per well) in 24-wells cell culture plates (Fisher sci) using a culture media composed of DMEM supplemented with 10 % FBS (v/v), 1.4 µg/ml of

hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml of insulin (Sigma-Aldrich), 5 µg/ml of transferrin (Sigma-Aldrich), 1 µg/ml of fibronectin (Sigma-Aldrich), 20 000 units of penicillin/streptomycin and 50 µg/ml of gentamicin. The culture was incubated at 38 °C in a 6 % CO₂ atmosphere. Half of the cell culture media was replaced every 2 days. After 7 to 9 days, cells (minimum 80 % confluence) were used for the characterization of *C. jejuni* isolates.

4.3.2.2 Adhesion and Invasion of chicken primary caecal cells

Based on the protocol elaborated by Byrne et al., 2007, ready to use primary cells were first washed with HBSS then infected with 10⁷ CFU of *C. jejuni* per well. This inoculum, obtained after an overnight culture on TSA sheep blood Agar, was resuspended in PBS to an optical density of 1.0 taken at 630nm (approximately 10⁸ CFU/ml), diluted 1/10 (v/v) in PBS, centrifuged and then resuspended in DMEM containing 1 % FBS (v/v). The infected cell culture was incubated for 3 h at 37 °C then washed 3 times with HBSS. Cells were lysed with PBS containing 0.5 % (v/v) of Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and the *C. jejuni* recovered were enumerated on Mueller-Hinton Agar. For invasion, prior to lysis, cells were further incubated for 1 h in DMEM containing 1 % FBS and 50 µg/ml of gentamicin, a concentration lethal for all tested isolates, and then washed in HBSS 3 times. For all assays strain 81-176 was used as control. The initial inoculum was also enumerated on Mueller-Hinton Agar.

4.3.5 Chicken colonization and competition assays

All animal experimentations were approved by the “Comité d'éthique sur l'utilisation des animaux” (CEUA) of the Veterinary Medicine Faculty of the University of Montréal. In the same room, day-old chickens (n = 9) were separated in three groups housed in separate pens. Birds were raised on wood shavings on concrete floored pens and had *ad libitum* access to water and to a standard commercial feed. Just before the inoculation, fresh caecal droppings were collected to investigate for the presence of *C. jejuni*. At 14 days of age, each chicken was simultaneously inoculated *per os* with a mix suspension of two different *C. jejuni* strains in a 1:1 ratio, possessing different mean rank values (Table 1 and Figure 5).

The inoculating suspensions were obtained as follow: a -80 °C frozen aliquot was cultured on mCCDA for 24 h at 42 °C. Strains were then transferred onto TSA sheep-blood Agar and incubated for another 24 h. Each strain was suspended in 1ml of trypton salt (TS) (Innovation Diagnostic Inc.) to obtain an optic density (630 nm) of 1.0. This suspension was further diluted to obtain 10⁵ CFU/ml and then mixed with equal volume of the second strain to form the final inoculation suspension (Table 1). All suspensions were enumerated by culture on Mueller-Hinton Agar. All chickens were euthanized in a CO₂ chamber 7 days later and the level of caecal *C. jejuni* was enumerated on mCCDA plates.

4.3.6 Detection of challenge strains by PCR

Individual chicken caecal contents recovered 7 days post-inoculation were diluted up to 10⁻⁵, plated on mCCDA and incubated 24 h. DNA was extracted using a standard

phenol-chloroform procedure (Juteau et al., 2004) from the whole content of each 10^{-5} dilution mCCDA plate. The detection of genes specific to the inoculated strain was done by PCR (Table 3) using an ECO QPCR (Illumina, Montréal Biotech Inc, Montréal). A total of 40 ng of DNA was amplified according to the protocol listed in Table 2. The primers for the *virB11* were those used by Datta et al., 2003 whereas CJ0144 and *pseD* primers were designed in this study using Pearl Primer (Marshall, 2004). It was determined by microarray and confirmed by PCR that strain 3 was negative (-) for *pseD*, that strains 5 and 6 were positive (+) for *virB11* and that strain 3 was positive for Cj0144 (Table 3).

4.3.7 Gene association with phenotypic properties

Genes associated with chicken colonization were previously characterized in the studied strains by microarray (Thibodeau et al. 2013). The genes present in the strain (strain 1), possessing the highest mean rank and thus the highest chicken potential colonization capacity, were compared to those present in the strain (strain 7) possessing the lowest mean rank (Figure 5). Genes specific to both strains were identified. It was then assessed, in our 41 strain collection, if their presence could also be associated with the strains potential colonization capacities. A total of 30 strains, originating from different chicken lots or possessing different phenotypical properties, were retained for this analysis.

4.3.8 Statistical analysis

All statistical analysis were computed in GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). The Kruskal-Wallis test was used to compare the strains phenotypic properties and mean ranking. The mean phenotypic properties of the 2008 strains and the 2003 strains

were compared using the Mann-Whitney analysis. The Spearman test was used to assess the correlation between phenotypic properties. The phenotypical properties of strains possessing or not a given gene were compared using the Mann-Whitney statistical analysis. An alpha value lower the 0.05 was used to considered genes present in strains likely to possess different phenotypical properties, while an alpha value lower than $0.05 / (\text{number of evaluated genes})$ was used to identify genes present in strain with different phenotypic properties.

4.4 Results

4.4.1 Phenotypic properties of the strains

Strains harboured different autoagglutination properties ($p = 0.0083$, Figure 1) as well as chemotaxis (Figure 2) properties ($p < 0.0001$). Adhesion and invasion levels (Figure 3 and Figure 4) to chicken caecal primary cells were also found variable (both $p < 0.0001$).

A correlation was found between the strains adhesion and invasion properties ($p = 0.012$) but not between the other evaluated phenotypic properties. To take into account all phenotypic properties when comparing strains, strains were ranked according to their phenotypic properties and the mean rank value for all strain was calculated. Strains had different mean rank values ($p = 0.004$, Figure 5). The strain mean rank values correlated with their autoagglutination ($p = 0.003$), chemotaxis ($p < 0.001$), primary cell adhesion ($p < 0.001$) and primary cell invasion ($p < 0.001$) properties.

4.4.2 Chicken colonisation competition experiment

Chickens were negative for *C. jejuni* prior to their inoculation. Chickens in all groups were colonized at the same level seven days after the co-inoculation (7 PI) of strains possessing opposed phenotypic profiles. Mean counts (log CFU/g of caecal matter) and associated SEM for group A, group B and group C chickens were respectively 8.2 ± 0.7 , 8.2 ± 0.7 and 8.2 ± 0.4 . Gene *virB11*, associated to strains (5, 6) possessing low mean rank values, was not detected in the bacteria recovered from the diluted chicken caecal content plated on mCCDA while gene *cj0144*, present only strain 3, was detected (Table 3).

4.4.3 Strains comparison

The gene profile of the strain possessing the highest mean rank value (strain 1) was compared to the gene profile of the strain possessing the lowest mean rank value (strain 7). A total of 20 genes were found present only in the highest ranking strain (data not shown). Of these, 8 were present in other strains that possessed higher mean rank values (Table 4). On the contrary, a total of 27 genes were found present only in the strain possessing the lowest mean rank value (data not shown) and 11 present in other strains that also possessed lower mean rank values (Table 5).

4.5 Discussion

The foodborne pathogen *C. jejuni* colonizes the chicken gut in high numbers by mechanisms yet to be fully described. This study characterized chicken *C. jejuni* strains recovered from caecum content and associated their phenotypic properties with their gene content in order to improve knowledge on chicken colonization factors.

It was shown in another study that *C. jejuni* adhesion and invasion properties were correlated (Malagon et al., 2010). Our results concur with these findings. On the other hand, it was also observed that autoagglutination could affect adhesion and invasion of epithelial cells (Golden, 2002, Guerry et al., 2006), that chemotaxis could also influence adhesion and invasion (Vegge et al., 2009, Tareen et al., 2010) and that both autoagglutination and chemotaxis are affected by the bacteria flagellum (Golden, 2002, Lertsethtakarn et al., 2011). These observations are in opposition with the current study findings where the autoagglutination, chemotaxis and adhesion/invasion of primary caecal cells properties do not appear correlated. These differences are probably linked with the use, in our study, of multiple strains, not modified genetically, that are displaying a gradient of properties instead of the drastic shift in phenotypic properties that can be observed with mutant strains.

It was demonstrated that strains with superior *in vitro* invasion capabilities can outcompete other strains in chicken colonization assays, making it the gold standard when evaluating the capacity of given strain to colonize a chicken (Pope et al., 2007). In our study, the lack of correlation between all phenotypical properties led us to use a novel classification method that allowed us to take into account all evaluated phenotypical properties to appreciate the potential of a given strain to colonize a chicken. We established the mean rank of each strain according to its relative phenotypic properties. The mean rank value correlated with all other evaluated phenotypical properties. To validate that the classification of the strains according to their mean rank value reflected the strains chicken colonization potential, an *in vivo* competition assay was carried out. This assay showed that

strains possessing low mean rank values were not detected in the 10^{-5} mCCDA dilution. This suggests that the dominant strains in this assay were the ones with the highest mean rank value and therefore validated the usefulness of the strain classification method.

Comparison of the gene profile of the best performing with the poorest performing strain allowed the identification of 8 genes present in strains possessing higher mean rank, chemotaxis, adhesion or invasion properties than strains not positive for these same genes. Of these genes, the *arsC* gene was strongly associated to strains ($p = 0.001$) possessing high mean rank values and therefore most probably high chicken colonization capacities. This gene was previously identified in a study that compared the gene content of two strains possessing different colonization capacities (Ahmed et al., 2002). In *C. jejuni*, *arsC* is part of an operon conferring resistance to arsenic but not to antibiotics (Wang et al., 2009). Arsenic resistance is variable in *C. jejuni* strains (Wang et al., 2009). *ArsC* is not present in all annotated sequenced strains. In most strains lacking it, such as NCTC 11168, arsenic resistance is mediated by a different set of genes: *arsR3*, *arsC2* and *arsB* (Shen et al., 2013).

In comparison to other microbes like *Yersinia*, arsenic resistance genes may be present on a plasmid also coding for virulence associated proteins (Neyt et al., 1997). It was hypothesized that this resistance is an evolutionary artifact acquired by *Yersinia* resulting from the massive use of arsenical compounds in the swine industry to control *Serpulina hyodysenteriae* infections (Mallik et al., 2012). Knowing that arsenical compounds are used to control coccidiosis in chicken, involvement of *arsC* in *C. jejuni* chicken colonization might be indirect as proposed for *Yersinia*, participating to the selective emergence of more

specialized chicken strains. For *C. jejuni*, direct implication of *arsC* in the evaluated phenotypic properties and chicken colonization remains to be assessed.

HsdS and *rloB* genes, listed in Table 5, are coding for proteins involved in the type I restriction-modification system. All variants of these genes have not been detected by the microarray analysis since all *C. jejuni* should harbour them. The *HsdS* and *rlo* genes nucleotide content are variable in *C. jejuni* and their chromosomal location differ from strain to strain (Miller et al., 2005). Nevertheless, in our study, variants of these genes were associated to strains possessing different chicken colonization potentials. This is the first clear observation of the possible association of these genes with chicken colonization. In another study, it was noted that *cj0690c* (putative restriction/modification enzyme) was divergent between two strains possessing different *flaA* type as well as chicken colonization (Pope et al, 2007).

Type-I restriction modification systems are enzymes that are able to recognize foreign DNA and prevent its insertion in the bacterial genome. *C. jejuni* type-I restriction system loci type may correlate with the source of isolation of *C. jejuni* (Miller et al. 2005). In another study, the presence of a restriction enzyme (Cj1051, type II restriction-modification) was preferentially associated to *C. jejuni* strains isolated from human cases compared to cattle strains (Hannon et al., 2009). Restriction modification systems are also playing a role in the emergence of evolutionary lineage of *S. aureus* and *Listeria* (Orsi et al., 2011, McCarthy et Lindsay, 2012) giving rise of specialized groups of strains. In our study, the presence of type I restriction-modification gene variants in our *C. jejuni* strains, especially in those that have good chicken colonization potential, suggests that *C. jejuni*

lineages could exist and may be linked to the emergence of strains with greater chicken colonization capacities.

Strains possessing the genes listed in Table 5 showed lower phenotypical properties than the other strains. These genes are coding for important proteins for the generation of the bacterial envelope, nutrient acquisition, metabolism and motility. This is to our knowledge the first report of genes that may be associated to strain with a weaker ability to colonize chickens.

We cannot exclude in our study the possibility that strains possessing these genes did not performed well in the *in vitro* assays for the phenotypical characterization because the culture media or culture environment used were not appropriate to these strains specific metabolic needs. Many of Table 5 genes still have a putative function and should therefore be studied in more details. It is also possible that the lack of other genes than those included in the microarray made these strains to perform less in the *in vitro* assays or that the expression of these gene was impaired in the studied strains. Therefore, the exact importance of Table 5 genes in chicken colonization, in our studied strains, remains to be further assessed.

Finally, it is also interesting to note that two CJE1719 variants, a zinc-binding dehydrogenase family oxydoreductase, were associated to strains showing opposite phenotypic properties, suggesting that different forms of this gene may impact on *C. jejuni* phenotype, making of CJE1719 a target of choice for further studies on its role in chicken colonization as well as the importance of zinc in this association.

4.6 Conclusions

In this study, a combination of phenotypic and genetic characterization was used in order to identify genes providing some *C. jejuni* strains a competitive advantage when colonizing the chicken gastrointestinal tract. This study identified new genes that are associated with strains possessing better chicken colonization capacities. Among these genes, this study reports further evidences supporting the involvement of arsenic resistance genes in chicken colonization. It also suggests, for the first time, the association of type I restriction modification genes with chicken colonization capacities. We also observed that different variants of gene CJE1719 were associated to strains possessing a stronger or weaker chicken colonization potential. Role and confirmation of the direct involvement of the identified genes in chicken colonization will be assessed in further studies.

4.7 Acknowledgements

We thank the following for their financial supports: Ministère de l'Agriculture et des Pêches du Québec (**MAPAQ**), the Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP) and NSERC grant no: 130565330 for the NSERC Industrial Research Chair in Meat safety and financial partners.

4.8 References

1. Ahmed, I. H., Manning, G., Wassenaar, T. M., Cawthraw, S. & Newell, D. G. 2002. Identification of genetic differences between two *Campylobacter jejuni* strains with different colonization potentials. *Microbiology*, 148, 1203-12.

2. Biswas, D., Fernando, U. M., Reiman, C. D., Willson, P. J., Townsend, H. G., Potter, A. A. & Allan, B. J. 2007. Correlation between *in vitro* secretion of virulence-associated proteins of *Campylobacter jejuni* and colonization of chickens. *Curr Microbiol*, 54, 207-12.
3. Bruant, G., Maynard, C., Bekal, S., Gaucher, I., Masson, L., Brousseau, R. & Harel, J. 2006. Development and validation of an oligonucleotide microarray for detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 72, 3780-4.
4. Byrne, C. M., Clyne, M. & Bourke, B. 2007. *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells *in vitro*. *Microbiology*, 153, 561-9.
5. Datta, S., Niwa, H. & Itoh, K. 2003. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 345-8.
6. Fernando, U., Biswas, D., Allan, B., Willson, P. & Potter, A. A. 2007. Influence of *Campylobacter jejuni* *fliA*, *rpoN* and *flgK* genes on colonization of the chicken gut. *Int J Food Microbiol*, 118, 194-200.
7. Flanagan, R. C., Neal-McKinney, J. M., Dhillon, A. S., Miller, W. G. & Konkel, M. E. 2009. Examination of *Campylobacter jejuni* Putative Adhesins Leads to the Identification of a New Protein, Designated FlpA, Required for Chicken Colonization. *Infect Immun*, 77, 2399-2407.

8. Gangaiah, D., Liu, Z., Arcos, J., Kassem, II, Sanad, Y., Torrelles, J. B. & Rajashekara, G. 2010. Polyphosphate kinase 2: a novel determinant of stress responses and pathogenesis in *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, 5, e12142.
9. Golden, N. J. 2002. Identification of Motility and Autoagglutination *Campylobacter jejuni* Mutants by Random Transposon Mutagenesis. *Infect Immun*, 70, 1761-1771.
10. Guerry, P., Ewing, C. P., Schirm, M., Lorenzo, M., Kelly, J., Pattarini, D., Majam, G., Thibault, P. & Logan, S. 2006. Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Mol Microbiol*, 60, 299-311.
11. Hannon, S. J., Taboada, E. N., Russell, M. L., Allan, B., Waldner, C., Wilson, H. L., Potter, A., Babiuk, L. & Townsend, H. G. 2009. Genomics-based molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from feedlot cattle and from people in Alberta, Canada. *J Clin Microbiol*, 47, 410-20.
12. Hendrixson, D. R. & DiRita, V. J. 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Mol Microbiol*, 52, 471-84.
13. Hermans, D., Van Deun, K., Martel, A., Van Immerseel, F., Messens, W., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F. & Pasmans, F. 2011. Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Vet Res*, 42.
14. Hermans, D., Pasmans, F., Heyndrickx, M., Van Immerseel, F., Martel, A., Deun, K. & Haesebrouck, F. 2012. A tolerogenic mucosal immune response leads to persistent *Campylobacter jejuni* colonization in the chicken gut. *Crit Rev Microbiol*, 38, 17-29.

15. Hiatt, K. L., Stintzi, A., Andacht, T. M., Kuntz, R. L. & Seal, B. S. 2008. Genomic differences between *Campylobacter jejuni* isolates identify surface membrane and flagellar function gene products potentially important for colonizing the chicken intestine. *Funct Integr Genomics*, 8, 407-20.
16. Holt, J. P., Grant, A. J., Coward, C., Maskell, D. J. & Quinlan, J. J. 2012. Cj1051c is a Major Determinant for the Restriction Barrier of *Campylobacter jejuni* Strain NCTC11168. *Appl Environ Microbiol*. Epub.
17. Klancnik, A., Guzej, B., Jamnik, P., Vuckovic, D., Abram, M. & Mozina, S. S. 2009. Stress response and pathogenic potential of *Campylobacter jejuni* cells exposed to starvation. *Res Microbiol*, 160, 345-52.
18. Lertsethtakarn, P., Ottemann, K. M. & Hendrixson, D. R. 2011. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu Rev Microbiol*, 65, 389-410.
19. Lin, J. & Martinez, A. 2006. Effect of efflux pump inhibitors on bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother*, 58, 966-72.
20. Malagon, I., Garcia, S. & Heredia, N. 2010. Adherence, invasion, toxigenic, and chemotactic properties of Mexican *Campylobacter* strains. *J Food Prot*, 73, 2093-8.
21. Mallik, S., Viridi, J. S. & Johri, A. K. 2012. Proteomic analysis of arsenite - mediated multiple antibiotic resistance in *Yersinia enterocolitica* biovar 1A. *J Basic Microbiol*, 52, 306-13.
22. Marshall, O. J. 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*, 20, 2471-2.

23. McCarthy, A. J. & Lindsay, J. A. 2012. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. *BMC Microbiol*, 12, 104.
24. Metris, A., Reuter, M., Gaskin, D. J., Baranyi, J. & van Vliet, A. H. 2011. *In vivo* and *in silico* determination of essential genes of *Campylobacter jejuni*. *BMC Genomics*, 12, 535.
25. Orsi, R. H., den Bakker, H. C. & Wiedmann, M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol*, 301, 79-96.
26. Palyada, K., Threadgill, D. & Stintzi, A. 2004. Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol*, 186, 4714-29.
27. Palyada, K., Sun, Y. Q., Flint, A., Butcher, J., Naikare, H. & Stintzi, A. 2009. Characterization of the oxidative stress stimulon and *PerR* regulon of *Campylobacter jejuni*. *BMC Genomics*, 10, 481.
28. Pope, C., Wilson, J., Taboada, E. N., Mackinnon, J., Felipe Alves, C. A., Nash, J. H., Rahn, K. & Tannock, G. W. 2007. Epidemiology, relative invasive ability, molecular characterization, and competitive performance of *Campylobacter jejuni* strains in the chicken gut. *Appl Environ Microbiol*, 73, 7959-66.
29. Quinn, T., Bolla, J. M., Pages, J. M. & Fanning, S. 2007. Antibiotic-resistant *Campylobacter*: could efflux pump inhibitors control infection? *J Antimicrob Chemother*, 59, 1230-6.

30. Rosenquist, H., Boysen, L., Galliano, C., Nordentoft, S., Ethelberg, S. & Borck, B. 2009. Danish strategies to control *Campylobacter* in broilers and broiler meat: facts and effects. *Epidemiol Infect*, 137, 1742-50.
31. Shen, Z., Han, J., Wang, Y., Sahin, O. & Zhang, Q. 2013. The Contribution of ArsB to Arsenic Resistance in *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, 8, e58894.
32. Tareen, A. M., Dasti, J. I., Zautner, A. E., Gross, U. & Lugert, R. 2010. *Campylobacter jejuni* proteins Cj0952c and Cj0951c affect chemotactic behaviour towards formic acid and are important for invasion of host cells. *Microbiology*, 156, 3123-35.
33. Thibodeau, A., Fravalo, P., Garneau, P., Masson, L., Laurent-Lewandowski, S., Quessy, S., Harel, J. & Letellier, A. 2013. Distribution of Colonization and Antimicrobial Resistance Genes in *Campylobacter jejuni* Isolated from Chicken. *Foodborne Pathog Dis*, 10, 382-91.
34. Thibodeau, A., Fravalo, P., Laurent-Lewandowski, S., Guevremont, E., Quessy, S. & Letellier, A. 2011. Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Québec. *Can J Vet Res*, 75, 298-307.
35. Vegge, C. S., Brondsted, L., Li, Y. P., Bang, D. D. & Ingmer, H. 2009. Energy taxis drives *Campylobacter jejuni* toward the most favorable conditions for growth. *Appl Environ Microbiol*, 75, 5308-14.
36. Wang, L., Jeon, B., Sahin, O. & Zhang, Q. 2009. Identification of an arsenic resistance and arsenic-sensing system in *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, 75, 5064-73.

37. Wassenaar, T. M., Fry, B. N. & van der Zeijst, B. A. 1993. Genetic manipulation of *Campylobacter*: evaluation of natural transformation and electro-transformation. *Gene*, 132, 131-5.
38. Young, K. T., Davis, L. M. & Dirita, V. J. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 5, 665-79.
39. Ziprin, R. L., Young, C. R., Byrd, J. A., Stanker, L. H., Hume, M. E., Gray, S. A., Kim, B. J. & Konkel, M. E. 2001. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. *Avian Dis*, 45, 549-57.

4.9 Tables

Table 1: Colonization potential and inoculated dose of the strains used in the *in vivo* chicken colonization competition assay

Strain	Mean rank value ± SEM	Inoculated dose Log CFU/bird	Group
Strain 2	36.2 ± 4.4	4.4	A
Strain 6	11.8 ± 4.2	4.5	
Strain 1	39.0 ± 0.1	4.5	B
Strain 5	18.3 ± 3.1	4.4	
Strain 3	34.8 ± 2.8	4.2	C
Strain 4	22.0 ± 7.1	4.4	

Strains were co-administered orally to each chicken, according to their experimental group; For each *in vitro* experiment, characterized strains were classified according to their phenotypic properties; the strain possessing the lowest property value (poorest performing strain) was assigned a rank value of 1 and the best a rank value of 41. The mean rank of the *in vitro* phenotypic properties (autoagglutination rank, chemotaxis rank, adhesion rank and invasion rank) was then calculated; Strains were numbered from 1 to 6 according to their decreasing mean rank value.

Table 2: PCR conditions for the detection of the genes specific to the strains used in the *in vivo* chicken colonization competition assay

Gene	Primers (5' – 3')	Cycle
<i>pseD</i>	F: GATGGAATGGTAAGCGTTGCACA	• 95°C for 20 s
	R: TTATCCTTGCTCCACCTTCGGTGC	• 56 °C for 20 s
		• 72°C for 20 s
<i>virB11</i>	F: TCTTGTGAGTTGCCTTACCCCTTTT	• 95°C for 20 s
	R: CCTGCGTGTCTGTGTTATTTACCC	• 65°C for 20 s
		• 72°C for 20 s
CJ0144	F: TTCATGAAGTTGTGAATGCTGAAA	• 95°C for 20 s
	R: TCGCTTACAACAAGTTCGCC	• 61 °C for 20 s
		• 72°C for 10 s

A total of 40 ng of DNA was amplified; Standard mixes consisted of a 20 µl reaction containing 1X QPCR master mix (MBI EVOLution EvaGreen (R), Montréal Biotech Inc.) and 350 nmol of each primer; Reactions positive after 35 cycles were rejected; All PCR cycles were preceded by an initial denaturation step consisting of a 15 min incubation at 95 °C; All PCR runs were ended by a final 5 min elongation step at 72 °C followed by a denaturation curve analysis.

Table 3: Identification of the dominant *C. jejuni* strain in the *in vivo* chicken colonization competition assay by the PCR detection of relevant genes

Sample	<i>pseD</i> detection	<i>virB11</i> detection	Cj0144 detection
Group A: caecal contents	2/3	0/3	0/3
Strain 2	+	-	-
Strain 6	+	+	-
Group B caecal contents	3/3	0/3	0/3
Strain 1	+	-	-
Strain 5	+	+	-
Group C caecal contents	0/3	0/3	3/3
Strain 3	-	-	+
Strain 4	+	-	-

Detection of genes specific to the inoculated strains in the *in vivo* competition assays, 7 days post-inoculation; the three chickens in group A received strains 2 and 6; the three chickens in group B received strains 1 and 5; the three chickens in group C received strains 3 and 4; Only strain 3 was negative (-) for *pseD*, only strains 1 and 2 were positive (+) for *virB11* and only strain 3 was positive for Cj0144. For each group, the ratio of the number of positive samples on the total number of tested samples (n =3) is shown. DNA extracted from each strain served as controls.

Table 4: Genes associated with *C. jejuni* strains possessing high phenotypic properties related to chicken colonization

Gene	Rank p value	Agg p value	Chm p value	Inv p value	Adh p value	Gene Function
<i>arsC</i>	0.001	0.254	0.007	0.027	0.037	Arsenate reductase
C8J1456	0.005	0.824	0.002	0.033	0.175	Hypothetical protein
C8J1083	0.006	0.788	0.001	0.063	0.172	Hypothetical protein LOS locus
<i>dmsA</i>	0.010	0.930	0.002	0.085	0.143	Anaerobic dimethyl sulfoxide reductase
<i>rloA</i>	0.021	0.826	0.003	0.085	0.113	type 1 restriction system variant
<i>HsdS</i>	0.039	0.857	0.007	0.221	0.279	type 1 restriction system variant
CJE1719	0.039	0.213	0.069	0.025	0.008	Zinc-binding dehydrogenase family variant
C8J0988	0.043	0.514	0.026	0.127	0.013	Hypothetical protein

Gene profile of the strain possessing the highest mean rank value (strain 1) was compared to the strain possessing the lowest mean rank value (strain 7) (Figure 5). Mann-Whitney test was used to assess that strains (n = 30) possessing these genes were likely to possess higher mean rank values than the other strains. Genes with a p value < 0.05 are present in strain likely to possess higher properties while genes with a p value < 0.003 are present in strain presenting higher phenotypic properties; Agg = autoagglutination; Chm = chemotaxis; Inv = invasion; Adh = adhesion.

Table 5: Genes associated with *C. jejuni* strains possessing lower phenotypic properties related to chicken colonization

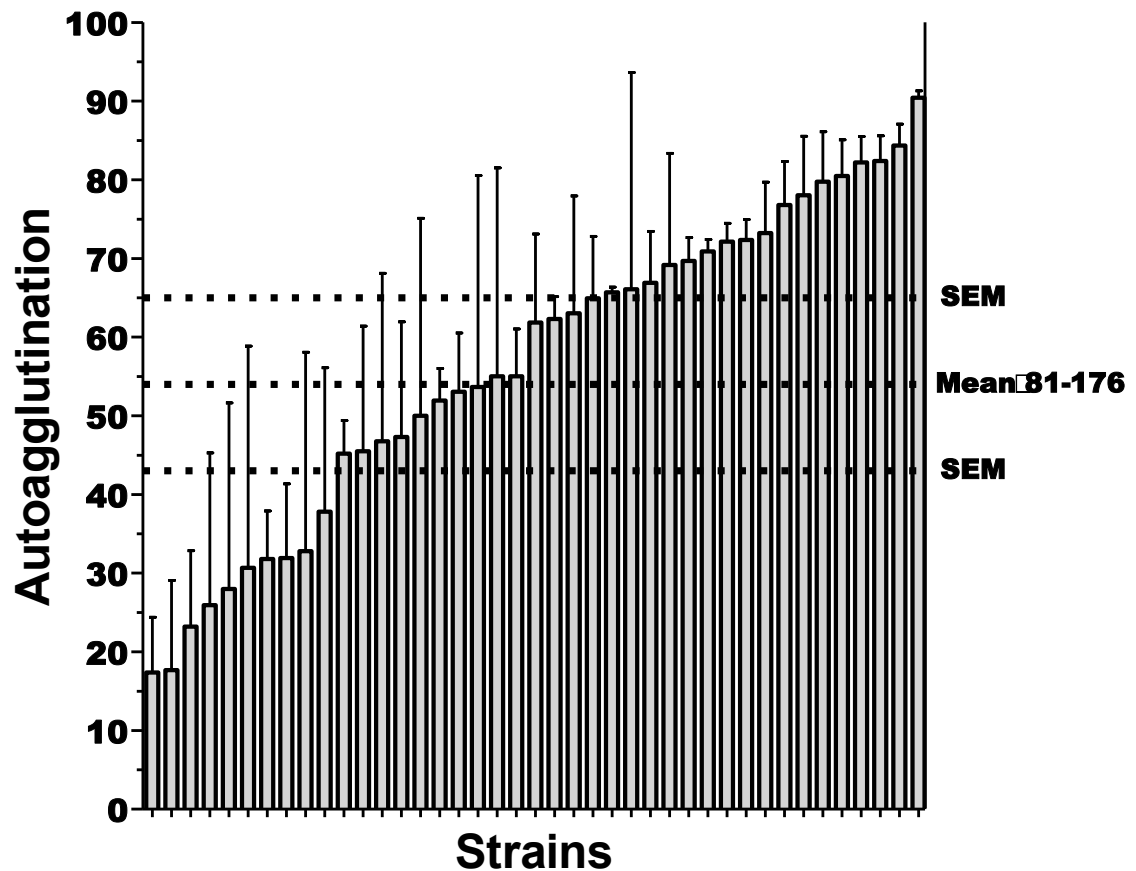
Gene	Rank p value	Agg p value	Chm p value	Inv p value	Adh p value	Function
<i>lctP</i>	0.002	0.222	0.018	0.037	0.023	L-lactate permease
CJ1325c	0.003	0.538	0.001	0.054	0.112	Putative periplasmic protein
CJE1277	0.004	0.538	0.002	0.037	0.087	Putative glycosyltransferase
CJE0171	0.006	0.796	0.003	0.070	0.049	Putative TonB-dependant outer membrane receptor
CJE1679	0.009	0.436	0.147	0.017	0.011	Methyl-accepting chemotaxis protein
CJ0223	0.010	0.983	0.037	0.002	0.266	Pseudogene, putative IgA protease family protein
<i>motA</i>	0.010	0.920	0.002	0.085	0.143	Flagellar motor proton channel possible variant
CJE1820	0.012	0.885	0.011	0.019	0.039	Putative periplasmic protein
CJE1730	0.021	0.645	0.015	0.068	0.041	Putative permease
<i>cfrA</i>	0.030	0.677	0.008	0.218	0.233	Ferric receptor <i>cfrA</i>
CJE1719	0.039	0.213	0.069	0.025	0.008	Zinc-binding dehydrogenase family oxidoreductase variant

Gene profile of the strain possessing the highest mean rank value (strain 1) was compared to the strain possessing the lowest mean rank value (strain 7) (Figure 5). Mann-Whitney test was used to assess that strains (n = 30) possessing these genes were likely to possess lower mean rank values than the other strains. Genes with a p value < 0.05 are present in

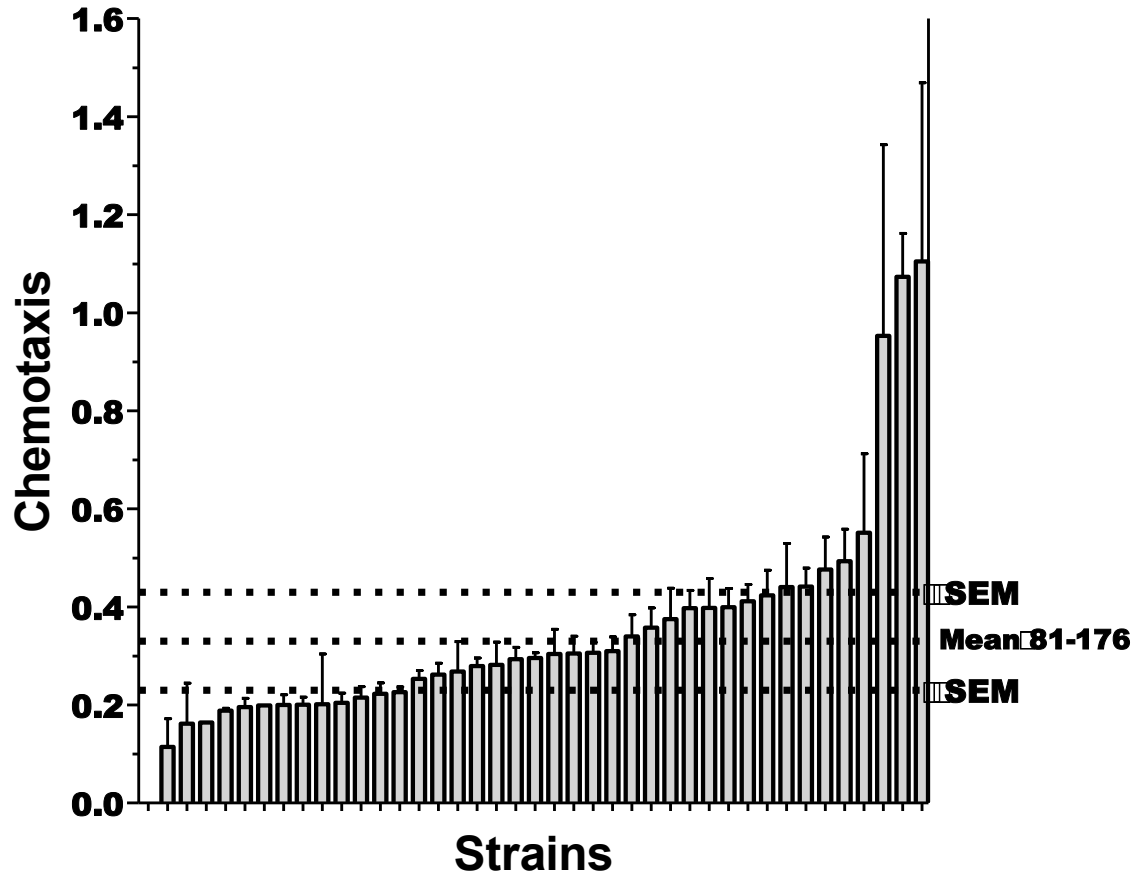
strain likely to possess lower properties while genes with a p value < 0.002 are present in strain presenting lower phenotypic properties; Agg = autoagglutination; Chm = chemotaxis; Inv = invasion; Adh = adhesion.

4.10 Figures

Figure 1: Autoagglutination capacities of the *C. jejuni* strains

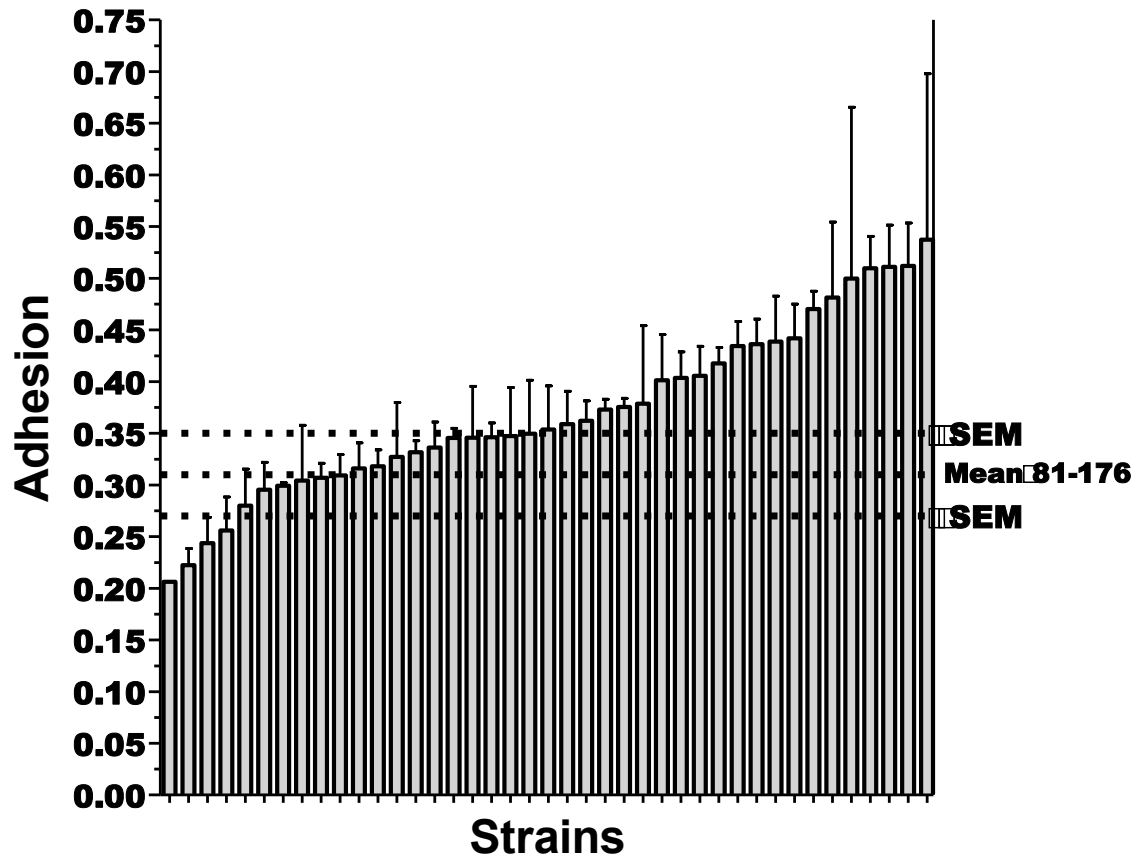


Autoagglutination of the 41 *C. jejuni* strains. The errors bars represent the SEM. The horizontal dashed lines represent the control strain 81-176 and it's SEM. Each result is the mean of 3 replicates. Strains results were classified by increasing order. Strains were found having different autoagglutination properties (Kruskal-Wallis, $p = 0.0083$). Autoagglutination is expressed as: $((\text{Initial DO } 630\text{nm} - 3 \text{ h DO } 630\text{nm})/\text{Initial DO } 630\text{nm}) \times 100$.

Figure 2: Chemotaxis properties of the *C. jejuni* strains

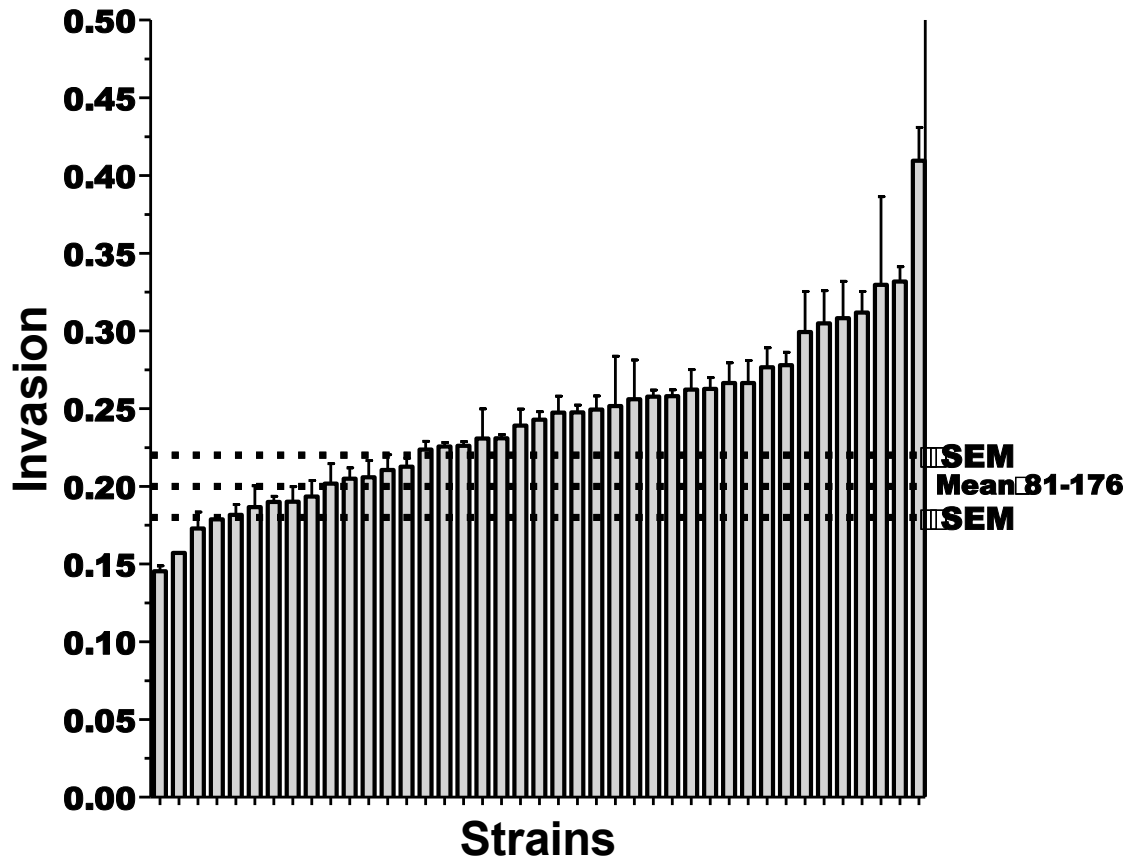
Chemotaxis properties of the 41 *C. jejuni* strains. The errors bars represent the SEM. The horizontal dashed lines represent the control strain 81-176 and its SEM. Each result is the mean of 3 to 6 replicates. Strains results classified by increasing order. Strains were found having different chemotaxis properties (Kruskal-Wallis, $p < 0.0001$). Chemotaxis is expressed as $-1/\log(\text{attracted bacteria} / \text{initial bacteria used})$.

Figure 3: Adhesion to primary caecal chicken cells by the *C. jejuni* strains



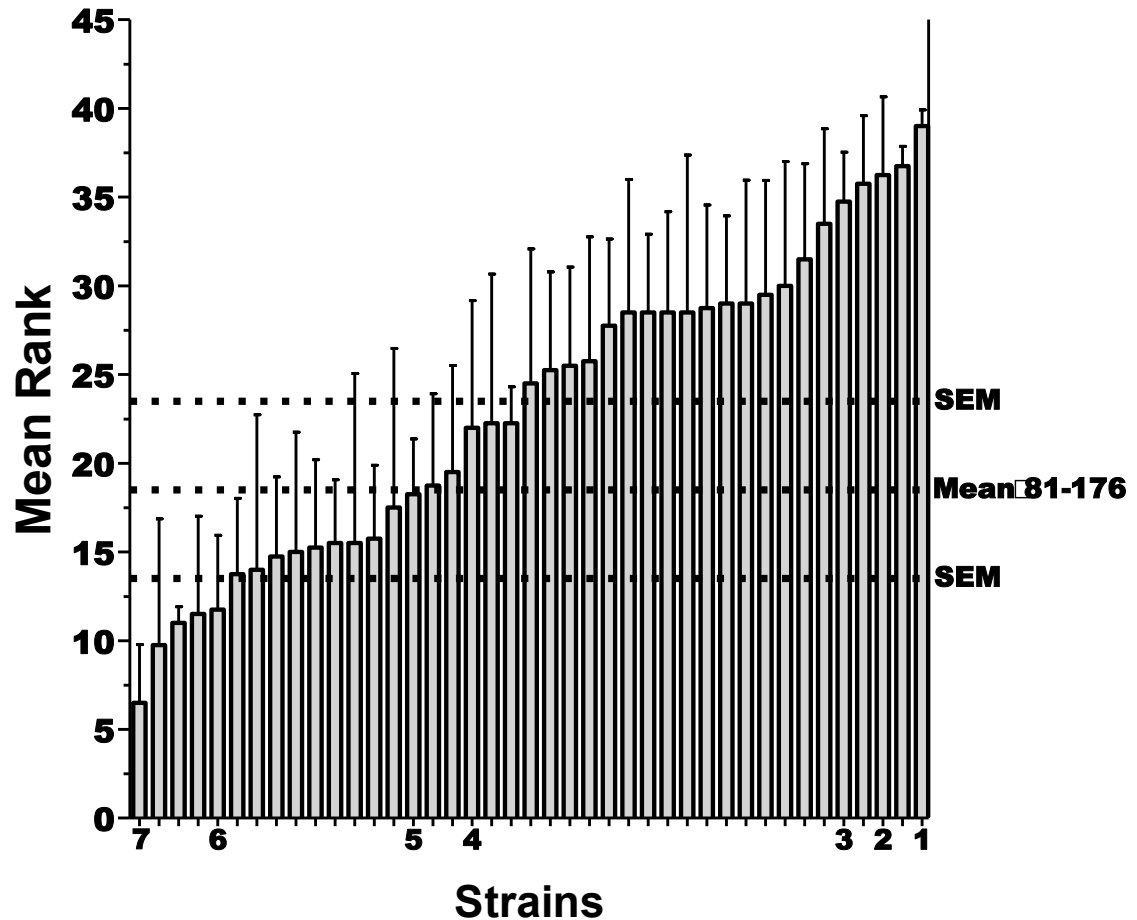
Adhesion levels to primary caecal cell of the 41 *C. jejuni* strains. The errors bars represent the SEM. The horizontal dashed lines represent the control strain 81-176 and it's SEM. Each result was the mean of 3 to 6 replicates. Strains results classified by increasing order. Strains were found having different adhesion properties (Kruskal-Wallis, $p < 0.0001$). Adhesion is expressed as $-1/\log(\text{adhered bacteria} / \text{initial bacteria used})$.

Figure 4: Invasion of primary caecal chicken cells by the *C. jejuni* strains



Invasion levels of primary caecal cell of the 41 *C. jejuni* strains using the gentamicin protection assay. The errors bars represent the SEM. The horizontal dashed lines represent the control strain 81-176 and its SEM. Each result is the mean of 3 to 6 replicates. Strains results classified by increasing order. Strains were found having different invasion properties (Kruskal-Wallis, $p < 0.0001$). Invasion is expressed as $-1/\log$ (invading bacteria / initial bacteria used).

Figure 5: Strains ranking based on their phenotyping properties



For a given strain, the mean rank is based on the phenotypical properties of each strain compared to all other tested in the autoagglutination, chemotaxis, adhesion and invasion assays. The errors bars represent the SEM. On the X axis, strains mentioned in the article are identified. The horizontal dashed lines represent the control strain 81-176 and it's SEM. A total of 41 strains were tested. Strains were classified by increasing order. Strains were found having different mean rank values (Kruskal-Wallis, $p < 0.0043$).

**Chapitre 5: Modification of *Campylobacter jejuni* Broiler
Colonization through an Experimental Blend of
Encapsulated Organic Acids and Essential Oils Used as
Feed Additive**

Article soumis au Canadian Journal of Veterinary Research

Modification of *Campylobacter jejuni* Broiler Colonization through an Experimental Blend of Encapsulated Organic Acids and Essential Oils Used as Feed Additive

Alexandre Thibodeau, Philippe Fravalo, Sylvette Laurent-Lewandowski, Nadia Bergeron, Evelyne Guévremont, Sylvain Quessy, Martine Boulianne, Robert Gauthier and Ann Letellier.

Chaire de recherche industrielle du CRSNG en salubrité des viandes (CRSV-CRSNG), Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, Département de microbiologie et de pathologie, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe (Québec), Canada, J2S 2M2 (Thibodeau, Fravalo, Laurent-Lewandowski, Bergeron, Quessy, Letellier); Agriculture and Agri-Food Canada, Food Research and Development Centre, 3600 Casavant Boulevard West, Saint-Hyacinthe (Quebec), Canada, J2S 8E3 (Guévremont); JEFO Nutrition Inc., 5020 avenue Jefo, Saint-Hyacinthe (Quebec), Canada, J2S 7B6 (Gauthier); Groupe de recherche et d'enseignement en salubrité alimentaire (GRESA), Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, Département de microbiologie et de pathologie vétérinaire, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe (Québec), Canada, J2S 2M2 (Thibodeau, Fravalo, Laurent-Lewandowski, Bergeron, Guévremont, Quessy, Boulianne, Letellier); Département de sciences cliniques, Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe (Québec), Canada, J2S 2M2 (Boulianne)

Address all correspondence to Dr Ann Letellier: Telephone: 450-773-8521 ext 8640; Fax: 450-778-8128; e-mail:

Disclaimer

The feed additive tested was provided by Jefo Nutrition Inc., St-Hyacinthe, Quebec, Canada.

5.1 Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of novel feed additive, consisted of a microencapsulated blend of organic acids and essential oils (OA/EO), on broiler chicken intestinal colonization and carcass contamination by *Campylobacter jejuni*. Day-old birds were separated into two rooms and then subdivided into two groups. Chicken groups were fed OA/EO or not from the day they hatched until they reached 35 days of age and were raised in conditions similar to commercial production. At 14 days of age, the chickens received an oral suspension of two *C. jejuni* strains. Four well characterized and different strains (two competing strain per room) were evaluated in this study. Over 3 weeks, the birds were sacrificed periodically and the levels of *C. jejuni* were monitored both in the caecum and on the eviscerated carcasses. *C. jejuni* intestinal colonization was further characterized by the use of high-resolution melting analysis of the *C. jejuni flaA* gene (HRM-*flaA*) in the chicken caecal content.

C. jejuni results observed between the two strain cocktails varied, reflecting a strain-dependent effect of the tested feed additive. In room two, the feed additive had no effect on the caecal counts. In room one, at 35 days of age, caecal *C. jejuni* counts were higher with OA/EO as opposed to carcasses counts, which were lower in the treated group. The HRM-*flaA* analysis showed that an amplification profile was predominant in birds fed OA/EO at 35 days of age in room one, suggesting the selection of *C. jejuni* by OA/EO.

Key words: *C. jejuni* control, feed additive, HRM, organic acids and essential oils, chicken colonization

5.2 Introduction

One of the most important worldwide foodborne bacterial pathogen is *Campylobacter jejuni* (1). It causes campylobacteriosis in humans, a gastrointestinal disease that may lead to serious autoimmune disorders like the Guillain-Barré syndrome (2). Consumption and mismanagement of contaminated poultry meat products have been identified as major human sources of *C. jejuni* (3). One way to reduce human exposure to *C. jejuni* is by controlling the pathogen at the farm level (4). It is estimated that the fecal matter of a colonized chicken contains approximately 10^6 CFU/g of *C. jejuni* (5).

Great *C. jejuni* genetic diversity is present in the chicken flocks, making it difficult to implement comprehensive and effective control measures. First, chicken farms may be exposed to environmental *C. jejuni* where high diversity is observed (6) leading to different farms being colonized by unrelated *C. jejuni* strains (7). On the other hand, on a same farm, isolated strains are often highly clonal (7), probably as a result of strains competing for the same ecological niche (8, 9).

Strategies used on the farms could also impact diversity during processing. It is known that carcass *C. jejuni* genetic diversity is higher than caecal diversity (10, 11). This probably results from the cross-contamination between slaughtered flocks (10, 11) and processing-related selection (12).

Numerous control strategies have been tested to reduce *C. jejuni* colonization in poultry, including the maintenance of high farm biosecurity, vaccination, phage therapy, competitive exclusion microflora and the use of feed additives (13). Interest in feed additives, especially non-antibiotic ones, is increasing as they represent an alternative to the antibiotics used in the poultry industry to promote the health and productivity of the birds. Also, the use of antibiotic agents for non-therapeutic purposes was stopped in some countries (14). Some non-antibiotic feed additives, such as organic acids and essential oils, were already tested for their action on *C. jejuni*, showing varying efficacy. Essential oil extracts, such as *Eucalyptus occidentalis*, Valencia orange and cinnamon, are very potent against *C. jejuni in vitro* (15, 16). Trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, and thymol

were also found effective at various concentrations even in the presence of caecal matter (17). On the other hand, essential oils active *in vitro* may lose their efficacy *in vivo*, as was shown with encapsulated trans-cinnamaldehyde (18). Organic acids such as caprylic acid, formic acid, sorbate, lactic and acetic acid are bactericidal against *C. jejuni in vitro* and are also effective at some degree *in vivo* (19, 20, 21, 22). It was also shown that the combination of formic acid and sorbate could prevent *C. jejuni* chicken colonization whereas their separate use could not (21). That being said, the capacity to reduce *C. jejuni* chicken colonization using organic acids is not absolute. Therefore, the varying efficacy of organic acids and essential oils as feed additives commands more research to confirm their individual or combined effects on *C. jejuni* chicken colonization. These studies should also take into account the strain diversity possibly encountered by chickens during industrial rearing to limit interpretations based on single-strain trials.

This study was meant to periodically quantify the effect of a new feed additive, predominantly based on microencapsulated sorbic acid and phenolic essential oils (OA/EO), both on the caecal colonization and carcass contamination of broiler chickens by different competing *C. jejuni* chicken strains. Finally, this study used for the first time the high-resolution melting analysis of the *C. jejuni flaA* gene (HRM-*flaA*) as a tool to follow the *C. jejuni* chicken caecal colonization dynamic.

5.3 Material and Methods

5.3.1 Experimental Design

All animal experiments were approved by the Ethics Committee (CEUA) of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal. The birds (200 female Ross chickens) were purchased from a local hatchery, transported to a level two biosecurity housing facility (CRA) and were raised on wood shavings in floored pens during the whole study. The chickens were given water and fed *ad libitum*. Upon reception, the day-old birds were divided into two rooms containing 100 chickens each and destined to receive different *C. jejuni* strains. The 100 chickens were then subdivided into two groups in each room.

From the beginning of the trial to the end, for each room, one chicken group received a standard commercial feed (control group, n = 50 birds) and the other received the same feed but supplemented with the experimental microencapsulated organic acid and phenolic essential oil blend (mainly constituted of fumaric acid, sorbic acid and thymol) at a concentration of 500 ppm (OA/EO group, n = 50 birds) and mixed manually at the CRA. For all groups, a standard starter diet composed of 18% protein, 3.85% fiber, 2.84% fat, 0.83% calcium, 0.61% phosphorous, 0.19% sodium, vitamin A 6238 UI/kg, vitamin D-3 2275 UI/kg and vitamin E 20 UI/kg was used from 0 to 21 days of age and a finishing diet composed of 15% protein, 5.32% fiber, 3.82% fat, 0.81% calcium, 0.55% phosphorous, 0.15% sodium, vitamin A 3900 UI/kg, vitamin D-3 1425 UI/kg and vitamin E 13 UI/kg was used for the remainder of the study.

Two days prior to the *C. jejuni* inoculation, fresh caecal droppings and feeds were tested to confirm the absence of *C. jejuni*. At 14 days of age, each chicken was orally inoculated with two different *C. jejuni* strains simultaneously. The birds received a suspension containing approximately 5×10^4 CFU of each strain, depending on the room they were housed in (Table 1). These strains possessed different phenotypic properties and originated from distinct broiler farms (Table 1). The strains were characterized in another study for their autoagglutination, chemotaxis and epithelial cell adhesion/invasion properties. The inoculating suspension was obtained as follows: a -80°C frozen aliquot was cultured on mCCDA (Innovation Diagnostic Inc., Montreal, Canada,) for 24 h, at 42°C , in a microaerobic atmosphere, using the *Campylobacter* gas generation kit (Oxoid, Nepean, Ontario, Canada.). The strains were then transferred onto tryptic soy Agar (TSA) containing 5% (v/v) defibrinated sheep's blood (Fisher sci, Ottawa, Ontario, Canada). Each strain was suspended in 1 ml of trypton salt (TS) (Innovation Diagnostic Inc.,) to obtain an optic density (630 nm) of 1.0, corresponding to approximately 10^8 CFU/ml. This suspension was further diluted to obtain approximately 10^5 CFU/ml and then mixed with an equal volume of the second strain to form the final inoculation suspension (Table 1). All suspensions were enumerated by culture on Mueller-Hinton Agar (Innovation Diagnostic Inc.).

On day 7, 14 and 21 post-inoculation (PI), the chickens were euthanized and processed in the experimental facility using procedures similar to commercial poultry production. For each group, small subgroups of four birds were stunned using electronarcosis, euthanized by bleeding, scalded (SYRI LTD, Saint-Félix-de-Valois, QC, CA) at 60°C for 110 s, mechanically plucked (Syri LTD) for 40 to 60 s and manually eviscerated. Immediately after the evisceration, the caeca, liver and spleen were individually collected for microbial analysis. The whole carcasses were then rinsed in 400 ml of peptone buffered water (Canadian Food Inspection Agency, Meat Hygiene Manual Procedure, Chapter 11, Appendix U). All samples were kept on ice and processed within 4 to 6 h.

5.3.2 Sample Processing

All *C. jejuni* incubations were conducted in a microaerobic atmosphere at 42°C. Detection of *C. jejuni* from three samples of 50 g of starter feed and grower feed and three samples of 10 g of pooled fresh droppings recovered from each group before the bird inoculation, was done using *Campylobacter* Enrichment Broth (Innovation Diagnostic Inc.) at a concentration of 1:9 (w/v), followed by mCCDA inoculation. After the incubation, the absence of typical colonies was verified on the Agar.

Samples from euthanized birds were processed for the enumeration of *C. jejuni* and the total aerobic bacteria in the caeca or post-evisceration carcasses. For each bird, the caecal content (1g) and carcass rinses were diluted in TS and plated on CASA Agar (Innovation Diagnostic Inc.) for the enumeration of *C. jejuni* (23). The first caecal content TS dilutions were supplemented with 10% (v/v) glycerol, and aliquots were kept at -80°C for total DNA extraction. Presence of *C. jejuni* in the organs was also investigated for one out of two birds. The liver (10 g) and spleen (whole) were dipped in 70% ethanol for 15 s, flamed and then homogenized in TS (1:9) with a stomacher for 30 s. Each organ suspension was then directly plated on CASA Agar. Organs were considered positive if at least one typical *Campylobacter* colony was detected for the spleen or liver sample. Half of the

carcass rinses were also plated on total aerobic bacteria Pétrifilm (3M, Saint-Paul, Minnesota, USA) and incubated at 37°C prior to enumeration.

5.3.3 DNA Extraction

DNA was extracted from a -80°C frozen 500 µl caecal suspension that was recovered 21 days post *C. jejuni* inoculation. Then, 100 mg of glass beads were added to each sample. Suspensions were vortexed for 15 s, heated at 95°C for 10 min, put on ice for 5 min and vortexed again for 15 s. Samples were then centrifuged at 18 000 x g for 10 min and the supernatant kept for a standard phenol: chloroform DNA extraction (24). The final concentration and purity of the DNA was assessed by NanoDrop (ND-1000, NanoDrop, Wilmington, USA) and standardized to 20 ng/µl, in sterile water.

5.3.4 HRM-*flaA* Typing

The genetic characterization of the DNA extracts from the strains and caecal contents was conducted using HRM-*flaA* analysis, as previously described (25), on an ECO QPCR (Illumina, Montreal Biotech Inc., Montreal). Then, 40 ng of DNA was subjected to amplification in a 20 µl reaction containing 1X QPCR master mix (MBI EVOLution EvaGreen (R), Montreal Biotech Inc.) and 350 nmol of each primer. Each plate contained a no-DNA control, the two inoculated strains, reference strain 81-176 and 8 caecal DNA samples. All samples were run in triplicate in two different PCR runs. The HRM-*flaA* data analysis was conducted using ECO software version 4.0 with the pre-melt region set between 72°C and 73°C and the post-melt region set between 91°C and 92°C. The curves obtained were normalized using reference strain 81-176. For each plate, sample curves were assigned a profile depending on the graphical comparison with the inoculated strain curves.

5.3.5 Statistical Analysis

The statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) with an alpha set to 0.05. The caecal and carcass bacterial levels between the

groups in rooms one and two were compared using the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons post-test. A one-way ANOVA was conducted to analyze the combined data and a Tukey post-test to compare the groups. The Chi square and Fisher exact test were respectively used to assess the effect of the additive on the *C. jejuni* organ occurrence and HRM-*flaA* profile selection.

5.4 Results

5.4.1 Caecal *Campylobacter* Levels

Before the inoculation, all chickens and feeds were free of *Campylobacter*. The treated and control chickens were both colonized at 7 days post-inoculation (Table 2) in both rooms but differences in the level of *C. jejuni* were observed in the caecum of the inoculated chickens ($p < 0.001$).

In room one, at 21 PI, the total *C. jejuni* counts were higher in the OA/EO group than the control group by a mean difference of 1.4 logs CFU/g. Also, in the room one control group, mean levels of *C. jejuni* decreased from 7 PI to 21 PI (0.8 log CFU/g), contrary to the OA/EO group where an increase (0.8 log CFU/g) was observed for the same period. In room two, counts decreased by a mean of 2.3 logs CFU/g for the control group between 7 PI and 14 PI.

Count differences between the two rooms could also be observed. In room two, control group strains showed a better colonization of chickens than their counterpart in room one by 1.6 logs CFU/g at 7 PI. In room one, the treated chickens had 1.3 logs CFU/g more *C. jejuni* than their counterparts in room two at 21 PI.

When room results were combined, differences between treatments could still be observed ($p < 0.001$) on caecal *C. jejuni* loads. At 7 PI, the additive reduced counts by 0.8 log CFU/g but increased them by 0.6 log CFU/g at 21PI.

5.4.2 Carcass *Campylobacter* Levels

Total *C. jejuni* counts of the post-evisceration carcasses differed between the chicken groups in each room ($p < 0.001$, Table 3). In room one, at 21 PI, *C. jejuni* levels found on the OA/EO group were lower by a mean of 1.4 logs CFU/carcass compared to the levels found on the control carcasses. Mean counts in the treated group decreased by 1.1 logs CFU/carcass (7 PI > 21 PI) throughout the study but increased by 1.3 logs CFU in the control group (14 PI < 21 PI). In room two, counts for the control group decreased by 0.8 log CFU/carcass between 7 PI and 14 PI.

Count differences between the two rooms could also be observed. The control carcasses from room one were less contaminated by 0.8 log CFU/carcass compared to their room two counterparts at 7 PI and treated carcasses were less contaminated by 1 log CFU/carcass at 21 PI.

When the room results were combined, differences could still be observed between treatments ($p < 0.001$) on carcass contamination levels. At 21 PI, the feed additive decreased the count by 0.9 log CFU/carcass.

5.4.3 Total Aerobic Bacterial Counts and *Campylobacter* Organ Occurrence

Throughout the study, the total aerobic bacterial counts of the carcasses ranged from 8 log CFU/carcass to 9 log CFU/carcass but were not statistically different ($p = 0.161$) for all groups in all rooms and when combining room results. For organ contamination, in room one, the livers or spleens of the tested chickens were found positive regardless of their group (Table 4), but overall, *Campylobacter* was found in fewer organs at 21 PI as compared to 7 PI ($p = 0.009$). OA /EO supplementation reduced the number of positive birds from six at 7 PI to one at 14 PI compared to the control feed where one more positive bird was found for the same period. When using time as a variable, it was found that the use of feed additive significantly lowered the number of positive birds ($p = 0.007$) between 7 PI and 14PI. This was not the case for the control group ($p = 0.076$). In room two, no difference was observed.

When all the data were combined, it was found that the number of positive birds significantly decreased from 11 to 5 ($p = 0.015$) from 7 PI to 14 PI in the treated group whereas the number in the control group did not.

5.4.4 HRM-*flaA* Profiles

An analysis was performed at 21 PI only in room one where caecal counts differed between the control and treated group. In the caecal contents of the control birds at 21 PI, three different profiles could be seen (Figure 1). In the OA/EO group, profile 1 dominated ($p = 0.042$) over profiles 2 and 3. Each inoculated strain had a different and reproducible HRM-*flaA* profile (profile 1 for strain 1 and profile 2 for strain 2, Figure 2) that could be related to the profiles seen in the caecal contents. Profile 3 was successfully reproduced *in vitro* by conducting a HRM-*flaA* analysis on a sample containing the DNA of both inoculated strains in different proportions (Figure 2).

5.5 Discussion

5.5.1 *Campylobacter jejuni* Broiler Chicken Colonization Model

This study evaluated the potential of using an in-feed additive as a strategy to reduce *C. jejuni* chicken colonization. The colonization model developed in this study accurately replicated natural chicken colonization. Indeed, the caecum *C. jejuni* levels obtained in both rooms were in keeping with field norms as we observed a mean colonization of 7.1 logs CFU/g for all birds throughout the study while the literature reports a mean of 4 to 10 logs CFU/g (26, 27). We also obtained a mean *C. jejuni* carcass contamination level of 4.7 logs CFU/carcass as it is reported that carcasses in commercial conditions can be contaminated with 1.8 to 8 logs CFU/carcass (26, 28). The *C. jejuni* caecal and carcass counts obtained in this study therefore reflect what can be seen in commercial processing plants, indicating that our *C. jejuni* colonization model is appropriate to study the effect of OA/EO on both *C. jejuni* caecal and carcass populations. Bird processing up to manual evisceration was reproducible during the whole study as

shown by the stable total aerobic bacteria counts for the carcasses (Table 4). No evisceration-related event affected the results as shown by the homogeneity of the carcasses studied.

5.5.2 Feed Additive Effect on *Campylobacter* Caecal Colonization

In the specific conditions of this study, the administration of the microencapsulated organic acids and essential oils did not prevent *C. jejuni* chicken colonization as observed in other studies (19, 20, 21, 22), regardless of the strain used.

The effect of OA/EO was strain dependent. In room one, the OA/EO increased the counts in the chicken caecum near the end of the production cycle of a broiler chicken (21 days PI, 35 days of age) while in room two, the feed additive only reduced chicken colonization at 7 PI.

The different phenotypic properties of the strains used seem to influence chicken caecal colonization at some degree. The inoculated strains of room two had lower adhesion/invasion properties and seemed slightly better for colonizing chickens, but only a few days after inoculation. It has been demonstrated that strains with lower invasion capabilities are poorer chicken colonizers (29) as opposed to observations made in this study. In our study, colonization may have been counterbalanced by other phenotypic properties of the tested strain or by differences in the chicken colonization model used. The differences observed at 7 PI and 14 PI between the two rooms could also be the results of the birds' unequal inoculation.

In room one, the OA/EO increased the *C. jejuni* counts in the chicken caeca, contrary to other studies that reported the opposite effect (19, 20, 21, 22). These differences could stem from the novel use of a blend of organic acids and essential oils compared to the use of individual molecules in other studies. More studies on the individual substances contained in the feed additive would be necessary to identify their independent action on *C. jejuni*.

In this study, the unexpected increase in caecal *C. jejuni* level by OA/EO could be due to the selection of a strain, enabling it to better colonize the chicken. In other studies,

thymol and cinnamaldehyde were found to modify the chicken gut microflora by increasing the caecal *Lactobacillus* and *Escherichia coli* populations (30). Essential oils such as thymol and cinnamaldehyde also modified butyrate, isobutyric acid, propionic acid and isovaleric acid caecal proportions (30, 31). *C. jejuni* can metabolize different amino and organic acids such as citric, fumaric, lactic, malic, succinic (32), aspartic, glutamic acids, ketoglutarate, acetate, lactate (33) and can be attracted to them (34). Therefore, an increase in these organic acids in the gut concentration by the feed additive itself or by a modified microbiota may be beneficial for *C. jejuni*. Formic acid was also found to improve the intestinal mucosa physiology of chickens (35). Intestinal mucus can neutralize the bactericidal effect of organic acids (36). *C. jejuni* is also attracted to mucins (37) and colonizes the caecal mucosa (1). An improvement in the chicken gut mucus layer may lead to an increase in *C. jejuni* colonization for some strains. Modification of the chicken gut environment by the tested feed additive remains to be studied. In this study, we hypothesize that the modifications caused by the OA/EO experimental feed additive may have impacted the inoculated strains in a strain-dependent manner, favoring one strain over another and therefore increasing the *C. jejuni* caecal count at 21 PI.

This *C. jejuni* strain modulation is supported by the chicken caecal content HRM-*flaA* analysis results, where profile one seemed omnipresent when the feed additive was used. In recent studies, HRM-*flaA* was successfully shown to discriminate between *C. jejuni* strains distinguishable by *flaA* sequencing (25) and could successfully be used for MLST typing (38). To our knowledge, this study is the first to report the use of HRM analysis directly with chicken caecal content. The reproducible results obtained suggest that the HRM technology could be useful for the direct analysis of caecal content contaminated by *C. jejuni*. This is also, to our knowledge, the first observation of the modulation of competing *C. jejuni* chicken gut colonization by organic acids and essential oils. The exact mechanism that would make this selection possible remains to be investigated as well as its ubiquitous application to all *C. jejuni*.

5.5.3 Feed Additive Effect on Carcass *Campylobacter* Contamination

Carcass contamination also seemed to be strain dependent as it was room dependent. In room one, a significant *C. jejuni* 1.4 logs CFU/carcass reduction was achieved at 21 PI when using OA/EO. It also reduced the value of the carcass contamination by 0.5 log CFU/carcass at 21 PI in room two. These carcass *C. jejuni* reductions could result in an appreciable effect of OA/EO on public health. Indeed, some authors suggested that the reduction of carcass contamination by 1 log CFU/carcass could reduce human health risks by 50% to 90%, depending on the pre-existing production conditions (3).

This carcass count reduction is unexpected as the opposite effect was seen in the caecum in room one. In commercial settings, high *C. jejuni* caecal counts were found to be correlated with high carcass contamination (26). That being said, this is not always the case as the caecal colonization level is not always a good predictor of carcass contamination (28), as observed in this study.

This study is among the very few evaluating the effect of OA/EO on *C. jejuni* carcass contamination. It was reported that citric acid decreased ilea coliform levels but increased carcass populations of *Staphylococcus*, *Campylobacter* and lactic acid bacteria (39), in opposition to the results of this study. Nevertheless, in another study (40), a decrease of *C. jejuni* post-chill carcass contamination with the use of in-feed sub-therapeutic doses of macrolide was observed.

The mechanisms explaining the impact of feed additives on carcass contamination should be defined carefully. Processing seems to affect the type of *Campylobacter* found on the poultry carcasses (12, 41). Moreover, *C. jejuni* strain-dependent stress resistance can play a major role in this observation (42). If such mechanism is confirmed, using feed additives to favor chicken colonization and subsequently carcass contamination by strains more susceptible to the stresses encountered during processing may help to lower the number of remaining *C. jejuni* on the carcasses, thus possibly diminish consumer risks of contracting campylobacteriosis. Much work needs to be done to understand the effects of feed additives on carcass microbiology.

5.5.4 Feed Additive Effect on Organs Positivity

This study also showed that birds gradually cleared *C. jejuni* from their organs in both rooms. In room one, and when combining all results, this clearance was faster for the OA/EO treated group. This is, to our knowledge, the first time that this observation is reported. It has been suggested that the adaptive immune response might be responsible for chicken *C. jejuni* organ clearance (43). Chicken immunity modulation by the feed additive could also explain this result. For example, in another study, the organic acid butyrate was found to activate chicken host defense peptides *in vitro* in chicken tissue explants as well as monocytes and macrophages. Butyrate also increased response against *Salmonella* Enteritidis, both *in vitro* and *in vivo*, when added as a feed additive (1 log caecal reduction) (44). Immune stimulation by OA/EO used in this study remains to be demonstrated.

Overall, OA/EO did not prevent *C. jejuni* chicken colonization at 14 days of age. The effects of the feed additive seemed strain dependent as different results were obtained for the strain combinations tested. For room one, and when combining both room results, the feed additive moderately lowered the *C. jejuni* levels found on the carcasses at 21 PI, which could lead to a lower consumer exposure to the pathogen, although caecal levels were unexpectedly increased for room one treated chickens. Using the HRM-*flaA* analysis, we also suggest that the type of feed given to the chickens may modulate the *C. jejuni* chicken colonization dynamic, which could have led to the chicken colonization increase observed in room one. The positivity of the organs of the birds fed OA/EO also diminished faster than that of the control group for room one and when combining room results, indicating a possible immunostimulatory effect of OA/EO. Further studies on more *C. jejuni* strains should be carried out to confirm this. Finally, in perspective, based on these results, we hypothesize that the OA/EO additive tested could modify the chicken gut, thus preferentially benefiting the caecal colonization of some *C. jejuni* strains and possibly affected the strains fitness under processing conditions. This remains to be validated in further studies.

5.7 Acknowledgements

We would like to thank the following for their financial support: Ministère de l'Agriculture et des Pêches du Québec (MAPAQ), JEFO Nutrition Inc., the Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP) and NSERC grant no: 130565330. We would also like to thank all those who participated in this study, especially those who helped to process the birds and samples.

5.8 References

1. Young KT, Davis LM, VJ Dirita. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. Nat. Rev. Microbiol. 2007; 5: 665-679.
2. Yuki N, Koga M. Bacterial infections in Guillain-Barre and Fisher syndromes. Curr. Opin. Neurol. 2006; 19: 451-457.
3. EFSA Panel on Biological Hazards. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA Journal. 2011; 9: 141.
4. Nauta M, Hill A, Rosenquist AH, Brynestad S, Fetsch A, van der Logt P, Fazil A, Christensen B, Katsma E, Borck B, Havelaar A. A comparison of risk assessments on *Campylobacter* in broiler meat. Int. J. Food. Microbiol. 2009; 129: 107-123.
5. Allen V M, Ridley AM, Harris JA, Newell DG and Powell L. Influence of production system on the rate of onset of *Campylobacter* colonization in chicken flocks reared extensively in the United Kingdom. Br. Poult. Sci. 2011; 52: 30-39.
6. Taboada E N, Ross SL, Mutschall SK, Mackinnon JM, Roberts MJ, Buchanan CJ, Kruczkiewicz P, Jokinen CC, Thomas JE, Nash JH, Gannon VP, Marshall B, Pollari F,

Clark CG. Development and Validation of a Comparative Genomic Fingerprinting Method for High-Resolution Genotyping of *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 2012; 50: 788-797.

7.Nadeau E, Messier S, Quessy S. Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans. J. Food. Prot. 2002; 65: 73-78.

8.Konkel M E, Christensen JE, Dhillon AS, Lane AB, Hare-Sanford R, Schaberg DM, Larson CL. *Campylobacter jejuni* strains compete for colonization in broiler chicks. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73: 2297-2305.

9.Calderon-Gomez LI, Hartley LE, McCormack A, Ringoir DD, Korolik V. Potential use of characterised hyper-colonising strain(s) of *Campylobacter jejuni* to reduce circulation of environmental strains in commercial poultry. Vet. Microbiol. 2009; 134: 353-361.

10.Normand V, Boulianne M, Quessy S. Evidence of cross-contamination by *Campylobacter* spp. of broiler carcasses using genetic characterization of isolates. Can. J. Vet. Res. 2008; 72: 396-402.

11.Ellerbroek, LI, Lienau JA, Klein G. *Campylobacter* spp. in broiler flocks at farm level and the potential for cross-contamination during slaughter. Zoonoses Public Health. 2010; 57: e81-88.

12. Bily L, Petton J, Lalande F, Rouxel S, Denis M, Chemaly M, Salvat G, Fravallo P. Quantitative and qualitative evaluation of *Campylobacter* spp. contamination of turkey cecal contents and carcasses during and following the slaughtering process. J. Food. Prot. 2010; 73: 1212-1218.

13. Hermans D, Van Deun K, Messens W, Martel A, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Rasschaert G, Heyndrickx M, Pasmans F. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: urgent need for intensified fundamental research. *Vet. Microbiol.* 2011; 152: 219-228.
14. Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry science.* 2005; 84: 634-643.
15. Nannapaneni R, Chalova VI, Crandall PG, Ricke SC, Johnson MG, O'Blyan CA. *Campylobacter* and *Arcobacter* species sensitivity to commercial orange oil fractions. *Int. J. Food. Microbiol.* 2009; 129: 43-49.
16. Kurekci C, Bishop-Hurley SL, Vercoe PE, Durmic Z, Al Jassim RAM, McSweeney CS. Screening of Australian Plants for Antimicrobial Activity against *Campylobacter jejuni*. *Phytother. Res.* 2012; 26: 186-190.
17. Johny A K, Darre MJ, Donoghue AM, Donoghue DJ, Venkitanarayanan K. Antibacterial effect of trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, and thymol on *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents *in vitro*. *JAPR.* 2010; 19: 237-244.
18. Hermans D, Martel A, Van Deun AK, Van Immerseel F, Heyndrickx M, Haesebrouck F, Pasmans F. The Cinnamon-Oil Ingredient trans-Cinnamaldehyde Fails To Target *Campylobacter jejuni* Strain KC 40 in the Broiler Chicken Cecum Despite Marked *In Vitro* Activity. *J. Food Prot.* 2011; 74: 1729-1734.
19. Heres M, Engel B, Urlings HA, Wagenaar JA, van Knapen F. Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by *Campylobacter* and *Salmonella*. *Vet. Microbiol.* 2004; 99: 259-267.

- 20.Solis de los Santos F, Donoghue AM, Venkitanarayanan K, Metcalf JH, Reyes-Herrera I, Dirain ML, Aguiar VF, Blore PJ, Donoghue DJ. The natural feed additive caprylic acid decreases *Campylobacter jejuni* colonization in market-aged broiler chickens. *Poult. Sci.* 2009; 88: 61-64.
- 21.Skanseng, B, Kaldhusdal M, Moen B, Gjevre AG, Johannessen GS, Sekelja M, Trosvik P, Rudi K. Prevention of intestinal *Campylobacter jejuni* colonization in broilers by combinations of in-feed organic acids. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 109: 1265-1273.
- 22.Molatova Z, Skrivanova E, Bare J, Houf K, Bruggeman G, Marounek M. Effect of coated and non-coated fatty acid supplementation on broiler chickens experimentally infected with *Campylobacter jejuni*. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 2011; 95: 701-706.
- 23.Le Bars H, Kayal S, Bonnaure-Mallet M, Minet J. CASA chromogenic medium for enteric *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49: 3675-3677.
- 24.Juteau P, Tremblay D, Villemur R, Bisailon JG, Beaudet R. Analysis of the bacterial community inhabiting an aerobic thermophilic sequencing batch reactor (AT-SBR) treating swine waste. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004; 66: 115-122.
- 25.Merchant-Patel S, Blackall PJ, Templeton J, Price EP, Tong SY, Huygens F, Giffard PM. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genotyping by high-resolution melting analysis of a *flaA* fragment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76: 493-499.
- 26.Hue O, Allain V, Laisney MJ, Le Bouquin S, Lalande F, Petetin I, Rouxel S, Quesne S, Gloaguen PY, Picherot M, Santolini J, Bougeard S, Salvat G, Chemaly M. *Campylobacter*

contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. Food Microbiol. 2011; 28: 862-868.

27. Malher X, Simon M, Charnay V, Deserts RD, Lehebel A, Belloc C. Factors associated with carcass contamination by *Campylobacter* at slaughterhouse in cecal-carrier broilers. Int. J. Food. Microbiol. 2011; 150: 8-13.

28. Allen V M, Bull SA, Corry JE, Domingue G, Jorgensen F, Frost JF, Whyte R, Gonzalez A, Elviss N, Humphrey TJ. *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. Int. J. Food Microbiol. 2007; 113: 54-61.

29. Pope C, Wilson J, Taboada EN, Mackinnon J, Felipe Alves CA, Nash JH, Rahn K, Tannock GW. Epidemiology, relative invasive ability, molecular characterization, and competitive performance of *Campylobacter jejuni* strains in the chicken gut. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73: 7959-7966.

30. Tiihonen K, Kettunen H, Bento MH, Saarinen M, Lahtinen S, Ouwehand AC, Schulze H, Rautonen N. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. Br. Poult. Sci. 2010; 51: 381-392.

31. Cross DE, McDevitt RM, Acamovic T. Herbs, thyme essential oil and condensed tannin extracts as dietary supplements for broilers, and their effects on performance, digestibility, volatile fatty acids and organoleptic properties. Br. Poult. Sci. 2011; 52: 227-237.

32. Hinton A. Growth of *Campylobacter* in media supplemented with organic acids. Journal of food protection. 2006; 69: 34-38.

33. Line JE, Hiatt KL, Guard-Bouldin J, Seal BS. Differential carbon source utilization by *Campylobacter jejuni* 11168 in response to growth temperature variation. *J. Microbiol. Methods.* 2010; 80: 198-202.
34. Hugdahl MB, Beery JT, Doyle MP. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 1988; 56: 1560-1566.
35. Garcia V, Catala-Gregori P, Hernandez F, Megias MD, Madrid J. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers. *JAPR.* 2007; 16: 555-562.
36. Hermans D, Martel A, Van Deun K, Verlinden M, Van Immerseel F, Garmyn A, Messens W, Heyndrickx M, Haesebrouck F, Pasmans F. Intestinal mucus protects *Campylobacter jejuni* in the ceca of colonized broiler chickens against the bactericidal effects of medium-chain fatty acids. *Poult. Sci.* 2010; 89: 1144-1155.
37. Thibodeau A, Fravallo P, Laurent-Lewandowski S, Guevremont E, Quessy S, Letellier A. Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Quebec. *Can. J. Vet. Res.* 2011; 75: 298-307.
38. Levesque S, Michaud S, Arbeit RD, Frost EH. High-resolution melting system to perform multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One.* 2011; 6: e16167.
39. Aydin A, Pekel AY, Issa G, Demirel G, Patterson PH. Effects of dietary copper, citric acid, and microbial phytase on digesta pH and ileal and carcass microbiota of broiler chickens fed a low available phosphorus diet. *JAPR.* 2010; 19: 422-431.

40. Berrang ME, Ladely SR, Meinersmann RJ, Fedorka-Cray PJ. Subtherapeutic tylosin phosphate in broiler feed affects *Campylobacter* on carcasses during processing. *Poult. Sci.* 2007; 86: 1229-1233.
41. Elvers KT, Morris VK, Newell DG, Allen VM. Molecular tracking, through processing, of *Campylobacter* strains colonizing broiler flocks. *Appl Environ. Microbiol.* 2011; 77: 5722-5729.
42. Habib I, Uyttendaele M, De Zutter L. Survival of poultry-derived *Campylobacter jejuni* of multilocus sequence type clonal complexes 21 and 45 under freeze, chill, oxidative, acid and heat stresses. *Food Microbiol.* 2010; 27: 829-834.
43. Hermans D, Pasmans F, Heyndrickx M, Van Immerseel F, Martel A, Deun K, Haesebrouck F. A tolerogenic mucosal immune response leads to persistent *Campylobacter jejuni* colonization in the chicken gut. *Crit. Rev. Microbiol.* 2012; 38: 17-29.
44. Sunkara LT, Achanta M, Schreiber NB, Bommineni YR, Dai G, Jiang W, Lamont S, Lillehoj HS, Beker A, Teeter RG, Zhang G. Butyrate enhances disease resistance of chickens by inducing antimicrobial host defense peptide gene expression. *PLoS One.* 2011; 6: e27225.

5.9 Tables

Table 1: Phenotypical Properties of the Strains used in the Chicken Colonization Model

Strain	Autoagglutination	Chemotaxis	Adhesion	Invasion	Inoculation Dose (Logs)	Room
Strain 1	65	0.493	0.406	0.409	4.7 CFU/ml	1
Strain 2	78	0.476	0.500	0.277	4.4 CFU/ml	
Strain 3	62	0.411	0.222	0.247	5.6 CFU/ml	2
Strain 4	63	0.115	0.244	0.211	4.2 CFU/ml	

Autoagglutination (DO 630nm after 3 h of incubation at room temperature/DO 630 nm initial bacterial suspension x 100); adhesion, invasion and chemotaxis: $-1/\log$ (recovered bacteria after test/initial bacteria). Strains 1 and 2 were co-administered to all chickens in room one; strains 3 and 4 were co-administered to all chickens in room two. The strains originated from distinct broiler farms. Strain 1 and strain 2 were, in our strain collection, strains possessing higher overall phenotypic properties whereas strain 3 and 4 possessed lower phenotypic properties.

Table 2: OA/EO Supplementation Effects on Mean Caecal *C. jejuni* Counts at different time post-strain inoculation

Room	Group	7 PI (log CFU/g)	14 PI (log CFU/g)	21 PI (log CFU/g)
1	Ctl	7.3 (0.2) ^B	7.0 (0.1)	6.5 (0.2) ^D
	OA/EO	7.1 (0.3)	7.0 (0.2)	7.9 (0.2) ^{AC}
2	Ctl	8.9 (0.1) ^{AC}	6.6 (0.2)	6.6 (0.2)
	OA/EO	7.6 (0.2) ^D	6.6 (0.1)	6.6 (0.3) ^B
Combined	Ctl	8.1 (0.2) ^C	6.8 (0.1)	6.6 (0.1) ^D
	OA/EO	7.3 (0.2) ^D	6.8 (0.1)	7.2 (0.2) ^C

(SEM); “A” being statistically different from “B” between the rooms for the same sampling time; “C” being statistically different from “D” between the groups for the same sampling time and within a room; n = 16 for 7 PI and 14 PI; n=18 for 21 PI; PI = post-inoculation time; chickens inoculated at 14 days of age.

Table 3: OA/EO Supplementation Effects on Mean Carcass *C. jejuni* Counts at different time post-strain inoculation

Room	Group	7 PI (log CFU/carcass)	14 PI (log CFU/carcass)	21 PI (log CFU/carcass)
1	Ctl	4.6 (0.2) ^B	4.0 (0.1) ^A	5.3 (0.3) ^C
	OA/EO	5.0 (0.2)	4.0 (0.1) ^A	3.9 (0.1) ^{BD}
2	Ctl	5.4 (0.1) ^A	4.6 (0.2) ^B	5.4 (0.1)
	OA/EO	5.2 (0.1)	4.6 (0.2) ^B	4.9 (0.1) ^A
Combined	Ctl	5.0 (0.1)	4.3 (0.1)	5.3 (0.2) ^C
	OA/EO	5.1 (0.1)	4.3 (0.1)	4.4 (0.1) ^D

(SEM); “A” being statistically different from “B” between the rooms for the same sampling time; “C” being statistically different from “D” between the groups for the same sampling time and within a room; n = 16 for 7 PI and 14 PI; n=18 for 21 PI; PI = post-inoculation time; chickens inoculated at 14 days of age.

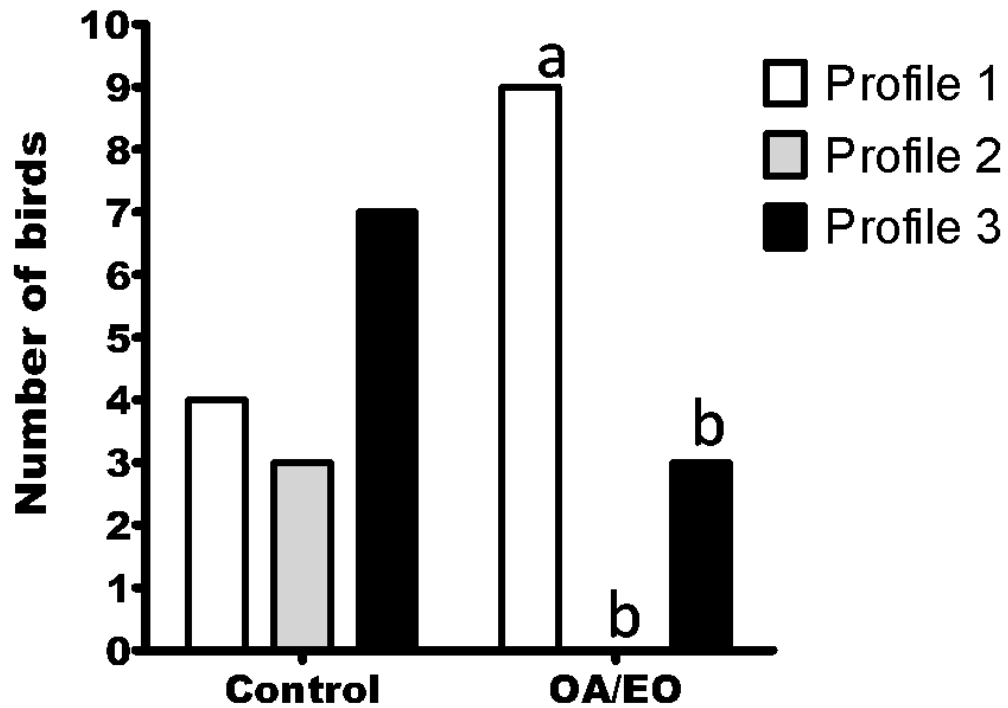
Table 4: OA/EO Supplementation Effects on *Campylobacter* -positive Organs

Room	Group	7 PI n = 8	14 PI n = 8	21 PI n = 9
1	Ctl	4	5 ^C	1 ^D
	OA/EO	6 ^A	1 ^B	5
2	Ctl	8	6	6
	OA/EO	5	4	3
Combined	Ctl	12	11	7
	OA/EO	11 ^A	5 ^B	4

All results are expressed as number of positive birds; “A” being statistically different from “B” between the sampling time within one room; “C” being statistically different from “D” between the sampling time within one room ; PI = post-inoculation time; chickens inoculated at 14 days of age.

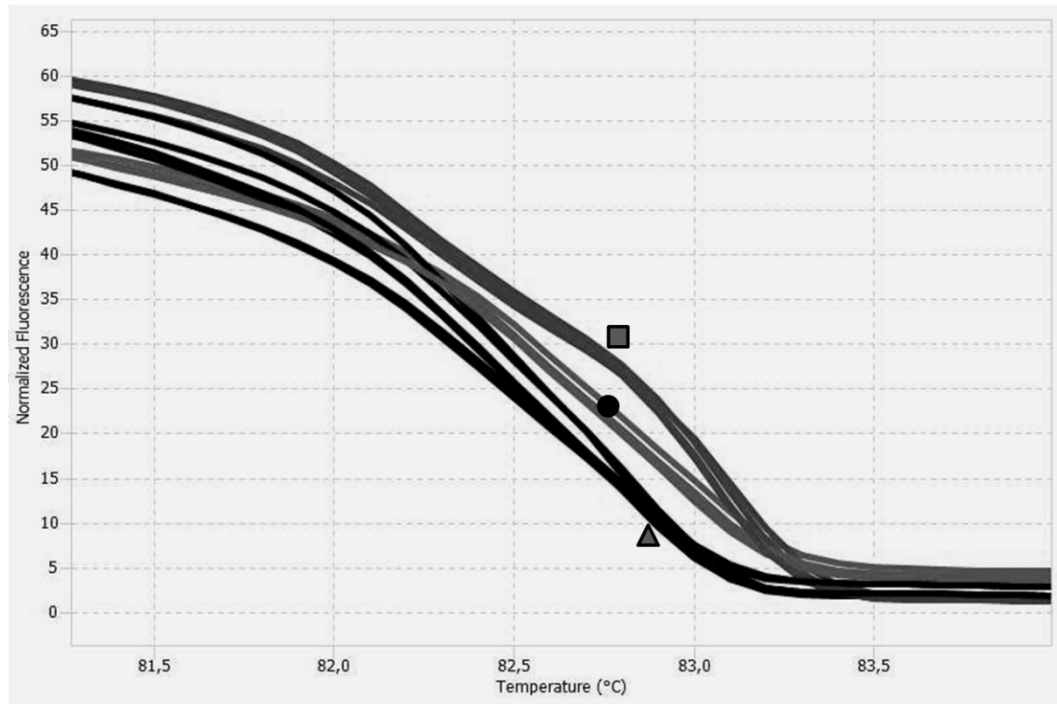
5.10 Figures

Fig 1: OA/EO effect on HRM-*flaA* feces profiles of broilers at 21 PI



The total DNA extracted from the feces of the birds in room one at 21PI was also subjected to a HRM-*flaA* analysis. In OA/EO birds, profile 1 (a) was found in more birds than profiles 2 and 3 (b) ($p= 0.042$). A total of 14 birds were in the control group, while 12 were in the OA/EO group.

Fig 2: HRM-*flaA* profiles of Inoculated *C. jejuni* Strains obtained *in vitro*



Three different profiles were obtained after HRM-*flaA* analysis of room one inoculated strains using DNA extracted from fresh culture: strain 1 alone (circle), strain 2 alone (square), mix of their DNA in a 1:9 or 1:99 proportion (triangle).

Chapitre 6: Discussion

Campylobacter jejuni est un pathogène humain d'importance majeure en santé publique. Le poulet est un réservoir et important vecteur de *C. jejuni* vers l'humain, soit par la chaîne alimentaire ou soit en agissant comme source de contamination environnementale. Des lacunes existent quant à la compréhension des mécanismes impliqués dans la colonisation intestinale du poulet par *C. jejuni*.

Certains gènes importants pour la colonisation ont été identifiés, mais leur distribution dans les isolats de *C. jejuni* présents dans les élevages commerciaux est inconnue. Peu de gènes associés à la colonisation des oiseaux ont été décrits, ce qui justifie des études qui visent à mieux caractériser les facteurs génétiques impliqués dans cette colonisation. De plus, leur effet sur la colonisation des oiseaux n'est connu que pour les quelques souches ayant servi à réaliser ces études; la fonction de ces gènes dans la colonisation n'est souvent pas connue chez une majorité représentative de souches. Finalement, le contrôle de *C. jejuni* à la ferme reste ardu malgré l'application de mesures strictes de biosécurité. Certaines méthodes de contrôle de *C. jejuni* ont été mise au point, mais elles n'ont pas été évaluées sur plusieurs souches bien caractérisées et n'éradiquent pas le pathogène. De plus, leur effet sur la contamination des carcasses n'est pas étudié et demeure donc inconnu.

Ces travaux de doctorat viennent donc préciser ces points toujours nébuleux de la relation qui unit *C. jejuni* et le poulet. Des isolats de *C. jejuni*, issus de poulets élevés selon une régie conventionnelle (donc considérés comme capables de coloniser un poulet) isolés en 2003 ou en 2008, ont été caractérisés phénotypiquement et génétiquement. La caractérisation génétique a permis d'établir la distribution des gènes de colonisation et de résistance aux antibiotiques dans une population temporellement et géographiquement variée de *C. jejuni*. La caractérisation phénotypique a permis d'attribuer des profils de propriétés phénotypiques aux souches et à les classer selon leur potentiel *in vitro* de colonisation des oiseaux. La présence de certains gènes a par la suite été associée aux souches qui possédaient des propriétés phénotypiques (potentiel de colonisation) supérieures ou inférieures aux souches négatives pour la détection de ces mêmes gènes.

Ceci a permis d'identifier des gènes possiblement impliqués dans la colonisation des oiseaux. L'importance réelle de ces gènes pour la colonisation intestinale du poulet reste cependant à confirmer par la création de mutants de plusieurs souches de terrain possédant ces gènes, et la réévaluation de leur propriété phénotypiques et de leur capacité à coloniser un poulet.

Une méthode de contrôle de *C. jejuni* qui utilisait la voie alimentaire a ensuite été évaluée. Le produit utilisé était à base d'acides organiques et d'huiles essentielles, molécules réputées pour avoir un effet bactéricide sur *C. jejuni*. L'efficacité de cet additif alimentaire a été vérifiée dans un modèle de colonisation des oiseaux comparable à la réalité commerciale de l'élevage du poulet. Grâce à la caractérisation phénotypique et génétique des souches de *C. jejuni*, l'effet de la méthode de contrôle a pu être observé sur 4 souches distinctes. Cette utilisation de multiples souches, très bien caractérisées, a permis de mieux prédire l'effet du produit dans des conditions commerciales dans lesquelles les oiseaux sont souvent colonisés par des *C. jejuni* aux propriétés génétiques et phénotypiques très variées. De plus, l'utilisation de ces souches a permis d'établir, tout comme observé lors des caractérisations phénotypiques et génétiques préalables, que l'utilisation de souches possédant naturellement un potentiel de colonisation varié était cruciale pour l'étude des interactions *C. jejuni*-poulet.

Parallèlement, pour une première fois au Canada, la présence de *C. jejuni* dans les élevages biologiques de poulet du Québec a été établie. Les souches isolées de ces élevages ont été caractérisées partiellement et possédaient des propriétés phénotypiques très variables et une résistance aux antibiotiques peu fréquente.

6.1 Échantillonnage

Deux types d'élevages ont été échantillonnés dans le cadre de ces travaux de doctorat: des élevages conventionnels et des élevages biologiques. Les souches caractérisées ont été isolées soit en 2009 (biologiques), soit en 2008 (conventionnelles) ou soit en 2003 (conventionnelles) pour maximiser la diversité de souches analysées et pour vérifier si les souches de 2003 étaient différentes de celles de 2009.

6.1.1 Échantillonnage des élevages conventionnels

Tout d'abord, pour les élevages conventionnels, les isolats recueillis ont été échantillonnés en 2003 et en 2008. Considérant le risque de sélection de différents types de *C. jejuni* par l'emploi de multiples méthodes de culture du pathogène alimentaire (voir revue de littérature), l'échantillonnage de 2008 a été réalisé selon la méthode préconisée en 2003, c'est-à-dire un ensemencement direct des matières caecales sur mCCDA. L'isolement sur mCCDA est la méthode la plus sensible pour l'isolement de *C. jejuni* à partir des matières fécales. Le milieu mCCDA est très performant (Best et coll., 2003, Rodgers et coll., 2010), mais il pourrait être perfectionné. La variété de la morphologie des colonies qui peuvent y être observée pour *C. jejuni* (ASPC, 2002), dont certaines sont identiques à des non *Campylobacter* (observations personnelles), rend son utilisation sous optimale puisqu'il devient quelque fois difficile de différencier les vrais *Campylobacter* des autres bactéries pouvant contaminer le milieu. Ceci multiplie les colonies à repiquer et part le fait même, le temps requis pour l'isolement. Tel que mentionné précédemment, les prochaines études, pour lesquelles une détection et un isolement de *C. jejuni* sont nécessaires, devraient utiliser un milieu mCCDA amélioré ou un autre milieu de culture plus performant, même si la capacité de comparaison avec les études passées est compromise. Neanmoins, l'utilisation de ce milieu a peut-être généré plus de travail pour l'isolement de *C. jejuni*, mais en contrepartie a permis d'assurer une détection optimale des élevages positifs.

Dans cette étude, deux périodes d'échantillonnages ont été couvertes. La présence de *C. jejuni* a été détectée dans moins d'élevages en 2008 comparativement à 2003. Les différences entre les deux échantillonnages (2003 vs 2008) sont la période, le nombre de lots et la méthode de confirmation à l'espèce des souches isolées. Moins de lots ont été échantillonnés en 2008 et sur une période de temps plus courte. Par contre, l'échantillonnage s'est déroulé vers la fin de l'été et le début de l'automne, période souvent associée, dans d'autres études, à une augmentation de la positivité des élevages de poulets pour *C. jejuni* (EFSA, 2011). Ceci a sans doute été favorable pour l'obtention d'une grande diversité d'isolats. Cependant, pour le Canada et le Québec, aucun programme de

surveillance ciblant *C. jejuni* en élevage ou en abattoir n'existe, si bien qu'il est difficile de bien évaluer la représentativité des souches recueillies dans le cadre de cette étude.

Ces différences en termes de taille d'échantillonnage (54 lots en 2009, 83 en 2003), de régions géographiques touchées (2 abattoirs échantillonnés en 2009, 4 échantillonnés en 2003) et de période (3 mois en 2009 contre 12 mois en 2003) peuvent expliquer en partie la différence de prévalence observée entre les deux échantillonnages. Par contre, il est également possible que la biosécurité des élevages se soit améliorée, surtout avec les épisodes d'Influenza aviaire qui ont éclaté en Colombie-Britannique et au Manitoba en 2005 (CBC, 2008). L'augmentation de la taille de l'échantillonnage aurait permis une meilleure estimation de la prévalence des élevages positifs pour l'année 2008 en plus d'offrir la possibilité de recueillir et d'identifier une plus grande variété de souches de *C. jejuni*. Une augmentation de la diversité des souches à caractériser aurait pu être un atout pour l'étude des facteurs de colonisation. Par contre, ceci aurait engendré beaucoup plus de travail et l'observation d'encore plus de phénotypes différents rendant l'analyse des résultats finaux d'autant plus laborieuse.

Notre étude a utilisé des souches très éloignées dans le temps (2003 vs 2008) pour maximiser les chances de caractériser différents types de *C. jejuni*. Par contre, l'analyse par puce à ADN et des propriétés phénotypiques semble confirmer l'inverse: les souches de 2003 étaient comparables aux souches de 2008. De plus, certaines souches provenant de lots distincts de poulets possédaient des caractéristiques phénotypiques et génotypiques semblables. L'augmentation de la taille d'échantillonnage n'aurait peut-être pas apporté une plus grande variété de souches. Cette parité des caractéristiques phénotypiques et génétiques des souches isolées en 2003 et en 2008 permet de les traiter comme un seul groupe.

Certains pourraient questionner l'emploi de la puce à ADN pour grouper les souches isolées, car souvent le MLST et le PFGE sont les méthodes utilisées (Taboada et coll., 2012). Il a cependant été démontré que la puce à ADN avait un pouvoir de discrimination supérieure au MLST (Clark et coll., 2012). De plus, il semble que la détection par PCR de 40 gènes accessoires de *C. jejuni* (donc avec présence variable) soit

suffisante pour comparer les souches aussi efficacement que le PFGE et le MLST (Carrillo et coll., 2012, Clark et coll., 2012, Taboada et coll., 2012). La puce à ADN utilisée détectait la présence de 147 gènes variables; ce nombre était donc suffisant pour assurer un grand pouvoir de discrimination de la puce à ADN et donc la discrimination efficace des souches. Par contre, la méthode de comparaison génétique des souches à préconiser dépend toujours du contexte de son utilisation; l'analyse de la séquence nucléotidique du gène *flaA* ou *porA* est peu coûteuse et rapide, le PFGE est très discriminant et des protocoles standards internationaux sont disponibles alors que le MLST détecte l'accumulation de mutations dans des gènes de ménage et est donc plus approprié pour étudier des souches très distantes dans le temps ou géographiquement ou pour étudier la phylogénie des souches.

6.1.2 Échantillonnage des élevages biologiques

L'échantillonnage des élevages certifiés biologiques a été réalisé dans le cadre d'une étude exploratoire. Au Canada, aucune donnée n'était disponible quant à la présence de *C. jejuni* dans ce type d'élevage. Il était attendu qu'elle soit relativement élevée puisqu'il a été démontré dans d'autres études que les poulets issus des élevages biologiques étaient plus souvent colonisés que ceux des élevages conventionnels (Young et coll., 2009). Dans notre étude, le nombre d'élevages échantillonnés était limité, ce qui limite également la certitude entourant la prévalence de lots positifs observé. Cependant, il aurait été très difficile d'augmenter le nombre d'élevages différents échantillonnés puisque l'élevage biologique de poulet était et est toujours marginal au Québec. Il aurait été cependant possible d'augmenter le nombre de répétitions des échantillonnages pour un même élevage de manière à accroître le nombre de lots testés. L'étude a tout de même permis, pour la première fois, de conclure que *C. jejuni* est bien présent dans les élevages biologiques de poulet du Québec et ce, dans une quantité d'élevage représentative de la production Québécoise.

Puisqu'aucune carcasse n'a été échantillonnée, il est difficile d'apprécier avec précision le risque de contracter la campylobactériose suite à la consommation de ces produits. Cependant, il est permis de croire que ce risque ne serait pas plus grand que celui

associé à la consommation de produits carnés d'élevages conventionnels. Premièrement, il a été démontré dans une autre étude que la contamination des carcasses des poulets issus d'élevages biologiques était semblable à celle des produits de volailles issues d'élevages conventionnels (Cui et coll., 2005). De plus, la quasi-totalité des carcasses des oiseaux échantillonnés dans la présente étude était destinée à la congélation (observations personnelles lors des échantillonnages); la congélation diminue la viabilité de *C. jejuni* (El-Shibiny et coll., 2009a, Sampers et coll., 2010) et peut être utilisée avec succès comme outil de contrôle du niveau de contamination des carcasses de poulet (Boysen et Rosenquist, 2009). Il serait pertinent de vérifier le niveau de contamination des carcasses après la congélation de manière à mieux évaluer l'apport de ces produits carnés au risque humain de contracter une campylobactériose.

Il serait donc intéressant d'obtenir des isolats de carcasses issues d'élevages biologiques, de les caractériser et de les comparer avec les isolats issus des caecums des mêmes oiseaux et issus de cas de campylobactériose. Cependant, la campylobactériose étant sous déclarée et la production biologique marginale, beaucoup plus d'isolats humains seraient sans doute nécessaires pour évaluer et quantifier le lien entre les productions biologiques et leur effet sur la santé publique, comparativement à une étude du même type pour la production avicole conventionnelle. Il serait aussi très pertinent de caractériser génétiquement ces isolats, soit en utilisant les méthodes développées dans le cadre des présents travaux ou ultimement par séquençage, et de les comparer aux souches issues des élevages de régie conventionnelle et issues des cas humains.

6.2 Caractérisation phénotypique

En ce qui a trait à la caractérisation phénotypique, l'ensemble des souches d'origine biologique a été utilisé alors qu'un choix a dû être fait pour les souches d'élevages conventionnels (annexe 1). Effectivement, pour ces élevages, plus d'une souche a été caractérisée par lot ce qui ouvre la porte à l'analyse multiple de la même souche étant donné la forte clonalité de *C. jejuni* dans un même élevage (Nadeau et coll., 2002).

Cependant, il a été observé que des bactéries indistinctes par certaines méthodes de typage génétique pouvaient avoir des caractéristiques phénotypiques différentes (Malik-Kale et coll., 2007). Il est donc pertinent de caractériser plus d'une souche par lot. Les résultats obtenus pour la caractérisation sont en accord avec la littérature: plusieurs souches issues du même lot de poulet avaient des propriétés phénotypiques et génétiques très semblables alors que quelques souches issues d'un même lot de poulet étaient différentes.

6.2.2 Caractérisation de la résistance aux antibiotiques

Les souches de notre étude ont été caractérisées au niveau de leur résistance aux antibiotiques. La méthode utilisée a été celle de la détermination de la CMI des souches par dilution des antibiotiques en Agar Mueller-Hinton supplémenté de 5 % de sang de mouton selon le CLSI, tel que présenté dans le chapitre 2. Cette méthode a été préférée aux autres, car elle est plus sensible que la diffusion sur disque (Lehtopolku et coll., 2012), ne nécessite pas de croissance en bouillon comparativement au Sensititretm et est moins dispendieuse que l'Etest. Durant la réalisation de ce doctorat, il a été très difficile d'obtenir de la croissance en bouillon pour différentes souches de *C. jejuni* (données non publiées). Puisque le Sensititre détermine la sensibilité à un antibiotique selon la croissance ou non de bouillons de *C. jejuni*, il a été jugé que cette méthode pourrait être problématique pour nos souches malgré une littérature qui appuie l'utilisation de la technique pour *C. jejuni* (Luber et coll., 2003).

La résistance aux antibiotiques des souches analysées dans le cadre de cette étude est peu fréquente, autant pour les souches d'origine biologique (chapitre 2) que pour les souches d'origine conventionnelle de 2008 (annexe 2). Ceci est en accord avec les données rendues disponibles en 2008 et en 2009 par le PICRA (PICRA, 2010). La résistance aux antibiotiques pour les souches de 2008 était moins fréquente qu'en 2003. Il est intéressant de noter qu'en 2008, parmi les lots de poulets échantillonnés, un seul avait fait usage de tétracycline et aucun n'avait reçu de macrolide (annexe 2 et annexe 3); 51 % des souches étaient résistantes à la tétracycline et aucune résistance aux macrolides n'a été observée. Une forte résistance à la tétracycline a aussi été observée dans les souches d'origine

biologique (chapitre 2). Il serait donc très intéressant de mieux caractériser les souches résistantes à la tétracycline dans le but de comprendre pourquoi elles conservent cette résistance malgré l'absence d'utilisation de cet antibiotique. Cette résistance est peut-être conservée due à une exposition naturelle de *C. jejuni* à la tétracycline. Il se peut également que d'autres gènes, situés sur le même plasmide, sélectionnent positivement pour cette résistance. Il serait donc intéressant de caractériser la localisation des déterminants génétiques de cette résistance (sans doute *tetO* plasmidique, voir chapitre 2). Si cette résistance est plasmidique, il serait pertinent de séquencer plusieurs plasmides pour déterminer quels gènes sont liés physiquement à la résistance à la tétracycline et d'observer si la perte des déterminants génétiques de la résistance à la tétracycline ou des gènes qui y sont liés affecte les propriétés phénotypiques de *C. jejuni*.

Il est intéressant de mentionner que pour la bacitracine ainsi que pour le ceftiofur, antibiotiques pour lesquels *C. jejuni* est naturellement résistant (Kirkpatrick et Tribble, 2011), une variété de CMI a été observée, autant en 2003 qu'en 2008. Ceci évoque la présence de mécanismes supplémentaires de résistance à ces antibiotiques pour certaines souches, tel un efflux plus actif, des modifications affectant la membrane bactérienne ou une présence différentielle de β -lactamases capables de s'attaquer aux céphalosporines de 3^{ème} génération. La présence de multiples déterminants de la résistance à la bacitracine et au ceftiofur pourrait faire de *C. jejuni* un réservoir additionnel de gènes de résistances à ces antibiotiques qui pourraient éventuellement être transmis à d'autres bactéries. Ces gènes ne sont pas pris en compte dans le système de surveillance actuel du PICRA. La caractérisation de ces mécanismes est donc importante au niveau de la santé publique. Il est également intéressant de noter que cette variation dans les CMI observées, autant pour la bacitracine que pour le ceftiofur, n'a pu être corrélée à aucune autre propriété phénotypique ou génétique.

Le milieu utilisé pour l'isolement de ces souches a été le mCCDA, lequel contenait 32 mg/L de céfopérazone, un antibiotique de la classe des céphalosporines, tout comme le ceftiofur pour lequel *C. jejuni* est aussi naturellement résistant. Il est intrigant d'avoir retrouvé en 2008 deux souches de *C. jejuni* pour lesquelles la CMI pour le ceftiofur était

sous cette concentration de céfopérazone (4 mg/L et 16 mg/L). Cette observation intrigante soulève, jumelée à la vaste distribution des CMI observée pour le ceftiofur, qu'il existe peut-être certaines souches de *C. jejuni* dont la CMI pour le céfopérazone est inférieure à 32 mg/L, ce qui pourrait causer de faux négatifs lors de la recherche de lots de poulets colonisés par *C. jejuni*. Il se peut également que le ceftiofur soit simplement plus actif que le céfopérazone contre certaines souches de *C. jejuni*, comme c'est le cas pour *E. coli* (Yuang et coll, 2009), malgré que ces deux antibiotiques soient de la même classe. Si les souches de *C. jejuni* ne possèdent pas les mêmes β -lactamases, il se peut qu'elles n'aient pas les mêmes sensibilités au ceftiofur et au céfopérazone. La présence de β -lactamases chez *C. jejuni* est très peu étudiée (voir chapitre 1). Il serait donc pertinent de vérifier la résistance au céfopérazone des souches caractérisée dans cette étude et de la comparer avec leur résistance au ceftiofur.

D'après les résultats obtenus pour les élevages conventionnels et biologiques, la bacitracine à une concentration de 32 mg/L pourrait être utilisée dans le milieu mCCDA puisque *C. jejuni* y est résistant. L'utilisation de bacitracine comme nouvel agent de sélection pourrait permettre l'inhibition des bactéries indésirables pouvant croître sur mCCDA. La bacitracine est utilisée dans le milieu Butzler (extrait de viande, peptone, NaCl, sang de cheval défibriné, bacitracine, céfazoline, colistine, cycloheximide, novobiocine) lequel peut être employé pour l'isolement de *Campylobacter* (Oxoid, 2012).

Nos résultats sont en accord avec ceux observés par le PICRA. Les données du PICRA sont le fruit d'analyse d'isolats provenant de la viande vendue au détail alors que la présente étude a caractérisé la résistance aux antibiotiques pour des souches issues de contenus caeaux. Puisque la diversité génétique de *C. jejuni* retrouvée sur les carcasses des oiseaux peut être différente de celle retrouvée dans les caecums (Normand et coll., 2008), une différence entre nos résultats et ceux du PICRA aurait été plausible.

L'analyse de la résistance aux antibiotiques des souches des élevages biologiques peut nous permettre d'apprécier l'effet qu'aurait le retrait des antibiotiques de l'élevage conventionnel. Les souches issues de 2008 n'étaient pas plus résistantes aux antibiotiques

que les souches d'origine biologique isolées en 2009. Il semble donc que l'élimination de l'utilisation de certains antibiotiques, tel qu'observé pour les lots de poulet échantillonnés en 2008 (annexe 3), n'aurait pas eu d'impact sur la résistance aux antibiotiques de *C. jejuni*. Par contre, cette observation ne peut s'étendre aux autres populations bactériennes des poulets étant donné qu'elles n'ont pas été évaluées chez les poulets biologiques. De plus, l'effet de l'utilisation ou non des antibiotiques sur la santé globale des oiseaux n'a pas été évalué.

6.2.3 Autoagglutination

L'autoagglutination des souches d'origine conventionnelle (chapitre 4) et des souches d'origine biologique (chapitre 2) a été vérifiée. L'autoagglutination semblait autant variable pour les souches d'origine conventionnelle que pour les souches d'origine biologique. L'autoagglutination est reconnue dans la littérature pour être très variable, tel qu'observé dans cette étude (Ewing et coll., 2009). Ceci pourrait être dû à la variation de phase qui peut moduler la glycosylation du flagelle (van Alphen et coll., 2008b). Il est également important de noter que l'autoagglutination d'une souche donnée était plus lente à 4 °C et plus rapide à 37 °C (résultats non publiés), ce qui évoque l'implication de la motilité dans l'autoagglutination. Cependant, les propriétés d'autoagglutination et de chimiotactisme, bien que pouvant être associées à la motilité (Nuijten et coll., 1990, Cohn et coll., 2007, van Alphen et coll., 2008b), n'étaient pas corrélées (chapitre 4). L'autoagglutination peut être influencée la glycosylation du flagelle (van Alphen et coll., 2008b, Ewing et coll., 2009) ou par le quorum sensing (Jeon et coll., 2003). Ces deux propriétés influencent également la motilité (Ewing et coll., 2009) et la motilité est nécessaire pour le chimiotactisme (Lertsethtakarn et coll., 2011). Les essais de chimiotactisme réalisés dans le cadre de cette étude utilisaient des bactéries resuspendues dans de l'agar mou, ce qui empêchait leur autoagglutination. Ceci pourrait expliquer le manque de corrélation entre les résultats de chimiotactisme et d'autoagglutination observés.

6.2.4 Chimiotactisme

Le chimiotactisme envers la mucine (extrait brut gastrique) commerciale de bœuf des souches d'origines conventionnelles et biologiques (chapitre 2 et 4) a été étudié en utilisant un nouveau protocole (chapitre 2) mis au point dans le cadre des travaux effectués dans cette thèse. Le nouveau protocole était nécessaire puisque de faux positifs ont été observés lors l'utilisation du test classique (Kanungpean et coll., 2011a).

La mucine de poulet n'était pas disponible commercialement. La mucine de bœuf a donc été utilisée. L'emploi d'un produit commercial a été préférée à celle d'extraits d'intestins de poulet pour permettre une meilleure homogénéité des analyses. Le type de mucines peut être différent entre les espèces animales (Kilcoyne et coll., 2012) ce qui aurait pu affecter les observations de cette étude (telle la grande variabilité observée pour cette épreuve) puisque la mucine de bœuf a été utilisée au lieu de la mucine de poulet. Cependant, la souche contrôle de *C. jejuni* utilisée (81-176) a répondu positivement à la mucine de bœuf tel qu'attendu. Des essais préliminaires (données non publiées) qui ont comparé l'utilisation de la mucine de bœuf aux extraits d'intestins de poulet lors de l'utilisation du protocole classique, nous ont permis d'observer une réponse positive et de la même amplitude entre la mucine de bœuf et celle extraite d'intestin de poulet, pour plusieurs souches de *C. jejuni*, dont notre contrôle positif (résultats non publiés). Les résultats du chimiotactisme étaient variables. Le chimiotactisme étant lié à la motilité, il se peut également que la variation de phase ait joué un rôle dans cette variabilité en modifiant l'expression de gènes reliés la glycosylation du flagelle (van Alphen et coll., 2008b) ou à la synthèse du flagelle (Karlyshev et coll., 2002, Hendrixson, 2006).

6.2.4 Adhésion et invasion des cellules caecales primaires

Les souches issues des élevages conventionnels ont été caractérisées pour leur adhésion et leur invasion à des cellules primaires intestinales récoltées de caeca d'oiseaux (chapitre 4). Dans la plupart des études, les épreuves d'adhésion et d'invasion sont effectuées sur des lignées cellulaires non avicoles (voir revue de littérature). Ces essais ont révélé une faible capacité d'adhésion et d'invasion de la part de *C. jejuni* d'origines

multiples (Hu et coll., 2008). Il semblait donc important de mettre au point un modèle de culture de cellules primaires, d'autant plus que ce type de culture est peu employé pour *C. jejuni* dans la littérature (Borrmann et coll., 2007, Byrne et coll., 2007, Van Deun et coll., 2008b, Vegge et coll., 2009). Le développement de cultures primaires a apporté un défi supplémentaire aux travaux réalisés dans le cadre de cette thèse, un aspect qui se veut novateur face à ce qui était fait dans d'autres études. Ceci a permis la mise au point des essais d'adhésion et d'invasion plus près de la réalité de la colonisation intestinale de *C. jejuni*.

Des caeca de poussins ont tout d'abord été utilisés pour effectuer l'extraction des cellules primaires, avec comme résultats un maigre récolte de cellules (résultats non publiés). Il a donc été décidé d'employer des cellules de caecums prélevés à l'abattoir (poulets de 38 jours d'âge en moyenne), ce qui était beaucoup plus pratique et qui a généré de bons rendements reproductibles. Il serait cependant très intéressant de comparer l'adhésion et l'invasion des cellules primaires des souches de *C. jejuni* selon l'utilisation de cellules isolées de poussins ou de poulets matures. Il est fort probable que l'utilisation de cellules issues de poulets matures ou de poussins donnerait des résultats similaires, étant donné que des modèles de colonisation du poussin de 1 jours existent et que plusieurs auteurs suggèrent que le délai de colonisation observé dans les 2 premières semaines de vie du poulet seraient dû soit à un effet inhibiteur de la microflore intestinale ou à la présence d'anticorps maternels (voir revue de littérature). Cependant, il ne faut pas exclure la présence de différents récepteurs cellulaires impliqués dans la colonisation intestinale du poulet selon la maturité des cellules intestinales utilisées. L'implication de récepteurs cellulaires lors de la colonisation intestinale du poulet par *C. jejuni* reste à être déterminée expérimentalement.

L'utilisation des cellules primaires s'est révélée ardue et coûteuse en plus de ne pas démontrer d'avantages nets vis-à-vis les autres cultures cellulaires: les taux d'adhésion et d'invasions obtenues étaient équivalents à ce qui a été obtenu dans d'autres études qui utilisaient des lignées cellulaires commerciales humaines (Byrne et coll., 2007). Par contre,

les résultats obtenus dans cette étude n'ont pas été comparés avec l'infection d'autres lignées de cellules épithéliales. Il se peut donc que les phénotypes d'adhésion et d'invasion observés dans notre modèle aient été différents selon la lignée cellulaire choisie. La sécrétion de mucine n'a pas non plus été évaluée dans le modèle de culture cellulaire primaire. Il a été démontré que la mucine influençait l'adhésion et l'invasion de *C. jejuni* aux cellules épithéliales (Tu et coll., 2008, Alemka et coll., 2010). Il serait également intéressant de vérifier, lors d'expériences futures, la présence de cellules M dans la culture de cellule primaire puisqu'il a été observé que *C. jejuni* formait des microcolonies sur ces cellules (Kalischuk et coll., 2010). Il pourrait être pertinent aussi d'utiliser des caeca *ex vivo* pour effectuer les tests d'adhésion et d'invasion. Par contre, il est important de noter que dans cette étude, l'utilisation des cellules primaires a permis de différencier et de classer les souches de *C. jejuni* et d'évaluer *in vitro* leur potentiel de colonisation des poulets (chapitre 4) lequel a été validé *in vivo* (chapitre 4).

6.2.5 Conclusions sur la caractérisation phénotypique

Tableau VI: Comparaison des caractéristiques phénotypiques des souches issues des élevages biologiques et conventionnels

Propriété phénotypique	Élevages biologique	Élevages conventionnels	Valeur de p
Autoagglutination moyenne	40 ± 33	57 ± 20	0,012
Chimiotactisme moyen	0,22 ± 0,19	0,32 ± 0,19	< 0,001

n = 54 pour les élevages biologiques; n = 41 pour les élevages conventionnels; ± écart type; en gras: groupe ayant la plus grande moyenne; valeur de p selon le test de Mann-Whitney; Les résultats des épreuves d'autoagglutination et de chimiotactisme sont présentés plus en détails dans les chapitres 1 et 4.

Dans cette étude, l'autoagglutination, le chimiotactisme, l'adhésion et l'invasion de cellules primaires issues de caecums de poulets matures ont été caractérisés pour diverses souches de *C. jejuni* de provenance (année, élevages, types d'élevage) différentes. De manière générale, tant pour les souches d'origine conventionnelle que pour les souches

d'origine biologique, leur caractérisation phénotypique a été très variable, ce qui est en accord avec ce qui a été déjà observé pour *C. jejuni*. Les souches de *C. jejuni* sont très diversifiées génétiquement (Wilson et coll., 2010). Cette variété peut de surcroît être accentuée par la variation de phase qui peut créer encore plus de diversité de phénotypes (Bayliss et coll., 2012).

Étant donné que le chimiotactisme et que l'autoagglutination des souches d'origine biologique étaient plus faibles que celles des souches d'origine conventionnelle, il est possible de suggérer que les souches d'origine biologique pourraient être moins aptes à compétitionner pour la colonisation d'un même poulet. Il faut cependant faire cette affirmation avec un peu de circonspection: la capacité d'adhésion/invasion des souches aux cellules épithéliales n'a pas été caractérisée et ces souches sont tout de même capables de coloniser un poulet puisqu'elles ont été isolées de contenus caecaux.

En complément d'étude, il aurait été intéressant de caractériser également la résistance au stress oxydatif (selon ce qui a été observé dans le chapitre 5) et la capacité à utiliser certains nutriments (selon les observations du chapitre 3 et 4) de manière à obtenir un portrait encore plus précis des caractéristiques phénotypiques des souches étudiées pour raffiner et peut-être identifier quels phénotypes, autres que l'invasion, pourraient être plus fortement associés à la colonisation des oiseaux. Il semble que le test de l'autoagglutination ne soit pas réellement apte à discriminer entre des souches pour leur potentiel de colonisation, surtout lorsqu'on tente de l'associer à la présence de gènes de colonisation (chapitre 4). Par contre, l'autoagglutination pourrait être utile pour évaluer la survie à l'environnement et la capacité de reconnaissance des bactéries entre elles (Girard et coll., 2010) ce qui donnerait un rôle indirect à l'autoagglutination dans la colonisation des oiseaux. L'autoagglutination pourrait également être impliquée dans la formation de biofilm intestinaux par des interactions flagelle-flagelle et flagelle-cellule intestinale (Haddock et coll., 2010), phénotype non évalué dans la présente étude.

6.3 Puce à ADN

Les souches recueillies ont été caractérisées au niveau génétique pour déterminer leur contenu en gènes associés à la colonisation du poulet. Étant donné le grand nombre de systèmes biologiques (exemple: motilité, capsule, LOS, chimiotactisme) et de gènes identifiés comme importants dans ce processus (Hermans et coll., 2011b), une méthode permettant la réalisation d'un important volume d'analyses se devait d'être choisie. Pour ce faire, une puce à ADN a été créée pour vérifier la présence de gènes associés à la colonisation du poulet et à la résistance aux antibiotiques pour *C. jejuni* (chapitre 3).

Il aurait aussi été possible d'utiliser une série de PCR multiplexes pour caractériser nos souches (Taboada et coll., 2012). Cependant, environ 300 gènes ont initialement été ciblés pour ce criblage. Le multiplexage aurait nécessité beaucoup de mise au point pour couvrir autant de gènes. Une autre méthode intéressante aurait été le séquençage complet des souches, ce qui aurait permis de connaître tout le contenu en gènes. Toutefois, le volume de données à traiter aurait été phénoménal et les analyses statistiques pour comparer autant d'associations auraient requis une très grande collection de souches, ce qui aurait été trop coûteux. Le choix pour la méthode s'est donc arrêté sur les puces à ADN, d'autant plus que les laboratoires qui ont collaboré à cette thèse possédaient une grande expertise de cette technique et que les appareils pour réaliser les hybridations, la lecture des puces et leur analyse étaient disponibles.

6.3.1 Dessin de la puce à ADN

Le choix des gènes ciblés par les sondes s'est fait suite à une revue de la littérature. Les gènes ciblés étaient ceux déjà prouvés comme importants pour la colonisation du poulet, potentiellement importants et associés à des systèmes biologiques impliqués dans la colonisation ainsi que quelques gènes uniques aux différentes souches contrôles séquencées utilisées. Par ailleurs, les souches contrôles utilisées possèdent un pouvoir de colonisation distinct (Ahmed et coll., 2002).

Les séquences références utilisées pour la création des sondes ont été celles de la souche RM1221, isolée d'une carcasse de poulet (Fouts et coll., 2005). Certaines sondes dessinées ont été retirées après la validation de la puce avec 4 souches contrôles (non hybridation ou hybridation non spécifique). Il est également possible de visualiser les gènes pouvant être détectés par la puce à ADN chez les quatre souches séquencées utilisées ainsi que pour quatre autres dont le génome est annoté et disponible sur le site web du NCBI (dans les tables supplémentaires de l'article du chapitre 3). Notre étude se démarque des autres car peu d'étude ont validé leur puce à ADN en utilisant autant de souches contrôles et que peu d'entre elles ont rendu disponibles autant de détails quant à la création et la spécificité des sondes de leur puce à ADN.

Grâce à l'expérience acquise, une version améliorée (v2.0) de la puce devrait être créée. L'absence de complémentarité entre les sondes qui ont hybridé à certains variants indique la présence d'une diversité génétique plus grande que celle présentement détectée par la puce à ADN. Considérant le nombre grandissant de génomes de *C. jejuni* disponibles, de nouvelles sondes devraient être dessinées pour optimiser la détection des gènes détectés par la première version de la puce. Il serait aussi pertinent d'augmenter le nombre de gènes présents sur la puce pour l'harmoniser avec le typage des gènes accessoires suggérés par certains auteurs (Quinones et coll., 2007, Taboada et coll., 2012) en plus d'y inclure les gènes de colonisation nouvellement identifiés.

6.3.2 Gènes toujours présents ou absents dans les souches hybridées

Un total de 57 souches a été hybridé aux puces à ADN dans cette étude. Plusieurs gènes ont toujours ou jamais été détectés dans cette collection (chapitre 3). Les protéines des gènes toujours présents pourraient servir de cibles thérapeutiques ou être de bonnes candidates vaccinales (après évaluation de leur immunoréactivité et de leur bonne expression chez plusieurs souches différentes isolées de périodes différentes) puisqu'elles étaient très conservées chez toutes les souches de *C. jejuni* hybridées et qu'elles étaient stables dans le temps. Quant aux gènes absents, principalement des gènes de résistance aux antimicrobiens, il est important de conserver ces sondes sur la puce à ADN pour suivre leur

possible apparition. Ceci est d'autant plus vrai que deux gènes (*acp2*variant et CJ81176-070c), tous deux de fonction putative, impliqués dans la formation de la paroi bactérienne et retrouvés chez la souche contrôle 81-176, font partie de ce groupe.

6.3.3 Gènes variables

La présence de 254 gènes et variants chez 57 souches de *C. jejuni* issus de deux années différentes d'échantillonnage a été évaluée dans cette étude. De ce nombre, 147 ont été détectés chez 2 % à 98 % des souches hybridées sur les puces (chapitre 3).

La présence variable de gènes associés à la colonisation des poulets évoquait la possibilité que les souches retrouvées ne possédaient pas toutes le même potentiel de colonisation des oiseaux, bien que toutes isolées de poulets à l'abattage, donc présumées être capable de coloniser (chapitre 3). Cette présence inégale suggérait donc que les souches emploient des stratégies différentes et d'efficacité variable pour coloniser le poulet. La caractérisation phénotypique des souches et la comparaison de leur contenu en gène a confirmé cette observation (chapitre 4). Cependant, il est important de noter que l'absence d'un gène ne signifie pas automatiquement la perte du phénotype. La perte d'un gène peut être compensée par d'autres, ce qui rend la caractérisation phénotypique nécessaire avant de conclure sur le potentiel de colonisation des oiseaux.

Le profil phénotypique et génotypique des souches de terrain étant très variable, tel que démontré dans cette étude, il devient essentiel, lors de l'analyse du pouvoir de colonisation associé à un gène, de muter le gène chez plusieurs souches, de vérifier que le phénotype est modifié pour chacune d'entre elles et que les souches complémentées récupèrent leur phénotype d'origine. Ceci est appuyé par l'observation que la mutation de *capA* dans des souches distinctes ne semble pas avoir le même effet sur la capacité de ces souches à coloniser un oiseau (Ashgar et coll., 2007, Flanagan et coll., 2009).

6.3.4 Analyse phénotypique et génotypique des souches

Tableau VII: Comparaison des propriétés phénotypiques des souches contenues dans les deux groupes majeurs de *C. jejuni* identifiés par la puce à ADN

Propriété phénotypique	Groupe NCTC11168	Groupe 81116	Valeur de p
Autoagglutination moyenne	55 ± 18	60 ± 22	0,457
Chimiotactisme moyen	0,31 ± 20	0,44 ± 0,19	0,007
Adhésion moyenne	0,35 ± 0,09	0,42 ± 0,07	0,029
Invasion moyenne	0,22 ± 0,04	0,27 ± 0,07	0,018
Rang moyen	20 ± 7	30 ± 6	0,001

n = 18 pour le groupe NCTC11168 et n = 12 pour le groupe 81116; en gras: groupe ayant la plus grande moyenne; valeur de p selon le test de Mann-Whitney; Les propriétés phénotypiques des souches sont présentées dans le chapitre 4.

Les souches ont été caractérisées pour leur contenu en gènes par puce à ADN (chapitre 3) et pour leurs caractéristiques phénotypiques (chapitre 4). Lors de l'analyse génétique, les souches ont été comparées et semblaient former 2 groupes distincts: groupe de la souche *C. jejuni* 81116 et groupe de la souche *C. jejuni* NCTC11168 (chapitre 3). Étant donné que ces deux souches contrôles possèdent des capacités de colonisation du poulet différentes (Ahmed et coll., 2002), l'hypothèse que les souches rattachées à ces groupes possédaient des potentiels de colonisation différents avait été émise (chapitre 3). L'analyse des propriétés phénotypiques de ces souches peut répondre en partie à cette hypothèse.

Pour éviter l'analyse de souches identiques, pour chaque lot, les souches ont été incluses uniquement si elles possédaient des caractéristiques phénotypiques différentes. Dans le cas des lots où toutes les souches possédaient des caractéristiques phénotypiques semblables, 1 seule souche a été sélectionnée au hasard. Il a été possible d'observer, exception faite de l'autoagglutination, que toutes les caractéristiques phénotypiques évaluées étaient supérieures pour les souches du groupe de la souche 81116 (Tableau VII) comparativement aux souches du groupe de la souche NCTC 11168. Il y a donc de fortes probabilités que les souches de ce groupe possédaient un potentiel de colonisation différent

des souches de l'autre groupe. Lors des essais de compétition *in vivo* (chapitre 4), des souches du groupe NCTC11168 (souche 5 et 6) ont été mises en compétition avec des souches du groupe 81116 (souche 1 et souche 2). La présence de gènes associés aux souches 5 et 6 n'a pas été détectée dans des dilutions de matière caecales des oiseaux inoculés, suggérant que les souches du groupe 81116 possèdent un meilleur potentiel de colonisation. Une autre étude utilisant une puce à ADN spécifique au génome de la souche NCTC11168 avait elle aussi permis de séparer des souches de *C. jejuni* en deux groupes distincts : la viabilité de souches après incubation dans une atmosphère aérobie était différente entre ces deux groupes (On, 2006). Ces études suggèrent que des groupes de souches possédant des caractéristiques phénotypiques différentes peuvent être identifiés par puce à ADN.

Après caractérisation phénotypique, les souches ont été classées en rang sur la base de leur performance relative pour chacune des propriétés phénotypiques étudiées. Il est donc possible de vérifier quels gènes étaient plus présents chez les souches possédant des propriétés phénotypiques supérieures aux autres souches. Cette approche est innovatrice puisque dans beaucoup d'études, uniquement 2 souches aux phénotypes très opposés sont comparées (Ahmed et coll., 2002, Pope et coll., 2007). La même chose a été faite dans cette étude, mais l'analyse a été poussée plus loin: le possible impact de ces gènes dans l'ensemble des souches de *C. jejuni* caractérisées a été vérifié. Notre étude permet donc d'évaluer avec plus de précision si les gènes retrouvés dans les souches aux potentiels opposés semblent importants dans la colonisation du poulet.

Les résultats de notre étude, basés sur l'analyse d'une grande collection de souches, viennent supporter l'implication des gènes codant pour la résistance à l'arsenic dans la colonisation du poulet. Il serait donc très intéressant de vérifier l'effet de l'arsenic sur le transcriptome des souches possédant le gène *arsC*. De plus *arsC* a peut-être une double fonction chez *C. jejuni*, tel que *porA* (porine et adhésine) (Moser et coll., 1997, De et coll., 2000) ce qui lui permettrait d'avoir un impact direct sur la colonisation des oiseaux. Cependant, il se pourrait que la résistance à l'arsenic ne soit pas directement impliquée dans la colonisation. Ceci est expliqué par le fait que l'arsenic n'était pas présent dans les

milieux de culture qui ont servi à l'évaluation phénotypique des souches, ce qui n'a donc pas pu induire la transcription de gènes impliqués dans la résistance à l'arsenic ou la co-transcription d'autres gènes; les souches *arsC* positives ne devraient pas donc pas avoir un niveau de transcription supérieur aux autres souches, du moins basé sur l'activation des gènes liés à la résistance à l'arsenic. Il serait donc pertinent de déléter *arsC* dans plusieurs de nos souches et ensuite réévaluer leurs propriétés phénotypiques.

La présence de *arsC* dans les souches de *C. jejuni* soulève un questionnement quant à la présence d'autres gènes de résistance aux métaux lourds chez ce pathogène. La question est assez importante puisque des métaux (cuivre, zinc, manganèse, sélénium) entrent dans la formulation des diètes des oiseaux et que leur utilisation excède souvent les concentrations recommandées par les instances gouvernementales. Cette utilisation fait en sorte que des quantités significatives se retrouvent dans les déjections des animaux qui par la suite peuvent contaminer l'environnement (Dozier et coll., 2003, Aksu et coll., 2011). Ces molécules sont considérées comme des antioxydants, améliorant du même coup l'immunité des animaux, leurs performances zootechniques et la qualité de leur viande (Bao et coll., 2009). Les métaux sont aussi utilisés pour s'assurer qu'aucune carence ne se développe chez les animaux (Bao et coll., 2009). Ces minéraux ont également un effet antibactérien qui promeut la bonne santé intestinale des oiseaux (Bao et coll., 2009). La co-sélection de bactéries résistantes à ces métaux par l'alimentation des animaux est donc possible. Dans ce contexte, la présence de résistance aux métaux chez des bactéries peut leur conférer un avantage lors de leur établissement chez un hôte recevant des doses importantes de métaux. *C. jejuni* possède des mécanismes de résistance à ces métaux (cuivre et zinc) qui peuvent donc pourrait être sélectionnés par l'utilisation de métaux en élevage (Hall et coll., 2008, Kaakoush et coll., 2008, Stahl et coll., 2012). La résistance aux métaux peut aussi être liée à la résistance aux antibiotiques et donc être co-sélectionnée (Baker-Austin et coll., 2006). C'est le cas pour *E. coli* isolé de purin de porc pour lequel la présence de cuivre et de zinc était associée à la résistance aux β -lactamines (Hölzel et coll., 2012). Certains gènes de résistance aux métaux peuvent aussi être impliqués dans la virulence des bactéries. Par exemple, le gène *cueO* de *Salmonella* Thyphimurium est

impliqué dans la résistance au cuivre et lorsqu'il est muté, la virulence de *Salmonella* Thyphimurium est atténuée (Achard et coll., 2010). Cependant, les connaissances reliées à la résistance aux métaux, à la sélection de souches et l'effet de cette résistance sur les phénotypes de *C. jejuni* sont à approfondir.

Il est également intéressant de constater que les systèmes de restriction de type I étaient associés à des souches plus aptes à coloniser le poulet. Il existe trois types de système de restriction. Le système de restriction de type I, identifié dans la présente étude, protège les bactéries de l'infection par de l'ADN étranger, pas seulement d'un genre ou d'une espèce bactérienne différente, mais aussi entre souches ou lignées différentes (Murray, 2000). Les enzymes de restriction de type I catalysent la restriction et la modification de l'ADN. La reconnaissance de l'ADN se fait par la présence de méthylation à des sites de reconnaissance précis. Le système de restriction de type I est le produit des gènes *hsd* (host specificity for DNA) (Bickle et Kruger, 1993). Le système de restriction de type I semble une entité autonome dans le génome d'une bactérie: il élimine l'ADN pouvant le menacer, détruit les bactéries qui tentent de l'éliminer de leur génome et peut se transférer de bactérie en bactérie (Kobayashi, 2001). Les fonctions biologiques précises du système de restriction de type I et l'avantage qu'ils confèreraient à *C. jejuni* restent à déterminer. La présence de gènes codant pour ce système dans certaines souches pourrait indiquer que les souches de *C. jejuni* ayant une capacité différente d'incorporation de nouveau matériel génétique pourraient avoir un potentiel de colonisation différent, ce qui pourrait engendrer la formation d'une lignée de souche fortement spécialisée dans la colonisation du poulet. L'implication des systèmes de restriction dans la colonisation du poulet mérite plus d'attention. Il serait intéressant de confirmer expérimentalement que les souches possédant une capacité de colonisation supérieure des poulets peuvent échanger facilement du matériel génétique entre elles, par exemple par transformation naturelle, alors que ces échanges seraient peu fréquents, voire impossibles, avec les autres souches. Il serait aussi pertinent de déléter ces gènes chez plusieurs souches et d'ensuite réévaluer leur propriétés phénotypiques et leur capacité de coloniser un poulet.

Certains gènes ont aussi été associés à des souches dont les propriétés phénotypiques étaient plus faibles que celles d'autres ne possédant pas ces mêmes gènes. Ceci ne veut pas dire qu'ils ne sont pas impliqués dans la colonisation des poulets. Après tout, ils sont présents chez des souches isolées directement d'oiseaux. Ces souches ont peut-être développé des mécanismes de colonisation des oiseaux tout simplement moins efficaces que les autres souches de *C. jejuni*. Ceci illustre certaines limites de la caractérisation *in vivo*. Il est difficile de recréer en laboratoire les conditions environnementales rencontrées par *C. jejuni* lors de la colonisation d'un oiseau. L'idéal, serait de pouvoir recueillir rapidement les souches de *C. jejuni* directement des oiseaux pour ensuite les travailler. L'oiseau servirait en quelque sorte de milieu de culture. La séparation immunomagnétique des bactéries pourrait être une technique envisagée (King et coll., 2012).

6.4 Contrôle de *Campylobacter jejuni* en élevage

Jusqu'à ce jour, peu de méthodes de contrôle se sont avérées très efficaces pour diminuer la colonisation des oiseaux par *C. jejuni*. Un nouvel additif alimentaire à base d'un mélange d'acides organiques et d'huiles essentielles a donc été évalué dans un modèle de colonisation semblable aux conditions d'élevage commerciales du poulet. Grâce à la caractérisation phénotypique et génotypique des souches, il a été permis d'évaluer l'effet de cet additif sur quatre souches fort différentes.

6.4.1 Choix de la méthode de contrôle utilisée

Plusieurs méthodes de contrôle s'offraient à nous, notamment le dessin d'un vaccin ciblant une des protéines dont la présence est conservée parmi notre collection de souches. Par contre, l'emploi d'un vaccin contre une bactérie ne causant pas pour l'instant de pertes économiques importantes pour l'industrie avicole semble peu probable étant donné les coûts supplémentaires qui seraient engendrés par son administration. Seule un incitatif réglementaire convaincant pour les éleveurs forcerait la vaccination des oiseaux contre *C. jejuni*.

L'utilisation de mesures accrues de biosécurité et de programmes HACCP à la ferme permettrait également un contrôle accru de *C. jejuni* ainsi que des autres maladies pouvant affecter la volaille (van de Giessen et coll., 1998). Des normes nationales de biosécurité sont mises en place dans l'industrie au Canada (ACIA, 2010). Cependant, les mesures de biosécurité ne sont pas toujours respectées, même lorsque des incitatifs sont mis en place pour promouvoir leur respect (Racicot et coll., 2012). De plus, l'instauration de mesure de biosécurité peut apparaître onéreuse pour l'éleveur, ce qui influence nettement son intérêt à les utiliser (Fraser et coll., 2010).

L'application d'une méthode de contrôle par la voie alimentaire apparaît optimale. Elle nécessite peu de manipulation étant donné son application directe dans la moulée ou l'eau des oiseaux. Cette méthode permet aussi de promouvoir la santé intestinale et le gain de poids (Amerah et coll., 2012). La composition et la texture de la moulée peuvent aussi jouer un rôle dans la lutte contre *C. jejuni*. En effet, il a été observé qu'une nourriture de granulométrie élevée augmentait le temps de rétention de la moulée dans le gésier et parallèlement le temps de contact entre le bol alimentaire et l'acidité du gésier, affectant alors la survie de *C. jejuni* (Moen et coll., 2012). De plus, des alternatives à l'utilisation des antibiotiques sont recherchées par l'industrie face à l'émergence de la résistance aux antibiotiques en élevage, autant pour les pathogènes animaux que zoonotiques. La combinaison d'additifs alimentaires dans une formulation adaptée, doublée de la mise en application des mesures de biosécurité accrues en élevages apparaît la meilleure combinaison pour lutter efficacement contre *C. jejuni*. L'utilisation d'huiles essentielles et d'acides organiques semble appropriée étant donné leur action positive sur la santé intestinale (Garcia et coll., 2007) et leur effet à faible concentration contre *C. jejuni* (Johny et coll., 2010) et leur administration présente comme facteur de croissance dans certains pays.

Il cependant très important de caractériser cet effet dans un contexte commercial pour valider les observations réalisées en conditions contrôlées. Les conditions étant très variables d'élevage en élevage (biosécurité, fournisseurs, localisation géographique, conditions environnementales, lignées génétiques de poulet), il se peut que les effets

observés ne soient pas applicables à grande échelle. Il n'en reste pas moins que les études en conditions contrôlées sont moins onéreuses que les études à grande échelle, ne représentent pas de risques pour les producteurs, permettent d'attribuer un effet précis à des molécules précises et doivent normalement être réalisées avant les essais terrains.

6.4.2 Choix du modèle de colonisation

Le modèle qui a été mis au point dans cette étude (inoculation à 14 jours d'âge) visait à mimer les conditions d'élevage commercial de la volaille au Canada. La détection des lots positifs à *C. jejuni* survient rarement avant le 14^e jour d'âge (Conlan et coll., 2007). Le modèle utilisé représentait une colonisation typique de *C. jejuni*, laquelle est présente à très haut niveau durant tout l'élevage. Il est aussi possible qu'une succession de différentes souches de *C. jejuni* se produise dans les élevages commerciaux. La persistance d'une souche dominante n'est pas nécessairement systématique (Kudirkiene et coll., 2010, Perez-Boto et coll., 2012b). Les niveaux de colonisations obtenus dans le modèle sont comparables à ce qui est observé en industrie (chapitre 5).

6.4.3 Effet des acides organiques et des huiles essentielles sur la colonisation caecale de *Campylobacter jejuni*

L'étude a utilisé un mélange d'huiles essentielles et d'acides organiques encapsulé comme stratégie alimentaire pour lutter contre la colonisation des oiseaux en élevage par *C. jejuni* (chapitre 5). L'encapsulation est nécessaire pour assurer la libération du produit dans l'intestin et pour le protéger de l'acidité de l'estomac (Molatova et coll., 2011). L'additif alimentaire n'a pas bloqué la colonisation des oiseaux. Au contraire, elle semble l'avoir améliorée pour les souches qui avaient été caractérisées comme ayant un fort potentiel de colonisation des poulets. Tel que suggéré dans le chapitre 5, les changements intestinaux apportés par l'additif alimentaire ont sans doute favorisé la colonisation de certaines souches. Il serait donc intéressant de mieux caractériser la réponse de *C. jejuni* vis-à-vis des modifications de l'environnement dans lequel la bactérie se trouve, telle que la croissance

en milieu riche sous différentes concentrations d'acides organiques ou d'huiles essentielles et leurs effets sur les propriétés phénotypiques des souches.

Un effet marqué sur la colonisation caecale a été observé dans la salle 1 (chapitre 5). Les souches utilisées dans cette salle (souche 1 et 2) possédaient des gènes différents (Annexe 3, Tableau VIII). À première vue, si l'on considère que l'additif alimentaire a favorisé la souche 1, tel que supporté par les données du HRM (chapitre 5), il est difficile d'expliquer pourquoi cette dernière a mieux colonisé les oiseaux lorsque les gènes des deux souches sont comparés. La présence de nombreux gènes de métabolisme et de transport des nutriments chez la souche 2 laisse aussi à croire que la capacité à utiliser certains substrats comme source de carbone ou d'énergie entre les souches était différente, ce qui aurait aussi pu affecter positivement ou négativement l'une ou l'autre des souches. Il serait intéressant de pouvoir démontrer l'utilité de ces gènes selon les conditions du modèle employé et de répéter cet essai. Il est également possible que les différences de colonisations entre les 2 souches puissent être expliquées par une expression différente de certains gènes. Dans ce contexte, déterminer le transcriptome de ces 2 souches lors de la colonisation serait très pertinent.

Une autre différence a pu être observée entre les salles: dans la salle 2, un pic de bactéries anaérobiques sulfite-réductrices (ASR) a pu être observé immédiatement après l'inoculation des souches de *C. jejuni* (résultats non publiés). Les oiseaux des deux salles recevaient la même moulée et avaient été dispersés dans les salles au hasard lors de la mise en place de l'expérimentation. Le seul paramètre expliquant cette différence au niveau des ASR serait la composition du mélange de souches reçues par les oiseaux. L'impact de *C. jejuni* sur la microflore intestinale des poulets est inconnu. Il serait donc très intéressant de le caractériser, en plus de définir si cet impact dépend de la capacité des souches à coloniser les poulets.

6.4.3 Effet des acides organiques et des huiles essentielles sur la contamination des carcasses par *Campylobacter jejuni*

Cette étude a permis d'observer les effets de l'additif alimentaire sur la contamination des carcasses par *C. jejuni* : les carcasses de poulets traités avec l'additif alimentaire présentaient une contamination moindre. Cette observation intéressante suggère que ceci pourrait être dû à un changement dans la réponse au stress des souches puisque leur survie semble diminuée lorsqu'elles sont exposées sur la carcasse des poulets (chapitre 5). Il serait donc intéressant en perspective de caractériser la résistance au stress oxydatif et aux biocides des quatre souches et de vérifier s'il est possible de moduler cette résistance en faisant varier les paramètres de culture pour y inclure des conditions semblables à celles rencontrées au niveau intestinal (milieux riches en nutriments) lors de l'ajout de l'additif alimentaire à la ration des poulets. Par exemple, l'utilisation du pyruvate dans un milieu de culture permet à *C. jejuni* de croître en conditions aérobiques (Verhoeff-Bakkenes et coll., 2008). Il serait donc très intéressant de vérifier si l'ajout d'autres acides organiques (seuls ou en combinaison), dont ceux qui composent l'additif alimentaire évalué, modulent la croissance de *C. jejuni* ou sa résistance au stress. Par contre, l'effet n'a pu être visualisé qu'à la toute fin de l'expérience, ce qui laisse supposer que les souches ont eu besoin de beaucoup de temps pour évoluer de la sorte.

Dans l'industrie nord-américaine, des agents technologiques, c'est-à-dire des molécules (acides organiques, dérivés du chlore, brome) ayant une activité antibactérienne, sont ajoutés à l'eau de rinçage des carcasses de poulet pour diminuer les niveaux globaux de bactéries sur les produits finis (Bucher et coll., 2012). Au Canada, l'emploi de ces molécules est régi par le gouvernement fédéral via la « Politique sur la différenciation des additifs alimentaires des agents technologiques » (Santé Canada, 2008). Dans notre étude, l'eau utilisée provenait du réseau de la ville de Saint-Hyacinthe qui probablement contenait une faible concentration en chlore. Il serait intéressant de répéter l'expérience en utilisant des agents technologiques et de vérifier si les différences observées subsistent toujours. Il est intéressant de noter que l'emploi de ces agents ne garantit pas l'innocuité des aliments.

Aux États-Unis, de 2005 à 2011 en Alabama, une étude a observé une prévalence moyenne de 41 % de produits finis de volaille (sans peau et sans os) positif pour *Campylobacter* et ce peu importe l'année ou la saison d'échantillonnage (Williams et Oyarzabal, 2012).

6.4.4 Effet des acides organiques et des huiles essentielles sur la présence de *Campylobacter jejuni* dans le foie et la rate des poulets

Un effet de l'additif alimentaire sur la présence de *C. jejuni* dans le foie et la rate des oiseaux a pu être observé (chapitre 5). La présence de *C. jejuni* dans les organes des oiseaux a déjà été décrite (Cox et coll., 2006). Certains pourraient avancer que cette présence observée était le résultat d'évènements de contamination croisée. Ceci est peu probable étant donné les faibles niveaux de *C. jejuni* observés (rappelons qu'un gramme de matière fécale dans notre étude contenait en moyenne 10^7 CFU de *C. jejuni*) et que le flambage extérieur des échantillons d'organes avant leur traitement a été appliqué avec soin pour éliminer la contamination externe. Cependant, il a été démontré chez des souris que des bactéries pouvaient se propager de l'intestin au foie peu de temps après l'euthanasie des animaux. En effet, dans les 15 minutes suivant la mort, 50 % (4/8) des cultures de foie étaient contaminées par des bactéries. Les auteurs de cette étude suggèrent que les bactéries peuvent migrer de l'intestin au foie après la mort (Heimesaat et coll., 2012). La présence de *C. jejuni* dans les organes est peut-être due à ce même phénomène. Nonobstant le mécanisme par lequel *C. jejuni* se retrouve dans les organes du poulet, l'additif alimentaire utilisé a diminué l'impact de ce mécanisme pour deux souches de *C. jejuni* considérées comme possédant un fort potentiel de colonisation des poulets.

Conclusions

Cette thèse de doctorat avait comme sujet d'étude *C. jejuni*, un pathogène alimentaire très important en santé publique. L'hypothèse principale de cette recherche était que malgré une littérature existante sur la colonisation du poulet par *C. jejuni*, que plusieurs autres facteurs de colonisation sont présents et peuvent être décrits par l'étude plus approfondie des propriétés phénotypiques et génotypiques des souches de terrain isolées de poulets. Les expériences réalisées dans le cadre de cette thèse ont permis de confirmer cette hypothèse.

Tout d'abord, l'ensemble des travaux réalisés lors de cette thèse est très original puisque très peu d'études portent exclusivement sur la fastidieuse caractérisation de l'association entre *C. jejuni* et son hôte naturel le poulet.

Cette thèse a permis d'établir, pour la toute première fois au Canada, que les poulets élevés selon une régie certifiée biologique étaient fortement colonisés par des souches de *C. jejuni* aux propriétés phénotypiques diverses et pour lesquelles la résistance aux antibiotiques étaient peu fréquente.

De plus, dans le cadre de ces travaux, une puce à ADN a été mise au point. Elle est originale puisqu'elle permet la détection de gènes associés à la colonisation intestinale des poulets par *C. jejuni* et de variants de ces mêmes gènes. Cet outil novateur a d'ailleurs permis, pour la première fois, de strictement décrire la présence de gènes de *C. jejuni* associés à la colonisation des poulets chez des souches d'origines géographiques et temporelles différentes.

Également pour la première fois, l'appréciation *in vitro* du pouvoir de colonisation d'une souche donnée a été établie en tenant compte de plusieurs caractéristiques phénotypiques différentes des souches, soit l'autoagglutination, le chimiotactisme, l'adhésion et l'invasion de cellules primaires de caecum de poulet, alors que la majorité des autres études ne se basent que sur l'évaluation de l'invasion. Ceci a permis le classement des souches et ensuite la comparaison de leur profil de gènes. Cette comparaison est également novatrice puisqu'elle est effectuée pour plusieurs souches issues du terrain, lesquelles possèdent une gamme étendue de propriétés phénotypiques, alors que les autres études disponible dans la littérature scientifique font la comparaison du contenu en gène

d'uniquement 2 souches possédant des propriétés diamétralement opposées, sans validation dans un large éventail de souches. La comparaison entre les propriétés phénotypiques et le profil de gènes des souches a permis, pour la première fois, d'identifier le système de restriction-modification de type 1 et le gène CJE1719 comme étant associés à la colonisation intestinale du poulet par *C. jejuni*, en plus de supporter l'implication de la résistance à l'arsenic dans cette colonisation.

Finalement, étant donné la grande variété de phénotypes et de profils de gènes observés dans cette étude, une méthode de contrôle de *C. jejuni* par la voie alimentaire a été évaluée contre des souches reflétant cette réalité. Les résultats obtenus ont permis de conclure que toutes les souches de *C. jejuni* ne répondaient pas de la même manière face à cette méthode de contrôle. Ceci est également novateur puisque la majorité des travaux portant sur le contrôle de *C. jejuni* en élevage n'incluent pas cet important paramètre dans leurs protocoles expérimentaux.

Bibliographie

- Aarestrup 2006. *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*, Washington, D.C., ASM Press.
- Abley, M. J., Wittum, T. E., Zerby, H. N. & Funk, J. A. 2012. Quantification of *Campylobacter* and *Salmonella* in cattle before, during, and after the slaughter process. *Foodborne Pathog Dis*, 9, 113-9.
- Achard, M. E. S., Tree, J. J., Holden, J. A., Simpfendorfer, K. R., Wijburg, O. L. C., Strugnell, R. A., Schembri, M. A., Sweet, M. J., Jennings, M. P. & McEwan, A. G. 2010. The Multi-Copper-Ion Oxidase CueO of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Is Required for Systemic Virulence. *Infect Immun*, 78, 2312-2319.
- Adkin, A., Hartnett, E., Jordan, L., Newell, D. & Davison, H. 2006. Use of a systematic review to assist the development of *Campylobacter* control strategies in broilers. *J Appl Microbiol*, 100, 306-15.
- Agence canadienne d'inspection des aliments. 2012. *Agence canadienne d'inspection des aliments - Lois et Règlements* [Online]. Available: <http://www.inspection.gc.ca/au-sujet-de-l-acia/lois-et-reglements/fra/1299846777345/1299847442232> [Accessed August 7th 2012].
- Agence canadienne d'inspection des aliments. 2010. *Guide général du producteur - Norme nationale de biosécurité pour les fermes avicoles* [Online]. Available: <http://www.inspection.gc.ca/francais/anima/biosec/stdnorf.shtml> [Accessed September 2nd 2012].
- Agence de santé publique du Canada. 2002. Isolement des *Campylobacter* thermophiles dans les aliments.
- Agence de santé publique du Canada. 2003. *Campylobactériose* [Online]. Available: <http://dsol-smed.phac-aspc.gc.ca/dsol-smed/ndis/diseases/camp-fra.php> [Accessed August 7th 2012].

- Agence de santé publique du Canada. 2006. *Maladies à déclaration obligatoire en direct* [Online]. Available: http://dsol-smed.phac-aspc.gc.ca/dsol-smed/ndis/c_ind-fra.php#top_list [Accessed August 7th 2012].
- Agence de santé publique du Canada. 2010. Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA) 2009 – Résultats préliminaires.
- Agriculture et agroalimentaire Canada. 2012. *Agriculture et Agroalimentaire Canada - Marché de la volaille - Coup d'oeil sur l'industrie avicole canadienne...* [Online]. Available: http://www.agr.gc.ca/poultry-volaille/gpl_fra.htm [Accessed August 7th 2012].
- Agriculture et agroalimentaire Canada. 1991. L'élevage du poulet et du dindon à griller au Canada. *In*: Canada, A. E. A. (ed.).
- Ahmed, I. H., Manning, G., Wassenaar, T. M., Cawthraw, S. & Newell, D. G. 2002. Identification of genetic differences between two *Campylobacter jejuni* strains with different colonization potentials. *Microbiology*, 148, 1203-12.
- Ahmed, R., Leon-Velarde, C. G. & Odumeru, J. A. 2012. Evaluation of novel Agars for the enumeration of *Campylobacter* spp. in poultry retail samples. *J Microbiol Methods*, 88, 304-10.
- Aksu, T., Aksu, M. I., Yoruk, M. A. & Karaoglu, M. 2011. Effects of organically-complexed minerals on meat quality in chickens. *Br Poult Sci*, 52, 558-63.
- Alemka, A., Whelan, S., Gough, R., Clyne, M., Gallagher, M. E., Carrington, S. D. & Bourke, B. 2010. Purified chicken intestinal mucin attenuates *Campylobacter jejuni* pathogenicity *in vitro*. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 898-903.
- Alfredson, D. A. & Korolik, V. 2005. Isolation and expression of a novel molecular class D beta-lactamase, OXA-61, from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 2515-8.

- Alfredson, D. A. & Korolik, V. 2007. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 277, 123-32.
- Allen, V. M., Ridley, A. M., Harris, J. A., Newell, D. G. & Powell, L. 2011. Influence of production system on the rate of onset of *Campylobacter* colonization in chicken flocks reared extensively in the United Kingdom. *Br Poult Sci*, 52, 30-9.
- Allos, B. M. 1998. *Campylobacter jejuni* infection as a cause of the Guillain-Barre syndrome. *Infect Dis Clin North Am*, 12, 173-84.
- Almofiti, Y. A., Dai, M., Sun, Y., Hao, H., Liu, Z., Cheng, G. & Yuan, Z. 2011. The physiologic and phenotypic alterations due to macrolide exposure in *Campylobacter jejuni*. *Int J Food Microbiol*, 151, 52-61.
- Altekruse, S. F., Swerdlow, D. L. & Stern, N. J. 1998. Microbial food borne pathogens. *Campylobacter jejuni*. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 14, 31-40.
- Amerah, A. M., Mathis, G. & Hofacre, C. L. 2012. Effect of xylanase and a blend of essential oils on performance and *Salmonella* colonization of broiler chickens challenged with *Salmonella* Heidelberg. *Poult Sci*, 91, 943-7.
- Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S., Normand, V. & Boulianne, M. 2007. Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. caecal colonization in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. *Prev Vet Med*, 81, 250-64.
- Arsenault, J. 2010. Épidémiologie spatiale de la campylobactériose au Québec. Thèse de Doctorat, Montréal.
- Asakura, M., Samosornsuk, W., Hinenoya, A., Misawa, N., Nishimura, K., Matsuhisa, A. & Yamasaki, S. 2008. Development of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 52, 260-6.

- Ashgar, S. S., Oldfield, N. J., Wooldridge, K. G., Jones, M. A., Irving, G. J., Turner, D. P. & Ala'Aldeen, D. A. 2007. CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. *J Bacteriol*, 189, 1856-65.
- Axelsson-Olsson, D., Waldenstrom, J., Broman, T., Olsen, B. & Holmberg, M. 2005. Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, 71, 987-92.
- Axelsson-Olsson, D., Svensson, L., Olofsson, J., Salomon, P., Waldenstrom, J., Ellstrom, P. & Olsen, B. 2010. Increase in acid tolerance of *Campylobacter jejuni* through coinubation with amoebae. *Appl Environ Microbiol*, 76, 4194-200.
- Bachtiar, B. M., Coloe, P. J. & Fry, B. N. 2007. Knockout mutagenesis of the *kpsE* gene of *Campylobacter jejuni* 81116 and its involvement in bacterium-host interactions. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 49, 149-54.
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R. & McArthur, J. V. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol*, 14, 176-82.
- Bao, Y. M., Choct, M., Iji, P. A. & Bruerton, K. 2009. Optimal dietary inclusion of organically complexed zinc for broiler chickens. *Br Poult Sci*, 50, 95-102.
- Bardon, J., Kolar, M., Cekanova, L., Hejnar, P. & Koukalova, D. 2009. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and its resistance to antibiotics in poultry in the Czech Republic. *Zoonoses Public Health*, 56, 111-6.
- Barnes, I. H., Bagnall, M. C., Browning, D. D., Thompson, S. A., Manning, G. & Newell, D. G. 2007. Gamma-glutamyl transpeptidase has a role in the persistent colonization of the avian gut by *Campylobacter jejuni*. *Microb Pathog*, 43, 198-207.
- Barrangou, R. & Horvath, P. 2012. CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annu Rev Food Sci Technol*, 3, 143-62.

- Barrios, P. R., Reiersen, J., Lowman, R., Bisailon, J. R., Michel, P., Fridriksdottir, V., Gunnarsson, E., Stern, N., Berke, O., McEwen, S. & Martin, W. 2006. Risk factors for *Campylobacter* spp. colonization in broiler flocks in Iceland. *Prev Vet Med*, 74, 264-78.
- Baurhoo, B., Ferket, P. R. & Zhao, X. 2009. Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. *Poult Sci*, 88, 2262-72.
- Baylis, C. L., MacPhee, S., Martin, K. W., Humphrey, T. J. & Betts, R. P. 2000. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *J Appl Microbiol*, 89, 884-91.
- Bayliss, C. D., Bidmos, F. A., Anjum, A., Manchev, V. T., Richards, R. L., Grossier, J. P., Wooldridge, K. G., Ketley, J. M., Barrow, P. A., Jones, M. A. & Tretyakov, M. V. 2012. Phase variable genes of *Campylobacter jejuni* exhibit high mutation rates and specific mutational patterns but mutability is not the major determinant of population structure during host colonization. *Nucleic Acids Res*, 40, 5876-89.
- Best, E. L., Powell, E. J., Swift, C., Grant, K. A. & Frost, J. A. 2003. Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiol Lett*, 229, 237-41.
- Bickle, T. A. & Kruger, D. H. 1993. Biology of DNA restriction. *Microbiol Rev*, 57, 434-50.
- Bingham-Ramos, L. K. & Hendrixson, D. R. 2008. Characterization of two putative cytochrome c peroxidases of *Campylobacter jejuni* involved in promoting commensal colonization of poultry. *Infect Immun*, 76, 1105-14.
- Biocentric. 2012. *Sensititre Campylobacter* [Online]. Available: <http://www.biocentric.com/index.php/microbiologie/bacteries-veterinaires/cmi->

liquide-bacteries-veterinaire/sensitire-Campylobacter-veterinaire-cmi-antibiotique.html [Accessed August 7th 2012].

- Biswas, D., Fernando, U. M., Reiman, C. D., Willson, P. J., Townsend, H. G., Potter, A. A. & Allan, B. J. 2007. Correlation between *in vitro* secretion of virulence-associated proteins of *Campylobacter jejuni* and colonization of chickens. *Curr Microbiol*, 54, 207-12.
- Bjorkroth, J. 2005. Microbiological ecology of marinated meat products. *Meat Sci*, 70, 477-80.
- Blaser, M. J. 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J Infect Dis*, 176 Suppl 2, S103-5.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277, 1453-62.
- Borrmann, E., Berndt, A., Hanel, I. & Kohler, H. 2007. *Campylobacter*-induced interleukin-8 responses in human intestinal epithelial cells and primary intestinal chick cells. *Vet Microbiol*, 124, 115-24.
- Boukraa, L., Messier, S. & Robinson, Y. 1991. Isolation of *Campylobacter* from livers of broiler chickens with and without necrotic hepatitis lesions. *Avian Dis*, 35, 714-7.
- Bouwknegt, M., van de Giessen, A. W., Dam-Deisz, W. D., Havelaar, A. H., Nagelkerke, N. J. & Henken, A. M. 2004. Risk factors for the presence of *Campylobacter* spp. in Dutch broiler flocks. *Prev Vet Med*, 62, 35-49.
- Boysen, L. & Rosenquist, H. 2009. Reduction of thermotolerant *Campylobacter* species on broiler carcasses following physical decontamination at slaughter. *J Food Prot*, 72, 497-502.

- Bras, A. M., Chatterjee, S., Wren, B. W., Newell, D. G. & Ketley, J. M. 1999. A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization. *J Bacteriol*, 181, 3298-302.
- Bruant, G., Maynard, C., Bekal, S., Gaucher, I., Masson, L., Brousseau, R. & Harel, J. 2006. Development and validation of an oligonucleotide microarray for detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 72, 3780-4.
- Bucher, O., Fazil, A., Rajic, A., Farrar, A., Wills, R. & McEwen, S. A. 2012. Evaluating interventions against *Salmonella* in broiler chickens: applying synthesis research in support of quantitative exposure assessment. *Epidemiol Infect*, 140, 925-45.
- Buckley, A. M., Wang, J., Hudson, D. L., Grant, A. J., Jones, M. A., Maskell, D. J. & Stevens, M. P. 2010. Evaluation of live-attenuated *Salmonella* vaccines expressing *Campylobacter* antigens for control of *C. jejuni* in poultry. *Vaccine*, 28, 1094-105.
- Bull, S. A., Thomas, A., Humphrey, T., Ellis-Iversen, J., Cook, A. J., Lovell, R. & Jorgensen, F. 2008. Flock health indicators and *Campylobacter* spp. in commercial housed broilers reared in Great Britain. *Appl Environ Microbiol*, 74, 5408-13.
- Burrowes, B., Harper, D. R., Anderson, J., McConville, M. & Enright, M. C. 2011. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 9, 775-85.
- Byrd, J. A., Hargis, B. M., Caldwell, D. J., Bailey, R. H., Herron, K. L., McReynolds, J. L., Brewer, R. L., Anderson, R. C., Bischoff, K. M., Callaway, T. R. & Kubena, L. F. 2001. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. *Poult Sci*, 80, 278-83.
- Byrne, C. M., Clyne, M. & Bourke, B. 2007. *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells *in vitro*. *Microbiology*, 153, 561-9.

- Cagliari, C., Mouline, C., Cloeckert, A. & Payot, S. 2006. Synergy between efflux pump CmeABC and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 3893-6.
- Calderon-Gomez, L. I., Hartley, L. E., McCormack, A., Ringoir, D. D. & Korolik, V. 2009. Potential use of characterised hyper-colonising strain(s) of *Campylobacter jejuni* to reduce circulation of environmental strains in commercial poultry. *Vet Microbiol*, 134, 353-61.
- Caldwell, D. B., Wang, Y. & Lin, J. 2008. Development, stability, and molecular mechanisms of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 3947-54.
- Caner, V., Cokal, Y., Cetin, C., Sen, A. & Karagenc, N. 2008. The detection of *hipO* gene by real-time PCR in thermophilic *Campylobacter* spp. with very weak and negative reaction of hippurate hydrolysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94, 527-32.
- Cardinale, E., Tall, F., Gueye, E. F., Cisse, M. & Salvat, G. 2004. Risk factors for *Campylobacter* spp. infection in Senegalese broiler-chicken flocks. *Prev Vet Med*, 64, 15-25.
- Carrillo, C. D., Kruczkiewicz, P., Mutschall, S., Tudor, A., Clark, C. & Taboada, E. N. 2012. A Framework for Assessing the Concordance of Molecular Typing Methods and the True Strain Phylogeny of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Using Draft Genome Sequence Data. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 57.
- Conseil des appellations réservées et des termes valorisants. 2012. *Répertoire des produits biologiques certifiés au Québec* [Online]. Available: <http://www.produitsbioquebec.info/interroGrandPublicFr.do> [Accessed August 7th 2012].

- Carvalho, C., Susano, M., Fernandes, E., Santos, S., Gannon, B., Nicolau, A., Gibbs, P., Teixeira, P. & Azeredo, J. 2010a. Method for bacteriophage isolation against target *Campylobacter* strains. *Lett Appl Microbiol*, 50, 192-7.
- Carvalho, C. M., Gannon, B. W., Halfhide, D. E., Santos, S. B., Hayes, C. M., Roe, J. M. & Azeredo, J. 2010b. The *in vivo* efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC Microbiol*, 10, 232.
- Cawthraw, S. A., Wassenaar, T. M., Ayling, R. & Newell, D. G. 1996. Increased colonization potential of *Campylobacter jejuni* strain 81116 after passage through chickens and its implication on the rate of transmission within flocks. *Epidemiol Infect*, 117, 213-5.
- Cawthraw, S. A. & Newell, D. G. 2010. Investigation of the presence and protective effects of maternal antibodies against *Campylobacter jejuni* in chickens. *Avian Dis*, 54, 86-93.
- CBC News. 2008. *Avian Flu: The next pandemic?* [Online]. Available: <http://www.cbc.ca/news/background/avianflu/> [Accessed August 7th 2012].
- Chaban, B., Musil, K. M., Himsforth, C. G. & Hill, J. E. 2009. Development of cpn60-based real-time quantitative PCR assays for the detection of 14 *Campylobacter* species and application to screening of canine fecal samples. *Appl Environ Microbiol*, 75, 3055-61.
- Chaveerach, P., ter Huurne, A. A., Lipman, L. J. & van Knapen, F. 2003. Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. *Appl Environ Microbiol*, 69, 711-4.
- Chon, J. W., Hyeon, J. Y., Yim, J. H., Kim, J. H., Song, K. Y. & Seo, K. H. 2012. Improvement of modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate Agar by supplementation with a high concentration of polymyxin B for detection of

- Campylobacter jejuni* and *C. coli* in chicken carcass rinses. *Appl Environ Microbiol*, 78, 1624-6.
- Christensen, J. E., Pacheco, S. A. & Konkel, M. E. 2009. Identification of a *Campylobacter jejuni*-secreted protein required for maximal invasion of host cells. *Mol Microbiol*, 73, 650-662.
- Clark, C. G., Taboada, E., Grant, C. C., Blakeston, C., Pollari, F., Marshall, B., Rahn, K., Mackinnon, J., Daignault, D., Pillai, D. & Ng, L. K. 2012. Comparison of molecular typing methods useful for detecting clusters of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates through routine surveillance. *J Clin Microbiol*, 50, 798-809.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; approved standard M31-S1*, Villanova, Pennsylvania.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. *CLSI-Microbiology* [Online]. Available: <http://www.clsi.org/Content/NavigationMenu/Committees/Microbiology/Microbiology.htm> [Accessed August 7th 2012].
- Cody, A. J., Maiden, M. J. & Dingle, K. E. 2009. Genetic diversity and stability of the *porA* allele as a genetic marker in human *Campylobacter* infection. *Microbiology*, 155, 4145-54.
- Cohn, M. T., Ingmer, H., Mulholland, F., Jorgensen, K., Wells, J. M. & Brondsted, L. 2007. Contribution of conserved ATP-dependent proteases of *Campylobacter jejuni* to stress tolerance and virulence. *Appl Environ Microbiol*, 73, 7803-13.
- Cole, K., Farnell, M. B., Donoghue, A. M., Stern, N. J., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. N., Volodina, L. I., Kovalev, Y. N., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Levchuk, V. P., Pokhilenko, V. D., Borzenkov, V. N., Svetoch, O. E., Kudryavtseva, T. Y., Reyes-Herrera, I., Blore, P. J., Solis de los Santos, F. & Donoghue, D. J. 2006. Bacteriocins reduce *Campylobacter* colonization and alter gut morphology in turkey poults. *Poult Sci*, 85, 1570-5.

- Conlan, A. J., Coward, C., Grant, A. J., Maskell, D. J. & Gog, J. R. 2007. *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens: a modelling perspective. *J R Soc Interface*, 4, 819-29.
- Coote, J. G., Stewart-Tull, D. E., Owen, R. J., Bolton, F. J., Siemer, B. L., Candlish, D., Thompson, D. H., Wardlaw, A. C., On, S. L., Candlish, A., Billcliffe, B., Jordan, P. J., Kristiansen, K. & Borman, P. 2007. Comparison of virulence-associated *in vitro* properties of typed strains of *Campylobacter jejuni* from different sources. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 722-32.
- Corcionivoschi, N., Clyne, M., Lyons, A., Elmi, A., Gundogdu, O., Wren, B. W., Dorrell, N., Karlyshev, A. V. & Bourke, B. 2009. *Campylobacter jejuni* cocultured with epithelial cells reduces surface capsular polysaccharide expression. *Infect Immun*, 77, 1959-67.
- Coward, C., van Diemen, P. M., Conlan, A. J., Gog, J. R., Stevens, M. P., Jones, M. A. & Maskell, D. J. 2008. Competing isogenic *Campylobacter* strains exhibit variable population structures *in vivo*. *Appl Environ Microbiol*, 74, 3857-67.
- Cox, N. A., Hofacre, C. L., Bailey, J. S., Buhr, R. J., Wilson, J. L., Hiett, K. L., Richardson, L. J., Musgrove, M. T., Cosby, D. E., Tankson, J. D., Vizzier, Y. L., Cray, P. F., Vaughn, L. E., Holt, P. S. & Bourassaa, D. V. 2005. Presence of *Campylobacter jejuni* in various organs one hour, one day, and one week following oral or intracloacal inoculations of broiler chicks. *Avian Dis*, 49, 155-8.
- Cox, N. A., Richardson, L. J., Buhr, R. J., Fedorka-Cray, P. J., Bailey, J. S., Wilson, J. L. & Hiett, K. L. 2006. Natural presence of *Campylobacter* spp. in various internal organs of commercial broiler breeder hens. *Avian Dis*, 50, 450-3.
- Cui, S., Ge, B., Zheng, J. & Meng, J. 2005. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in organic chickens from Maryland retail stores. *Appl Environ Microbiol*, 71, 4108-11.

- Davis, L. M., Kakuda, T. & DiRita, V. J. 2009. A *Campylobacter jejuni* *znuA* orthologue is essential for growth in low-zinc environments and chick colonization. *J Bacteriol*, 191, 1631-40.
- de Boer, P., Wagenaar, J. A., Achterberg, R. P., van Putten, J. P., Schouls, L. M. & Duim, B. 2002. Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity *in vivo*. *Mol Microbiol*, 44, 351-9.
- De, E., Jullien, M., Labesse, G., Pages, J. M., Molle, G. & Bolla, J. M. 2000. MOMP (major outer membrane protein) of *Campylobacter jejuni*; a versatile pore-forming protein. *FEBS Lett*, 469, 93-7.
- Dhillon, A. S., Shivaprasad, H. L., Schaberg, D., Wier, F., Weber, S. & Bandli, D. 2006. *Campylobacter jejuni* infection in broiler chickens. *Avian Dis*, 50, 55-8.
- Donhauser, S. C., Niessner, R. & Seidel, M. 2011. Sensitive quantification of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Campylobacter jejuni* by combining stopped polymerase chain reaction with chemiluminescence flow-through DNA microarray analysis. *Analytical Chemistry*, 83, 3153-60.
- Dozier, W. A., 3rd, Davis, A. J., Freeman, M. E. & Ward, T. L. 2003. Early growth and environmental implications of dietary zinc and copper concentrations and sources of broiler chicks. *Br Poult Sci*, 44, 726-31.
- Eberle, K. N. & Kiess, A. S. 2012. Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry. *Poult Sci*, 91, 255-64.
- European Food Safety Agency 2012. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal*, 10, 233.
- European Food Safety Agency 2011. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal*, 9, 141.

- Ehrenreich, A. 2006. DNA microarray technology for the microbiologist: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73, 255-73.
- El-Shibiny, A., Connerton, P. & Connerton, I. 2009a. Survival at refrigeration and freezing temperatures of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* on chicken skin applied as axenic and mixed inoculums. *Int J Food Microbiol*, 131, 197-202.
- El-Shibiny, A., Scott, A., Timms, A., Metawea, Y., Connerton, P. & Connerton, I. 2009b. Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. *J Food Prot*, 72, 733-40.
- Ellerbroek, L. I., Lienau, J. A. & Klein, G. 2010. *Campylobacter* spp. in broiler flocks at farm level and the potential for cross-contamination during slaughter. *Zoonoses Public Health*, 57, e81-8.
- Elliott, K. T. & Dirita, V. J. 2008. Characterization of CetA and CetB, a bipartite energy taxis system in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol*, 69, 1091-103.
- Elvers, K. T., Morris, V. K., Newell, D. G. & Allen, V. M. 2011. Molecular tracking, through processing, of *Campylobacter* strains colonizing broiler flocks. *Appl Environ Microbiol*, 77, 5722-9.
- Elviss, N. C., Williams, L. K., Jorgensen, F., Chisholm, S. A., Lawson, A. J., Swift, C., Owen, R. J., Griggs, D. J., Johnson, M. M., Humphrey, T. J. & Piddock, L. J. 2009. Amoxicillin therapy of poultry flocks: effect upon the selection of amoxicillin-resistant commensal *Campylobacter* spp. *J Antimicrob Chemother*, 64, 702-11.
104. Evans, S. J. & Sayers, A. R. 2000. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. *Prev Vet Med*, 46, 209-23.
- Éleveurs de volailles du Québec. 2012. *Les Éleveurs de volaille du Québec* [Online]. Available: <http://volaillesduquebec.qc.ca/fr> [Accessed August 7th 2012].

- Ewing, C. P., Andreishcheva, E. & Guerry, P. 2009. Functional characterization of flagellin glycosylation in *Campylobacter jejuni* 81-176. *J Bacteriol*, 191, 7086-93.
- Fernando, U., Biswas, D., Allan, B., Willson, P. & Potter, A. A. 2007. Influence of *Campylobacter jejuni* *fliA*, *rpoN* and *flgK* genes on colonization of the chicken gut. *Int J Food Microbiol*, 118, 194-200.
- Fernando, U., Biswas, D., Allan, B., Attah-Poku, S., Willson, P., Valdivieso-Garcia, A. & Potter, A. A. 2008. Serological assessment of synthetic peptides of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 FlaA protein using antibodies against multiple serotypes. *Med Microbiol Immunol*, 197, 45-53.
- Fitzgerald, C., Stanley, K., Andrew, S. & Jones, K. 2001. Use of pulsed-field gel electrophoresis and flagellin gene typing in identifying clonal groups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in farm and clinical environments. *Appl Environ Microbiol*, 67, 1429-36.
- Flanagan, R. C., Neal-McKinney, J. M., Dhillon, A. S., Miller, W. G. & Konkel, M. E. 2009. Examination of *Campylobacter jejuni* Putative Adhesins Leads to the Identification of a New Protein, Designated FlpA, Required for Chicken Colonization. *Infect Immun*, 77, 2399-2407.
- Flint, A., Butcher, J., Clarke, C., Marlow, D. & Stintzi, A. 2010. Use of a rabbit soft tissue chamber model to investigate *Campylobacter jejuni*-host interactions. *Front Microbiol*, 1, 126.
- Fineran, P. C. & Charpentier, E. 2012. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: Acquisition of new information. *Virology*, 434, 202-209.
- Food and Drug Administration. 2011. *Bacteriological Analytical Manual-Chapter 7-Campylobacter* [Online]. Available: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm072616.htm> [Accessed August 7th 2012].

- Food Safety and Inspection Service. 2011. Isolation, Identification and Enumeration of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse and Sponge Samples.
- Food Safety and Inspection Service. 2012. *FSIS HACCP Verification Campylobacter Results: July-December, 2011* [Online]. Available: http://www.fsis.usda.gov/science/HACCP_Verification_Campylobacter_Results_2011/index.asp [Accessed August 7th 2012].
- Fouts, D. E., Mongodin, E. F., Mandrell, R. E., Miller, W. G., Rasko, D. A., Ravel, J., Brinkac, L. M., DeBoy, R. T., Parker, C. T., Daugherty, S. C., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Madupu, R., Sullivan, S. A., Shetty, J. U., Ayodeji, M. A., Shvartsbeyn, A., Schatz, M. C., Badger, J. H., Fraser, C. M. & Nelson, K. E. 2005. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS Biol*, 3, e15.
- Fraser, R. W., Williams, N. T., Powell, L. F. & Cook, A. J. 2010. Reducing *Campylobacter* and *Salmonella* infection: two studies of the economic cost and attitude to adoption of on-farm biosecurity measures. *Zoonoses Public Health*, 57, e109-15.
- Friis, C., Wassenaar, T. M., Javed, M. A., Snipen, L., Lagesen, K., Hallin, P. F., Newell, D. G., Toszeghy, M., Ridley, A., Manning, G. & Ussery, D. W. 2010. Genomic characterization of *Campylobacter jejuni* strain M1. *PLoS One*, 5, e12253.
- Frye, J. G., Lindsey, R. L., Rondeau, G., Porwollik, S., Long, F., McClelland, M., Jackson, C. R., Englen, M. D., Meinersmann, R. J., Berrang, M. E., Davis, J. A., Barrett, J. B., Turpin, J. B., Thitaram, S. N. & Fedorka-Cray, P. J. 2010. Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the National Center for Biotechnology Information database. *Microb Drug Resist*, 16, 9-19.
- Gangaiah, D., Liu, Z., Arcos, J., Kassem, II, Sanad, Y., Torrelles, J. B. & Rajashekara, G. 2010. Polyphosphate kinase 2: a novel determinant of stress responses and pathogenesis in *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, 5, e12142.

- Garcia, V., Catala-Gregori, P., Hernandez, F., Megias, M. D. & Madrid, J. 2007. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 16, 555-562.
- Gardner, T. J., Fitzgerald, C., Xavier, C., Klein, R., Pruckler, J., Stroika, S. & McLaughlin, J. B. 2011. Outbreak of *Campylobacteriosis* associated with consumption of raw peas. *Clin Infect Dis*, 53, 26-32.
- Garenaux, A., Jugiau, F., Rama, F., de Jonge, R., Denis, M., Federighi, M. & Ritz, M. 2008. Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. *Curr Microbiol*, 56, 293-7.
- Gaynor, E. C., Wells, D. H., MacKichan, J. K. & Falkow, S. 2005. The *Campylobacter jejuni* stringent response controls specific stress survival and virulence-associated phenotypes. *Mol Microbiol*, 56, 8-27.
- Ge, B., McDermott, P. F., White, D. G. & Meng, J. 2005. Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 3347-54.
- Ghareeb, K., Awad, W. A., Mohnl, M., Porta, R., Biarnes, M., Bohm, J. & Schatzmayr, G. 2012. Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Poult Sci*, 91, 1825-32.
- Gibreel, A., Skold, O. & Taylor, D. E. 2004a. Characterization of plasmid-mediated *aphA-3* kanamycin resistance in *Campylobacter jejuni*. *Microb Drug Resist*, 10, 98-105.
- Gibreel, A., Tracz, D. M., Nonaka, L., Ngo, T. M., Connell, S. R. & Taylor, D. E. 2004b. Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to tet(O)-mediated tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 3442-50.
- Gillespie, I. A., O'Brien, S. J., Penman, C., Tompkins, D., Cowden, J. & Humphrey, T. J. 2008. Demographic determinants for *Campylobacter* infection in England and

- Wales: implications for future epidemiological studies. *Epidemiol Infect*, 136, 1717-25.
- Girard, V., Cote, J. P., Charbonneau, M. E., Campos, M., Berthiaume, F., Hancock, M. A., Siddiqui, N. & Mourez, M. 2010. Conformation change in a self-recognizing autotransporter modulates bacterial cell-cell interaction. *J Biol Chem*, 285, 10616-26.
- Golden, N. J. 2002. Identification of Motility and Autoagglutination *Campylobacter jejuni* Mutants by Random Transposon Mutagenesis. *Infect Immun*, 70, 1761-1771.
- Grant, C. C. R., Konkell, M. E., Cieplak, W. & Tompkins, L. S. 1993. Role of Flagella in Adherence, Internalization, and Translocation of *Campylobacter-Jejuni* in Nonpolarized and Polarized Epithelial-Cell Cultures. *Infect Immun*, 61, 1764-1771.
- Griggs, D. J., Peake, L., Johnson, M. M., Ghori, S., Mott, A. & Piddock, L. J. 2009. Beta-lactamase-mediated beta-lactam resistance in *Campylobacter* species: prevalence of Cj0299 (bla OXA-61) and evidence for a novel beta-Lactamase in *C. jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 3357-64.
- Gripp, E., Hlahla, D., Didelot, X., Kops, F., Maurischat, S., Tedin, K., Alter, T., Ellerbroek, L., Schreiber, K., Schomburg, D., Janssen, T., Bartholomaeus, P., Hofreuter, D., Woltemate, S., Uhr, M., Brenneke, B., Gruning, P., Gerlach, G., Wieler, L., Suerbaum, S. & Josenhans, C. 2011. Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. *BMC Genomics*, 12, 584.
- Guccione, E., Leon-Kempis Mdel, R., Pearson, B. M., Hitchin, E., Mulholland, F., van Diemen, P. M., Stevens, M. P. & Kelly, D. J. 2008. Amino acid-dependent growth of *Campylobacter jejuni*: key roles for aspartase (*AspA*) under microaerobic and oxygen-limited conditions and identification of *AspB* (Cj0762), essential for growth on glutamate. *Mol Microbiol*, 69, 77-93.

- Guerin, M. T., Martin, W., Reiersen, J., Berke, O., McEwen, S. A., Bisailon, J. R. & Lowman, R. 2007. A farm-level study of risk factors associated with the colonization of broiler flocks with *Campylobacter* spp. in Iceland, 2001-2004. *Acta Vet Scand*, 49, 18.
- Guerry, P., Ewing, C. P., Schirm, M., Lorenzo, M., Kelly, J., Pattarini, D., Majam, G., Thibault, P. & Logan, S. 2006. Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Mol Microbiol*, 60, 299-311.
- Guerry, P. 2007. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol*, 15, 456-61.
- Gundogdu, O., Mills, D. C., Elmi, A., Martin, M. J., Wren, B. W. & Dorrell, N. 2011. The *Campylobacter jejuni* transcriptional regulator Cj1556 plays a role in the oxidative and aerobic stress response and is important for bacterial survival *in vivo*. *J Bacteriol*, 193, 4238-49.
- Guo, B., Wang, Y., Shi, F., Barton, Y. W., Plummer, P., Reynolds, D. L., Nettleton, D., Grinnage-Pulley, T., Lin, J. & Zhang, Q. 2008. CmeR functions as a pleiotropic regulator and is required for optimal colonization of *Campylobacter jejuni* *in vivo*. *J Bacteriol*, 190, 1879-90.
- Gupta, A., Nelson, J. M., Barrett, T. J., Tauxe, R. V., Rossiter, S. P., Friedman, C. R., Joyce, K. W., Smith, K. E., Jones, T. F., Hawkins, M. A., Shiferaw, B., Beebe, J. L., Vugia, D. J., Rabatsky-Ehr, T., Benson, J. A., Root, T. P., Angulo, F. J. & Group, N. W. 2004. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997-2001. *Emerg Infect Dis*, 10, 1102-9.
- Habib, I., Uyttendaele, M. & De Zutter, L. 2011. Evaluation of ISO 10272:2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. *Food Microbiol*, 28, 1117-23.
- Haddock, G., Mullin, M., MacCallum, A., Sherry, A., Tetley, L., Watson, E., Dagleish, M., Smith, D. G. & Everest, P. 2010. *Campylobacter jejuni* 81-176 forms distinct

- microcolonies on *in vitro*-infected human small intestinal tissue prior to biofilm formation. *Microbiology*, 156, 3079-84.
- Hald, B., Skovgard, H., Pedersen, K. & Bunkenborg, H. 2008. Influxed insects as vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Danish broiler houses. *Poult Sci*, 87, 1428-34.
- Hall, S. J., Hitchcock, A., Butler, C. S. & Kelly, D. J. 2008. A Multicopper oxidase (Cj1516) and a CopA homologue (Cj1161) are major components of the copper homeostasis system of *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol*, 190, 8075-85.
- Hanel, I., Muller, J., Muller, W. & Schulze, F. 2004. Correlation between invasion of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter jejuni*. *Vet Microbiol*, 101, 75-82.
- Hanel, I., Borrmann, E., Muller, J., Muller, W., Pauly, B., Liebler-Tenorio, E. M. & Schulze, F. 2009. Genomic and phenotypic changes of *Campylobacter jejuni* strains after passage of the chicken gut. *Vet Microbiol*, 136, 121-9.
- Hanning, I., Biswas, D., Herrera, P., Roesler, M. & Ricke, S. C. 2010. Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* isolated from pasture flock poultry. *J Food Sci*, 75, M496-502.
- Hannon, S. J., Taboada, E. N., Russell, M. L., Allan, B., Waldner, C., Wilson, H. L., Potter, A., Babiuk, L. & Townsend, H. G. 2009. Genomics-based molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from feedlot cattle and from people in Alberta, Canada. *J Clin Microbiol*, 47, 410-20.
- Harada, K., Asai, T., Kojima, A., Sameshima, T. & Takahashi, T. 2006. Characterization of macrolide-resistant *Campylobacter coli* isolates from food-producing animals on farms across Japan during 2004. *J Vet Med Sci*, 68, 1109-11.
- Hartley-Tassell, L. E., Shewell, L. K., Day, C. J., Wilson, J. C., Sandhu, R., Ketley, J. M. & Korolik, V. 2010. Identification and characterization of the aspartate chemosensory receptor of *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol*, 75, 710-30.

- Hazelbauer, G. L., Falke, J. J. & Parkinson, J. S. 2008. Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem Sci*, 33, 9-19.
- Hazeleger, W. C., Bolder, N. M., Beumer, R. R. & Jacobs-Reitsma, W. F. 2008. Darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae as potential vectors for the transfer of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica* serovar paratyphi B variant Java between successive broiler flocks. *Appl Environ Microbiol*, 74, 6887-91.
- He, Y., Frye, J. G., Strobaugh, T. P. & Chen, C. Y. 2008. Analysis of AI-2/LuxS-dependent transcription in *Campylobacter jejuni* strain 81-176. *Foodborne Pathog Dis*, 5, 399-415.
- Heimesaat, M. M., Boelke, S., Fischer, A., Haag, L. M., Loddenkemper, C., Kuhl, A. A., Gobel, U. B. & Bereswill, S. 2012. Comprehensive postmortem analyses of intestinal microbiota changes and bacterial translocation in human flora associated mice. *PLoS One*, 7, e40758.
- Helms, M., Simonsen, J., Olsen, K. E. & Molbak, K. 2005. Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study. *J Infect Dis*, 191, 1050-5.
- Hendrixson, D. R., Akerley, B. J. & DiRita, V. J. 2001. Transposon mutagenesis of *Campylobacter jejuni* identifies a bipartite energy taxis system required for motility. *Mol Microbiol*, 40, 214-24.
- Hendrixson, D. R. & DiRita, V. J. 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Mol Microbiol*, 52, 471-84.
- Hendrixson, D. R. 2006. A phase-variable mechanism controlling the *Campylobacter jejuni* FlgR response regulator influences commensalism. *Mol Microbiol*, 61, 1646-59.
- Henry, I., Reichardt, J., Denis, M. & Cardinale, E. 2011. Prevalence and risk factors for *Campylobacter* spp. in chicken broiler flocks in Reunion Island (Indian Ocean). *Prev Vet Med*, 100, 64-70.

- Heres, L., Engel, B., Urlings, H. A., Wagenaar, J. A. & van Knapen, F. 2004. Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by *Campylobacter* and *Salmonella*. *Vet Microbiol*, 99, 259-67.
- Hermans, D., Martel, A., Van Deun, K., Verlinden, M., Van Immerseel, F., Garmyn, A., Messens, W., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F. & Pasmans, F. 2010. Intestinal mucus protects *Campylobacter jejuni* in the ceca of colonized broiler chickens against the bactericidal effects of medium-chain fatty acids. *Poult Sci*, 89, 1144-55.
- Hermans, D., Martel, A., van Deun, K., van Immerseel, F., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F. & Pasmans, F. 2011a. The cinnamon-oil ingredient trans-cinnamaldehyde fails to target *Campylobacter jejuni* strain KC 40 in the broiler chicken cecum despite marked *in vitro* activity. *J Food Prot*, 74, 1729-34.
- Hermans, D., Van Deun, K., Martel, A., Van Immerseel, F., Messens, W., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F. & Pasmans, F. 2011b. Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Vet Res*, 42.
- Hermans, D., Van Deun, K., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F., Rasschaert, G., Heyndrickx, M. & Pasmans, F. 2011C. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: urgent need for intensified fundamental research. *Vet Microbiol*, 152, 219-28.
- Hermans, D., Pasmans, F., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Rasschaert, G., Heyndrickx, M., Van Deun, K. & Haesebrouck, F. 2012. Poultry as a Host for the Zoonotic Pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12, 89-98.
- Heuer, O. E., Pedersen, K., Andersen, J. S. & Madsen, M. 2001. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. *Lett Appl Microbiol*, 33, 269-74.
- Hiett, K. L., Stintzi, A., Andacht, T. M., Kuntz, R. L. & Seal, B. S. 2008. Genomic differences between *Campylobacter jejuni* isolates identify surface membrane and

- flagellar function gene products potentially important for colonizing the chicken intestine. *Funct Integr Genomics*, 8, 407-20.
- Hitchcock, A., Hall, S. J., Myers, J. D., Mulholland, F., Jones, M. A. & Kelly, D. J. 2010. Roles of the twin-arginine translocase and associated chaperones in the biogenesis of the electron transport chains of the human pathogen *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 156, 2994-3010.
- Hitchen, P. G. & Dell, A. 2006. Bacterial glycoproteomics. *Microbiology*, 152, 1575-80.
- Hoang, K. V., Stern, N. J., Saxton, A. M., Xu, F., Zeng, X. & Lin, J. 2011. Prevalence, development, and molecular mechanisms of bacteriocin resistance in *Campylobacter*. *Appl Environ Microbiol*, 77, 2309-16.
- Hofreuter, D., Tsai, J., Watson, R. O., Novik, V., Altman, B., Benitez, M., Clark, C., Perbost, C., Jarvie, T., Du, L. & Galan, J. E. 2006. Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Infect Immun*, 74, 4694-707.
- Hofreuter, D., Novik, V. & Galan, J. E. 2008. Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. *Cell Host Microbe*, 4, 425-33.
- Holmes, K., Tavender, T. J., Winzer, K., Wells, J. M. & Hardie, K. R. 2009. AI-2 does not function as a quorum sensing molecule in *Campylobacter jejuni* during exponential growth *in vitro*. *BMC Microbiol*, 9, 214.
- Howard, S. L., Jagannathan, A., Soo, E. C., Hui, J. P., Aubry, A. J., Ahmed, I., Karlyshev, A., Kelly, J. F., Jones, M. A., Stevens, M. P., Logan, S. M. & Wren, B. W. 2009. *Campylobacter jejuni* glycosylation island important in cell charge, legionaminic acid biosynthesis, and colonization of chickens. *Infect Immun*, 77, 2544-56.
- Holzel, C. S., Muller, C., Harms, K. S., Mikolajewski, S., Schafer, S., Schwaiger, K. & Bauer, J. 2012. Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environ Res*, 113, 21-27.

- Hu, L. & Kopecko, D. J. 1999. *Campylobacter jejuni* 81-176 associates with microtubules and dynein during invasion of human intestinal cells. *Infect Immun*, 67, 4171-82.
- Hu, L., McDaniel, J. P. & Kopecko, D. J. 2006. Signal transduction events involved in human epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni* 81-176. *Microb Pathog*, 40, 91-100.
- Hu, L., Tall, B. D., Curtis, S. K. & Kopecko, D. J. 2008. Enhanced microscopic definition of *Campylobacter jejuni* 81-176 adherence to, invasion of, translocation across, and exocytosis from polarized human intestinal Caco-2 cells. *Infect Immun*, 76, 5294-304.
- Huang, J. L., Yin, Y. X., Pan, Z. M., Zhang, G., Zhu, A. P., Liu, X. F. & Jiao, X. A. 2010. Intranasal immunization with chitosan/pCAGGS-flaA nanoparticles inhibits *Campylobacter jejuni* in a White Leghorn model. *J Biomed Biotechnol*, 2010.
- Huang, S., Sahin, O. & Zhang, Q. 2007. Infection-induced antibodies against the major outer membrane protein of *Campylobacter jejuni* mainly recognize conformational epitopes. *FEMS Microbiol Lett*, 272, 137-43.
- Hugdahl, M. B., Beery, J. T. & Doyle, M. P. 1988. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*, 56, 1560-6.
- Hurd, S., Patrick, M., Hatch, J., Clogher, P., Wymore, K., Cronquist, A. B., Segler, S., Robinson, T., Hanna, S., Smith, G. & Fitzgerald, C. 2012. Clinical laboratory practices for the isolation and identification of *Campylobacter* in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) sites: baseline information for understanding changes in surveillance data. *Clin Infect Dis*, 54 Suppl 5, S440-5.
- Inglis, G. D. & Kalischuk, L. D. 2003. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Appl Environ Microbiol*, 69, 3435-47.
- Irving Nachamkin, C. M. S., Martin J. Blaser 2008. *Campylobacter*, 3rd Edition. ASM Press.

- Islam, A., Raghupathy, R. & Albert, M. J. 2010. Recombinant PorA, the major outer membrane protein of *Campylobacter jejuni*, provides heterologous protection in an adult mouse intestinal colonization model. *Clin Vaccine Immunol*, 17, 1666-71.
- Javed, M. A., Cawthraw, S. A., Baig, A., Li, J., McNally, A., Oldfield, N. J., Newell, D. G. & Manning, G. 2012. Cj1136 is required for lipooligosaccharide biosynthesis, hyperinvasion, and chick colonization by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*, 80, 2361-70.
- Jennings, J. L., Sait, L. C., Perrett, C. A., Foster, C., Williams, L. K., Humphrey, T. J. & Cogan, T. A. 2011. *Campylobacter jejuni* is associated with, but not sufficient to cause vibronic hepatitis in chickens. *Vet Microbiol*, 149, 193-9.
- Jeon, B., Itoh, K., Misawa, N. & Ryu, S. 2003. Effects of quorum sensing on *flaA* transcription and autoagglutination in *Campylobacter jejuni*. *Microbiol Immunol*, 47, 833-9.
- Jeon, B., Muraoka, W., Sahin, O. & Zhang, Q. 2008. Role of Cj1211 in natural transformation and transfer of antibiotic resistance determinants in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2699-708.
- Jeon, B., Muraoka, W., Scupham, A. & Zhang, Q. 2009. Roles of lipooligosaccharide and capsular polysaccharide in antimicrobial resistance and natural transformation of *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother*, 63, 462-8.
- Jeon, B., Muraoka, W. T. & Zhang, Q. 2010. Advances in *Campylobacter* biology and implications for biotechnological applications. *Microb Biotechnol*, 3, 242-58.
- Jeon, B., Wang, Y., Hao, H., Barton, Y. W. & Zhang, Q. 2011. Contribution of CmeG to antibiotic and oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother*, 66, 79-85.

- John, A., Connerton, P. L., Cummings, N. & Connerton, I. F. 2011. Profound differences in the transcriptome of *Campylobacter jejuni* grown in two different, widely used, microaerobic atmospheres. *Res Microbiol*, 162, 410-8.
- Johny, A. K., Darre, M. J., Donoghue, A. M., Donoghue, D. J. & Venkitanarayanan, K. 2010. Antibacterial effect of trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, and thymol on *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents *in vitro*. *Journal of Applied Poultry Research*, 19, 237-244.
- Jones, M. A., Marston, K. L., Woodall, C. A., Maskell, D. J., Linton, D., Karlyshev, A. V., Dorrell, N., Wren, B. W. & Barrow, P. A. 2004. Adaptation of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 to high-level colonization of the avian gastrointestinal tract. *Infect Immun*, 72, 3769-76.
- Joshua, G. W., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A. V. & Wren, B. W. 2006. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 152, 387-96.
- Joslin, S. N. & Hendrixson, D. R. 2009. Activation of the *Campylobacter jejuni* FlgSR two-component system is linked to the flagellar export apparatus. *J Bacteriol*, 191, 2656-67.
- Kaakoush, N. O., Raftery, M. & Mendz, G. L. 2008. Molecular responses of *Campylobacter jejuni* to cadmium stress. *FEBS J*, 275, 5021-33.
- Kakuda, T. & DiRita, V. J. 2006. Cj1496c encodes a *Campylobacter jejuni* glycoprotein that influences invasion of human epithelial cells and colonization of the chick gastrointestinal tract. *Infect Immun*, 74, 4715-23.
- Kalischuk, L. D., Leggett, F. & Inglis, G. D. 2010. *Campylobacter jejuni* induces transcytosis of commensal bacteria across the intestinal epithelium through M-like cells. *Gut Pathog*, 2, 14.

- Kamal, N., Dorrell, N., Jagannathan, A., Turner, S. M., Constantinidou, C., Studholme, D. J., Marsden, G., Hinds, J., Laing, K. G., Wren, B. W. & Penn, C. W. 2007. Deletion of a previously uncharacterized flagellar-hook-length control gene *fliK* modulates the sigma54-dependent regulon in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 153, 3099-111.
- Kanungpean, D., Kakuda, T. & Takai, S. 2011a. False positive responses of *Campylobacter jejuni* when using the chemical-in-plug chemotaxis assay. *J Vet Med Sci*, 73, 389-91.
- Kanungpean, D., Kakuda, T. & Takai, S. 2011b. Participation of CheR and CheB in the chemosensory response of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 157, 1279-89.
- Karlyshev, A. V., Linton, D., Gregson, N. A., Lastovica, A. J. & Wren, B. W. 2000. Genetic and biochemical evidence of a *Campylobacter jejuni* capsular polysaccharide that accounts for Penner serotype specificity. *Mol Microbiol*, 35, 529-41.
- Karlyshev, A. V., Linton, D., Gregson, N. A. & Wren, B. W. 2002. A novel paralogous gene family involved in phase-variable flagella-mediated motility in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 148, 473-80.
- Karlyshev, A. V., Everest, P., Linton, D., Cawthraw, S., Newell, D. G. & Wren, B. W. 2004. The *Campylobacter jejuni* general glycosylation system is important for attachment to human epithelial cells and in the colonization of chicks. *Microbiology*, 150, 1957-64.
- Karlyshev, A. V., Champion, O. L., Churcher, C., Brisson, J. R., Jarrell, H. C., Gilbert, M., Brochu, D., St Michael, F., Li, J., Wakarchuk, W. W., Goodhead, I., Sanders, M., Stevens, K., White, B., Parkhill, J., Wren, B. W. & Szymanski, C. M. 2005. Analysis of *Campylobacter jejuni* capsular loci reveals multiple mechanisms for the generation of structural diversity and the ability to form complex heptoses. *Mol Microbiol*, 55, 90-103.

- Kawatsu, K., Taguchi, M., Yonekita, T., Matsumoto, T., Morimatsu, F. & Kumeda, Y. 2010. Simple and rapid detection of *Campylobacter* spp. in naturally contaminated chicken-meat samples by combination of a two-step enrichment method with an immunochromatographic assay. *Int J Food Microbiol*, 142, 256-9.
- Kelana, L. C. & Griffiths, M. W. 2003. Use of an autobioluminescent *Campylobacter jejuni* to monitor cell survival as a function of temperature, pH, and sodium chloride. *J Food Prot*, 66, 2032-7.
- Kiess, A. S., Parker, H. M. & McDaniel, C. D. 2010. Evaluation of different selective media and culturing techniques for the quantification of *Campylobacter* spp. from broiler litter. *Poult Sci*, 89, 1755-62.
- Kilcoyne, M., Gerlach, J. Q., Gough, R., Gallagher, M. E., Kane, M., Carrington, S. D. & Joshi, L. 2012. Construction of a natural mucin microarray and interrogation for biologically relevant glyco-epitopes. *Analytical Chemistry*, 84, 3330-8.
- Kim, J. S., Artymovich, K. A., Hall, D. F., Smith, E. J., Fulton, R., Bell, J., Dybas, L., Mansfield, L. S., Tempelman, R., Wilson, D. L. & Linz, J. E. 2012. Passage of *Campylobacter jejuni* through the chicken reservoir or mice promotes phase variation in contingency genes Cj0045 and Cj0170 that strongly associates with colonization and disease in a mouse model. *Microbiology*, 158, 1304-16.
- Kinana, A. D., Cardinale, E., Bahsoun, I., Tall, F., Sire, J. M., Garin, B., Boye, C. S., Dromigny, J. A. & Perrier-Gros-Claude, J. D. 2007. Analysis of topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant and -susceptible *Campylobacter jejuni* strains isolated in Senegal. *Int J Antimicrob Agents*, 29, 397-401.
- King, R. M., Day, C. J., Hartley-Tassell, L. E., Connerton, I. F., Tiralongo, J., McGuckin, M. A. & Korolik, V. 2012. Carbohydrate binding and gene expression by *in vitro* and *in vivo* propagated *Campylobacter jejuni* after Immunomagnetic Separation. *J Basic Microbiol*.

- Kirkpatrick, B. D. & Tribble, D. R. 2011. Update on human *Campylobacter jejuni* infections. *Curr Opin Gastroenterol*, 27, 1-7.
- Kizerwetter-Swida, M. & Binek, M. 2009. Protective effect of potentially probiotic *Lactobacillus* strain on infection with pathogenic bacteria in chickens. *Pol J Vet Sci*, 12, 15-20.
- Kobayashi, I. 2001. Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res*, 29, 3742-56.
- Koga, M., Gilbert, M., Takahashi, M., Li, J., Koike, S., Hirata, K. & Yuki, N. 2006. Comprehensive analysis of bacterial risk factors for the development of Guillain-Barre syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Infect Dis*, 193, 547-55.
- Konkel, M. E., Kim, B. J., Klena, J. D., Young, C. R. & Ziprin, R. 1998. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*, 66, 3666-72.
- Konkel, M. E., Kim, B. J., Rivera-Amill, V. & Garvis, S. G. 1999. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Mol Microbiol*, 32, 691-701.
- Konkel, M. E., Christensen, J. E., Dhillon, A. S., Lane, A. B., Hare-Sanford, R., Schaberg, D. M. & Larson, C. L. 2007. *Campylobacter jejuni* strains compete for colonization in broiler chicks. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2297-2305.
- Kopecko, D. J., Hu, L. & Zaal, K. J. 2001. *Campylobacter jejuni*--microtubule-dependent invasion. *Trends Microbiol*, 9, 389-96.
- Kostic, T., Weilharter, A., Rubino, S., Delogu, G., Uzzau, S., Rudi, K., Sessitsch, A. & Bodrossy, L. 2007. A microbial diagnostic microarray technique for the sensitive detection and identification of pathogenic bacteria in a background of nonpathogens. *Anal Biochem*, 360, 244-54.

- Kudirkiene, E., Malakauskas, M., Malakauskas, A., Bojesen, A. M. & Olsen, J. E. 2010. Demonstration of persistent strains of *Campylobacter jejuni* within broiler farms over a 1-year period in Lithuania. *J Appl Microbiol*, 108, 868-77.
- Kurekci, C., Bishop-Hurley, S. L., Vercoe, P. E., Durmic, Z., Al Jassim, R. A. & McSweeney, C. S. 2012. Screening of Australian plants for antimicrobial activity against *Campylobacter jejuni*. *Phytother Res*, 26, 186-90.
- Kusumaningrum, H. D., van Asselt, E. D., Beumer, R. R. & Zwietering, M. H. 2004. A quantitative analysis of cross-contamination of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. via domestic kitchen surfaces. *J Food Prot*, 67, 1892-903.
- Ladely, S. R., Harrison, M. A., Fedorka-Cray, P. J., Berrang, M. E., Englen, M. D. & Meinersmann, R. J. 2007. Development of macrolide-resistant *Campylobacter* in broilers administered subtherapeutic or therapeutic concentrations of tylosin. *J Food Prot*, 70, 1945-51.
- Laisney, M. J., Gillard, M. O. & Salvat, G. 2004. Influence of bird strain on competitive exclusion of *Campylobacter jejuni* in young chicks. *Br Poult Sci*, 45, 49-54.
- Law, B. F., Adriance, S. M. & Joens, L. A. 2009. Comparison of *in vitro* virulence factors of *Campylobacter jejuni* to *in vivo* lesion production. *Foodborne Pathog Dis*, 6, 377-85.
- Lawes, J. R., Vidal, A., Clifton-Hadley, F. A., Sayers, R., Rodgers, J., Snow, L., Evans, S. J. & Powell, L. F. 2012. Investigation of prevalence and risk factors for *Campylobacter* in broiler flocks at slaughter: results from a UK survey. *Epidemiol Infect*, 1-13.
- Layton, S. L., Morgan, M. J., Cole, K., Kwon, Y. M., Donoghue, D. J., Hargis, B. M. & Pumford, N. R. 2011. Evaluation of *Salmonella*-vectored *Campylobacter* peptide epitopes for reduction of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Clin Vaccine Immunol*, 18, 449-54.

- Leblanc-Maridor, M., Beaudou, F., Seegers, H., Denis, M. & Belloc, C. 2011. Rapid identification and quantification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by real-time PCR in pure cultures and in complex samples. *BMC Microbiol*, 11, 113.
- Lehtopolku, M., Kotilainen, P., Puukka, P., Nakari, U. M., Siitonen, A., Eerola, E., Huovinen, P. & Hakanen, A. J. 2012. Inaccuracy of the disk diffusion method compared with the Agar dilution method for susceptibility testing of *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol*, 50, 52-6.
- Leon-Kempis Mdel, R., Guccione, E., Williamson, M. & Kelly, D. J. The *Campylobacter jejuni* PEB1a adhesin is an aspartate/glutamate-binding protein of an ABC transporter essential for microaerobic growth on dicarboxylic amino acids.
- Lertsethtakarn, P., Ottemann, K. M. & Hendrixson, D. R. 2011. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu Rev Microbiol*, 65, 389-410.
- Letowski, J., Brousseau, R. & Masson, L. 2004. Designing better probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays. *J Microbiol Methods*, 57, 269-78.
- Lin, J., Michel, L. O. & Zhang, Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 2124-31.
- Lin, J., Akiba, M., Sahin, O. & Zhang, Q. 2005. CmeR functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 1067-75.
- Lin, J. & Martinez, A. 2006. Effect of efflux pump inhibitors on bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother*, 58, 966-72.
- Line, J., Hiett, K. & Conlan, A. 2008. Comparison of challenge models for determining the colonization dose of *Campylobacter jejuni* in broiler chicks. *Poult Sci*, 87, 1700-6.

- Line, J., Hielt, K., Guard, J. & Seal, B. 2011. Temperature affects sole carbon utilization patterns of *Campylobacter coli* 49941. *Curr Microbiol*, 62, 821-5.
- Line, J. E., Hielt, K. L., Guard-Bouldin, J. & Seal, B. S. 2010. Differential carbon source utilization by *Campylobacter jejuni* 11168 in response to growth temperature variation. *J Microbiol Methods*, 80, 198-202.
- Lior, H., Woodward, D. L., Edgar, J. A., Laroche, L. J. & Gill, P. 1982. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J Clin Microbiol*, 15, 761-8.
- Liu, L., Hussain, S. K., Miller, R. S. & Oyarzabal, O. A. 2009. Efficacy of mini VIDAS for the detection of *Campylobacter* spp. from retail broiler meat enriched in Bolton broth, with or without the supplementation of blood. *J Food Prot*, 72, 2428-32.
- Logan, S. M., Kelly, J. F., Thibault, P., Ewing, C. P. & Guerry, P. 2002. Structural heterogeneity of carbohydrate modifications affects serospecificity of *Campylobacter* flagellins. *Mol Microbiol*, 46, 587-97.
- Logan, S. M., Hui, J. P., Vinogradov, E., Aubry, A. J., Melanson, J. E., Kelly, J. F., Nothaft, H. & Soo, E. C. 2009. Identification of novel carbohydrate modifications on *Campylobacter jejuni* 11168 flagellin using metabolomics-based approaches. *FEBS J*, 276, 1014-23.
- Luangtongkum, T., Morishita, T. Y., Ison, A. J., Huang, S., McDermott, P. F. & Zhang, Q. 2006. Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. *Appl Environ Microbiol*, 72, 3600-7.
- Luangtongkum, T., Jeon, B., Han, J., Plummer, P., Logue, C. M. & Zhang, Q. 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol*, 4, 189-200.

- Luangtongkum, T., Shen, Z., Seng, V. W., Sahin, O., Jeon, B., Liu, P. & Zhang, Q. 2012. Impaired fitness and transmission of macrolide-resistant *Campylobacter jejuni* in its natural host. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 1300-8.
- Luber, P., Bartelt, E., Genschow, E., Wagner, J. & Hahn, H. 2003. Comparison of broth microdilution, E Test, and Agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol*, 41, 1062-8.
- Lyngstad, T. M., Jonsson, M. E., Hofshagen, M. & Heier, B. T. 2008. Risk factors associated with the presence of *Campylobacter* species in Norwegian broiler flocks. *Poult Sci*, 87, 1987-94.
- MacKichan, J. K., Gaynor, E. C., Chang, C., Cawthraw, S., Newell, D. G., Miller, J. F. & Falkow, S. 2004. The *Campylobacter jejuni* dccRS two-component system is required for optimal *in vivo* colonization but is dispensable for *in vitro* growth. *Mol Microbiol*, 54, 1269-86.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. & Spratt, B. G. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3140-5.
- Malagon, I., Garcia, S. & Heredia, N. 2010. Adherence, invasion, toxigenic, and chemotactic properties of Mexican *Campylobacter* strains. *J Food Prot*, 73, 2093-8.
- Malik-Kale, P., Raphael, B. H., Parker, C. T., Joens, L. A., Klena, J. D., Quinones, B., Keech, A. M. & Konkel, M. E. 2007. Characterization of genetically matched isolates of *Campylobacter jejuni* reveals that mutations in genes involved in flagellar biosynthesis alter the organism's virulence potential. *Appl Environ Microbiol*, 73, 3123-36.
- Malik-Kale, P., Parker, C. T. & Konkel, M. E. 2008. Culture of *Campylobacter jejuni* with sodium deoxycholate induces virulence gene expression. *J Bacteriol*, 190, 2286-97.

- Man, S. M. 2011. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8, 669-85.
- Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec. 2012. Bilan annuel 2010-2011 - Toxi-infections alimentaires.
- Marchant, J., Wren, B. & Ketley, J. 2002. Exploiting genome sequence: predictions for mechanisms of *Campylobacter* chemotaxis. *Trends Microbiol*, 10, 155-9.
- Marotta, F., Zilli, K., Tonelli, A., Sacchini, L., Alessiani, A., Migliorati, G. & Di Giannatale, E. 2012. Detection and Genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Use of DNA Oligonucleotide Arrays. *Mol Biotechnol*.
- Mayr, A. M., Lick, S., Bauer, J., Tharigen, D., Busch, U. & Huber, I. 2010. Rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in food, using multiplex real-time PCR. *J Food Prot*, 73, 241-50.
- McDowell, S. W., Menzies, F. D., McBride, S. H., Oza, A. N., McKenna, J. P., Gordon, A. W. & Neill, S. D. 2008. *Campylobacter* spp. in conventional broiler flocks in Northern Ireland: epidemiology and risk factors. *Prev Vet Med*, 84, 261-76.
- McGill, K., Kelly, L., Madden, R. H., Moran, L., Carroll, C., O'Leary, A., Moore, J. E., McNamara, E., O'Mahony, M., Fanning, S. & Whyte, P. 2009. Comparison of disc diffusion and epsilometer (E-test) testing techniques to determine antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* isolates of food and human clinical origin. *J Microbiol Methods*, 79, 238-41.
- McIver, C., Hogan, T., White, P. & Tapsall, J. 2004. Patterns of quinolone susceptibility in *Campylobacter jejuni* associated with different *gyrA* mutations. *Pathology*, 36, 166-9.

- McKay, D., Fletcher, J., Cooper, P. & Thomson-Carter, F. M. 2001. Comparison of two methods for serotyping *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol*, 39, 1917-21.
- Mdegela, R. H., Nonga, H. E., Ngowi, H. A. & Kazwala, R. R. 2006. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* infections in humans, chickens and crows in Morogoro, Tanzania. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 53, 116-21.
- Metcalf, J. H., Donoghue, A. M., Venkitanarayanan, K., Reyes-Herrera, I., Aguiar, V. F., Blore, P. J. & Donoghue, D. J. 2011. Water administration of the medium-chain fatty acid caprylic acid produced variable efficacy against enteric *Campylobacter* colonization in broilers. *Poult Sci*, 90, 494-7.
- Metcalf, B. & Bell, D. J. 1971. *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*, 4ieme édition, Toronto, London ; Academic Press.
- Miller, R. S., Speegle, L., Oyarzabal, O. A. & Lastovica, A. J. 2008. Evaluation of three commercial latex agglutination tests for identification of *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol*, 46, 3546-7.
- Miller, W. G., On, S. L., Wang, G., Fontanoz, S., Lastovica, A. J. & Mandrell, R. E. 2005. Extended multilocus sequence typing system for *Campylobacter coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. helveticus*. *J Clin Microbiol*, 43, 2315-29.
- Misawa, N. & Blaser, M. J. 2000. Detection and characterization of autoagglutination activity by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*, 68, 6168-75.
- Moen, B., Oust, A., Langsrud, O., Dorrell, N., Marsden, G. L., Hinds, J., Kohler, A., Wren, B. W. & Rudi, K. 2005. Explorative multifactor approach for investigating global survival mechanisms of *Campylobacter jejuni* under environmental conditions. *Appl Environ Microbiol*, 71, 2086-94.
- Moen, B., Rudi, K., Svihus, B. & Skanseng, B. 2012. Reduced spread of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens by stimulating the bird's natural barriers. *J Appl Microbiol*.

- Molatova, Z., Skrivanova, E., Macias, B., McEwan, N. R., Brezina, P. & Marounek, M. 2010. Susceptibility of *Campylobacter jejuni* to organic acids and monoacylglycerols. *Folia Microbiol (Praha)*, 55, 215-20.
- Molatova, Z., Skrivanova, E., Bare, J., Houf, K., Bruggeman, G. & Marounek, M. 2011. Effect of coated and non-coated fatty acid supplementation on broiler chickens experimentally infected with *Campylobacter jejuni*. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 95, 701-6.
- Moran, A. P. & Penner, J. L. 1999. Serotyping of *Campylobacter jejuni* based on heat-stable antigens: relevance, molecular basis and implications in pathogenesis. *J Appl Microbiol*, 86, 361-77.
- Moran, L., Kelly, C., Cormican, M., McGettrick, S. & Madden, R. H. 2011. Restoring the selectivity of Bolton broth during enrichment for *Campylobacter* spp. from raw chicken. *Lett Appl Microbiol*, 52, 614-8.
- Moser, I., Schroeder, W. & Salnikow, J. 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, 233-8.
- Murray, N. E. 2000. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 412-34.
- Myers, J. D. & Kelly, D. J. 2005. A sulphite respiration system in the chemoheterotrophic human pathogen *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 151, 233-42.
- Nadeau, E., Messier, S. & Quessy, S. 2002. Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans. *J Food Prot*, 65, 73-8.
- Nannapaneni, R., Chalova, V. I., Crandall, P. G., Ricke, S. C., Johnson, M. G. & O'Bryan, C. A. 2009. *Campylobacter* and *Arcobacter* species sensitivity to commercial orange oil fractions. *Int J Food Microbiol*, 129, 43-9.

- National Antimicrobials Monitoring System. 2012. NARMS Retail Meat Annual Report, 2010.
- Nather, G., Alter, T., Martin, A. & Ellerbroek, L. 2009. Analysis of risk factors for *Campylobacter* species infection in broiler flocks. *Poult Sci*, 88, 1299-305.
- Nauta, M., Hill, A., Rosenquist, H., Brynestad, S., Fetsch, A., van der Logt, P., Fazil, A., Christensen, B., Katsma, E., Borck, B. & Havelaar, A. 2009. A comparison of risk assessments on *Campylobacter* in broiler meat. *Int J Food Microbiol*, 129, 107-23.
- Nelson, J. M., Smith, K. E., Vugia, D. J., Rabatsky-Ehr, T., Segler, S. D., Kassenborg, H. D., Zansky, S. M., Joyce, K., Marano, N., Hoekstra, R. M. & Angulo, F. J. 2004. Prolonged diarrhea due to ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* infection. *J Infect Dis*, 190, 1150-7.
- Nemelka, K. W., Brown, A. W., Wallace, S. M., Jones, E., Asher, L. V., Pattarini, D., Applebee, L., Gilliland, T. C., Jr., Guerry, P. & Baqar, S. 2009. Immune response to and histopathology of *Campylobacter jejuni* infection in ferrets (*Mustela putorius furo*). *Comp Med*, 59, 363-71.
- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 593-656.
- Normand, V., Boulianne, M. & Quessy, S. 2008. Evidence of cross-contamination by *Campylobacter* spp. of broiler carcasses using genetic characterization of isolates. *Can J Vet Res*, 72, 396-402.
- Novik, V., Hofreuter, D. & Galan, J. E. 2010. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in its interaction with epithelial cells. *Infect Immun*, 78, 3540-53.
- Nuijten, P. J., van Asten, F. J., Gaastra, W. & van der Zeijst, B. A. 1990. Structural and functional analysis of two *Campylobacter jejuni* flagellin genes. *J Biol Chem*, 265, 17798-804.

- Oakley, B. B., Morales, C. A., Line, J. E., Seal, B. S. & Hiett, K. L. 2012. Application of high-throughput sequencing to measure the performance of commonly used selective cultivation methods for the foodborne pathogen *Campylobacter*. *FEMS Microbiol Ecol*, 79, 327-36.
- Odongo, R., Reilly, S. S. & Gilliland, S. E. 2009. Validation of an improved method for detection of *Campylobacter jejuni* in foods. *J Food Sci*, 74, M207-12.
- Organisation mondiale de la santé animale. 2008. OIE Terrestrial Manual 2008-CH A P T E R 2 . 9 . 3 .-*Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.
- Oxoid. 2012. *Campylobacter selective media* [Online]. Available: http://www.oxoid.com/CA/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0689&c=CA&lang=EN&minfo=Y [Accessed August 7th 2012].
- Oyarzabal, O. A., Rad, R. & Backert, S. 2007. Conjugative transfer of chromosomally encoded antibiotic resistance from *Helicobacter pylori* to *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*, 45, 402-8.
- Pajaniappan, M., Hall, J. E., Cawthraw, S. A., Newell, D. G., Gaynor, E. C., Fields, J. A., Rathbun, K. M., Agee, W. A., Burns, C. M., Hall, S. J., Kelly, D. J. & Thompson, S. A. 2008. A temperature-regulated *Campylobacter jejuni* gluconate dehydrogenase is involved in respiration-dependent energy conservation and chicken colonization. *Mol Microbiol*, 68, 474-91.
- Palyada, K., Threadgill, D. & Stintzi, A. 2004. Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol*, 186, 4714-29.
- Palyada, K., Sun, Y. Q., Flint, A., Butcher, J., Naikare, H. & Stintzi, A. 2009. Characterization of the oxidative stress stimulon and PerR regulon of *Campylobacter jejuni*. *BMC Genomics*, 10, 481.
- Park, S. F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol*, 74, 177-88.

- 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. & Barrell, B. G. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403, 665-8.
- Pearson, B. M., Gaskin, D. J., Segers, R. P., Wells, J. M., Nuijten, P. J. & van Vliet, A. H. 2007. The complete genome sequence of *Campylobacter jejuni* strain 81116 (NCTC11828). *J Bacteriol*, 189, 8402-3.
- Pei, Z. & Blaser, M. J. 1993. PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in gram-negative nutrient transport systems. *J Biol Chem*, 268, 18717-25.
- Penner, J. L. & Hennessy, J. N. 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J Clin Microbiol*, 12, 732-7.
- Perez-Boto, D., Garcia-Pena, F. J., Abad-Moreno, J. C. & Echeita, M. A. 2012a. Dynamics of populations of *Campylobacter jejuni* in two grandparent broiler breeder farms: Persistent vs. transient strains. *Vet Microbiol*. Epub.
- Perez-Boto, D., Garcia-Pena, F. J., Abad-Moreno, J. C. & Echeita, M. A. 2012b. Dynamics of populations of *Campylobacter jejuni* in two grandparent broiler breeder farms: Persistent vs. transient strains. *Vet Microbiol*, 159, 204-11.
- Poli, V. F., Thorsen, L., Olesen, I., Wik, M. T. & Jespersen, L. 2012. Differentiation of the virulence potential of *Campylobacter jejuni* strains by use of gene transcription analysis and a Caco-2 assay. *Int J Food Microbiol*, 155, 60-8.
- Pope, C., Wilson, J., Taboada, E. N., Mackinnon, J., Felipe Alves, C. A., Nash, J. H., Rahn, K. & Tannock, G. W. 2007. Epidemiology, relative invasive ability, molecular

- characterization, and competitive performance of *Campylobacter jejuni* strains in the chicken gut. *Appl Environ Microbiol*, 73, 7959-66.
- Poropatich, K. O., Walker, C. L. & Black, R. E. 2010. Quantifying the association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barre syndrome: a systematic review. *J Health Popul Nutr*, 28, 545-52.
- Potturi-Venkata, L. P., Backert, S., Lastovica, A. J., Vieira, S. L., Norton, R. A., Miller, R. S., Pierce, S. & Oyarzabal, O. A. 2007. Evaluation of different plate media for direct cultivation of *Campylobacter* species from live broilers. *Poult Sci*, 86, 1304-11.
- Quinn, T., Bolla, J. M., Pages, J. M. & Fanning, S. 2007. Antibiotic-resistant *Campylobacter*: could efflux pump inhibitors control infection? *J Antimicrob Chemother*, 59, 1230-6.
- Quinones, B., Parker, C. T., Janda, J. M., Jr., Miller, W. G. & Mandrell, R. E. 2007. Detection and genotyping of *Arcobacter* and *Campylobacter* isolates from retail chicken samples by use of DNA oligonucleotide arrays. *Appl Environ Microbiol*, 73, 3645-55.
- Quinones, B., Guilhabert, M. R., Miller, W. G., Mandrell, R. E., Lastovica, A. J. & Parker, C. T. 2008. Comparative genomic analysis of clinical strains of *Campylobacter jejuni* from South Africa. *PLoS One*, 3, e2015.
- Quinones, B., Miller, W. G., Bates, A. H. & Mandrell, R. E. 2009. Autoinducer-2 production in *Campylobacter jejuni* contributes to chicken colonization. *Appl Environ Microbiol*, 75, 281-5.
- Racicot, M., Venne, D., Durivage, A. & Vaillancourt, J. P. 2011. Description of 44 biosecurity errors while entering and exiting poultry barns based on video surveillance in Quebec, Canada. *Prev Vet Med*, 100, 193-9.

- Racicot, M., Venne, D., Durivage, A. & Vaillancourt, J. P. 2012. Evaluation of strategies to enhance biosecurity compliance on poultry farms in Quebec: effect of audits and cameras. *Prev Vet Med*, 103, 208-18.
- Rajashekara, G., Drozd, M., Gangaiah, D., Jeon, B., Liu, Z. & Zhang, Q. 2009. Functional characterization of the twin-arginine translocation system in *Campylobacter jejuni*. *Foodborne Pathog Dis*, 6, 935-45.
- Raphael, B. H., Pereira, S., Flom, G. A., Zhang, Q. J., Ketley, J. M. & Konkel, M. E. 2005. The *Campylobacter jejuni* response regulator, CbrR, modulates sodium deoxycholate resistance and chicken colonization. *J Bacteriol*, 187, 3662-3670.
- Refregier-Petton, J., Rose, N., Denis, M. & Salvat, G. 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.
- Reid, A. N., Pandey, R., Palyada, K., Whitworth, L., Doukhanine, E. & Stintzi, A. 2008. Identification of *Campylobacter jejuni* genes contributing to acid adaptation by transcriptional profiling and genome-wide mutagenesis. *Appl Environ Microbiol*, 74, 1598-612.
- Ridley, A. M., Toszeghy, M. J., Cawthraw, S. A., Wassenaar, T. M. & Newell, D. G. 2008. Genetic instability is associated with changes in the colonization potential of *Campylobacter jejuni* in the avian intestine. *J Appl Microbiol*, 105, 95-104.
- Riedel, C. T., Cohn, M. T., Stabler, R. A., Wren, B. & Brondsted, L. 2012. Cellular response of *Campylobacter jejuni* to trisodium phosphate. *Appl Environ Microbiol*, 78, 1411-5.
- Ringoir, D. D. & Korolik, V. 2003. Colonisation phenotype and colonisation potential differences in *Campylobacter jejuni* strains in chickens before and after passage *in vivo*. *Vet Microbiol*, 92, 225-35.
- Riordan, T., Humphrey, T. J. & Fowles, A. 1993. A point source outbreak of *Campylobacter* infection related to bird-pecked milk. *Epidemiol Infect*, 110, 261-5.

- Rodgers, J. D., Clifton-Hadley, F. A., Marin, C. & Vidal, A. B. 2010. An evaluation of survival and detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broiler caecal contents using culture-based methods. *J Appl Microbiol*, 109, 1244-52.
- Rodgers, J. D., Lawes, J. R., Vidal, A. B., Ellis-Iversen, J., Ridley, A., Pleydell, E. J., Powell, L. F., Toszeghy, M., Stapleton, K. & Clifton-Hadley, F. A. 2012. Characteristics and comparative performance of direct culture, direct PCR and enumeration methods for detection and quantification of *Campylobacter* spp. in broiler caeca. *Vet Microbiol*.
- Rodin, S., Andersson, A. F., Wirta, V., Eriksson, L., Ljungstrom, M., Bjorkholm, B., Lindmark, H. & Engstrand, L. 2008. Performance of a 70-mer oligonucleotide microarray for genotyping of *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol*, 8, 73.
- Ruiz-Palacios, G. M. 2007. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clin Infect Dis*, 44, 701-3.
- Rushton, S. P., Humphrey, T. J., Shirley, M. D., Bull, S. & Jorgensen, F. 2009. *Campylobacter* in housed broiler chickens: a longitudinal study of risk factors. *Epidemiol Infect*, 137, 1099-110.
- Sagarzazu, N., Cebrian, G., Condon, S., Mackey, B. & Manas, P. 2010. High hydrostatic pressure resistance of *Campylobacter jejuni* after different sublethal stresses. *J Appl Microbiol*, 109, 146-55.
- Sahin, O., Zhang, Q., Meitzler, J. C., Harr, B. S., Morishita, T. Y. & Mohan, R. 2001. Prevalence, antigenic specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. *Appl Environ Microbiol*, 67, 3951-7.
- Sahin, O., Plummer, P. J., Jordan, D. M., Sulaj, K., Pereira, S., Robbe-Austerman, S., Wang, L., Yaeger, M. J., Hoffman, L. J. & Zhang, Q. 2008. Emergence of a tetracycline-resistant *Campylobacter jejuni* clone associated with outbreaks of ovine abortion in the United States. *J Clin Microbiol*, 46, 1663-71.

- Sampers, I., Habib, I., De Zutter, L., Dumoulin, A. & Uyttendaele, M. 2010. Survival of *Campylobacter* spp. in poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration, and heat treatment. *Int J Food Microbiol*, 137, 147-53.
- Sang, F. C., Shane, S. M., Yogasundram, K., Hagstad, H. V. & Kearney, M. T. 1989. Enhancement of *Campylobacter jejuni* virulence by serial passage in chicks. *Avian Dis*, 33, 425-30.
- Santé Canada. 2008. *Politique sur la différenciation des additifs alimentaires des agents technologiques* [Online]. Available: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/pubs/policy_fa-pa-fra.php [Accessed September 3rd 2012].
- Santé Canada. 2011. *Utilisation de médicaments en dérogation des directives de l'étiquette (UMDDE)* [Online]. Available: <http://hc-sc.gc.ca/dhp-mps/vet/label-etiquet/index-fra.php> [Accessed August 7th 2012].
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270, 467-70.
- Senior, N. J., Bagnall, M. C., Champion, O. L., Reynolds, S. E., La Ragione, R. M., Woodward, M. J., Salguero, F. J. & Titball, R. W. 2011. *Galleria mellonella* as an infection model for *Campylobacter jejuni* virulence. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 661-9.
- Skanseng, B., Kaldhusdal, M., Moen, B., Gjevre, A. G., Johannessen, G. S., Sekelja, M., Trosvik, P. & Rudi, K. 2010. Prevention of intestinal *Campylobacter jejuni* colonization in broilers by combinations of in-feed organic acids. *J Appl Microbiol*, 109, 1265-73.
- Skovgard, H., Kristensen, K. & Hald, B. 2011. Retention of *Campylobacter* (Campylobacterales: *Campylobacteraceae*) in the house fly (*Diptera: Muscidae*). *J Med Entomol*, 48, 1202-9.

- Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E. & Dooley, J. S. 2005. *Campylobacter jejuni*. *Lett Appl Microbiol*, 41, 297-302.
- Snelling, W. J., Stern, N. J., Lowery, C. J., Moore, J. E., Gibbons, E., Baker, C. & Dooley, J. S. 2008. Colonization of broilers by *Campylobacter jejuni* internalized within *Acanthamoeba castellanii*. *Arch Microbiol*, 189, 175-9.
- Solis-Soto, L. Y., Garcia, S., Wesley, I. & Heredia, N. 2011. A charcoal- and blood-free enrichment broth for isolation and PCR detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken. *J Food Prot*, 74, 221-7.
- Sorensen, M. C., van Alphen, L. B., Harboe, A., Li, J., Christensen, B. B., Szymanski, C. M. & Brondsted, L. 2011. Bacteriophage F336 recognizes the capsular phosphoramidate modification of *Campylobacter jejuni* NCTC11168. *J Bacteriol*, 193, 6742-9
- St-Pierre, K., Levesque, S., Frost, E., Carrier, N., Arbeit, R. D. & Michaud, S. 2009. Thermotolerant *coliforms* are not a good surrogate for *Campylobacter* spp. in environmental water. *Appl Environ Microbiol*, 75, 6736-44.
- Stahl, M., Friis, L. M., Nothaft, H., Liu, X., Li, J., Szymanski, C. M. & Stintzi, A. 2011. L-fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 7194-9.
- Stahl, M., Butcher, J. & Stintzi, A. 2012. Nutrient Acquisition and Metabolism by *Campylobacter jejuni*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 5.
- Stapleton, K., Cawthraw, S. A., Cooles, S. W., Coldham, N. G., La Ragione, R. M., Newell, D. G. & Ridley, A. M. 2010. Selecting for development of fluoroquinolone resistance in a *Campylobacter jejuni* strain 81116 in chickens using various enrofloxacin treatment protocols. *J Appl Microbiol*, 109, 1132-8.
- Stern, N. J., Bailey, J. S., Blankenship, L. C., Cox, N. A. & McHan, F. 1988. Colonization characteristics of *Campylobacter jejuni* in chick ceca. *Avian Dis*, 32, 330-4.

- Stern, N. J., Cox, N. A., Bailey, J. S., Berrang, M. E. & Musgrove, M. T. 2001. Comparison of mucosal competitive exclusion and competitive exclusion treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* spp. colonization in broiler chickens. *Poult Sci*, 80, 156-60.
- Stern, N. J., Robach, M. C., Cox, N. A. & Musgrove, M. T. 2002. Effect of drinking water chlorination on *Campylobacter* spp. colonization of broilers. *Avian Dis*, 46, 401-4.
- Stern, N. J., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Kovalev, Y. N., Volodina, L. I., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P. & Levchuk, V. P. 2005. *Paenibacillus polymyxa* purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens. *J Food Prot*, 68, 1450-3.
- Stern, N. J., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Pokhilenko, V. D., Levchuk, V. P., Svetoch, O. E. & Seal, B. S. 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 3111-6.
- Stern, N. J. 2008. *Salmonella* species and *Campylobacter jejuni* cecal colonization model in broilers. *Poult Sci*, 87, 2399-403.
- Suchodolski, J. S. 2011. Companion animals symposium: microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *J Anim Sci*, 89, 1520-30.
- Sunkara, L. T., Achanta, M., Schreiber, N. B., Bommineni, Y. R., Dai, G., Jiang, W., Lamont, S., Lillehoj, H. S., Beker, A., Teeter, R. G. & Zhang, G. 2011. Butyrate enhances disease resistance of chickens by inducing antimicrobial host defense peptide gene expression. *PLoS One*, 6, e27225.
- Suo, B., He, Y., Paoli, G., Gehring, A., Tu, S. I. & Shi, X. 2010. Development of an oligonucleotide-based microarray to detect multiple foodborne pathogens. *Mol Cell Probes*, 24, 77-86.

- Svensson, S. L., Davis, L. M., MacKichan, J. K., Allan, B. J., Pajaniappan, M., Thompson, S. A. & Gaynor, E. C. 2009. The CprS sensor kinase of the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni* influences biofilm formation and is required for optimal chick colonization. *Mol Microbiol*, 71, 253-72.
- Svetoch, E. A. & Stern, N. J. 2010. Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. in poultry-- A review. *Poult Sci*, 89, 1763-8.
- Szymanski, C. M., Yao, R., Ewing, C. P., Trust, T. J. & Guerry, P. 1999. Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol*, 32, 1022-30.
- Szymanski, C. M. & Wren, B. W. 2005. Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nat Rev Microbiol*, 3, 225-37.
- Taboada, E. N., Acedillo, R. R., Carrillo, C. D., Findlay, W. A., Medeiros, D. T., Mykytczuk, O. L., Roberts, M. J., Valencia, C. A., Farber, J. M. & Nash, J. H. 2004. Large-scale comparative genomics meta-analysis of *Campylobacter jejuni* isolates reveals low level of genome plasticity. *J Clin Microbiol*, 42, 4566-76.
- Taboada, E. N., Mackinnon, J. M., Luebbert, C. C., Gannon, V. P., Nash, J. H. & Rahn, K. 2008. Comparative genomic assessment of Multi-Locus Sequence Typing: rapid accumulation of genomic heterogeneity among clonal isolates of *Campylobacter jejuni*. *BMC Evol Biol*, 8, 229.
- Taboada, E. N., Ross, S. L., Mutschall, S. K., Mackinnon, J. M., Roberts, M. J., Buchanan, C. J., Kruczkiewicz, P., Jokinen, C. C., Thomas, J. E., Nash, J. H., Gannon, V. P., Marshall, B., Pollari, F. & Clark, C. G. 2012. Development and Validation of a Comparative Genomic Fingerprinting Method for High-Resolution Genotyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*, 50, 788-97.
- Tajada, P., Gomez-Graces, J. L., Alos, J. I., Balas, D. & Cogollos, R. 1996. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12 beta-lactam

- agents and combinations with beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 40, 1924-5.
- Tareen, A. M., Dasti, J. I., Zautner, A. E., Gross, U. & Lugert, R. 2010. *Campylobacter jejuni* proteins Cj0952c and Cj0951c affect chemotactic behaviour towards formic acid and are important for invasion of host cells. *Microbiology*, 156, 3123-35.
- Tareen, A. M., Dasti, J. I., Zautner, A. E., Gross, U. & Lugert, R. 2011. Sulphite : cytochrome c oxidoreductase deficiency in *Campylobacter jejuni* reduces motility, host cell adherence and invasion. *Microbiology*, 157, 1776-85.
- Thibault, P., Logan, S. M., Kelly, J. F., Brisson, J. R., Ewing, C. P., Trust, T. J. & Guerry, P. 2001. Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J Biol Chem*, 276, 34862-70.
- Thomas, M. K., Majowicz, S. E., Sockett, P. N., Fazil, A., Pollari, F., Dore, K., Flint, J. A. & Edge, V. L. 2006. Estimated Numbers of Community Cases of Illness Due to *Salmonella*, *Campylobacter* and Verotoxigenic *Escherichia Coli*: Pathogen-specific Community Rates. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 17, 229-34.
- Thomas, M. K., Majowicz, S. E., Pollari, F. & Sockett, P. N. 2008. Burden of acute gastrointestinal illness in Canada, 1999-2007: interim summary of NSAGI activities. *Can Commun Dis Rep*, 34, 8-15.
- Tiihonen, K., Kettunen, H., Bento, M. H., Saarinen, M., Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Schulze, H. & Rautonen, N. 2010. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. *Br Poult Sci*, 51, 381-92.
- Tu, Q. V., McGuckin, M. A. & Mendz, G. L. 2008. *Campylobacter jejuni* response to human mucin MUC2: modulation of colonization and pathogenicity determinants. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 795-802.
- Ugarte-Ruiz, M., Gomez-Barrero, S., Porrero, M. C., Alvarez, J., Garcia, M., Comeron, M. C., Wassenaar, T. M. & Dominguez, L. 2012. Evaluation of four protocols for the

- detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices. *J Appl Microbiol*, 113, 200-8.
- Van Alphen, L. B., Bleumink-Pluym, N. M., Rochat, K. D., van Balkom, B. W., Wosten, M. M. & van Putten, J. P. 2008a. Active migration into the subcellular space precedes *Campylobacter jejuni* invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol*, 10, 53-66.
- Van Alphen, L. B., Wuhrer, M., Bleumink-Pluym, N. M., Hensbergen, P. J., Deelder, A. M. & van Putten, J. P. 2008b. A functional *Campylobacter jejuni* maf4 gene results in novel glycoforms on flagellin and altered autoagglutination behaviour. *Microbiology*, 154, 3385-97.
- Van Asselt, E. D., Jacobs-Reitsma, W. F., van Brakel, R., van der Voet, H. & van der Fels-Klerx, H. J. 2008. *Campylobacter* prevalence in the broiler supply chain in the Netherlands. *Poult Sci*, 87, 2166-72.
- Van de Giessen, A. W., Tilburg, J. J., Ritmeester, W. S. & van der Plas, J. 1998. Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by application of hygiene measures. *Epidemiol Infect*, 121, 57-66.
- Van Deun, K., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. & Pasmans, F. 2008a. Short-chain fatty acids and L-lactate as feed additives to control *Campylobacter jejuni* infections in broilers. *Avian Pathol*, 37, 379-83.
- Van Deun, K., Pasmans, F., Ducatelle, R., Flahou, B., Vissenberg, K., Martel, A., Van den Broeck, W., Van Immerseel, F. & Haesebrouck, F. 2008b. Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Vet Microbiol*, 130, 285-97.
- Van Gerwe, T., Bouma, A., Klinkenberg, D., Wagenaar, J. A., Jacobs-Reitsma, W. F. & Stegeman, A. 2010. Medium chain fatty acid feed supplementation reduces the probability of *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet Microbiol*, 143, 314-8.

- Van Overbeke, I., Duchateau, L., De Zutter, L., Albers, G. & Ducatelle, R. A comparison survey of organic and conventional broiler chickens for infectious agents affecting health and food safety.
- Van Vliet, A. H., Ketley, J. M., Park, S. F. & Penn, C. W. 2002. The role of iron in *Campylobacter* gene regulation, metabolism and oxidative stress defense. *FEMS Microbiol Rev*, 26, 173-86.
- Vegge, C. S., Brondsted, L., Li, Y. P., Bang, D. D. & Ingmer, H. 2009. Energy taxis drives *Campylobacter jejuni* toward the most favorable conditions for growth. *Appl Environ Microbiol*, 75, 5308-14.
- Verhoeff-Bakkenes, L., Arends, A. P., Snoep, J. L., Zwietering, M. H. & de Jonge, R. 2008. Pyruvate relieves the necessity of high induction levels of catalase and enables *Campylobacter jejuni* to grow under fully aerobic conditions. *Lett Appl Microbiol*, 46, 377-82.
- Verhoeff-Bakkenes, L., Hazeleger, W. C., de Jonge, R. & Zwietering, M. H. 2009. *Campylobacter jejuni*: a study on environmental conditions affecting culturability and *in vitro* adhesion/invasion. *J Appl Microbiol*, 106, 924-31.
- Wagenaar, J. A., Van Bergen, M. A., Mueller, M. A., Wassenaar, T. M. & Carlton, R. M. 2005. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet Microbiol*, 109, 275-83.
- Wang, Y. & Taylor, D. E. 1990. Natural transformation in *Campylobacter* species. *J Bacteriol*, 172, 949-55.
- Wassenaar, T. M., van der Zeijst, B. A., Ayling, R. & Newell, D. G. 1993. Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. *J Gen Microbiol*, 139 Pt 6, 1171-5.
- Wassenaar, T. M. & Newell, D. G. 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol*, 66, 1-9.

- Wassenaar, T. M., Kist, M. & de Jong, A. 2007. Re-analysis of the risks attributed to ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* infections. *Int J Antimicrob Agents*, 30, 195-201.
- Wassenaar, T. M., Fernandez-Astorga, A., Alonso, R., Marteinsson, V. T., Magnusson, S. H., Kristoffersen, A. B. & Hofshagen, M. 2009. Comparison of *Campylobacter* fla-SVR genotypes isolated from humans and poultry in three European regions. *Lett Appl Microbiol*, 49, 388-95.
- Wassenaar, T. M. 2011. Following an imaginary *Campylobacter* population from farm to fork and beyond: a bacterial perspective. *Lett Appl Microbiol*, 53, 253-63.
- Weerakoon, D. R., Borden, N. J., Goodson, C. M., Grimes, J. & Olson, J. W. 2009. The role of respiratory donor enzymes in *Campylobacter jejuni* host colonization and physiology. *Microb Pathog*, 47, 8-15.
- Weingarten, R. A., Grimes, J. L. & Olson, J. W. 2008. Role of *Campylobacter jejuni* respiratory oxidases and reductases in host colonization. *Appl Environ Microbiol*, 74, 1367-75.
- Wesley, I. V., Rostagno, M., Hurd, H. S. & Trampel, D. W. 2009. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in market-weight turkeys on-farm and at slaughter. *J Food Prot*, 72, 43-8.
- World Health Organization. 2009. *Diarrhoeal disease fact sheet N°330* [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html> [Accessed August 7th 2012].
- Widders, P. R., Thomas, L. M., Long, K. A., Tokhi, M. A., Panaccio, M. & Apos, E. 1998. The specificity of antibody in chickens immunised to reduce intestinal colonisation with *Campylobacter jejuni*. *Vet Microbiol*, 64, 39-50.
- Williams, A. & Oyarzabal, O. A. 2012. Prevalence of *Campylobacter* spp. in skinless, boneless retail broiler meat from 2005 through 2011 in Alabama, USA. *BMC Microbiol*, 12, 184.

- Williams, L. K., Jorgensen, F., Grogono-Thomas, R. & Humphrey, T. J. 2009. Enrichment culture for the isolation of *Campylobacter* spp: Effects of incubation conditions and the inclusion of blood in selective broths. *Int J Food Microbiol*, 130, 131-4.
- Williams, L. K., Sait, L. C., Cogan, T. A., Jorgensen, F., Grogono-Thomas, R. & Humphrey, T. J. 2012. Enrichment culture can bias the isolation of *Campylobacter* subtypes. *Epidemiol Infect*, 140, 1227-35.
- Willis, W. L. & Reid, L. 2008. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. *Poult Sci*, 87, 606-11.
- Wilson, D. L., Rathinam, V. A., Qi, W., Wick, L. M., Landgraf, J., Bell, J. A., Plovanich-Jones, A., Parrish, J., Finley, R. L., Mansfield, L. S. & Linz, J. E. 2010. Genetic diversity in *Campylobacter jejuni* is associated with differential colonization of broiler chickens and C57BL/6J IL10-deficient mice. *Microbiology*, 156, 2046-57.
- Wisessombat, S., Kittiniyom, K., Srimanote, P., Wonglumsom, W. & Voravuthikunchai, S. P. 2010. Enhancement of viable *Campylobacter* detection by chemotactic stimuli. *J Microbiol Methods*, 82, 170-6.
- Wosten, M. M., Wagenaar, J. A. & van Putten, J. P. 2004. The FlgS/FlgR two-component signal transduction system regulates the fla regulon in *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem*, 279, 16214-22.
- Wosten, M. M., van Dijk, L., Parker, C. T., Guilhabert, M. R., van der Meer-Janssen, Y. P., Wagenaar, J. A. & van Putten, J. P. 2010. Growth phase-dependent activation of the DccRS regulon of *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol*, 192, 2729-36.
- Wyszynska, A., Raczko, A., Lis, M. & Jagusztyn-Krynicka, E. K. 2004. Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 cjaA gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine*, 22, 1379-89.

- Xu, F., Zeng, X., Haigh, R. D., Ketley, J. M. & Lin, J. 2010. Identification and characterization of a new ferric enterobactin receptor, CfrB, in *Campylobacter*. *J Bacteriol*, 192, 4425-35.
- Xue, F., Zeng, D., Xu, F., Zhang, R., Chen, Y., Yang, Y., Wang, X., Li, Z., Zhang, X. & Jiang, Y. 2012. Gene expression profile of *Campylobacter jejuni*-induced GBS in bama miniature pigs. *Cell Tissue Res*, 348, 523-36.
- Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N. & Tsukamoto, T. 2007. Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 1467-73.
- Young, I., Rajic, A., Wilhelm, B. J., Waddell, L., Parker, S. & McEwen, S. A. 2009. Comparison of the prevalence of bacterial enteropathogens, potentially zoonotic bacteria and bacterial resistance to antimicrobials in organic and conventional poultry, swine and beef production: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Infect*, 137, 1217-32.
- Young, K. T., Davis, L. M. & Dirita, V. J. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 5, 665-79.
- Zautner, A. E., Ohk, C., Tareen, A. M., Lugert, R. & Gross, U. 2012. Epidemiological association of *Campylobacter jejuni* groups with pathogenicity-associated genetic markers. *BMC Microbiol*, 12, 171.
- Zeng, X., Xu, F. & Lin, J. 2009. Molecular, antigenic, and functional characteristics of ferric enterobactin receptor CfrA in *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*, 77, 5437-48.

- Zhang, G., Ma, L. & Doyle, M. P. 2007. Potential competitive exclusion bacteria from poultry inhibitory to *Campylobacter jejuni* and *Salmonella*. *J Food Prot*, 70, 867-73.
- Zheng, J., Meng, J., Zhao, S., Singh, R. & Song, W. 2006. Adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. *J Food Prot*, 69, 768-74.
- Zilbauer, M., Dorrell, N., Wren, B. W. & Bajaj-Elliott, M. 2008. *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102, 123-9.
- Ziprin, R. L., Young, C. R., Stanker, L. H., Hume, M. E. & Konkel, M. E. 1999. The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. *Avian Diseases*, 43, 586-589.
- Ziprin, R. L., Young, C. R., Byrd, J. A., Stanker, L. H., Hume, M. E., Gray, S. A., Kim, B. J. & Konkel, M. E. 2001a. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. *Avian Dis*, 45, 549-557.
- Ziprin, R. L., Young, C. R., Byrd, J. A., Stanker, L. H., Hume, M. E., Gray, S. A., Kim, B. J. & Konkel, M. E. 2001b. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. *Avian Dis*, 45, 549-57.
- Compendium of Veterinary Products* [Online]. Available: <http://umontreal.naccvp.com/>?

Annexe 1: Lack of correlation between *Campylobacter jejuni in vitro* phenotypic properties in field isolates

Présentation orale effectuée dans le cadre du 5 ième Symposium du CRIP, tenu à Saint-Hyacinthe le 17 mai 2012.

Lack of correlation between *Campylobacter jejuni in vitro* phenotypic properties in field isolates.

Alexandre Thibodeau, Philippe Fravalo, Sylvette Laurent-Lewandowski, Evelyne Guévremont, Sylvain Quessy et Ann Letellier.

Abstract

Campylobacter jejuni is a major cause of foodborne infections. It is the zoonotic agent responsible for *Campylobacteriosis*, a gastroenteric disease that may evolve to severe autoimmune disorders. Consuming or mishandling contaminated poultry meat products is an important source of human *Campylobacteriosis*. *C. jejuni* chicken colonization mechanisms are still misunderstood. Many *C. jejuni* phenotypic properties influence chicken gut colonization but correlation between these properties are unknown in field isolates. The aim of this study was to assess phenotypic properties, such as autoagglutination, chemotaxis, adhesion and invasion to chicken primary caecal cells, of *C. jejuni* isolates recovered in 2003 and 2008 from chicken caecal samples. Autoagglutination was tested by measuring changes in optic density of bacterial suspensions. Chemotaxis was assessed using transwell inserts to calculate the proportions of bacteria attracted to mucin. Adhesion and invasion assays were carried out using a primary cell culture obtained from enzymatic digestion of fresh caecum and proportions of primary cells adhering or invading bacteria were evaluated. Results ranged from 15% to 90% for autoagglutination, 0.11 to 1.9 (-log(proportion of attracted bacteria)) for chemotaxis, 0.21 to 0.61(-log(proportion of adhering bacteria)) for adhesion and 0.16 to 0.41(-log(proportion of invading bacteria)) for invasion. All phenotypic properties were found equal between the 2003 and 2008 isolates. In this study, only adhesion and invasion correlated (Spearman, $p = 0.0120$). We conclude, for field isolates, that no clear correlations were present between the evaluated *in vitro* phenotypic properties. Therefore, a prudent and more comprehensive approach should be applied for field strain phenotypic characterization before making any conclusions from *in vitro* observation and applied to chicken colonization capacity of a given isolate.

Annexe 2: Caractérisation d'isolats de *Campylobacter jejuni* isolés de poulets du Québec

Conférence orale présentée dans le cadre du symposium de l'ACFAS, Université de Montréal, 2010.

Caractérisation d'isolats de *Campylobacter jejuni* isolés de poulets du Québec.

**Alexandre THIBODEAU¹, Évelyne Guévremont², Sylvain Quessy¹,
Sylvette Laurent-Lewandowski¹, Philippe Fravalo³ et Ann Letellier¹**

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

(2)Agriculture et Agroalimentaire Canada, Saint-Hyacinthe

(3) Agence Française de sécurité sanitaire des aliments, Ploufragan, France

C. jejuni est un pathogène causant des toxi-infections bactériennes d'origine alimentaire. La viande de volaille est décrite comme le principal vecteur de transmission de ce microorganisme vers l'humain. Le but de ce projet est de caractériser phénotypiquement les *C. jejuni* isolés de productions aviaires québécoises, avec pour objectif d'identifier des phénotypes impliqués dans la capacité des isolats à coloniser l'intestin du poulet. Une collection de *C. jejuni* a été recueillie à partir de caeca de poulets à l'abattoir en 2008. Pour ces isolats, les profils de résistance aux antibiotiques ont été établis ainsi que certains phénotypes possiblement associés à une capacité variable de colonisation du poulet tels que l'autoagglutination, le chimiotactisme et l'adhésion/invasion vis-à-vis des cellules primaires caecales aviaires. Une collection, partiellement caractérisée en 2003-2004, est exploitée pour comparaison. Des isolats de 2008 sont résistants à la tétracycline, la clindamycine, la bacitracine et au ceftiofur. Ces résistances sont moindres que celles observées en 2003-2004, sauf en ce qui a trait à la résistance au ceftiofur qui apparaît stable. Les phénotypes d'autoagglutination, de chimiotactisme et d'adhésion/invasion à des cellules primaires sont très variables d'un *C. jejuni* à l'autre, peu importe l'année d'isolement. L'étude de cette différence pourrait mener à l'identification de facteurs cruciaux pour la colonisation et la persistance en élevages de *C. jejuni*.

Tableau 1: Résistance aux antibiotiques des souches d'élevage conventionnel

Antibiotique	Tet	Ery	Chl	Cip	Gen	Nal	Cli	Amp	Azi
2008 (%)	51	0	0	0	0	0	5	0	0
2003 (%)	82	38	0	0	0	11	0	12	32

2008: n = 82; 2003: n = 76; Tet = Tétracycline; Ery = érythromycine; Chl = chloremphénocole; Cip = ciprofloxacine; Gen = gentamicine; Nal = acide nalidixique; Cli = clindamycine; Amp = ampicilline; Azi = azithromycine; présenté dans le cadre de l'ACFAS 2010, Université de Montréal.

Tableau 2: CMI pour la bacitracine et le ceftiofur, antibiotiques pour lesquels *C. jejuni* est considéré comme résistant naturellement

CMI ($\mu\text{g/ml}$)	4	6	8	16	32	64	128	256	> 256
Bacitracine 2008 (%)	0	0	0	0	0	0	0	83	17
Bacitracine 2003 (%)	1	0	0	0	5	63	12	3	16
Ceftiofur 2008 (%)	1	0	0	1	28	12	41	5	11
Ceftiofur 2003 (%)	0	0	0	0	1	54	5	8	32

2008: n = 82; 2003: n = 76; présenté dans le cadre de l'ACFAS 2010, Université de Montréal.

Annexe 3: Résultats supplémentaires

Tableau IX: Antibiotiques et désinfectants utilisés sur les fermes positives pour *C. jejuni* en 2008 et résistance aux antibiotiques observée chez les souches issues de ces fermes

Ferme	Antimicrobiens	Désinfectants	Antibiorésistance des isolats
1	Bacitracine, Narasine	Rocco	Bac, Cef, Cli
2	3-Nitro, Bacitracine, Robenidine, Salinomycine	Aucun	Cef, Cli
3	3-Nitro, Bacitracine, Robenidine, Salinomycine	Aucun	Cef
4	Bacitracine, Salinomycine	Virkon, Fumigation	Cef, Tet
5	Bacitracine, Salinomycine, Zoalène	Bioagrimix	Cef, Tet
6	3-Nitro, Salinomycine, Tylosine, Zoalène, Sulfa-25	Aucun	Bac, Cef, Tet
7	3-Nitro, Bacitracine, Nicarbazine, Salinomycine	Hyperox	Bac, Cef, Tet
8	3-Nitro, Flavomycine, Robenidine, Salinomycine	Aucun	Cef, Cli, Tet
9	Bacitracine, Salinomycine, Zoalène	Virkon	Cef, Cli
10	Flavomycine, Momensin, Zoalène	Aucun	Cef

n = 53 fermes; Bac: bacitracine; Cef: ceftiofur; Cli: clindamycine; Tet: tétracycline; Présenté dans le cadre de la Journée de la Recherche 2009, Saint-Hyacinthe, Canada.

Tableau VIII: Gènes uniques retrouvés dans les souches co-inoculées dans la salle 1

Souche 1	Souche 2	Fonction
CJ1371	--	Lipoprotéine putative homologue de vacJ
<i>maf4</i>	--	Facteur de motilité accessoire
<i>arsR</i>	--	Répresseur de l'opéron de la résistance à l'arsenic
<i>tetO</i>	--	Résistance à la tétracycline
<i>porAv1</i>	--	Porine, protéine majeure de la membrane (MOMP)
CJE0312	--	Protéine accepteuse de méthyle
<i>maf5</i>	--	Facteur de motilité accessoire
<i>kpsC v1</i>	--	Protéine d'export des polysaccharides capsulaires, variant
--	<i>docBv1</i>	Protéine accepteuse de méthyle, variant
--	<i>fla</i>	Flagellines (A et B)
--	<i>rloB</i>	Protéine hypothétique rloB (type 1 restriction system)
--	<i>bla_{Oxa61}</i>	B-lactamase
--	CJE1193	Transporteur famille LysE
--	<i>kgtP</i>	Alpha-kétoglutarate perméase
--	CJ1322	Protéine hypothétique
--	CJE1307	Protéine de multiple résistance aux drogues, famille SMR
--	<i>ccpA-1</i>	Cytochrome c551 peroxydase
--	<i>uppP</i>	Undécaprényle-diphosphatase
--	<i>maf3</i>	Facteur de motilité accessoire

Annexe 4: Accords des coauteurs et permissions des éditeurs