



Université de Montréal

**Perspectives de l'usage de poudre de jaunes d'œuf comme additif  
alimentaire contre *Campylobacter jejuni* chez le poulet: mode  
d'immunisation et effet de l'encapsulation**

Département pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de  
l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en sciences vétérinaires  
option hygiène vétérinaire et innocuité des aliments

Août, 2015

©Amina Soumaila Garba, 2015

# Résumé

La campylobactériose est une zoonose causée par *Campylobacter jejuni*, une bactérie commensale du poulet, considérée comme la principale source de contamination humaine. *C. jejuni* est rarement retrouvé dans le tube digestif des poulets avant deux ou trois semaines d'âge. Ce qui pourrait s'expliquer par la transmission d'une immunité maternelle (anticorps IgY) transmise aux poussins via le jaune d'œuf. À la Chaire de recherche en Salubrité des Viandes (CRSV), la caractérisation d'anticorps IgY extraits de jaunes d'œufs frais a montré des niveaux de production d'anticorps différents selon le mode d'immunisation et suggère, *in vitro*, des effets sur ce pathogène. Ce qui laisse penser qu'en tant qu'additif alimentaire, une poudre de jaunes d'œuf potentialisée permettrait de lutter contre *C. jejuni* chez le poulet à griller. Dans ce travail, le processus de fabrication de l'additif (déshydratation par « Spray dry » puis encapsulation) a été évalué et les différents modes d'immunisation des poules pondeuses ont également été comparés. Les anticorps ont été extraits des différentes poudres de jaunes d'œuf ou du produit final encapsulé, et caractérisés *in vitro* (dosage / ELISA, test de mobilité, bactéricidie, western blot). Puis, une évaluation *in vivo* de la capacité de ces poudres encapsulées, incorporée à 5 % dans la moulée, afin de réduire ou de bloquer la colonisation intestinale des oiseaux par *C. jejuni* a été testée. *In vitro*, les résultats ont montré des concentrations d'anticorps et d'efficacité variables selon le type de vaccination. Dans cette étude, on a observé que le « Spray dry » a concentré les anticorps dans les poudres et que ces anticorps sont restés fonctionnels contre *C. jejuni*. On a également observé que l'encapsulation n'entraîne pas une perte quantitative des anticorps contenus dans les poudres. Malgré les résultats *in vitro* encourageants, les résultats *in vivo* ne révèlent aucune inhibition ou réduction de la colonisation des oiseaux par *C. jejuni*. L'absence d'efficacité la poudre de jaunes d'œuf encapsulée dans notre étude n'est pas due à une perte quantitative et/ou qualitative des anticorps comme soutenu dans les expériences *in vitro*. Ce qui démontre que les recherches

doivent être poursuivies afin de déterminer les conditions optimales de l'utilisation de la poudre de jaune d'œuf *in vivo*, en tant qu'additif alimentaire chez les poulets.

Mots clés : *Campylobacter jejuni*, colonisation, poulet à griller, poudre de jaunes d'œuf, immunoglobuline.

# Abstract

Campylobacteriosis is a zoonosis caused by *Campylobacter jejuni*, a commensal bacterium of chicken. Chickens are considered the main identified source of human infection. *C. jejuni* is rarely found in the digestive tract of chickens before two or three weeks of age. Part of this may be caused by the transmission of maternal immunity (IgY antibodies) to the chicks via the egg yolk. At the Research Chair in Meat Safety (RCMS), a characterization of IgY antibody extracted from fresh egg yolks showed different production levels of antibodies, depending on the mode of immunization of the laying hens, and were proven, *in vitro*, to recognize the pathogen. These findings suggest that, as a feed additive, a potentiated egg yolk powder could fight against *C. jejuni* colonization in broilers. In this work, the additive manufacturing process (dehydration by « Spray dry » and then encapsulation) is evaluated and the different methods used to immunize the corresponding laying hens were also compared. Antibodies were extracted from the egg powers or the final encapsulated product, and characterized *in vitro* (dosage/ELISA, mobility and bactericidal tests, Western blot). Then, an *in vivo* assessment of the ability of these encapsulated powders, incorporated at 5% in the feed, to reduce or block intestinal colonization by *C. jejuni* in birds was tested. *In vitro* results showed antibody concentrations and effectiveness were variable depending on the type of immunization. In this study, it was observed that the “spray drying” concentrated the antibodies in powders and that these antibodies remained functional against *C. jejuni*. It was also observed that encapsulation does not lead to quantitative and quantitative loss of antibodies contained in the powder. However, despite the encouraging *in vitro* results, in the *in vivo* *C. jejuni* assay, no inhibition or reduction of birds’ colonization could be observed. This lack of effectiveness of the encapsulated egg yolk powders should not be due to a loss of the quantity and/or quality of the antibodies as supported in the *in vitro* experiments. This

shows that more research is needed to determine the optimal conditions for potentialized egg yolk powder to be use *in vivo* as a food additive to control *C. jejuni* colonization in chickens.

***Key words:*** *Campylobacter jejuni, immunoglobulin, chicken colonization, egg yolk powder*

# Table des matières

Résumé .....	i
Abstract .....	iii
Table des matières .....	v
Liste des tableaux .....	vii
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations .....	viii
Dédicaces .....	ix
Remerciements .....	x
Introduction .....	1
Chapitre I : Recensement de la littérature .....	4
I.1 <i>Campylobacter jejuni</i> .....	4
I.1.1 Historique.....	4
I.1.2 Sources et voies de contamination de l'Homme par <i>C. jejuni</i> .....	5
I.1.3 Principales caractéristiques microbiologiques de <i>C. jejuni</i> .....	5
I.1.4 Principaux paramètres de croissance de <i>C. jejuni</i> .....	6
I.1.5 Principaux facteurs de virulence de <i>C. jejuni</i> .....	7
I.2 Pathogénie et infections à <i>Campylobacter jejuni</i> .....	10
I.3. <i>Campylobacter jejuni</i> dans les élevages de poulets .....	13
I.3.1 Vecteurs de <i>Campylobacter jejuni</i> .....	13
I.3.2 Facteurs associés à la colonisation du poulet par <i>C. jejuni</i> .....	14
I.3.3 Production d'anticorps contre <i>C. jejuni</i> chez le poulet.....	14
I.4 Prévention et stratégie de contrôle de la colonisation du poulet par <i>C. jejuni</i> .....	16
I.4.1 Utilisation de moustiquaires.....	17
I.4.2 Utilisation des vaccins .....	17
I.4.3 Bactériophages .....	18
I.4.4 Probiotiques .....	18
I.4.5 Bactériocines.....	19
I.4.6 Additifs alimentaires .....	19
I.4.7 Poudre d'œufs.....	20
1. 5 Techniques de production de poudre et Mode d'encapsulation.....	23
I.6 Problématique, hypothèse et objectifs.....	24

Chapitre II .....	26
ABSTRACT .....	26
INTRODUCTION .....	27
MATERIALS AND METHODS .....	30
Preparation of egg-yolk powders and encapsulated .....	30
IgYs Extraction.....	31
Agglutination test .....	31
<i>C. jejuni</i> total protein extractions .....	32
Total or anti- <i>C. jejuni</i> IgYs Quantification by ELISA .....	32
SDS-PAGE and immunoblotting .....	34
Motility assay .....	35
Bactericidal assay .....	35
In vivo assay .....	36
Fecal and cecal <i>Campylobacter jejuni</i> numeration.....	37
Statistics .....	37
RESULTS.....	37
Quantification of total and anti- <i>C. jejuni</i> IgY in EYP and EEYP .....	37
Agglutination test .....	38
SDS-PAGE and immunoblotting .....	38
Motility assay .....	39
Bactericidal assay .....	39
In vivo assay .....	40
DISCUSSION .....	40
ACKNOWLEDGEMENT .....	45
REFERENCES .....	46
ANNEXES .....	51
Discussion générale .....	59
Conclusion .....	65
Références .....	66



## Liste des tableaux

<i>Table 1: Individual agglutination tests for Homologous and Heterologous C. jejuni strains with EYP and EEYP IgYs.</i> .....	52
<i>Table 2: Means of migration diameters of each strain in presence of EYP IgYs</i> .....	56
<i>Table 3: Means of migration diameters of each strain in presence of EEYP IgYs</i> .....	56

## Liste des figures

<i>Figure 1 : Micrographie électronique à transmission de C. jejuni montrant les deux formes spiralée et coccoïde (Ng et al., 1985)</i> .....	6
<i>Figure 2 : Structure moléculaire de l'anticorps IgY</i> .....	16
<i>Figure 3: Total and anti-C. jejuni IgY concentrations in EYP and EEYP</i> .....	51
<i>Figure 4: Western blot analysis of EYP IgYs recognition to total proteins of Homologous and Heterologous strains</i> .....	53
<i>Figure 5: Western blot analysis of EEYP IgYs recognition to total proteins of Homologous and Heterologous strains</i> .....	54
<i>Figure 6: Motility test assessed with or without EYP or EEYP IgY against a mix of Homologous and Heterologous strains</i> .....	55
<i>Figure 7: The bactericidal test assessed with the Gr III (OMP) and Gr IV (KB) EYP</i> .....	57
<i>Figure 8: C. jejuni counts in fecal and cecal contents</i> .....	58

# Liste des abréviations

CEUA: Comité d'éthique sur l'utilisation des animaux  
CFU: *Colony forming unit* (Unité formant des colonies (UFC))  
*C. jejuni* : *Campylobacter jejuni*  
CRDA: Centre de recherche et de développement sur les aliments (Food Research and Development Centre (FRDC))  
CRSV: Chaire de Recherche en Salubrité des Viandes (Research Chair in Meat Safety (RCMS))  
EFSA: *European food safety authority* (Agence européenne de la sécurité des aliments)  
EYP: Egg Yolk Powder  
EEYP: Encapsulated Egg Yolk Powder  
cm : Centimètre  
g: Gramme  
GBS: *Guillain-Barré Syndrome* (Syndrome de Guillain-Barré)  
h: Heures  
kg: Kilogramme  
IgG : immunoglobulin G (immunoglobuline G)  
IgY : immunoglobulin Y (immunoglobuline Y)  
L: Litre  
mCCDA: *Charcoal cefoperazone deoxycholate Agar*  
mg: Milligramme  
min: Minute  
ml: Millilitre  
mM: Millimolaire  
ng: Nanogramme  
nm: Nanomètre  
nmol: Nanomole  
OD/DO: *Optic density*/Densité optique  
s: Seconde  
SD: *Standard deviation* (erreur standard à la moyenne)  
V/V: Volume / volume  
W/V: Masse / volume  
x g: Force g  
%: Pourcentage  
°C: Degré Celsius  
µg: Microgramme  
µl : Microlitre

# Dédicaces

*À Papa, de ta fille  
Avec Amour \*\**

# Remerciements

La réalisation de ce mémoire n'a été possible que grâce au concours de plusieurs personnes, à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de mémoire, le Dr Philippe Fravalo, qui a su diriger mes travaux avec beaucoup de disponibilité, de patience, de tact et d'intérêt. Malgré ses nombreuses occupations, il m'a toujours accordé généreusement le temps nécessaire pour partager avec moi ses idées, ne ménageant ni ses commentaires, toujours judicieux, ni ses encouragements. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je voudrai également remercier ma codirectrice, la Dre Ann Letellier pour sa gentillesse et sa contribution à ma formation. Merci également aux autres membres de mon comité-conseil : Dre Martine Boulianne et Dre Mariela Segura pour leurs conseils.

Merci aux membres du jury qui m'ont fait un grand honneur d'évaluer ce travail

Un grand merci au Dr Alexandre Thibodeau, pour son implication dans le projet, pour son temps, son attention ainsi que pour ses conseils avisés. Son aide fut précieuse et j'ai apprécié son enthousiasme et sa sympathie.

Merci à toute l'équipe de la CRSV. Merci spécialement à Audrey pour son aide dans mes débuts au laboratoire.

Merci à Normand et Pierrette d'avoir permis que l'expérimentation animale se réalise dans les meilleures conditions possibles au centre avicole. Merci également à Diane Rodier et Christine Blondin du secrétariat étudiant pour l'immense aide qu'elles m'ont apportée.

Je tiens également à remercier le Programme de Productivité agricole pour l'Afrique de Ouest - Niger (PPAAO-Niger) pour avoir financé cette formation. Merci spécialement au Pr Abdoulaye Gouro.

Merci également au Club Lions de Saint-Hyacinthe et à la famille Maiga Hamidou pour les beaux moments passés ensemble. Gros bisous à Anoura et Makeda.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à mes amis et à ma famille pour leur soutien, leur amour et leur patience tout au long de ma formation.

# Introduction

*Campylobacter* représente l'un des principaux agents bactériens responsables de gastro-entérites d'origine alimentaire dans le monde (Wassenaar, 2011). La campylobactériose se classe au quatrième rang (8,4 %) des maladies diarrhéiques les plus fréquentes dans le monde et se traduit par 7,5 millions d'années de perte de vie corrigées de l'incapacité (AVCI), soit plus que *Shigella* (7,1 millions) et *Escherichia coli* entérotoxigène (6,9 millions) (Murray et al., 2012). Les coûts économiques associés à la campylobactériose sont importants (Havelaar et al., 2012) et des complications graves telles que le syndrome de Guillain-Barré, l'arthrite réactive et le syndrome du côlon irritable peuvent survenir (Kaakoush et al., 2015). Ce qui explique l'importance de la campylobactériose dans les préoccupations des structures en charge de la santé publique.

En Europe, environ 190 000 cas de campylobactérioses sont rapportés chaque année, mais le nombre réel de cas est estimé à environ 9 millions annuellement. En 2010, un total de 212 064 cas de campylobactériose ont été rapportés en Europe, mais il faut retenir surtout que ce chiffre traduit une augmentation pour la cinquième année consécutive de 7 % par rapport à 2009 (EFSA, 2012). Le coût de la campylobactériose pour les systèmes de santé publique incluant la perte de productivité dans l'Union européenne se situe autour de 2,4 milliards d'euros par an (EFSA, 2011). En 2011, 9 478 cas de campylobactériose ont été déclarés au Canada (Agence de la santé publique du Canada, 2013), mais Thomas et al. (2008) estiment que pour chaque cas déclaré, le nombre réel de cas est de 29 à 43 et que chaque cas coûte environ 115 \$ à l'économie du pays. Aux États-Unis, les données récentes estiment le nombre de cas annuels à environ 0,8 million et les pertes économiques annuelles dues à la campylobactériose sont estimées à environ 1,5 milliard de dollars (Scallan et al., 2011; Scharff, 2012).

Il est connu depuis des décennies, et confirmé récemment que la principale source de contamination humaine reste la manipulation de la viande crue et la consommation de viande de volaille contaminée (Hoelzl et al., 2013; Skirrow, 1977).

*Campylobacter* est une bactérie commensale du poulet, mais incapable de le coloniser durant les premières semaines de vie. Ce qui suggère une protection par des anticorps (IgY) maternels transmis *in ovo* via le jaune d'œuf (Sahin et al., 2001). Le taux de portage intestinal dans la filière volaille est généralement compris entre 25 et 100 % et la contamination sur les carcasses est corrélée à l'intensité de la colonisation intestinale (Chemaly et al., 2012; Messaoudi et al., 2013). En effet, la quantité élevée de bactéries dans leurs ceacums (souvent  $> 10^8$  UFC / g de contenu) potentialise le nombre de *Campylobacter* sur les carcasses de poulets à l'abattoir au cours des opérations de traitement telles que l'échaudage, la plumaison et surtout l'éviscération. Ce qui entraîne une augmentation des risques pour la santé humaine (Gruntar et al., 2015; Svetoch & Stern, 2010).

Des évaluations quantitatives des risques, réalisées à plusieurs reprises, convergent pour établir qu'une réduction de 3 log<sub>10</sub> de la concentration de *Campylobacter* dans les intestins des poulets, ou une réduction de 2 log<sub>10</sub> sur la carcasse, permettrait de réduire les cas de campylobactériose de 90 % (EFSA, 2011; Rosenquist et al., 2003).

Des études ont été effectuées sur l'utilisation de poudre de jaune d'œufs comme additif pour réduire la colonisation intestinale du poulet par *C. jejuni*. Selon Hermans et al. (2014), l'utilisation préventive de poudres de jaune d'œufs potentialisées (contenant des anticorps spécifiquement dirigés contre *C. jejuni*), incorporées à 5 % dans l'alimentation bloquerait la colonisation intestinale des oiseaux non infectés par *C. jejuni*. Ces mêmes poudres permettraient également une réduction de 4,4-6,7 log<sub>10</sub> UFC chez des poussins infectés. Kassaiy et Mine (2004a) rapportent eux aussi, qu'un traitement prophylactique avec 10 % de

poudre de jaune d'œufs non potentialisée entraîne 3 à 4 log de réduction des *C. jejuni* fécaux. Cependant, selon Paul et al. (2014), même un traitement prophylactique avec une poudre de jaune d'œufs potentialisée ou non à 10 % dans la moulée n'est pas suffisante pour réduire significativement les comptes caecaux de *C. jejuni*.

Ainsi la non-convergence des voix dans l'évaluation de la stratégie de cette utilisation indique que les conditions optimales pour son utilisation ne sont pas encore identifiées.

En tenant compte du fait que *Campylobacter* ne se multiplie pas en dehors du tube digestif de l'oiseau (Messaoudi et al., 2013; Park, 2002), la présente étude s'inscrit dans une perspective dévaluation d'une option de diminution quantitative de *Campylobacter* dans le caecum du poulet à griller. Ceci, afin de participer à la réduction de risque de campylobactériose pour le consommateur.

Nous avons émis l'hypothèse qu'une immunisation passive par le maintien grâce à des poudres de jaunes d'œufs potentialisées et encapsulées, d'une concentration importante d'anticorps intestinaux contre *C. jejuni* peut réduire d'au moins 2 log sa présence chez le poulet à griller. Le premier objectif de ce travail sera d'étudier *in vitro* l'impact du processus de fabrication (déshydratation par « Spray dry » puis encapsulation) de cet additif alimentaire à partir de jaunes d'œufs obtenus selon différents modes d'immunisation de poules pondeuses. Le deuxième objectif sera d'évaluer *in vivo* la capacité de ces poudres de jaunes d'œufs encapsulées à réduire la colonisation intestinale du poulet par *C. jejuni*.

# Chapitre I : Recensement de la littérature

## I.1 *Campylobacter jejuni*

### I.1.1 Historique

En 1886, le médecin allemand Theodore Escherich observe pour la première fois "*Campylobacter*" à partir de frottis réalisés à l'aide de contenus de côlons de bébés décédés de "*Cholera infantum*". Il décrit "*Campylobacter*" comme une "bactérie" en forme de spirale et non cultivable (Kist, 1986). "*Campylobacter*" fut identifié pour la première fois en 1906 par deux vétérinaires britanniques à partir du mucus utérin de brebis gestantes (Percival et al., 2013). Plus tard en 1913, McFadyean et Stockman isolent des micro-organismes de fœtus avortés de bovins et en 1918, du fait de sa forme spiralée, Smith considère cette bactérie comme incluse dans la catégorie des *Vibrio*, et l'identifie comme *Vibrio fetus* (Vandamme et al., 2010). En 1927, Smith et Orcutt, isolent des jéjunums de bovins atteints de diarrhée, un groupe de bactéries qu'ils nomment *Vibrio jejuni*. En 1944, Doyle isole à son tour un vibron différent de matières fécales de porcs atteints de diarrhée et l'identifie comme *Vibrio coli* (Percival et al., 2013). En 1963, le genre *Campylobacter* appartenant à la classe *Epsilonproteobacteria* fut proposé par Sebald et Véron en raison des conditions de croissance (microaérophile) différentes de la bactérie, de son incapacité à utiliser les sucres (non fermentatif), et de la faible composition en bases guanine et cytosine de l'ADN (autour de 30 %) contrairement aux "vrais" *Vibrio* (plus de 43 %) (Silva et al., 2011). En 1972, près d'un siècle après Theodore Escherich en 1886, des "*Campylobacter*" provenant de selles d'enfants ont pu être isolés grâce à une méthode de filtration (Dekeyser et al., 1972). Actuellement, le genre *Campylobacter* comprend plus de 20 espèces et 8 sous-espèces (Debruyne et al., 2010). Les *Campylobacters* thermotolérants (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis*) sont désignés comme cause principale de gastro-entérites bactériennes d'origine alimentaire



humaines mais c'est *C. jejuni* qui est à l'origine de la majorité des cas de campylobactériose (Messaoudi et al., 2013).

### **I.1.2 Sources et voies de contamination de l'Homme par *C. jejuni***

Les origines possibles de *C. jejuni* pour l'Homme sont nombreuses; on les trouve particulièrement au sein des réservoirs animaux. La contamination humaine par *C. jejuni* peut se faire par contact avec des animaux sauvages (principalement les oiseaux), des animaux de compagnie, les animaux d'élevage qui constituent les principales sources mais aussi par contact avec des porteurs humains ou avec les eaux de surface contaminées (Levin, 2007; Messaoudi et al., 2013). Au niveau de la chaîne alimentaire, les produits d'élevage contaminés tels que le lait et la viande constituent des sources de contamination de *C. jejuni*, mais cette dernière est souvent due à l'ingestion de viandes de volaille crue, mal cuite ou à la consommation d'aliments contaminés par contact au cours de la préparation (Messaoudi et al., 2013). En effet les contaminations croisées dans la cuisine semblent être la voie la plus importante pour l'exposition. Selon l'EFSA (2011), la consommation et la manipulation des poulets peuvent représenter 20 à 30 % des infections chez l'humain, tandis que 50 à 80 % peuvent être attribuées au réservoir de poulet dans son ensemble. Des études ont démontré que les *C. jejuni* présents sur les morceaux de poulet étaient en mesure d'être transférés aux mains, aux ustensiles de cuisine ou même à des aliments prêt-à-manger, directement ou par l'intermédiaire d'une planche de découper (Guyard-Nicodeme et al., 2013; Lubber et al., 2006). Le transfert de *C. jejuni* à partir de cuisses de poulets contaminées naturellement sur une planche de découpe intervient dans 80 % des cas après 10 mn de contact (Fravalo et al., 2009).

### **I.1.3 Principales caractéristiques microbiologiques de *C. jejuni***

*C. jejuni* est une bactérie de la classe *Epsilonproteobacteria*, de la famille des *Campylobacteraceae* et du genre *Campylobacter* (Garrity et al., 2005). C'est une bactérie

incurvée ou en forme de tige en spirale (0,2 à 0,4  $\mu\text{m}$  de large et 0,5 à 5  $\mu\text{m}$  de long) avec un seul flagelle polaire à l'une ou aux deux extrémités (Percival et al., 2013).

*C. jejuni* peut également adopter une forme coccoïde non cultivable, considérée comme un état de dormance nécessaire pour la survie dans des conditions défavorables à la croissance (Van Vliet & Ketley, 2001).



**Figure 1 : Micrographie électronique à transmission de *C. jejuni* montrant les deux formes spiralée et coccoïde (Ng et al., 1985)**

#### **I.1.4 Principaux paramètres de croissance de *C. jejuni***

*C. jejuni* est une bactérie microaérophile présentant une croissance optimale dans une atmosphère à faible tension d'oxygène (5 %  $\text{O}_2$ , 10 % de  $\text{CO}_2$  et 85 %  $\text{N}_2$ ), à un pH compris entre 6,5 et 7,5, une activité d'eau de 0,997 et en présence de 0,5 % de chlorure de sodium. Bactérie à Gram négatif, oxydase positive, catalase positive et non sporulante, *C. jejuni* hydrolyse l'hippurate, l'indoxyl acétate et réduit le nitrate en nitrite (Levin, 2007). Cette bactérie tire son énergie des acides aminés ou du cycle d'acide tricarboxylique intermédiaire (Percival et al., 2013). Elle ne fermente ni n'oxyde les glucides, et ne produit pas d'indole (Silva et al., 2011). Toutefois il a été démontré que certaines souches de *C. jejuni* possèdent un îlot génomique qui en présence de L-fucose est régulée à la hausse, leur permettant ainsi d'absorber et d'utiliser le L-fucose en tant que substrat de croissance (Stahl et al., 2011).

C'est une bactérie thermotolérante, capable de croître entre 37 et 42°C, avec une température de croissance optimale de 41,5°C (Silva et al., 2011). Hazeleger et al. (1998) révèlent que l'absence des gènes codant pour les protéines de réponse au choc froid rend difficile la croissance de *C. jejuni* en dessous de 30°C, mais que cette bactérie reste métaboliquement active à des températures bien en dessous de sa température de croissance minimale. Selon ces auteurs, *C. jejuni* peut survivre à des températures aussi basses que 4°C. La réplication à cette température n'est pas possible, mais l'organisme reste encore mobile. *C. jejuni* est sensible à la congélation, aux rayons ultra-violet, à la plupart des désinfectants, ainsi qu'à la dessiccation, ce qui réduit sa capacité à se multiplier à l'extérieur d'un hôte animal et dans les aliments au cours de leur traitement et de stockage (Park, 2002). Néanmoins, *C. jejuni* est capable de survivre sur les surfaces de traitement des denrées alimentaires, entre le nettoyage, la désinfection et la reprise de production. Il peut alors contaminer les carcasses au cours des différentes étapes du processus à l'abattoir (Peyrat et al., 2008). L'inclusion dans un biofilm est aussi une autre stratégie permettant à *C. jejuni* de survivre dans des conditions environnementales difficiles. *C. jejuni* peut former des biofilms dans les systèmes d'acheminement de l'eau et sur une variété de surfaces abiotiques couramment utilisées dans de tels systèmes, ainsi que dans les milieux aquatiques naturels (Lehtola et al., 2006; Maal-Bared et al., 2012). *C. jejuni* est aussi capable de former un biofilm monospécifique, mais surtout coloniser un biofilm préexistant (Hanning et al., 2008; Joshua et al., 2006).

### **I.1.5 Principaux facteurs de virulence de *C. jejuni***

La colonisation de l'hôte par *C. jejuni* nécessite un certain nombre de facteurs de virulence, qui sont souvent des structures de surface bactérienne pouvant interagir avec les tissus de l'hôte. Ces facteurs favorisent ainsi la colonisation du tractus gastro-intestinal considérée comme essentielle pour l'infection (Nielsen et al., 2012). La paroi cellulaire de *C. jejuni* possède plusieurs facteurs de virulence dont des polysaccharides capsulaires, des

lipooligosaccharides et des O- et N-glycanes flagellaires qui jouent un rôle crucial dans l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales par *C. jejuni* (Mohan, 2015). Les protéines de la membrane externe ou « outer membrane proteins (OMP) » sont facilement reconnues par le système immunitaire et constituent les principales cibles pour la conception des vaccins stratégiques contre *C. jejuni* (Annamalai et al., 2013).

Le flagelle et ses composants sont des facteurs essentiels pour l'interaction initiale de *C. jejuni* avec son hôte et de faciliter la colonisation de l'intestin. La motilité et le chimiotaxisme conférés par le flagelle permettent à la bactérie de détecter les nutriments, de migrer à travers le mucus recouvrant les cellules intestinales et de s'y maintenir. La protéine flagellaire constitue la protéine immunogène associée à la colonisation la mieux caractérisée de *C. jejuni* chez les oiseaux et les mammifères (Lin, 2009). La flagelline se compose de deux sous-unités codées par *flaA* (major flagellin) et *flaB* (minor flagellin). Le gène *flaA* est exprimé à des niveaux beaucoup plus élevés que le gène *flaB* mais les deux sont nécessaires pour la motilité (Van Vliet & Ketley, 2001). L'appareil flagellaire est également responsable de la sécrétion de plusieurs protéines, dont les protéines Cia (Campylobacter invasive antigens) impliquées dans l'invasion des cellules épithéliales par *C. jejuni* (Dasti et al., 2010).

La MOMP (major outer membrane protein) ou *porA* est un antigène commun partagé par tous les sérotypes de *C. jejuni* et présent en grande quantité chez la bactérie. Elle est impliquée dans le transport des ions à travers la paroi cellulaire bactérienne et l'adhérence de la bactérie à la muqueuse intestinale (Islam et al., 2010).

Le facteur de liaison cellulaire Peb1 est une OMP également décrite comme l'un des principaux antigènes immunogènes de *C. jejuni* jouant un rôle clé dans l'adhésion aux cellules épithéliales (Cróinín & Backert, 2012). Il représente un important facteur d'adhésion

hautement conservé chez *C. jejuni* et est souvent reconnu par le sérum des patients convalescents après une campylobactériose (Burnens et al., 1995).

La lipoprotéine de surface JlpA a également été décrite comme une adhésine importante de *C. jejuni*. Le gène *jlpA* est régulé à la hausse en réponse à la mucine humaine suggérant que la protéine peut jouer un rôle clé dans la pathogénicité (Tu et al., 2008).

Les adhésines *cadF* (Campylobacter adhesion to fibronectin) et *flpA* (fibronectine-like protein A) quant à elle permettent la liaison de *C. jejuni* à la fibronectine des cellules épithéliales (Konkel et al., 2004).

La composante CmeC de la pompe à efflux CmeABC est une OMP qui joue un rôle essentiel dans la résistance aux médicaments et la pathogénèse. Largement exprimée et hautement conservée chez *C. jejuni*, la CmeC est immunogène *in vivo* et est essentielle pour la colonisation intestinale par *C. jejuni*. L'expression de CmeC est considérablement induite par les sels biliaires et fortement régulée à la hausse dans les voies intestinales. L'inhibition de pompe d'efflux CmeABC accroît la susceptibilité de *C. jejuni* à plusieurs antimicrobiens et réduit dans la colonisation *in vivo* de *C. jejuni* chez poulet (Lin et al., 2002).

La production de toxine CDT (Cytolethal distending toxin) a également été décrite comme un facteur de virulence important de cet agent pathogène. La toxine CDT est codée par *cdtA*, *cdtB* et *cdtC*, et leur expression est associée à la cytotoxicité. Le complexe tripartite CDT déclenche l'arrêt du cycle cellulaire des cellules eucaryotes, provoquant l'apoptose de la cellule concernée (Lai et al., 2014). Selon Van Deun et al. (2007) l'invasion provoquant l'inflammation cellulaire résulte probablement de la production de toxine et est suivie par une réduction de l'absorption intestinale. L'invasion du tissu épithélial par *C. jejuni* a été sujet à discussion : la voie intercellulaire (rupture des desmosomes) d'abord considérée (Wine et al., 2008), a été complétée par la mise en évidence d'une internalisation de type « trigger »

(Kalischuk et al., 2009) et les conséquences au niveau des perturbations intracellulaires sont de plus en plus précisément connues (Backert et al., 2013; Konkel et al., 2013). Le modèle s'accorde finalement pour retenir une contribution équivalente des deux systèmes pour l'invasion tissulaire par *C. jejuni*.

## **I.2 Pathogénie et infections à *Campylobacter jejuni***

Chez l'humain, bien que l'importance et les manifestations cliniques de l'infection par *C. jejuni* soient bien connues, les mécanismes de pathogénèse de cette infection sont encore mal compris (Hofreuter, 2014). La pénétration dans la muqueuse intestinale implique l'adhérence, l'internalisation et la translocation (Mohan, 2015). Selon une étude, *C. jejuni* contourne la couche de mucus et interagit avec les cellules épithéliales intestinales auxquelles elle se lie. Elle est ensuite internalisée par les cellules épithéliales, ce qui induit une production d'interleukine IL-8 permettant le recrutement de cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles, qui interagissent avec *C. jejuni*. Ces interactions donnent lieu à une importante réponse pro-inflammatoire et augmentent la production de cytokines correspondantes (Young et al., 2007). Ainsi la perturbation des jonctions serrées et l'induction de cytokines conduisent à la perte fonctionnelle (rôle de barrière et d'absorption) des cellules épithéliales suivie d'une destruction des tissus à l'origine de la manifestation de la maladie (Epps et al., 2013).

Dans les pays à revenu élevé, l'incidence annuelle de la campylobactériose est estimée entre 4,4 et 9,3 pour 1000 habitants (WHO, 2013). La campylobactériose peut survenir chez les patients de tous âges, mais dans une étude récente réalisée au Danemark, Nielsen et al. (2013) ont montré que l'infection est plus fréquente chez les jeunes enfants de 1 à 4 ans et les jeunes adultes de 15 à 24 ans. Des doses aussi faibles que 800 UFC ont longtemps été retenues comme doses infectantes, car elles suffisent pour provoquer la diarrhée (Black et al., 1988). Cependant, Hara-Kudo et Takatori (2011) proposent que la dose de *C. jejuni* nécessaire au

développement de la campylobactériose peut être aussi basse que 360 UFC, elle pourrait être de l'ordre de 100 UFC selon Teunis et al. (2005). On retiendra donc que la quantité nécessaire au déclenchement d'une campylobactériose est faible et variable selon les individus. La campylobactériose se manifeste 24 à 72 h après l'ingestion d'aliments contaminés, et se présente généralement sous forme d'une diarrhée aqueuse ou sanguinolente avec des douleurs abdominales, des crampes et de la fièvre, et peut être accompagnée de nausées et de vomissements (Gill, 2014). Bien que les symptômes se résolvent généralement en moins d'une semaine, des complications sévères telles que le syndrome de Guillain-Barré (SGB), l'arthrite réactive, et le syndrome du côlon irritable peuvent survenir (Kaakoush et al., 2015).

Dans les pays à revenu élevé, presque un tiers des cas de SGB est attribué à la campylobactériose et environ 20 % de ces cas nécessitent des soins intensifs. L'arthrite réactionnelle se produit chez 1-5 % des personnes infectées et le IBS se développe chez 36 % des patients atteints de campylobactériose dans les 1-2 ans après l'infection (WHO, 2013).

Le SGB est une maladie neurologique aiguë dans lequel le corps met en place une réponse immunologique à médiation cellulaire et humorale contre la myéline des nerfs périphériques. Cette réponse est due à un mimétisme moléculaire entre les lipo-oligosaccharides de l'enveloppe cellulaire de *C. jejuni* et les épitopes des gangliosides situés sur les nerfs du système nerveux périphérique, générant une réponse immunitaire croisée aboutissant aux lésions nerveuses (Nyati & Nyati, 2013). Elle se manifeste cliniquement par une faiblesse motrice progressive de plus d'un membre avec des réflexes faibles ou absents et aucune autre cause identifiable (Poropatich et al., 2010). Le syndrome de Miller-Fisher est une variante rare du syndrome de Guillain Barré associant une ophtalmoplégie (pouvant conduire à une diplopie binoculaire), une ataxie et une aréflexie (Yuki & Hartung, 2012).

Le syndrome du côlon irritable est un trouble gastro-intestinal fonctionnel chronique. L'un des facteurs de risque les plus importants pour le développement de ce syndrome est une infection entérique qui se caractérise par une maladie aiguë avec au moins deux caractéristiques cliniques suivantes : fièvre, vomissements et diarrhée et l'une des causes les plus fréquentes est une gastro-entérite à *C. jejuni* (Spiller & Lam, 2012). La physiopathologie du syndrome du côlon irritable n'est pas bien connue, mais la plus probable implique des mécanismes nerveux centraux et périphériques entraînant des modifications de la motilité et de la sécrétion digestive. Ceci provoque une hypersensibilité viscérale conduisant à des anomalies cellulaires et moléculaires dans les systèmes entéro-endocrines et immunitaires (Bellini et al., 2014). Le syndrome du côlon irritable se caractérise par une diarrhée et/ou de la constipation, des selles liquides (qui peuvent également contenir du mucus), des douleurs et crampes abdominales, ainsi que des ballonnements et des gaz (Torpy & Golub, 2011).

L'arthrite réactive est causée par une réponse auto-immune ou stimulée par un dépôt d'antigènes bactériens, notamment de *C. jejuni* dans les articulations. L'arthrite réactive est caractérisée par une triade classique d'arthrite inflammatoire des grosses articulations, d'urétrite chez les hommes, cervicite chez les femmes, et l'inflammation des yeux (conjonctivite principalement ou uvéite). Elle est aussi cliniquement associée à une douleur inflammatoire au niveau du dos et à des oligoarthrites (Selmi & Gershwin, 2014).

Ainsi, particulièrement pour *C. jejuni*, la mise en évidence progressive des conséquences à long terme d'une toxi-infection alimentaire repositionne l'intérêt du gestionnaire du risque pour la santé publique vis à vis de ces maladies longtemps considérées comme bénignes (Batz et al., 2013).



### **I.3. *Campylobacter jejuni* dans les élevages de poulets**

*C. jejuni* est une bactérie commensale du poulet qui se trouve principalement dans le cæcum, où son nombre varie généralement de  $10^6$  à  $10^8$  CFU / g (Hermans et al., 2011). L'ingestion d'aussi peu que 35 UFC de *C. jejuni* peut être suffisante pour coloniser le poulet et cette colonisation est complétée en 24 heures (Coward et al., 2008; Stern et al., 1988). Lorsque l'oiseau est colonisé, l'infection se propage rapidement dans le troupeau et la majorité (jusqu'à 95 %) des oiseaux se retrouvent contaminés en quelques jours, car le micro-organisme se transmet facilement par la voie féco-orale ainsi que par l'eau de boisson (Hermans et al., 2011). La colonisation des poulets de chair par *C. jejuni* est également influencée par de nombreux facteurs tels que la source du micro-organisme, la dose infectante, l'âge de l'animal, la période de l'année (prévalence marquée pendant les mois d'été), mais aussi par des facteurs climatiques (température, le soleil et les précipitations) (Hermans et al., 2012).

#### **I.3.1 Vecteurs de *Campylobacter jejuni***

La contamination des poulaillers et l'infection des poulets par *C. jejuni* se font de façon horizontale à partir de sources environnementales. Les facteurs de risques associés à la contamination sont surtout le mauvais entretien du bâtiment, la proximité avec d'autres animaux de ferme, le non-respect du protocole de nettoyage et de désinfection entre les lots produits ou encore la réutilisation de vieilles litières (Newell & Fearnley, 2003). Les vecteurs potentiels de contamination sont les animaux domestiques et sauvages (oiseaux sauvages), les rongeurs, les insectes et l'eau contaminée (particulièrement l'eau stockée ou provenant des tuyaux d'eau mal nettoyés). *C. jejuni* peut également être transporté dans les poulaillers par le personnel (agriculteurs, personnel d'entretien, vétérinaires, les équipes de capture) ainsi que les équipements contaminés utilisés entre divers bâtiments ou secteurs (Gill, 2014).

La transmission verticale a été suggérée par des preuves indirectes (Newell & Fearnley, 2003), mais est considérée, si elle existe, comme un phénomène rare donc représentant un risque faible pour les troupeaux commerciaux (Conlan et al., 2007).

### **I.3.2 Facteurs associés à la colonisation du poulet par *C. jejuni***

*C. jejuni* possède un flagelle polaire composée de O- et N-glycanes, crucial pour s'approcher des sites de fixation et envahir les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal des oiseaux (Dasti et al., 2010). Le chimiotactisme permet la migration de la bactérie vers des conditions favorables (affinité pour la glycoprotéine des mucines, le L-fucose, les acides aminés et les sels d'acides organiques) et est donc déterminant pour sa survie et la colonisation de la muqueuse intestinale (Bolton, 2015). La pompe à efflux de *C. jejuni*, jouant un rôle important dans la résistance aux métaux lourds, aux antibiotiques, aux autres agents antimicrobiens et aux sels biliaires présents dans le tractus intestinal du poulet, contribue aussi à la survie de la bactérie dans l'intestin du poulet (Lin et al., 2002). La régulation de la température, la réponse en cas de choc thermique et la capacité de se défendre du stress oxydatif constituent également des facteurs importants pour la colonisation du poulet par *C. jejuni*. Il en de même pour le transport du fer qui sert de micronutriment pour la croissance et fonctionne comme un catalyseur pour la formation de radicaux hydroxyles (Hermans et al., 2011).

### **I.3.3 Production d'anticorps contre *C. jejuni* chez le poulet**

Dans des conditions rencontrées dans les élevages commerciaux, *C. jejuni* est souvent absent dans le tube digestif des poulets de chair durant les 2-3 premières semaines de vie, mais l'inoculation expérimentale de poussins fraîchement éclos par *C. jejuni* peut établir la colonisation avec succès (Stern et al., 1988). Les raisons de cette phase de latence en production pourraient être attribuées à un effet inhibiteur de la colonisation par *C. jejuni* par des microorganismes commensaux dans l'intestin des jeunes poussins (Laisney et al., 2004),

ou à la présence d'anticorps maternels assurant la protection des oiseaux contre la colonisation (Sahin et al., 2001).

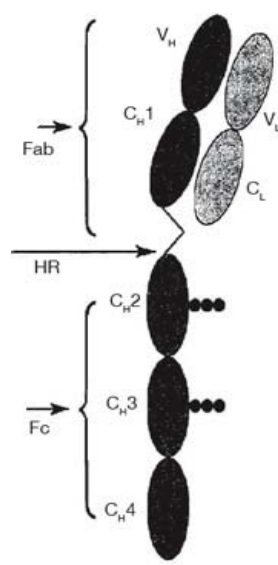
Chez la poule les anticorps présents dans la circulation systémique sont transférés dans l'œuf, puis absorbés dans la circulation embryonnaire afin de conférer plus tard une immunité passive aux poussins. Les anticorps maternels transférés sont principalement des anticorps IgY, mais un passage minimal d'anticorps IgA et IgM se produit également (Kowalczyk et al., 1985; Rose et al., 1974). Les anticorps IgY sont transférés de manière sélective du système circulatoire de poule au follicule ovarien. Ce transfert se fait par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique sur la surface de la membrane de la vésicule ombilicale, qui permet le transport de toutes les sous-populations sélectives de IgY présentes dans le sang maternel (Rose, 1981).

Les anticorps IgY sont principalement retrouvés dans le jaune d'œuf, contrairement aux anticorps IgA et IgM qui sont plutôt détectés dans le blanc d'œuf non embryonné, le liquide amniotique des œufs embryonnés et l'appareil digestif d'embryons de 19 jours qui contiennent également des IgY (Rose et al., 1974).

IgY représente la classe d'immunoglobuline prédominante, détectée chez des poussins de 2 jours d'âges issus d'œufs provenant de poules infectées par *C. jejuni* contrairement à des poussins éclos à partir d'œufs de poules SPF (specific pathogen-free) (Sahin et al., 2003).

Dans la première semaine de vie, lorsque le niveau d'anticorps maternels circulants et la perméabilité intestinale des poussins sont élevés, les anticorps IgY sont transportés au niveau de la muqueuse intestinale, lui conférant une protection contre la colonisation (Sahin et al., 2001). Le niveau des anticorps maternels chez les jeunes poussins diminue progressivement à des niveaux indétectables à 2 à 3 semaines d'âge, période qui coïncide avec l'apparition d'infections par *C. jejuni* en élevages commerciaux (Hermans et al., 2014).

Structurellement la molécule d'IgY se compose de deux lourdes (H) identiques et deux chaînes légères (L) identiques reliées par un pont disulfure. La chaîne légère se compose d'une région variable (VL) et un domaine constant (CL). La chaîne lourde se compose quant à elle d'une région variable (VH) et de quatre domaines constants (CH1, CH2, CH3 et CH4). Les deux zones de la chaîne lourde sont liées par une région charnière (CH). Le fragment Fc de IgY possédant deux chaînes latérales de carbohydrates est responsable de la plupart des fonctions biologiques (Figure 1) (Chalghoumi R. et al., 2009).



**Figure 2 : Structure moléculaire de l'anticorps IgY (adapté d'après Chalghoumi R. et al. (2009))**

#### **I.4 Prévention et stratégie de contrôle de la colonisation du poulet par *C. jejuni***

La maîtrise de *Campylobacter* peut intervenir à différents niveaux de la chaîne alimentaire. Rosenquist et al. (2003) estiment que les stratégies d'atténuation « de la ferme à la fourchette » seraient importantes à considérer en ce qui concerne la réduction de la transmission de *C. jejuni* à l'humain. Selon Nauta et al. (2005), une stratégie d'intervention combinée visant une plus faible concentration de *C. jejuni* intestinale, la réduction des fuites fécales lors de l'abattage ainsi que l'usage de la décontamination (chimique ou autre) à certains stades après

l'éviscération est la plus prometteuse, et serait plus efficace que de viser à diminuer la prévalence au seul niveau du troupeau, de l'animal ou du produit. Une réduction de 1 log 10 UFC sur la carcasse permettrait d'éviter environ 50-90 % des cas de campylobactériose humaine (EFSA, 2011; Nauta et al., 2005). Pour obtenir ce même effet en diminuant la prévalence en élevage seulement, celle-ci devrait être abaissée de 90 %. Ce qui sera probablement plus difficile à réaliser que la réduction de la concentration (Nauta et al., 2005).

Il a été démontré que durant les différentes étapes du processus d'abattage, les *C. jejuni* caecaux passent de 8 log 10 UFC/g de contenu à une moyenne de contamination de 2 log10 UFC/g de peau sur les carcasses (Hue et al., 2010). *C. jejuni* n'est normalement pas en mesure de croître et de se multiplier dans les aliments, en raison principalement de ses exigences atmosphériques spécifiques pour sa croissance et de son incapacité à se multiplier à basse température (Hazeleger et al., 1998; Park, 2002), d'où la nécessité de diminuer la prévalence et surtout le nombre de *C. jejuni* dans les élevages de volailles (Rosenquist et al., 2003). Ainsi diverses stratégies de contrôle ont été testées *in vitro*, en conditions expérimentales et au niveau de la ferme pour réduire la colonisation des volailles par *C.jejuni*.

#### **I.4.1 Utilisation de moustiquaires**

Selon Hald et al. (2007), l'utilisation de moustiquaires empêchant l'entrée des insectes volants, vecteurs potentiels de *C. jejuni*, dans le poulailler réduirait considérablement la contamination des volailles par *C. jejuni* durant l'été. Pour cela, ils recommandent que l'utilisation soit associée à des mesures de biosécurité rigoureuses.

#### **I.4.2 Utilisation des vaccins**

Plusieurs types de vaccins dont des vaccins à base de protéines flagellaires ou membranaires, des vaccins inactivés, tués ou des vaccins recombinants atténués issus de *Salmonella*, administrés soit par voie nasale, par voie orale, ou par voie intra péritonéale ont été étudiés.

Mais aucun de ces vaccins n'a complètement empêché la colonisation des poulets par *C. jejuni* (Annamalai et al., 2013). Les travaux sur le développement de vaccins se heurtent encore à un déficit d'informations sur le système immunitaire du poussin, qui freine par exemple le développement d'un vaccin atténué exprimant l'épitope peptidique linéaire de *C. jejuni* (Omp18/Cja) (Messaoudi et al., 2013). Cette protéine identifiée comme une protéine immunogène majeure chez les patients humains atteints de campylobactériose est hautement conservée chez les souches de *C. jejuni* isolées chez les humains, les chiens, les chats, les veaux et les poulets, mais est différent de celle des autres espèces de *Campylobacter* (Burnens et al., 1995).

#### **I.4.3 Bactériophages**

L'activité lytique des bactériophages a également été testée pour diminuer la colonisation du poulet par *C. jejuni*. Une infection initiale avec une haute dose de phages peut réduire les charges bactériennes de plusieurs ordres de grandeur, mais malheureusement cette diminution n'est pas stable et se retrouve réduite au bout de quelques jours. Les bactéries développent également une résistance aux phages par une modification des récepteurs de surface bactérienne ce qui rend les stratégies de contrôle par les phages inefficaces (Sørensen et al., 2012). De plus la diversité des récepteurs protéiques de *C. jejuni* exige une large population de phages, ce qui augmente aussi la complexité de cette stratégie (El-Shibiny et al., 2009; Messaoudi et al., 2013; Wassenaar, 2011).

#### **I.4.4 Probiotiques**

Des probiotiques (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, et *Pediococcus acidilactici*) isolés des intestins de poulets sains ont été efficaces pour inhiber la colonisation des oiseaux par *C. jejuni* (Ghareeb et al., 2012). Toutefois, l'efficacité des probiotiques est incertaine, principalement en raison de la rareté des données sur l'effet des

probiotiques contre ce pathogène, et sur le fonctionnement du microbiote intestinal chez le poulet (Ganan et al., 2012; Thibodeau et al., 2015).

#### **I.4.5 Bactériocines**

Un certain nombre de bactériocines produites par des bactéries commensales (*Lactobacillus salivarius* et *Enterococcus faecium*) ont permis des réductions importantes (5-8 log<sub>10</sub> CFU) de la colonisation intestinale par *C. jejuni*. Cependant, il a été démontré qu'une résistance intrinsèque et acquise contre les bactériocines peut se développer grâce à la pompe d'efflux CmeABC. Cette résistance, bien que peu fréquente, peut être transférée par transformation naturelle entre différentes souches et espèces de *C. jejuni* (Hoang et al., 2011; Kaakoush et al., 2015; Lin et al., 2002).

#### **I.4.6 Additifs alimentaires**

Des additifs alimentaires tels que les acides organiques (principalement à chaîne moyenne comme l'acide caprylique et l'acide caproïque) et les huiles essentielles (Eucalyptus occidentalis, orange Valencia, trans-cinnamaldéhyde, eugénol, carvacrol, thymol...) ont également été testés et *in vitro* ces molécules sont bactéricides à très faibles concentrations contre *C. jejuni* (Grilli et al., 2013b; Kurekci et al., 2012). Au niveau de groupe de recherche, les résultats d'études préliminaires *in vivo* sur le potentiel des acides organiques et des huiles essentielles microencapsulées à réduire la présence de *C. jejuni*, ont suggéré que ces composés naturels peuvent être efficaces pour lutter contre *C. jejuni* et améliorer la santé globale des oiseaux. Toutefois, le mécanisme d'action n'est pas connu et l'effet observé est faible. Cette faible réduction du pathogène dans les caecums à 7 jours post inoculation, a été suivie ensuite d'une augmentation inattendue de la présence du pathogène. Ceci semble indiquer que ces composés ont favorisé une sélection de *C. jejuni*, inoculés sous forme de culture multiple dans ce modèle. Cette sélection pourrait se faire soit par inhibition des

bactéries compétitives, soit par la création d'un environnement favorable au développement du pathogène (Thibodeau et al., 2014).

Ainsi, diverses mesures de contrôle ont été testées pour réduire la colonisation des volailles par *C. jejuni*, mais aucun moyen efficace de contrôle n'est commercialement disponible actuellement.

#### **I.4.7 Poudre d'œufs**

Une caractéristique majeure de l'épidémiologie de *C. jejuni* chez le poulet de chair se traduit donc par l'absence apparente de ce micro-organisme du tube digestif dans les 2-3 premières semaines de vie des oiseaux, ce qui pourrait impliquer une protection pendant cette période. Une origine envisagée pour cette protection est le maintien pendant cette période d'une immunité maternelle transmise *in ovo* via le jaune d'œuf. Cette protection est généralement attribuée aux anticorps IgY, particulièrement ceux dirigés contre les protéines associées à la colonisation (CAP dont *cadF*, *flaA*, *flaB*, *porA* ou MOMP, *cmeC*) (Al-Adwani et al., 2013). Ces protéines membranaires (OMP) sont efficacement reconnues par le système immunitaire des volailles, d'où leur utilisation pour la production de vaccins contre *C. jejuni* (Annamalai et al., 2013).

Dans un essai à visée préventive, Tsubokura et al. (1997) ont administré simultanément par voie orale à des oiseaux de 14 jours d'âge une suspension de 0,5 g d'une préparation d'IgY purifiés solubles dans l'eau avec  $10^6$  UFC de *C. jejuni*. Ces anticorps étaient obtenus à partir de jaunes d'œufs de poules immunisées avec des cellules entières inactivées de *C. jejuni*. Ces auteurs ont rapporté une importante réduction du nombre moyen de *C. jejuni* par g de contenu caecal dans l'essai préventif. Dans des essais curatifs, les oiseaux infectés par *C. jejuni* (excrétant  $10^7$  à  $10^5$  UFC/g de fèces) ont reçu par voie orale une suspension de 0,2 g de la préparation d'IgY, 4 jours après l'infection. Ce traitement à visée curative a montré cette fois



une réduction de moins de 1log de la concentration caecale de *C. jejuni*. Il faut souligner cependant que ces réductions ont été brèves, car les comptes de *C. jejuni* sont retournés à leurs niveaux initiaux de  $10^5$  UFC/g fèces après 24 et 48 h pour les traitements curatifs et à  $10^6$  UFC après 72 h pour le traitement préventif. La question de la rémanence de l'action des anticorps protecteurs est donc soulevée, une présence prolongée de ces derniers n'est pas testée par ces auteurs.

In *vitro*, l'utilisation d'anticorps IgY spécifiquement dirigés contre les protéines de surface (CAP dont CadF, FlaA, FlaB, PorA (MOMP), CmeC) de *C. jejuni* extraits d'une poudre de jaune d'œuf a inhibé la motilité, l'attachement aux cellules intestinales et/ou l'absorption efficace des nutriments par le pathogène. Ce qui suggère qu'*in vivo* ces anticorps pourraient diminuer la capacité de *C. jejuni* à rivaliser efficacement avec le microbiote indigène (Al-Adwani et al., 2013).

Dans une étude évaluant l'efficacité d'une poudre de jaune d'œuf non potentialisée (contenant des anticorps normaux non dirigés contre *C. jejuni*) contre *C. jejuni*, un aliment contenant une concentration allant de 1 à 10 % de cette poudre a été utilisé chez des poules pondeuses infectées avec  $10^7$  UFC de *C. jejuni* et traitées en continu pendant 4 semaines après l'infection. Aucune réduction de la colonisation par *C. jejuni* n'a été observée avec l'aliment contenant 1 et 2,5 % de poudre non potentialisée. Tout au long du test la population de *C. jejuni* dans l'intestin a été significativement réduite de 2 et 3 log<sub>10</sub> UFC par l'aliment contenant respectivement 7,5 et 10 % de poudre non potentialisée. À la fin de l'étude, le pathogène était également absent dans les intestins, les ovaires, les oviductes ainsi que les rates des poules traitées avec le supplément (Kassaify & Mine, 2004b).

Hermans et al. (2014) ont démontré que l'utilisation d'une poudre potentialisée à l'aide d'une fraction protéique de *C. jejuni*, incorporée à 5 % dans l'alimentation pendant 3 jours avant

l'infection a bloqué la transmission de *C. jejuni* chez des poussins âgés de 13 jours dans un modèle de « seeders » (utilisant des oiseaux infectés mis en contact avec des oiseaux non infectés pour mieux mimer, selon les auteurs, la transmission horizontale naturellement observée en élevage). La même poudre a entraîné une réduction de 6,7 log 10 UFC / g de la colonisation chez les poussins infectés avec  $8.10^4$  UFC de *C. jejuni*. Toujours dans le modèle de « seeders », ces auteurs ont également testé l'effet d'une poudre potentialisée à l'aide de lysats de cellules entières de *C. jejuni*, chez des poussins âgés de 13 jours. Avec la poudre incorporée à 5 % dans l'alimentation pendant 4 jours avant l'infection, les auteurs ont observé une diminution de la transmission et une réduction de 4,4 log 10 UFC de la colonisation chez les poussins infectés avec  $3.10^4$  UFC de *C. jejuni* (Hermans et al., 2014).

Cette étude encourage l'utilisation de poudre d'œuf de façon prolongée, mais les quantités à fournir, sur le long terme, excluent une perspective commerciale de cette approche.

Pour déterminer l'efficacité de l'immunothérapie passive à court terme utilisant une poudre de jaune d'œufs potentialisée contre les protéines associées à la colonisation (CadF /FlaA /FlpB /MOMP /CmeC /JlpA /Peb1A), des poulets ont été infectés à 3 jours d'âge et traités à partir de 12 à 14 jours d'âge, donc avec une visée curative. L'alimentation était complétée avec 10 % d'un cocktail des sept poudres et les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différences significatives dans ces conditions, entre la colonisation caecale par *C. jejuni* des groupes traités et du groupe contrôle positif non traité (Paul et al., 2014).

Au regard des résultats obtenus par ces différents auteurs, il est difficile de déterminer si les effets observés dans les différentes études sont dus à la poudre de jaune ou aux anticorps contenus dans les poudres. Ces études ne donnent pas d'informations sur le statut des poules qui ont fourni les œufs pour les poudres et ne présentent pas une caractérisation des anticorps contenus dans les jaunes frais ayant servi à la production des poudres, alors qu'il a été

démontré que le mode d'immunisation de poules pondeuses par *C. jejuni* modifie la composition des jaunes de façon importante. En effet dans une étude antérieure conduite à la Chaire de recherche en Salubrité des Viandes (CRSV), différents modes d'immunisation de poules contre *C. jejuni* ont permis une production d'œufs frais ainsi qu'une caractérisation des anticorps extraits de ces différents jaunes d'œuf frais. Les résultats montrent des niveaux de production d'anticorps différents selon le mode d'immunisation et suggèrent, *in vitro*, des effets sur ce pathogène (Perron et al, communication personnelle). De plus l'ensemble de ces travaux ne proposent aucune forme de protection des anticorps contenus dans les poudres de jaune d'œufs vis-à-vis d'une éventuelle dégradation et / ou dénaturation pendant le transit digestif. Ce qui pourrait expliquer l'absence d'efficacité de la poudre de jaunes d'œufs ou pour le moins, la grande quantité de poudre à administrer pour observer un effet.

### **1. 5 Techniques de production de poudre et Mode d'encapsulation**

L'encapsulation est une piste utilisée pour protéger des molécules actives de la digestion et permettre leur libération ciblée. Différents modes d'encapsulation existent, précédés d'un séchage par atomisation (Spray drying), refroidissement par pulvérisation (Spray cooling), atomisation par congélation (Spray chilling) ou encore lyophilisation (Cocero et al., 2009). Les matériaux de revêtement sont généralement des matériaux naturels tels que le sucre, des protéines, des lipides, et des polymères synthétiques ou modifiés (Solanki et al., 2013). L'encapsulation lipidique, déjà appliquée avec succès dans d'autres conditions d'encapsulation d'additifs alimentaires constitue une solution applicable, simple de mise en œuvre et permettant une libération tardive au site de colonisation visé (Holser, 2013).

Le séchage par pulvérisation est utilisé dans l'industrie alimentaire pour fournir des huiles aromatiques avec une certaine protection contre la dégradation et/ou l'oxydation, mais aussi pour la production de poudre à partir de produits liquides (Gouin, 2004). Le produit liquide est atomisé dans un courant d'air chaud pour obtenir une poudre instantanée. Le liquide initial

alimentant le pulvérisateur peut être une solution, une émulsion ou une suspension. Le séchage par pulvérisation en fonction du liquide initial et des conditions de fonctionnement, donne une poudre très fine (10-50 µm) et des particules de taille (2-3 µm) (Gharsallaoui et al., 2007).

Le spray cooling est la technologie d'encapsulation la moins chère et couramment utilisée (Gouin, 2004). Dans le spray cooling, le produit et la substance de revêtement sont atomisés dans l'air refroidi ou réfrigéré entraînant la solidification du matériau de revêtement autour du produit. Contrairement au séchage par atomisation, le refroidissement par pulvérisation ne comporte pas évaporation de l'eau. Dans refroidissement par pulvérisation, le matériau de revêtement est généralement une certaine forme d'huile végétale ou de ses dérivés (Desai & Jin Park, 2005).

#### **I.6 Problématique, hypothèse et objectifs**

Comme additif incorporable à l'aliment, une poudre de jaune d'œufs potentialisée semble être une avenue efficace pour bloquer ou diminuer la colonisation du poulet par *C. jejuni*. Cependant, bien que l'immunisation passive, à travers l'utilisation de poudres de jaune d'œufs potentialisées, semble être une approche prometteuse, les conditions de leur usage comme additif dans l'aliment pour bloquer ou diminuer la colonisation du poulet par *C. jejuni*, restent à déterminer. De plus, le maintien de la quantité et de la qualité des anticorps pendant la transformation des jaunes en poudre et après une étape d'encapsulation (visant à protéger les anticorps dans le transit digestif) est à confirmer. Ces étapes sont préalables à l'évaluation de l'effet du mode d'immunisation des poules dans la perspective de la production d'un additif alimentaire pour contrer *C. jejuni*.

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'immunisation passive, par le maintien d'une concentration importante d'anticorps intestinaux contre *C. jejuni*, à travers l'utilisation de

poudres de jaunes d'œufs encapsulées contenant des anticorps obtenus selon différents modes d'immunisation et actifs *in vitro* contre *C. jejuni*, peut réduire la présence de *C. jejuni* chez le poulet à griller. L'objectif visé est d'atteindre une réduction d'au moins 2 log de la concentration caecale du pathogène chez des oiseaux traités.

Les objectifs spécifiques de ce travail seront, disposant de jaunes d'œufs frais issus de poules immunisées contre *C. jejuni* selon différents modes, d'étudier l'impact d'un processus de fabrication d'un additif alimentaire encapsulé. Les étapes de séchage des jaunes en poudres (Spray dry) puis d'encapsulation de ces poudres seront particulièrement testées. Il s'agira de caractériser (quantitativement et qualitativement) les anticorps IgY présents dans les différentes poudres de jaunes non encapsulées, puis encapsulées, et enfin d'évaluer *in vivo* la capacité des poudres de jaunes d'œufs encapsulées à réduire la colonisation intestinale du poulet par *C. jejuni*.

# Chapitre II

## ***Campylobacter jejuni* mitigation option in chickens: Study of immunization mode and effect of encapsulation of anti *C. jejuni* egg yolk powder used as a food additive**

Amina Soumaila Garba<sup>1,3</sup>, Alexandre Thibodeau<sup>1,3</sup>, Audrey Perron<sup>1,3</sup>, Sylvette Laurent-Lewandowski<sup>1,3</sup>, Ann Letellier<sup>1,2,3</sup>, Philippe Fravallo<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Chaire de recherche industrielle du CRSNG en salubrité des viandes, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal; <sup>2</sup>Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal; <sup>3</sup>Groupe de recherche et d'enseignement en salubrité alimentaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal

### **ABSTRACT**

*Campylobacter jejuni* is a major zoonotic bacterial agent responsible for foodborne gastroenteritis worldwide, increasing the burden on public health. The handling and consumption of contaminated poultry meat are the main identified sources of human contamination. As for now, there is no economically viable farm mitigation option currently available to fight this zoonotic disease that can lead to serious complications (Guillain-Barré syndrome) and incidentally large public health costs. Control of *Campylobacter* load in the poultry primary production is recognized as an avenue to lower exposition of humans to the pathogen. The inability of this commensal bacterium to colonize the chicken during the first weeks of life suggests a protection of the chicks by maternal antibodies (IgY) transmitted *in ovo* via the egg yolk. This implies that maintaining an efficient concentration of intestinal antibodies against *C. jejuni* should be explored to increase protection of the chicks. Previous studies explored this strategy and suggested that the quantity and quality of antibodies effectively present, for a prolonged time, in the bird digestive tract would be determinant. The

use of a potentiated egg yolk powder as food additive could reduce colonization of chickens by this pathogen. Several studies have tested the egg yolk powder, potentiated or not against *C. jejuni*, but data on these studies show an inconstant reduction of cecal *C. jejuni* (maybe due denaturation and/or degradation of the antibody during the digestive transit). These studies also present rare characterizations of antibodies from egg yolks tested whereas it has been shown that the immunization method (oral and subcutaneous inoculation) of laying hens by *C. jejuni* changes the egg yolk composition significantly. To answer these knowledge gaps, an *in vitro* characterization (quantification, bacterial antigen recognition profiles, bactericidal effect, *C. jejuni* mobility limitation) of antibodies extracted from egg yolk powders originating from eggs of hens immunized with different modes of immunization was conducted. This was done in the perspective of manufacturing process evaluation, so the effect of Spray drying, method used to obtain the egg yolk powder, and encapsulation of the powders, in regards to the hens immunization mode, on the quantity and quality of the anti-*C. jejuni* antibody was evaluated. An *in vivo* test with the encapsulated powders, incorporated at 5% in the feed, was performed to evaluate their effectiveness to inhibit or reduce chicken colonization by *C. jejuni*. Despite the *in vitro* encouraging results, the *in vivo* trial revealed neither prevention nor reduction of *C. jejuni* colonization in the experimental conditions examined.

## INTRODUCTION

Currently, campylobacteriosis is ranked fourth (8.4%) of the most prevalent diarrheal diseases in the world, evaluated to 7.5 million years of disability-adjusted life years (DALY), more than *Shigella* (7.1 million) and enterotoxigenic *Escherichia coli* (6.9 million) (Murray et al., 2012). The economic costs associated with campylobacteriosis are tremendous (Havelaar et al., 2012) and serious complications such as Guillain-Barré syndrome, reactive arthritis, and irritable bowel syndrome may occur consecutively to campylobacteriosis (Kaakoush et al.,

2015). Handling or consumption of raw or undercooked poultry meat have been identified as the main sources of human contamination by *C. jejuni*, the etiological agent of the foodborne disease (Hoelzl et al., 2013; Skirrow, 1977). *C. jejuni* is a commensal bacterium of digestive tract of chickens and the asymptomatic carriage generally varies from  $10^6$  to  $10^8$  CFU / g (Hermans et al., 2011). This bacterium is unable to multiply in foods during processing or storage. Hence, for mitigation of *C. jejuni* load in the first step of the production, the birds themselves appear to be an interesting avenue in a public health perspective. The quantitative risk assessments indicated that a 3 log<sub>10</sub> reduction of *C. jejuni* in the intestines of chickens or a reduction of 2 log<sub>10</sub> on the carcass would reduce public health risks by 90% (EFSA, 2011; Rosenquist et al., 2003). Various control measures have been tested at the farm level to reduce the colonization of poultry by *C. jejuni* but no effective control strategy is yet commercially available (Grilli et al., 2013a; Hald et al., 2007; Umaraw et al., 2015). In commercial conditions, *C. jejuni* is usually undetectable in broilers during the first 2-3 weeks of life, and this lag phase could be attributed to the presence of maternal IgY antibodies transmitted via the yolk egg (Lin, 2009; Sahin et al., 2002).

In fact, protective effects of anti *C. jejuni* IgYs (from vaccinated hens) were described following oral inoculation of chickens with a pre-incubated mixture of IgYs and *C. jejuni* (Tsubokura et al., 1997). In this study the authors reported a significant reduction in the average number of *C. jejuni* per gram of cecal contents, but these reductions were brief because the counts of *C. jejuni* returned to their initial levels after 2- 3 days. The question of the persistence of the action of protective antibodies was raised and the effect of a prolonged presence of these antibodies was not tested by these authors.

demonstrated that the use of a potentiated EYP incorporated at 5% in the diet for 4 days before infection, reduced the transmission to other birds in a seeder model (using infected birds in contact with uninfected birds to better mimic, according to the authors, horizontal



transmission naturally observed in livestock) and lead to a drastic reduction of 4,4 - 6,7 log 10 CFU in seeders 3 days post inoculation. Kassaify & Mine (2004b) reported that prophylactic treatment with 10% EYP from non-immunized hens for 4 weeks before infection resulted in 3-4 log reduction of *C. jejuni* fecal counts 7 days post inoculation, in birds of 13 days of age. Interestingly, Paul et al. (2014) showed that a long-term prophylactic treatment (until 3 weeks of age) with 10% of EYP from hyper-immunized hens or non-immunized hens in feed was not sufficient to significantly reduce cecal counts of *C. jejuni*, at 7 days post inoculation.

It is unclear whether the effects observed in the different studies are due to the EYP or specifically to antibodies contained in EYP. These studies did not provide information on the status of hens that provided the eggs for EYP and did not present a characterization of antibodies contained in fresh egg yolks used for the production of EYP. Moreover, these works did not assess the benefits of EYP antibodies protection from a possible degradation and / or denaturation during the digestive transit, which could explain sometimes the lack of efficacy of the EYP, or at least the large amount of powder to be administered before observing an effect.

In a recent study conducted in our laboratory, different immunization methods were used for the production of antibodies against *C. jejuni* in eggs. The antibody characterization from these different fresh egg yolk preparations suggested, *in vitro*, that the some potentiated egg yolks (according to the hen's immunization protocol) were rich in anti-*C. jejuni* antibodies and that they could be used to control *C. jejuni* in chickens (Perron et al paper in preparation). Encapsulation could be an option to protect the antibodies from digestion and enable their effective and targeted delivery in the chicken gut.

Different encapsulation modes exist, after dehydration by spray drying, spray cooling, spray chilling or lyophilization (Cocero et al., 2009), that uses natural materials such as sugar,

proteins, lipids, and synthetic or modified polymers are mostly used (Solanki et al., 2013). Lipid encapsulation, already successfully applied in other encapsulation conditions of food additives, appears as a simple and cost effective solution for implementation of such a mitigation strategy (Holser, 2013).

In the present study, the ability of IgY contained in potentiated egg yolk powder to reduce chicken colonization by *C. jejuni* was tested on the egg yolks showing the most promises, according to the hens immunization protocols used.

The main objectives of this study were the characterization of the future additives along the critical steps of the manufacturing process. The impact of spray drying and encapsulation on the IgY antibodies were assessed prior to an *in vivo* evaluation of the ability of the feed additive candidates to reduce *C. jejuni* colonization of chickens.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Preparation of egg-yolk powders and encapsulated**

The eggs were collected during a previous study, from forty specific pathogen free (SPF) White Leghorn hens that were distributed in 4 groups: control (i.e. not in contact with *C. jejuni* (NI), orally challenged with live *C. jejuni* strains (OI), subcutaneously injected with a mix of outer membrane proteins extracted from the same *C. jejuni* strains (OMP) or subcutaneously injected with the corresponding mix of formalin-killed *C. jejuni* strains (KB) (according to Perron et al., in preparation). The *C. jejuni* strains used in the egg production study were strains EL34, EL38 and OL27 that were previously, extensively characterized by Thibodeau et al. (2014). The strain RM1221, isolated from poultry samples, was also used. In the subsequent experiments, all 4 strains are referred to the Homologous strains. *C. jejuni* strains 81116 and 700819 were also used and are referred to Heterologous strains.

Eggs were individually broken to aseptically separate egg yolks that were collected in sterile buckets, homogenized and converted to powder by Spray Drying using a commercial dryer (Niro Atomizer, Copenhagen, Denmark) available at the Food Research and Development Centre (FRDC) located in St-Hyacinthe, Canada. The temperature in the dryer was set to 183°C and the outlet temperature was 75°C. The resulting egg yolk powders (EYP) were separately collected according to the hens grouping and kept separately at 4°C. Parts of the powders were further encapsulated in a lipid matrix by Spray Cooling. The resulting encapsulated egg yolk powders (EEYP) were also kept at 4°C until use.

### **IgYs Extraction**

The extraction of IgYs from EYP was done according to the protocol described by Al-Adwani et al. (2013), with slight modifications. Briefly, 9 mL of sterile PBS and 3 g of EYP were vigorously mixed, then an equal volume of chloroform was added. The mixture was homogenized then centrifuged at 4000x g for 30 min and the water-soluble fraction, which contained the IgYs, was collected.

IgYs extraction from EEYP samples followed a more stringent procedure: aliquots of each EEYP were placed at -80°C overnight and then mechanically broken (using a cleaned mortar and pestle). The extraction method then followed the one applied on EYP except for the addition of silica beads (MP Biomedical, Ohio, USA) and the use of a FastPrep<sup>®</sup>-24 (Tissue and Cell Homogenizer, MP Biomedical, Ohio, USA) (6.0 m/s, 30 s) as a first step to increase the release of IgYs from 3g of the EEYP.

### **Agglutination test**

For agglutination tests, Homologous and Heterologous strains were grown on modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate *agar* (mCCDA) (Lab M Limited, Lancashire, United Kingdom), supplemented with Cefoperazone and Amphotericin (Lab M Limited, Lancashire,

United Kingdom) at 42°C for 24 h in BD CampyGen gazpak system (Becton, Dickinson and Compagny, Sparks, USA) for microaerobic conditions (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, and 5% O<sub>2</sub>) (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). Colonies were suspended in Phosphate Buffer Saline (PBS) (Oxoid Limited, Hampshire, England) to reach a 1.0 Optical Density (OD) measured at 600 nm, and 200 µl of the suspension were transferred in a well of an agglutination glass plate. Afterwards, 200 µL of IgY extracts were added, and the suspension was agitated and followed up to a maximum of 5 min or until agglutination appeared. Controls were composed of 200 µL of PBS (to control for auto agglutination of the strains) or 200 µL of IgYs from NI extracts to assess the role of non-specific antibody presence on the agglutination.

### ***C. jejuni* total protein extractions**

*C. jejuni* Homologous and Heterologous strains from an O/N culture were harvested, suspended in 6 mL of Brucella Broth (Becton, Dickinson and Compagny, Sparks, USA) and centrifuged at 3000x g for 15 min at 4°C. The pellet was suspended in 2 mL of PBS. After sonication (5 times, 0.4 Watt for 30 s, 1 min of cooling period between each time), the suspension was centrifuged at 10 000x g for 10 min to remove cellular debris. The total proteins were recovered in the supernatants and conserved in aliquots at -20°C. The protein concentration was determined with the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA).

### **Total or anti-*C. jejuni* IgYs Quantification by ELISA**

#### Coating of plates:

Quantification of total and specific IgY levels in EYP and EEYP extracts was done by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using the Chicken IgG ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories, Texas, USA). To quantify total IgYs, flat-bottomed 96-well polystyrene plates (Nunc-Immuno Plates Maxisorp, Inter Med, Denmark) were coated with

goat anti-chicken IgG antibodies, according to the protocol recommended by the manufacturer (1 $\mu$ L of antibodies to 100 $\mu$ L of coating buffer (0,05M Carbonate-bicarbonate [pH 9,6])).

To quantify anti-*C. jejuni* IgYs, plates were coated with a suspension of total protein (25 $\mu$ g/well) in coating buffer from a mix of the Homologous strains total protein extracts.

After incubation at 25°C for 1h, the plates were washed five times (washing solution: 50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, pH 8.0).

#### Blocking:

Plates were incubated with the blocking buffer (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 5% (w/v) skim milk powder, pH 8.0) at 25°C for 1h. After incubation, the plates were washed five times with the washing solution.

#### Samples:

EYP or EEYP extracts were diluted 1:80 000 in Sample/Conjugate Diluent (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 5% milk, 0.05% Tween 20) to quantify total IgYs and 1:10 000 for anti-*C. jejuni* IgYs. Then 100  $\mu$ L of each dilution were added to individual wells. A standard curve was prepared according to the Chicken IgG ELISA Quantitation Set protocol (Bethyl Laboratories, Texas, USA). Duplicate and triplicate wells were used for standards and samples respectively. After incubation at 25°C for 1h, the plates were washed five times with washing solution.

#### Revelation:

HRP Conjugated Chicken IgG-Fc Detection Antibody (Bethyl Laboratories, Texas, USA) were diluted 1:40 000 in the Sample/Conjugate Diluent and then transferred to each well (100  $\mu$ L/well). After 1h of incubation at 25°C, plates were washed five times.

TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine) (Bethyl Laboratories, Texas, USA) was added to each well (100  $\mu$ L/well), and plates were incubated at 25°C in the dark for 15 min. The

reaction was stopped by adding 100 µl of the ELISA Stop Solution (0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Bethyl Laboratories, Texas, USA). Finally, absorbance at 450 nm values of individual wells were measured by an *ELISA Universal Microplate Reader "EL 800"* (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA) and analyzed with the KC junior software (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA).

Total IgY and anti-*C. jejuni* IgY concentrations in EYP and EEYP were calculated against the standard curve.

For EEYP the incorporation coefficients were considered to calculate the concentration, excluding the lipid fraction, to assess the effect on embedding on the original IgY concentrations present in the power fraction of the feed additive.

### **SDS-PAGE and immunoblotting**

Total protein (40 µg/well) extracts from each *C. jejuni* strains were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with a 4.5% stacking gel and a 10% separating gel, at 100 V for 30 min and 200 V for 2h in running buffer (25mM Tris, 0.2M glycine, 0.1% SDS).

Samples were previously boiled in the sample loading buffer (62.5 mM Tris HCL [pH 6.8], 10% Glycerol, 3% SDS, 5% β-mercaptoéthanol, 0.01% bromophenol blue) at 100°C for 5 min prior to run the electrophoresis.

The separated proteins were transferred onto polyvinyl difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad Laboratories, Ontario, Canada) using transfer buffer (25 mM Tris [pH 8.3], 192 mM glycine, 20% methanol) at 100 V for 1h at 4°C (Mini Trans-Blot<sup>®</sup> cells, Bio-Rad). The membranes were blocked with blocking buffer (10 mM Tris [pH 7.4], 0.15M NaCl, 2% milk) for 1h.

The membranes were then incubated with an appropriate amount of IgYs from EYP and EEYP extracts. Two dilutions were performed for EYP extracts: 1:150 (NI – OI) and 1:300

(OMP - KB) in blocking buffer for 1h. Two dilutions were also performed for EEYP extracts: 1:75 (NI – OI) and 1:150 (OMP - KB) in blocking buffer for 1h at 25°C. Washing buffer (10 mM Tris [pH 7,4], 0,15M NaCl) was used five times to wash the membranes and then, they were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-chicken- IgG (Bethyl Laboratories, Texas, USA) at a dilution of 1:75 00 in Sample/Conjugate Diluent for 1h at 25°C. Finally, membranes were washed five times and developed by incubation in a solution containing 4-chloro-1-naphthol (Acros Organic, New Jersey, USA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fisher Scientific, New Jersey, USA) and stopped in methanol (Fisher Scientific, New Jersey, USA) for 20 min.

### **Motility assay**

Homologous and Heterologous strain were individually suspended to reach an absorbance of 1.00 at 600 nm. Motility assays were performed in Brucella Broth Medium supplemented with 0.4% Agar (Becton, Dickinson and Co., Sparks, USA) supplemented with EYP or EEYP IgY extracts (1:100).

The bacteria were sensitized by contact with the IgY for 3 min and 10 µL was dropped on the surface of the semisolid medium. Motility plates were incubated 24h at 42°C under microaerobic conditions. The growth diameter was then measured and the migration ratios (diameter achieved for a specific extract divided by to the value obtained with the group NI) were compared. For each strain and each antibody extracts, 3 independent trials were carried.

### **Bactericidal assay**

The bactericidal assay was performed in sterile microcentrifuge tubes, with the Homologous strains for the groups OMP and KB EYP. Each reaction contained 112,5 µL of diluted EYP (10% wt/vol) in Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Lab M Limited, Lancashire, United Kingdom), 112,5 µL of serum from 35 days of age chickens previously infected with *C. jejuni* and 25µL of bacteria suspended in BHI (OD of 1.00 at 600 nm). Controls included (i) bacteria with complement from chickens, without extracted antibodies; (ii) bacteria with diluted EYP

alone; (iii) only bacteria; (iv) bacteria with inactivated (56°C for 30 min) complement and diluted EYP. Assays were incubated for 1h at 37°C. After incubation, 100 µL of the suspension was plated on Tryptic Soya Agar (TSA) containing 5% (v/v) of sheep's blood (Oxoid, Ontario, Canada). After 48 h of incubation at 42 °C under microaerobic conditions, colonies were numerated and bactericidal activity was expressed as the percentage of reduction of the number of live bacteria counted compared to the control bacteria with inactivated complement and diluted EYP condition.

### **In vivo assay**

*In vivo* assay was performed with the approval of the Ethics Committee (CEUA) of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal. Day-old chicks (96) were distributed into two rooms. The first one contained eight (8) groups of 8 birds and the second room housed four (4) groups of 8 birds.

Upon arrival, each group received *ad libitum* a standard mash feed containing 5% of the different additives. In the first room, control groups (A1 and A2) received the empty encapsulation matrix, groups B1 and B2 received the NI EEYP, groups C1 and C2 received OI EEYP, and groups D1 and D2 received a mix of OMP and KB EEYP.

In the second room, the control group (A3) received the empty encapsulation matrix, the groups B3, C3 and D3 received respectively NI EEYP, OI EEYP, or a mix of OMP and Gr IV KB EEYP. The water was also given *ad libitum*.

On day 12, fresh feces were collected to account for the presence of *C. jejuni*. On day 14, the birds in the first room were inoculated orally with approximately  $2 \times 10^3$  total CFU per bird consisting of a mix of the four Homologous strains while the birds in the second room were inoculated with approximately  $3 \times 10^3$  CFU per bird of a mix of the two Heterologous strains. Inoculates were determined by enumeration in PBS. On day D1 post inoculation (PI), D3 PI, D5 PI and D7 PI, three (3) samples of fresh excreted feces were collected to follow the



evolution of *C. jejuni* excretion. On D7 PI, the birds were euthanized and fresh caecal contents were collected to enumerate the *C. jejuni* caecal populations.

### **Fecal and cecal *Campylobacter jejuni* numeration**

Cecal contents and fecal samples were diluted 1:9 (wt/vol) in Buffered Peptone Water (Lab M Limited, Lancashire, United Kingdom). After homogenization, 10-fold dilution series were made and 100  $\mu$ L of each dilution were plated on mCCDA supplemented with Cefoperazone and Amphotericin. After 48 h incubation at 42 °C under microaerobic conditions, colonies were enumerated.

### **Statistics**

Data were analyzed with GraphPad Prism 6 software. The significance level  $\alpha$  was set at 0.05. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test was carried out to compare the means of IgY concentrations for ELISA tests. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunn's post hoc test was also carried out to compare the means of IgY concentrations and the means of growth diameter and the migration average ratios for motility tests. A T test was done for the bactericidal effect and Kruskal-Wallis test was carried out to compare the means of log CFU counts in the *in vivo* assay.

## **RESULTS**

### **Quantification of total and anti-*C. jejuni* IgY in EYP and EEYP**

For the EYP, the measured concentrations of total IgY antibodies was equal for all groups (NI (not in contact with *C. jejuni* or group control), OI (orally challenged with live *C. jejuni* mix), OMP (subcutaneously injected with a mix of outer membrane proteins from *C. jejuni*), and KB (subcutaneously injected with a mix of formalin-killed *C. jejuni*)) (Figure 3A), but the levels of anti-*C. jejuni* IgYs (Figure 3B) were different (0.09  $\mu$ g/ml for NI, 0.24  $\mu$ g/ml for OI,

0.37 µg/ml for OMP and 0.61 µg/ml for KB) from one group to another (P<0,05 Anova followed by Tukey's post hoc tests).

The incorporation ratios of the EYP in the EEYP reached 44% (NI), 47% (OI), 46% (OMP) and 43% (KB). Similar concentrations of antibodies were recorded from each EEYP (Figures 3C and 3D). After application of incorporation ratios, total IgY and anti-*C.jejuni* IgY concentrations in EEYP were not significantly different from concentration levels obtained in the EYP.

### **Agglutination test**

The antibodies contained in EYP and EEYP corresponding to *C. jejuni* immunization conditions OI, OMP and KB were able to promote agglutination with the Homologous as well as with Heterologous strains. The agglutination was faster and easier to record with OMP and KB (Table 1). Agglutination was also stronger with the IgY purified from EYP compared to EEYP, but it should be noticed that to maximize the observations, the extracts concentrated as possible antibodies were used, so the EEYP extracts used in these tests didn't take into account the incorporation rates.

### **SDS-PAGE and immunoblotting**

Figures 4 and 5 describe the protein recognition profiles of the Homologous and Heterologous strain protein extracts by the antibody extracts from both EYP and corresponding EEYP.

For both Homologous and Heterologous strains, there was virtually no recognition profile with antibodies extracted from NI for both EYP and EEYP. Both Homologous and Heterologous strain proteins were recognized by IgYs from OI, OMP, and KB for both EYP and EEYP.

Despite the equivalent IgY concentrations for the EYP and EEYP used for these tests, recognition profiles were better defined for the EYP than the EEYP. But, for all of them, KB

provided recognition profiles with deeper colouration and included many more recognizable bands.

Total protein profile recognition varied depending on the IgY extracts considered, specifically when IgY extracts recovered after oral inoculation with whole bacteria (OI) were compared to IgY extracts recovered after subcutaneous injections with outer membrane proteins (OMP) or formalin killed bacteria (KB). There were bands which were recognized for all strains by each antibodies extract, but also some specifically appeared for one strain and not for the others.

### **Motility assay**

A motility test was done to evaluate the capacity of the IgY to inhibit the motility of *C. jejuni*. Results showed that whatever the type of egg yolk powder considered, encapsulated or not (EYP and EEYP), all the extracts induced a diminution of the migration (Figures 6A and 6B) when compared to the group without anti-*C. jejuni* IgY (AF). The difference between the group without anti-*C. jejuni* IgY (AF) and others groups (NI, OI, OMP and KB) was significant when using the EYP (Figure 6A) but only reach the level of significance ( $P < 0,05$  Anova followed by Dunn's post hoc tests) with KB when EEYP was tested (Figure 6B). There was no significant reduction when NI was retained as reference to compare migration diameters for different groups (Figures 6C and 6D). Individually (Tables 2 and 3) the migration by the different groups of antibodies is strain-dependent for both EYP and EEYP.

### **Bactericidal assay**

The test was used to appreciate the capacity of EYP antibodies to kill *C. jejuni* in presence of complement. To do so, the counts of CFU in the presence of complement (Test) were compared to the count of cultivable *C. jejuni* in the presence of inactivated complement (Control) for the groups (OMP and KB) containing the highest concentrations of antibodies. Although the values obtained seemed to indicate a reduction in *C. jejuni*, they did not achieve

the level of significance as to suggest a reducing effect of *C. jejuni* for these powders (EYP(OMP and KB))(Figure 7).

### **In vivo assay**

To evaluate the capacity of antibodies produced by different modes of immunization to protect birds from *C. jejuni*, an in vivo assay was conducted. Three types of EEYP were retained against *C. jejuni* strains: no potentiated EEYP against *C. jejuni*, EEYP containing antibodies produced by the “natural” birds infection (oral with live bacteria) and finally a mix of EEYP based on and the quantity and quality of their antibodies being relatively close (OMP and KB).

Despite the administration in prevention, all groups were equally colonized after oral inoculation of Homologous strains, as well as Heterologous ones, 3 days (3D) post inoculation (PI) as demonstrated by fecal counts of 7 and 5 log UFC/g for Homologous and Heterologous strains respectively (Figures 8A and 8B). Excretion of *C. jejuni* was rapid and stable for Homologous group (Figure 8A) while colonization was more progressive for Heterologous group (Figure 8B). At D5 PI, the level of *C. jejuni* in excreted fecal matter was 7 and 6 log (CFU/g) for chickens inoculated with the Homologous (Figure 8A) or the Heterologous strains (Graph 8A). At D7, the excretion was similar for both groups (Figures 8A and 8B). In the cecum at D7 PI, concentrations were between 8 and 10 log CFU/g of contents for all groups of birds (Figures 8C and 8D). EEYP did not prevent or reduced colonization by *C. jejuni*.

## **DISCUSSION**

The use of egg powder as a feed additive has been proposed by many studies as *in vitro* tests confirmed a possible inactivation of many intestinal pathogens through this way (Kassaify & Mine, 2004a).

In our conditions, both EYP and EEYP IgYs in OI (orally challenged with live *C. jejuni* mix), OMP (subcutaneously injected with *C. jejuni* mix outer membrane proteins), and KB (subcutaneously injected with formalin-killed *C. jejuni* mix) were able to react with both Homologous and Heterologous strains, confirming that vaccination with OMP, live or killed bacteria can induce functional antibodies against *C. jejuni*. The fact that the antibodies of the OI were able to recognize the different strains of *C. jejuni* in this study means that natural contamination resulting in a gastrointestinal colonization by *C. jejuni* is able to induce a seroconversion (Hodgins et al., 2015) sufficient to be translated to the egg yolk.

For both EYP and EEYP, antibodies level significantly differed according to antigen preparation. OMP and KB contain IgYs recognizing a wider variety of proteins and their recognition profiles were more apparent as compared to OI. Whatever the strain or type of immunization, the encapsulation process of the powder has not significantly and unilaterally altered the capacity of most IgYs to recognize *C. jejuni* proteins but also to disturb the *C. jejuni* mobility.

These results confirm that spray drying is an effective process for obtaining a concentrated additive of functional antibodies against *C. jejuni* and that the encapsulation allowed protection of the majority of antibodies in the EYP.

These *in vitro* results also confirm that the different modes of inoculation are not equivalent, at least in a quantitative perspective because anti-*C. jejuni* IgYs in OMP or KB were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in the OI. Moreover, in a qualitative perspective, our *in vitro* results suggested that antibodies extracted from different groups could provide a broad spectrum protection against a large number of *C. jejuni* strains. However OMP and KB may provide greater protection because they show better recognition and a greater number of recognized proteins.

This confirms the work of Al-Adwani et al. (2013) who had demonstrated that EYP IgY from hyperimmunized hens could bind with *C. jejuni*. These authors also showed that levels of EYP IgY from hyper immunized hens were significantly higher and presented a strong reactivity with *C. jejuni* proteins compared to those of EYP from nonimmunized hens. There were also different bands from one group to another and from one strain to another as reported by Yeh et al. (2014) who indicated that different sera from broiler chickens can react to various numbers of proteins, but also reacted to a conserved protein.

The motility assay showed that whatever the type of egg yolk powder considered, encapsulated or not (EYP and EEYP), all the groups provoked a diminution of the migration compared to the group without anti-*C. jejuni* antibodies (AF) and that individually tested, the effect of IgY was strain dependent. The question of efficiency, not specifically related to antibodies presence in egg yolk, of generic eggs to control pathogens had been suggested (Sable et al., 2000; Sattar Khan et al., 2000). Our tests on mobility confirm that unidentified elements, revealed in NI egg extracts, against *C. jejuni* are sufficient *in vitro* to disrupt the mobility, an important function of *C. jejuni* pathogenesis (Bolton, 2015), despite the fact that these extracts were not able to induce agglutination or reveal any western blot recognition profile.

These results are opposed to those observed by Hermans et al. (2014) in which IgYs extracted from EYP did not affect *C. jejuni* mobility. This could be explained by the fact that in our study, extracts were more concentrated in IgYs but also because of the optimization of our method by adding IgYs directly in the media.

In *vitro*, there is no bactericidal effect for EYP containing the highest concentrations of antibodies (OMP and KB) in presence of complement although in other studies, *C. jejuni* has been shown to be susceptible to killing by maternal antibodies, the killing being mediated by

both complement and specific antibody (Sahin et al., 2001). It is unclear what contributed to the incapacity to these EYP *in vitro* to kill the strains used in this study but it seems that a preliminary digestion step to release antibodies from the powders would be required.

Despite these *in vitro* results, the *in vivo* essay revealed neither prevention nor reduction of *C. jejuni* colonization by different EEYP incorporated at 5% in a preventive perspective in feed in this study specific conditions. Our *in vivo* results confirm the work of Paul et al. (2014) whose results suggest that a long-term prophylactic treatment (until 3 weeks of age) with 5% of hyperimmunized egg yolk powder or nonimmunized egg yolk powder in feed was not sufficient to significantly reduce cecal counts of *C. jejuni*. Interesting, Kassaify et Mine (2004b) previously reported that prophylactic treatment with 10% nonimmunized egg yolk powder for 4 weeks before infection resulted 3-4 log reduction of fecal *C. jejuni* counts in laying hens of 22-24 weeks of age. However, before attributing these results to the non-potentiated EYP, it is important to establish the status of hens providing eggs for this pathogen, because chicken contamination being frequent (Newell & Fearnley, 2003), there may be anti-*C. jejuni* antibodies in the eggs.

Ours results are also in contradiction with Hermans et al. (2014) whose suggested that the use of an EYP potentiated against hydrophobic protein fraction of one *C. jejuni* strain and incorporated at 5% in the diet for 3 days before infection could block the transmission and lead to a drastic reduction of 6.7 log CFU in chick of 13 days of age infected with  $8,10^4$  CFU of *C. jejuni*. The same authors suggested that EYP potentiated from whole-cell lysate incorporated at 5% in the diet for 4 days before infection could reduce transmission and resulted in a reduction of 4.4 log CFU of colonization in chicks of 13 days infected with  $3,10^4$  CFU of *C. jejuni*. In commercial conditions, colonization generally appears after the first 2-3 weeks of age, although it is possible experimentally in chicks of one day old. One of the hypothesis to explain this lag phase being the digestive flora of the young chick that

would not allow colonization by *C. jejuni* (Laisney et al., 2004), it therefore would be difficult to solely attribute the reducing or inhibiting effect of colonization only to the EYP on chicks of two weeks of age.

Although our results are in contrast with those of these authors, it is important to note that in our work, birds were treated for 2 weeks before infection and received a maximum EEYP incorporated in their feed (5%). The EYP that contained specific antibodies against *C. jejuni* was encapsulated (to increase the chances to obtain active concentrations in the gut) to the incorporation limit (about 50%) of an additive encapsulated in a lipid matrix incorporation. We hypothesize that the encapsulation digestion was not optimal in the young poultry gut, suggesting suboptimal release of the IgYs. So taking into account the incorporation ratios, we can consider that the effective concentration was about 2.5%, which was lower than what was used in other studies. Overall, the results of this trial suggest that prophylactic treatment with an EYP dose (2.5%) used in this experiment was not sufficient to inhibit or significantly reduce cecal colonization of chickens by *C. jejuni*. A preliminary test with the powder at 5% in the feed would have permitted to confront other studies.

Our inoculum contained several strains, characterized to be strains able to colonize chickens to a high level (Thibodeau et al., 2013). Within commercial broiler flocks multiple strains of *C. jejuni* can exist (Rivoal et al., 1999) and it is well known that there is a variability in the capacity of colonization and virulence among strains of *C. jejuni* (Mohan, 2015). Chicken *C. jejuni* strains harbour genetic and phenotypic diversity (Thibodeau et al., 2011) and it was shown that when co-inoculated, strains *C. jejuni* do not colonize the chicken intestine in the same way and that a high colonizing strain could dominate others (Thibodeau et al., 2015). Given the strain-dependent effect observed with the mobility test, this phenomenon is not to exclude in other studies with using less characterized strains where the strain ability to colonize a chicken is unknown and therefore making it hard to appreciate the effectiveness of



their egg yolks powders against a broader diversity of *C. jejuni* strains. Hence our infection model is more restrictive for a test with an additive and more representative of the poultry reality.

The non-convergent views from the literature in assessing the efficiency of using egg yolk powder as an additive to prevent *C. jejuni* colonization in poultry raised the concern that the optimal conditions for use are not yet identified. Our work indicates that absence of efficiency is not due to a loss of quantity or functionality of the antibodies.

However, given the *in vitro* heterogeneous results and the *in vivo* results obtained in this study, it would be important to continue research in order to achieve a commercial product. First, the effectiveness of the powder antibodies release must be tested independently of encapsulation. Antibodies dosage in the feces should be done in order to ensure effective antibodies release from the encapsulated egg yolk powder. Finally, it is also important to check whether the results obtained *in vivo* were due to one strain who did outcompete others during chicken colonization in this study (Thibodeau et al., 2015).

## **ACKNOWLEDGEMENT**

We want to acknowledge the following for their financial supports: the NSERC Industrial Research Chair in Meat safety and financial partners. We would like to thank all the staff of the housing facility (Centre de recherche avicole) for their excellent technical assistance during the *in vivo* assay.

## REFERENCES

- EFSA. (2011). Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production. *EFSA Journal*, 9(4), 2105. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2105
- Grilli, E., Vitari, F., Domeneghini, C., Palmonari, A., Tosi, G., Fantinati, P., . . . Piva, A. (2013). Development of a feed additive to reduce caecal *Campylobacter jejuni* in broilers at slaughter age: from in vitro to in vivo, a proof of concept. *Journal of Applied Microbiology*, 114(2), 308-317.
- Hald, B., Sommer, H. M., & Skovgård, H. (2007). Use of fly screens to reduce *Campylobacter spp.* introduction in broiler houses. *Emerging Infectious Diseases*, 13(12), 1951.
- Havelaar, A. H., Haagsma, J. A., Mangen, M. J., Kemmeren, J. M., Verhoef, L. P., Vijgen, S. M., . . . van Pelt, W. (2012). Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3), 231-238. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.029
- Hermans, D., Steendam, K. v., Verbrugge, E., Verlinden, M., Martel, A., Seliwiorstow, T., . . . Pasmans, F. (2014). Passive immunization to reduce *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens. *Veterinary Research*, 45(27).
- Hermans, D., Van Deun, K., Martel, A., Van Immerseel, F., Messens, W., Heyndrickx, M., . . . Pasmans, F. (2011). Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Veterinary Research*, 42, 82. doi: 10.1186/1297-9716-42-82
- Hodgins, D. C., Barjesteh, N., Paul, M. S., Ma, Z., Monteiro, M. A., & Sharif, S. (2015). Evaluation of a polysaccharide conjugate vaccine to reduce colonization by *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *BMC Research Notes*, 8(1), 204.
- Hoelzl, C., Mayerhofer, U., Steininger, M., Bruller, W., Hofstadter, D., & Aldrian, U. (2013). Observational trial of safe food handling behavior during food preparation using the

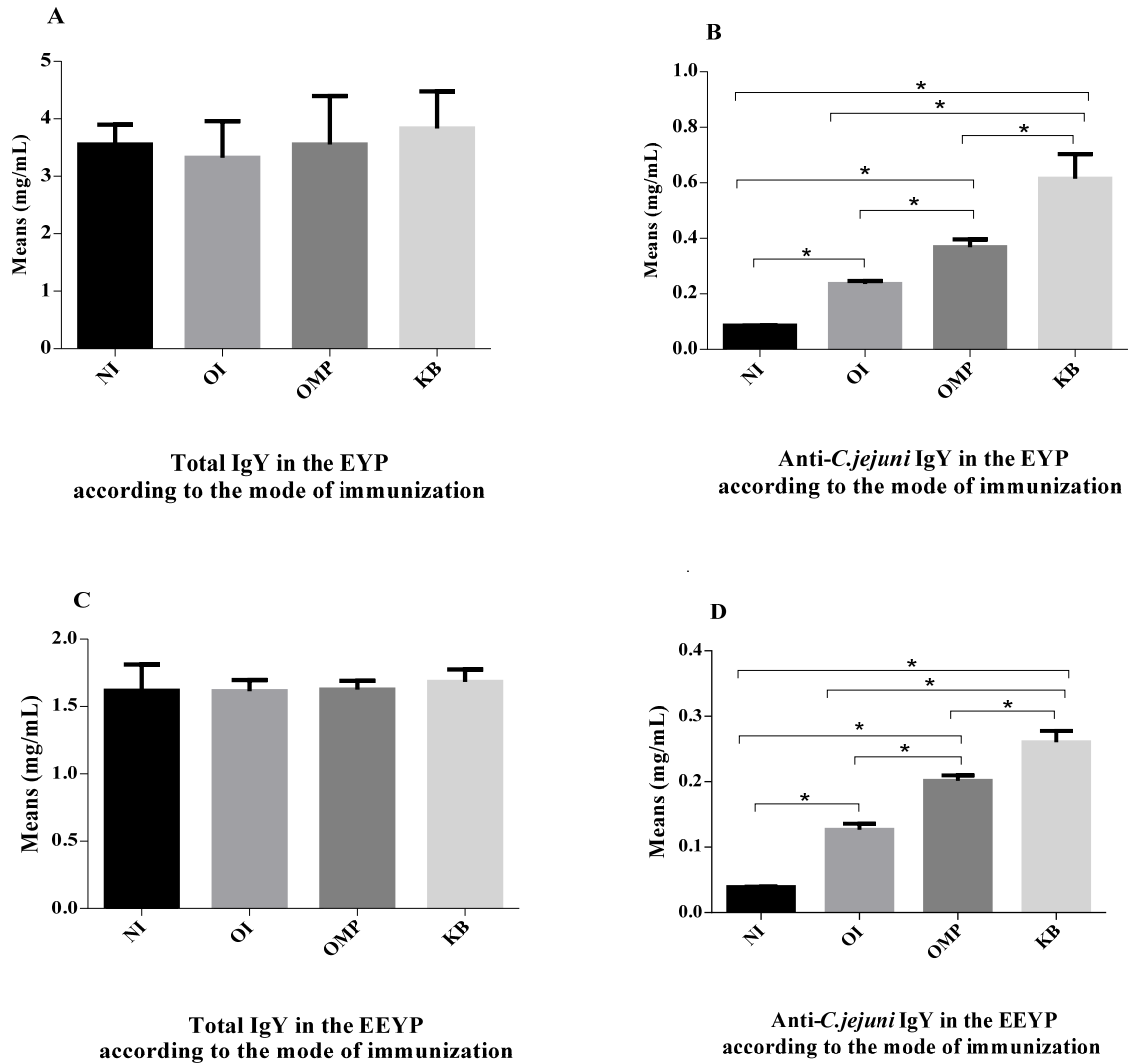
- example of *Campylobacter spp.* *Journal of Food Protection*, 76(3), 482-489. doi: 10.4315/0362-028x.jfp-12-231
- Holser, R. A. (2013). Lipid encapsulated phenolic compounds by fluidization. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 3(1), 13-15. doi: 10.4236/jeas.2013.31002.
- Kaakoush, N. O., Castano-Rodriguez, N., Mitchell, H. M., & Man, S. M. (2015). Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 687-720. doi: 10.1128/cmr.00006-15
- Kassaify, Z., & Mine, Y. (2004a). Effect of food protein supplements on *Salmonella* Enteritidis infection and prevention in laying hens. *Poultry Science*, 83(5), 753-760.
- Kassaify, Z., & Mine, Y. (2004b). Nonimmunized egg yolk powder can suppress the colonization of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Campylobacter jejuni* in laying hens. *Poultry Science*, 83(9), 1497-1506.
- Laisney, M. J., Gillard, M. O., & Salvat, G. (2004). Influence of bird strain on competitive exclusion of *Campylobacter jejuni* in young chicks. *British Poultry Science*, 45(1), 49-54.
- Lin, J. (2009). Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7), 755-765.
- Mohan, V. (2015). The role of probiotics in the inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization and virulence attenuation. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(8), 1503-1513. doi: 10.1007/s10096-015-2392-z
- Murray, C. J., Vos, T., Lozano, R., Naghavi, M., Flaxman, A. D., Michaud, C., . . . Memish, Z. A. (2012). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380(9859), 2197-2223. doi: 10.1016/s0140-6736(12)61689-4

- Newell, D. G., & Fearnley, C. (2003). Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4343-4351.
- Paul, N. C., Al-Adwani, S., Crespo, R., & Shah, D. H. (2014). Evaluation of passive immunotherapeutic efficacy of hyperimmunized egg yolk powder against intestinal colonization of *Campylobacter jejuni* in chickens. *Poultry Science*, 93(11), 2779-2787.
- Rivoal, K., Denis, M., Salvat, G., Colin, P., & Ermel, G. (1999). Molecular characterization of the diversity of *Campylobacter* spp. isolates collected from a poultry slaughterhouse: analysis of cross-contamination. *Letters in Applied Microbiology*, 29(6), 370-374.
- Rosenquist, H., Nielsen, N. L., Sommer, H. M., Nørrung, B., & Christensen, B. B. (2003). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 83(1), 87-103.
- Sable, S., Pons, A.-M., Gendron-Gaillard, S., & Cottenceau, G. (2000). Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4595-4597.
- Sahin, O., Morishita, T. Y., & Zhang, Q. (2002). *Campylobacter* colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. *Animal Health Research Reviews*, 3(02), 95-105.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3951-3957.
- Sattar Khan, M., Nakamura, S., Ogawa, M., Akita, E., Azakami, H., & Kato, A. (2000). Bactericidal action of egg yolk phosphovitin against *Escherichia coli* under thermal stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1503-1506.

- Skirrow, M. B. (1977). *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. *British Medical Journal*, 2(6078) 9-11
- Solanki, H. K., Pawar, D. D., Shah, D. A., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., & Thakar, P. M. (2013). Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMed research international*, 2013, 1-21. doi: 10.1155/2013/620719
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Garneau, P., Masson, L., Laurent-Lewandowski, S., Quessy, S., . . . Letellier, A. (2013). Distribution of colonization and antimicrobial resistance genes in *Campylobacter jejuni* isolated from chicken. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(4), 382-391.
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Laurent-Lewandowski, S., Guévremont, E., Quessy, S., & Letellier, A. (2011). Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Quebec. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(4), 298–307.
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Taboada, E. N., Laurent-Lewandowski, S., Guévremont, E., Quessy, S., & Letellier, A. (2015). Extensive characterization of *Campylobacter jejuni* chicken isolates to uncover genes involved in the ability to compete for gut colonization. *BMC Microbiology*, 15(1), 97.
- Tsubokura, K., Berndtson, E., Bogstedt, A., Kaijser, B., Kim, M., Ozeki, M., & Hammarström, L. (1997). Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni*-infected chickens. *Clinical and Experimental Immunology*, 108(3), 451-455.
- Umaraw, P., Prajapati, A., Verma, A. K., Pathak, V., & Singh, V. (2015). Control of *Campylobacter* in Poultry Industry from Farm to Poultry Processing Unit-a Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*(just-accepted), 00-00.

Yeh, H. Y., Hiett, K. L., Line, J. E., & Seal, B. S. (2014). Characterization and reactivity of broiler chicken sera to selected recombinant *Campylobacter jejuni* chemotactic proteins. *Archives of Microbiology*, 196(5), 375-383. doi: 10.1007/s00203-014-0969-z

## ANNEXES



**Figure 3: Total and anti-*C. jejuni* IgY concentrations in EYP and EEYP**

Quantification of IgY against *C. jejuni* from egg yolk powder (EYP) and encapsulated egg yolk powder (EEYP). NI represents the group control not in contact with *C. jejuni*, OI represents the group orally challenged with live *C. jejuni* mix, OMP represents the group subcutaneously injected with a mix of outer membrane proteins from *C. jejuni*, and the KB

represents the group subcutaneously injected with a mix of formalin-killed *C. jejuni*. Graphs 1A and 1B represent respectively the concentration of total and anti-*C. jejuni* IgYs from EYP. Graphs 1C and 1D represent total and anti-*C. jejuni* IgYs in EEYP. \*( $P < 0.05$  Anova followed by Tukey's post hoc tests).

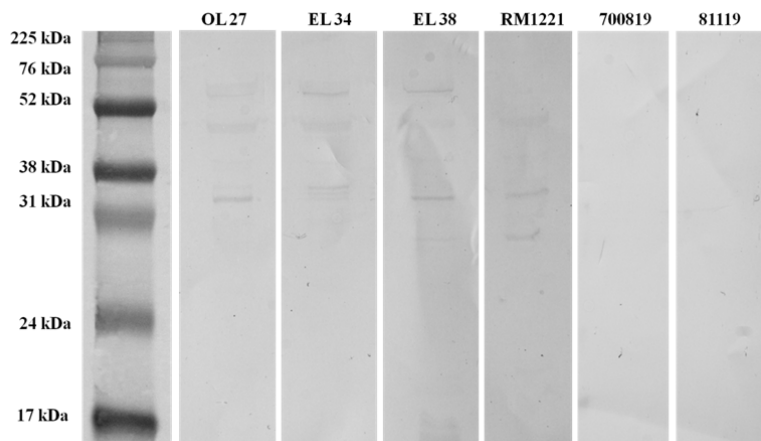
**Table 1: Individual agglutination tests for Homologous and Heterologous *C. jejuni* strains with EYP and EEYP IgYs.**

	NI		OI		OMP		KB	
	EYP	EEYP	EYP	EEYP	EYP	EEYP	EYP	EEYP
<b>OL 27</b>	-	-	**	*	***	**	***	**
<b>EL 34</b>	-	-	**	*	***	**	***	**
<b>EL 38</b>	-	-	**	*	***	**	***	**
<b>RM1221</b>	-	-	**	*	***	**	***	**
<b>81116</b>	-	-	**	*	***	**	***	**
<b>700819</b>	-	-	**	*	***	**	***	**

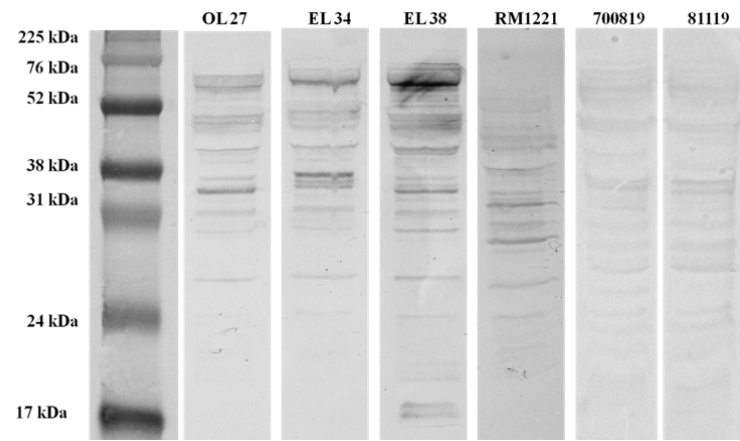
\*\*\* : 1min  
 \*\* : 3 min  
 \* : 5 min  
 - : > 5 min: no agglutination

The agglutination test was performed against both Homologous (OL 27, EL 34, EL 38, RM1221) and Heterologous strains (81116, 700819). There was no agglutination with the Control (PBS + NI IgY).

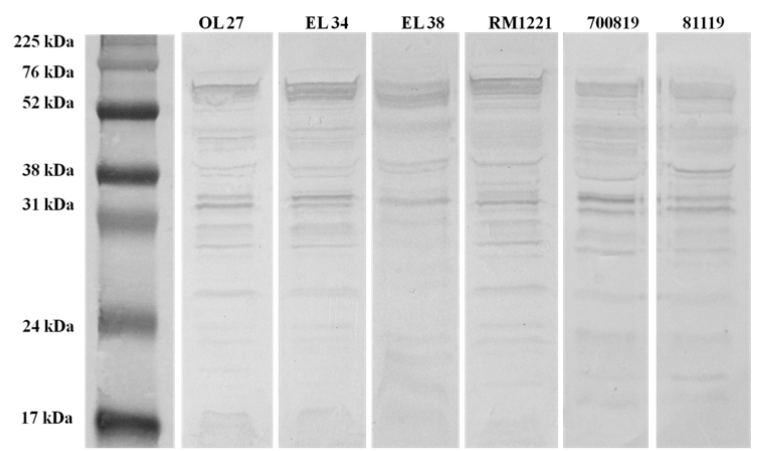




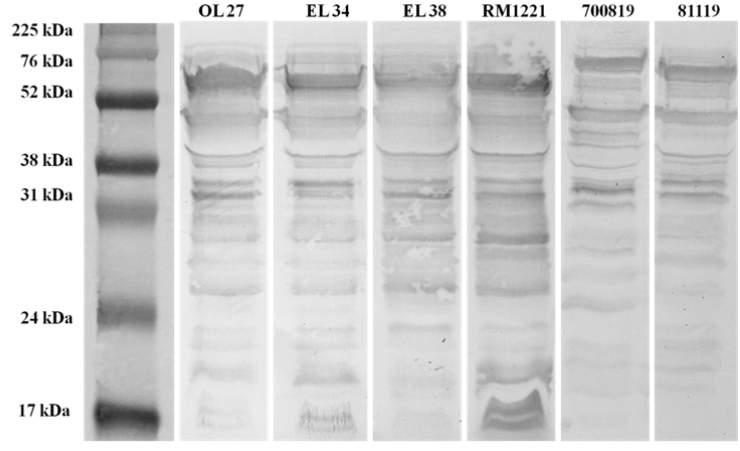
Western blot analysis of NI EYP IgYs recognition to total proteins of different strains



Western blot analysis of OI EYP IgYs recognition to total proteins of different strains

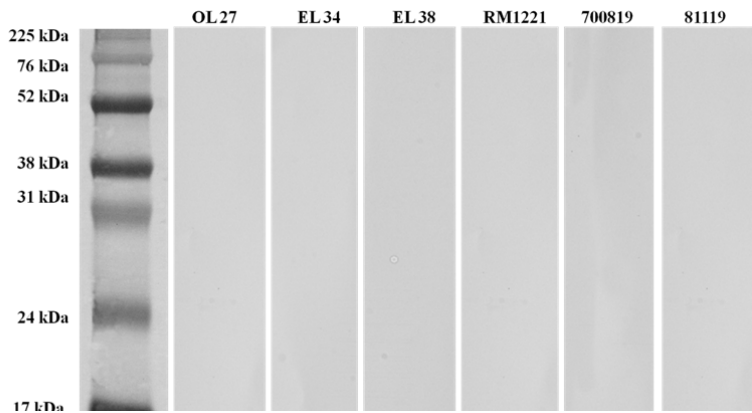


Western blot analysis of OMP EYP IgYs recognition to total proteins of different strains

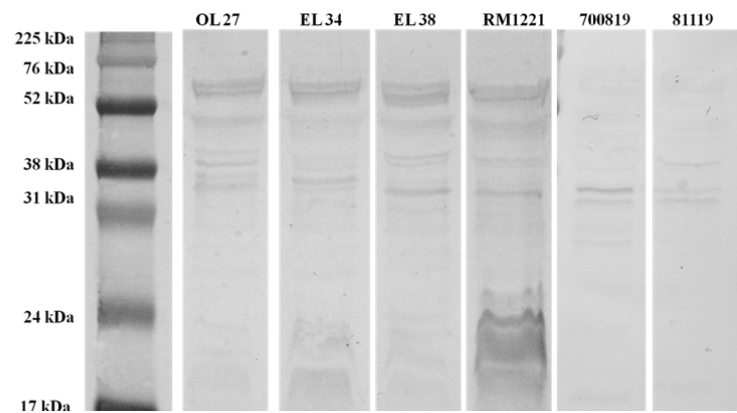


Western blot analysis of KB EYP IgYs recognition to total proteins of different strains

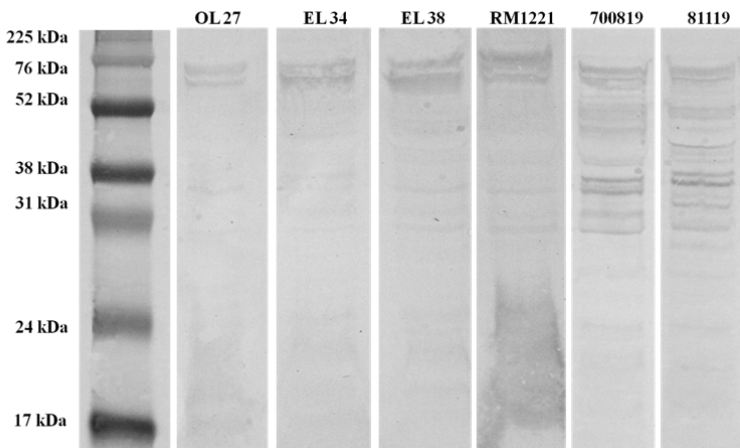
Figure 4: Western blot analysis of EYP IgYs recognition to total proteins of Homologous and Heterologous strains



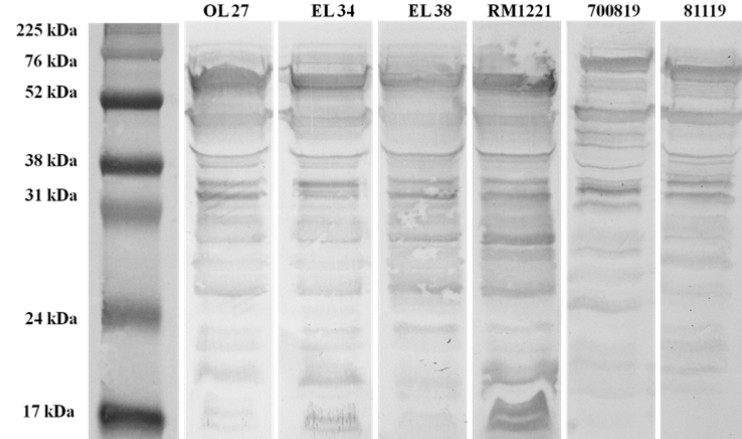
Western blot analysis of NI EEYP IgYs recognition to total proteins of different strains



Western blot analysis of OI EEYP IgYs recognition to total proteins of different strains

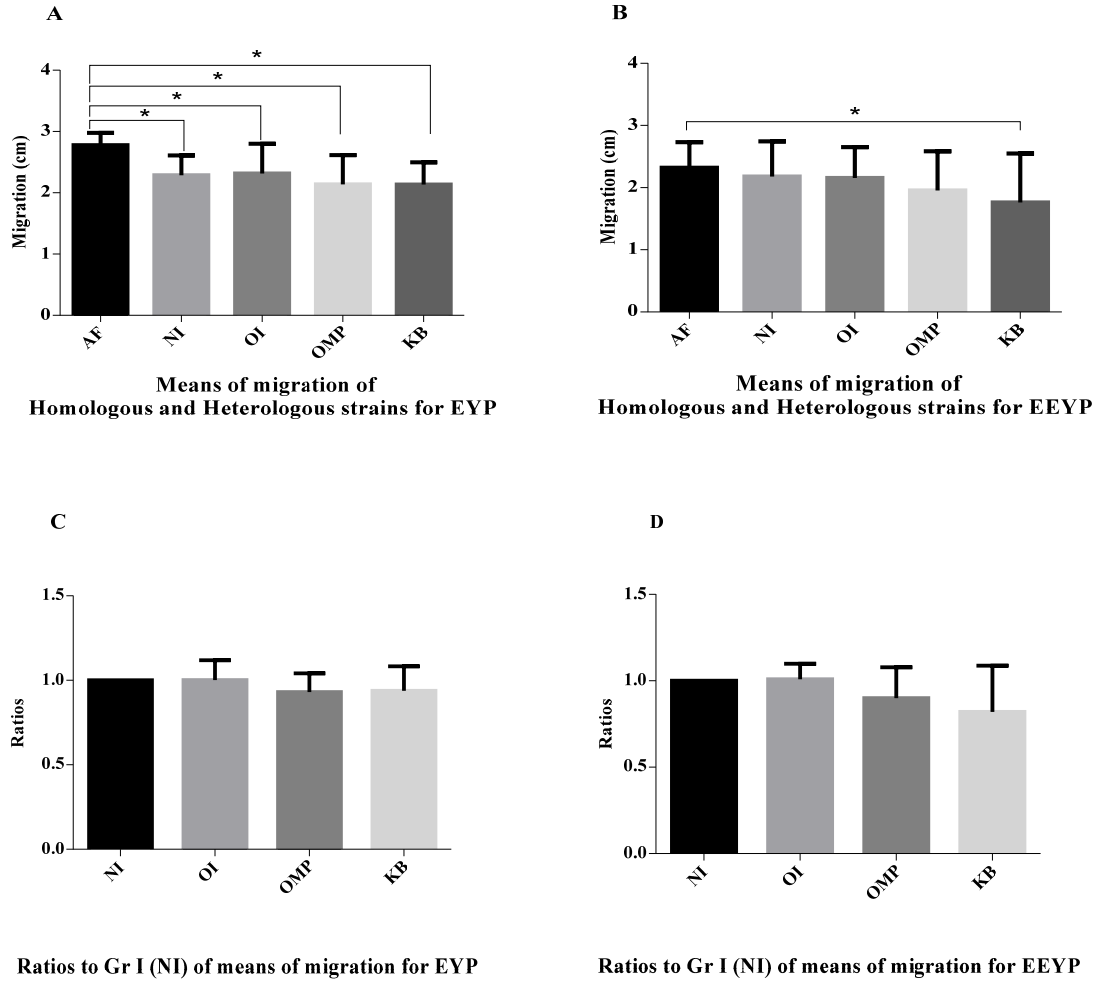


Western blot analysis of OMP EEYP IgYs recognition to total proteins of different strains



Western blot analysis of KB EEYP IgYs recognition to total proteins of different strains

Figure 5: Western blot analysis of EEYP IgYs recognition to total proteins of Homologous and Heterologous strains



**Figure 6: Motility test assessed with or without EYP or EEYP IgY against a mix of Homologous and Heterologous strains**

*Graphs 6A and 6B represent the means of migration in cm of a mix of Homologous and Heterologous strains, for groups with IgYs compared to no IgYs. Graphs 6C and 6D represent respectively the migration proportion, retaining NI as reference, for the different groups for EYP and EEYP.*

**Table 2: Means of migration diameters of each strain in presence of EYP IgYs**

	EYP			
	NI	OI	OMP	KB
<b>OL 27</b>	2,67 ± 0,12	2,07 ± 0,06*	2,00 ± 0,12*	1,77 ± 0,00*
<b>EL 34</b>	2,87 ± 0,12	2,63 ± 0,00	2,70 ± 0,12	2,37 ± 0,15*
<b>EL 38</b>	3,00 ± 0,00	2,50 ± 0,00*	2,70 ± 0,29	2,67 ± 0,00*
<b>RM1221</b>	2,67 ± 0,29	1,83 ± 0,25	1,43 ± 0,15*	1,37 ± 0,00*
<b>700819</b>	2,80 ± 0,06	2,37 ± 0,00*	2,40 ± 0,00*	2,40 ± 0,06*
<b>81116</b>	2,77 ± 0,35	2,37 ± 0,12	2,63 ± 0,25	2,27 ± 0,25*

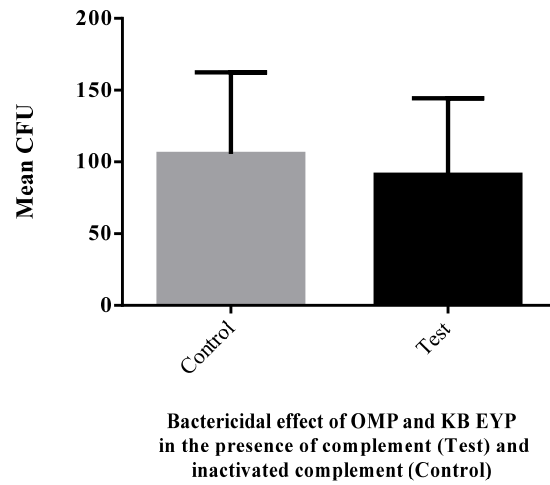
Mean diameter of migration zone in cm +/- SD; n= triplicate, \*= significant difference with NI

**Table 3: Means of migration diameters of each strain in presence of EEYP IgYs**

	EEYP			
	NI	OI	OMP	KB
<b>OL 27</b>	2,67 ± 1,15	2,67 ± 0,29	2,50 ± 0,25	2,77 ± 1,08
<b>EL 34</b>	2,53 ± 0,06	2,50 ± 0,00	2,50 ± 0,00	2,40 ± 0,00*
<b>EL 38</b>	1,53 ± 0,06	1,50 ± 0,00	1,20 ± 0,00	1,33 ± 0,06*
<b>RM1221</b>	1,93 ± 0,12	1,67 ± 0,29	1,13 ± 0,12*	1,07 ± 0,12*
<b>700819</b>	2 ± 0,00	2 ± 0,00	2 ± 0,00*	1 ± 0,00*
<b>81116</b>	2,40 ± 0,00	2,60 ± 0,17	2,40 ± 0,17	2,00 ± 0,00*

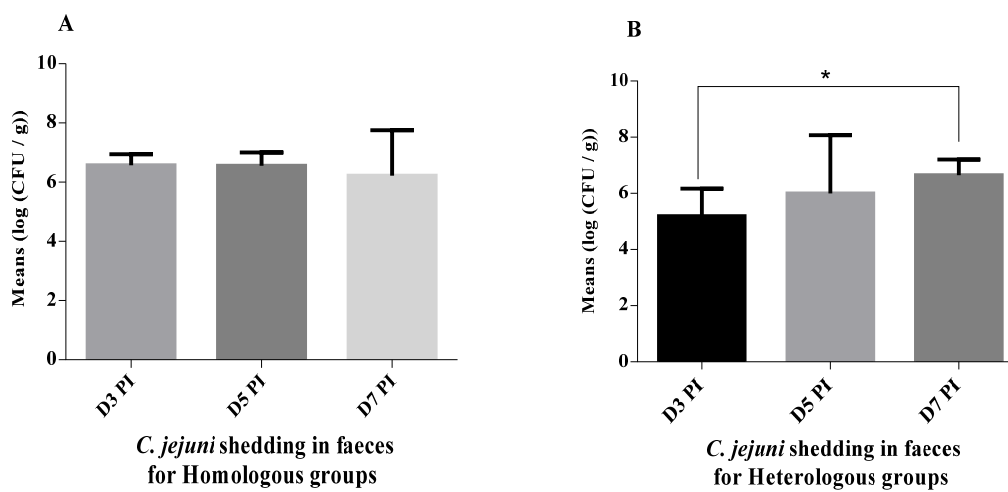
Mean diameter of migration zone in cm +/- SD; n= triplicate, \*= significant difference with NI

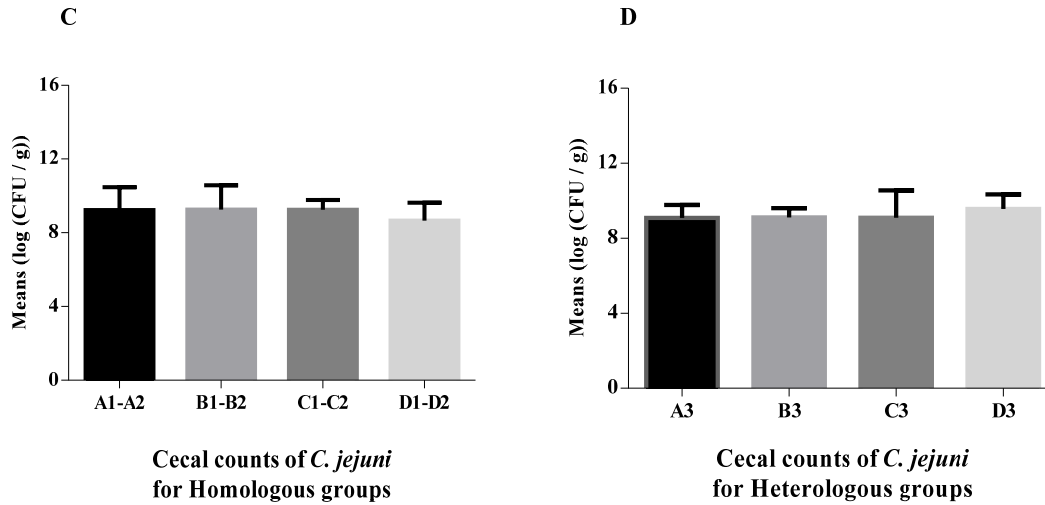
*Tables 3A and 3B represent the means of migration (± Standard deviation) for all groups and all strains for both EYP and EEYP.*



**Figure 7: The bactericidal test assessed with the Gr III (OMP) and Gr IV (KB) EYP**

The bar represents the mean count ( $n=8$ ) of still cultivable bacteria in the presence of complement (Test) or inactivated complement (Control) in presence of the powders EYP containing the highest concentrations of antibodies OMP and KB.





**Figure 8: *C. jejuni* counts in fecal and cecal contents**

*EEYP* was incorporated at 5% in the feed. Graphs 8A and 8B represent the level of *C. jejuni* from excreted fecal matter from D3 to D7 PI. Graphs 6C and 6D represent the colonization levels in caecum D7 PI. A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 and D2 were in the same room and were inoculated with Homologous strains (OL 27, EL 34, EL 38, and RM1221). A1 and A2 received only encapsulated matrix. B1 and B2 received NI *EEYP*. C1 and C2 received OI *EEYP*. D1 and D2 received a mix of OMP and KB *EEYP*. A3, B3, C3, and D3 were in the same room and were inoculated with Heterologous strains (700819, 81116). A3 received only encapsulated matrix. B3 received NI *EEYP*. C3 received OI *EEYP* and D3 received a mix of OMP and Gr KB *EEYP*.

# Discussion générale

L'utilisation de la poudre de jaune d'œuf comme additif alimentaire a été proposée par de nombreuses études, car des tests *in vitro* lui attribuent une éventuelle inactivation de nombreux agents pathogènes intestinaux (Kassaify & Mine, 2004a).

Dans nos travaux, les résultats révèlent qu'aussi bien une inoculation orale avec des bactéries vivantes (OI) qu'une injection sous-cutanée avec des protéines de la membrane externe (OMP), ou avec des *C. jejuni* tués (KB) peuvent induire des anticorps fonctionnels contre ce pathogène. La reconnaissance des différentes souches testées par les anticorps du groupe OI signifie également qu'une contamination naturelle, résultant en une colonisation gastro-intestinale par *C. jejuni*, est capable d'induire une séroconversion.

La contamination des poulets étant fréquente (Newell & Fearnley, 2003), il serait important d'établir le statut de poules fournissant les œufs, avant d'attribuer les effets *anti-C. jejuni* à la poudre non potentialisée (Kassaify & Mine, 2004b), lors de l'évaluation de cette dernière comme additif alimentaire. Ceci, bien que la question de l'efficacité, non spécifiquement liée aux anticorps présents dans le jaune d'œuf ait déjà été suggérée (Sable et al., 2000; Sattar Khan et al., 2000). Cette efficacité, non spécifiquement liée aux anticorps présents dans le jaune d'œuf a également été démontrée dans nos travaux par le test de mobilité. En effet, les résultats de ce test confirment que des éléments du jaune d'œuf, non-spécifiques contre *C. jejuni* (pas d'agglutination et de profil de reconnaissance western blot pour NI) sont capables *in vitro* de perturber la mobilité, une fonction importante de la pathogénèse de *C. jejuni* (Bolton, 2015). Toutefois, la présence d'anticorps joue un rôle majeur dans les propriétés antimicrobiennes de poudres de jaune d'œufs.

Les différents modes d'inoculation ne sont pas équivalents, d'un point de vue quantitatif, mais aussi qualitatif. Les concentrations en anticorps IgYs anti-*C. jejuni* dans les groupes OMP et

KB étaient significativement plus élevées ( $P < 0,05$ ) que dans le groupe OI. En outre, d'un point de vue qualitatif, le test de motilité a montré que quelque soit la poudre de jaune d'œuf considérée, encapsulée ou non, tous les groupes d'anticorps ont provoqué une réduction de la migration par rapport au groupe sans anticorps IgYs anti-*C. jejuni* (AF). L'effet des anticorps semble également être souche dépendant, à la différence des travaux d'Hermans et al. (2014), dans lesquels les anticorps IgYs extraits de poudre de jaune d'œuf n'avaient pas affecté la mobilité de *C. jejuni*. Ceci pourrait être expliqué par le fait que dans nos travaux les extraits étaient plus concentrés en anticorps IgYs, mais aussi en raison de l'optimisation de notre procédé par l'ajout d'anticorps IgYs directement dans la gélose.

Les résultats du western blot suggèrent que les anticorps extraits de différents groupes pourraient fournir une protection à large spectre contre un grand nombre de souches de *C. jejuni*. Toutefois, les groupes OMP et KB peuvent offrir une meilleure protection, car ils montrent une meilleure reconnaissance et un plus grand nombre de protéines reconnues. Ce qui confirme le travail d'Al-Adwani et al. (2013) qui avaient démontré que les niveaux d'anticorps IgYs extraits de poudre de jaune d'œuf de poules hyperimmunisées contre *C. jejuni* étaient significativement plus élevés et présentent une forte réactivité avec les protéines de *C. jejuni* par rapport aux anticorps IgYs extraits de poudre de jaune d'œuf de poules non vaccinées. Dans nos travaux, les profils de reconnaissance western blot présentaient aussi des protéines différentes, reconnues d'un groupe à l'autre et d'une souche à l'autre. Ces résultats rejoignent ceux de Yeh et al. (2014) démontrant que différents sérums de poulets de chair peuvent réagir avec une même protéine, mais également avec différentes protéines.

*In vitro*, aucun effet bactéricide de la poudre de jaunes d'œuf en présence de compléments n'a été observé, même pour les groupes contenant les concentrations d'anticorps IgYs les plus élevées (OMP et KB), alors que (Sahin et al. 2001) révèlent qu'en présence de compléments, les anticorps maternels auraient un effet bactéricide sur *C. jejuni*. On ignore encore les raisons



de l'incapacité de ces poudres de jaunes d'œuf *in vitro* à tuer les souches testées dans cette étude, mais il semblerait qu'une étape de digestion préliminaire soit nécessaire, afin de libérer les anticorps des poudres.

La caractérisation *in vitro* des anticorps contenus dans les différentes poudres de jaune d'œuf avant et après encapsulation, démontre que la vaccination des poules pondeuses et la collecte des œufs sont une façon simple et efficace pour produire des anticorps anti-*C. jejuni* quantitativement et qualitativement variables selon le type d'immunisation. Les résultats des tests ELISA démontrent également qu'il n'y a pas eu de perte quantitative et qualitative des anticorps contenus dans les poudres après encapsulation. Ce qui confirme que le spray dry est un procédé efficace pour l'obtention d'un additif concentré en anticorps fonctionnels contre *C. jejuni*, et que l'encapsulation par spray cooling, est un procédé permettant l'obtention d'un additif fonctionnel incorporable à l'aliment.

Différents types d'encapsulation dont le séchage par atomisation (Spray drying), atomisation par congélation (Spray chilling) la lyophilisation, l'extrusion, la cocrystallisation, la polymérisation interfaciale, l'inclusion moléculaire sont possibles (Cocero et al., 2009) et différents matériaux naturels tels que le sucre, des protéines, des lipides, et des polymères synthétiques ou modifiés sont utilisés comme matrice d'encapsulation (Solanki et al., 2013). Le spray cooling est le procédé d'encapsulation le moins coûteux (déjà appliqué avec succès dans d'autres conditions d'encapsulation d'additifs alimentaire), dont la matrice de revêtement est généralement constituée de matière grasse permettant une libération tardive en milieu humide (Cocero et al., 2009; Gouin, 2004; Holser, 2013).

Cependant, malgré les résultats encourageants obtenus *in vitro*, aucun effet inhibiteur ou réducteur de la colonisation par les différentes poudres de jaunes d'œuf encapsulées,

incorporées à 5 % de manière préventive dans la moulée n'a été relevé *in vivo* dans notre modèle expérimental.

Ces résultats confirment le travail de Paul et al. (2014), dont les résultats suggèrent qu'un traitement prophylactique à long terme (jusqu'à 3 semaines d'âge) avec 5 % de poudre de jaune d'œuf de poules hyperimmunisées ou non dans l'alimentation n'est pas suffisante pour réduire de manière significative les *C. jejuni* caecaux 7 jours post inoculation. Pourtant, Kassaiy et Mine (2004b) ont précédemment rapporté que le traitement prophylactique avec 10 % de poudre de jaune d'œuf de poules hyperimmunisées pendant 4 semaines dans l'alimentation avant l'infection entraîne une réduction de 3-4 log des comptes fécaux de *C. jejuni* chez des poules pondeuses de 22-24 semaines d'âge. Nos résultats sont également en contradiction avec ceux d'Hermans et al. (2014) qui suggèrent qu'une poudre de jaune d'œuf potentialisée contre une fraction protéique de *C. jejuni*, incorporée à 5 % dans l'alimentation pendant 3 jours avant l'infection, pourrait bloquer la transmission et conduire à une réduction drastique de 6,7 log 10 UFC la colonisation des poussins de 13 jours âge infectés par 8.104 CFU de *C. jejuni*. Les mêmes auteurs suggèrent qu'une poudre de jaune d'œuf potentialisée contre des lysats de cellules entières de *C. jejuni*, incorporée à 5 % dans l'alimentation pendant 4 jours avant l'infection, pourraient réduire la transmission et conduire à une réduction de 4,4 log 10 UFC la colonisation des poussins de 13 jours infecté par 3.104 UFC de *C. jejuni*.

Bien que nos résultats soient en opposition avec ceux de ces auteurs, il est important de noter que dans notre travail, les oiseaux ont été traités pendant 2 semaines avant l'infection et ont reçu la poudre de jaune d'œuf au taux maximum incorporable à la moulée (5 %). La poudre de jaune d'œuf a été encapsulée (pour augmenter les chances d'obtenir des concentrations actives dans l'intestin) à la limite d'incorporation (environ 50 %) d'un additif encapsulé dans une incorporation de matrice lipidique. Nous supposons donc que l'encapsulation est restée stable

dans l'intestin de la volaille, suggérant une non libération des anticorps IgYs. Donc, en prenant en compte les différents taux d'incorporation dans la matrice lipidique, on peut considérer que la concentration efficace était d'environ 2,5 %.

La colonisation souvent importante du poulet par *C. jejuni* se fait sans modifier dramatiquement le reste des populations de la microflore (Thibodeau, et al., 2015), mais changer l'alimentation avec la poudre de jaune en plus grande quantité est susceptible de changer la flore et de modifier les équilibres des populations bactériennes en faveur ou en défaveur de *C. jejuni*. Ce qui peut alors expliquer les résultats très différents selon les auteurs, car diverses études ont démontré le rôle de barrière que peut jouer la microflore contre certains pathogènes, dont *C. jejuni* ou *Salmonella* (Bhaskaran et al., 2011; Stern et al., 2008). Un changement de la flore suite à une augmentation de la quantité de poudre pourrait éventuellement expliquer le rôle indirect de la poudre qui au taux administré dans nos travaux devient un élément de la diète, plus proche d'une action indépendante de la présence des anticorps.

Aussi, une des hypothèses pour expliquer l'absence de *C. jejuni* chez le poulet durant les 2-3 premières semaines de l'âge étant la flore digestive du jeune poussin qui constituerait une barrière pour la colonisation par *C. jejuni* (Laisney et al., 2004), il serait difficile d'attribuer l'effet réducteur ou inhibiteur de la colonisation seulement à la poudre jaune d'œuf sur les poussins de l'âge de deux semaines comme démontré dans les travaux d'Hermans et al. (2014).

Plusieurs souches de *C. jejuni* peuvent exister dans un troupeau (Rivoal et al., 1999). Les différentes souches bactériennes utilisées dans notre étude ont été caractérisées et reconnues comme étant de bonnes souches colonisatrices (Thibodeau et al., 2013). Toutefois, et il est bien connu qu'il existe une variabilité dans la capacité de la colonisation et la virulence parmi

les souches de *C. jejuni* (Mohan, 2015). Certaines souches ont un potentiel de colonisation différent, donc plus compétitives que d'autres en cas de coïnfection. Cet avantage est lié à leurs fortes capacités d'autoagglutination, de chimiotactisme, d'adhérence et d'invasion leur permettant ainsi de supplanter les autres en cas de co-infection (Thibodeau et al., 2015). Compte tenu de l'effet de la souche dépendant observé avec le test de la mobilité, ce phénomène n'est à pas exclure contrairement aux autres études dans lesquelles nous ne pouvons pas connaître la force des souches utilisées et évaluer l'efficacité de leur poudre contre différentes souches de *C. jejuni*. Ce qui laisse supposer que les résultats observés dans nos travaux pourraient être dus à une souche meilleure colonisatrice que les autres plutôt qu'à une inefficacité de la poudre de jaune d'œuf.

Notre modèle d'infection également est plus restrictif pour un test avec un additif, mais le modèle est représentatif de la réalité du terrain.

Dans l'ensemble, les résultats de cet essai suggèrent que le traitement avec la dose prophylactique (2,5 %) utilisée dans cette expérience n'a pas été suffisant pour inhiber ou réduire la colonisation du caecum de poulets par *C. jejuni* de manière significative. Un essai préliminaire avec la poudre à 5 % dans l'alimentation aurait permis de faire face à d'autres études.

Ainsi, malgré les résultats encourageants obtenus *in vitro*, il serait difficile de transposer des résultats *in vitro* vers *in vivo* d'où la nécessité de continuer la recherche en vue de déterminer les conditions d'utilisation optimale de la poudre de jaune d'œuf contre *C. jejuni* chez le poulet à griller.

# Conclusion

La volaille constitue le principal réservoir zoonotique de *C. jejuni*. Le portage asymptomatique élevé (pouvant atteindre  $10^8$  UFC/g de fèces) dans le tube digestif des oiseaux fait des produits à base de volaille la principale source de campylobactériose pour l'humain avec parfois pour conséquences à long terme des maladies longtemps considérées comme bénignes. Malgré les nombreux efforts de recherche déployés, aucune stratégie n'est aujourd'hui disponible en conditions commerciales pour inhiber la colonisation des oiseaux par *C. jejuni*. Compte tenu de la particularité épidémiologique de *C. jejuni* chez le poussin (absence de *C. jejuni* dans le tube digestif durant les 2 à 3 premières semaines d'âge parallèle à la présence des anticorps maternels), pallier la disparition de l'immunité maternelle par une immunisation passive visant à maintenir dans le tube digestif des oiseaux une concentration importante d'anticorps semblait être une option efficace pour protéger les oiseaux d'une colonisation par *C. jejuni*. Bien que l'immunisation de poules pondeuses et la collecte des œufs soit un moyen efficace de production d'anticorps dans les jaunes en quantité et en qualité variable selon le mode d'immunisation, et que la mise en poudre par spray dry et l'encapsulation par spray cooling n'entraînent pas *in vitro* une perte quantitative et qualitative des anticorps, les résultats obtenus démontrent que les recherches doivent être poursuivies afin de déterminer les conditions optimales de son utilisation *in vivo* en tant qu'additif alimentaire chez les oiseaux.

En perspective il serait intéressant d'étudier l'effet de l'encapsulation par rapport au relargage des anticorps dans le tube digestif des oiseaux. Des essais avec une concentration plus élevée (5 %) de la poudre dans l'alimentation seraient également intéressants à évaluer, sur les diverses souches *in vivo* et/ou dans les conditions de terrain.

# Références

- Agence de la santé publique du Canada. (2013). Le rapport de l'administrateur en chef de la santé publique sur l'état de la santé publique au Canada, 2013, les maladies infectieuses — Une menace perpétuelle. Repéré le 19 Mai 2015 à <http://www.phac-aspc.gc.ca/cphorsphc-respcacsp/2013/assets/pdf/2013-fra.pdf>
- Al-Adwani, S. R., Crespo, R., & Shah, D. H. (2013). Production and evaluation of chicken egg-yolk-derived antibodies against *Campylobacter jejuni* colonization-associated proteins. *Foodborne Pathogens and Disease*, *10*(7), 624-631. doi: 10.1089/fpd.2012.1313
- Annamalai, T., Pina-Mimbela, R., Kumar, A., Binjawadagi, B., Liu, Z., Renukaradhya, G., & Rajashekara, G. (2013). Evaluation of nanoparticle-encapsulated outer membrane proteins for the control of *Campylobacter jejuni* colonization in chickens. *Poultry Science*, *92*(8), 2201-2211.
- Backert, S., Boehm, M., Wessler, S., & Tegtmeyer, N. (2013). Transmigration route of *Campylobacter jejuni* across polarized intestinal epithelial cells: paracellular, transcellular or both? *Cell Commun Signal*, *11*, 72. doi: 10.1186/1478-811x-11-72
- Batz, M. B., Henke, E., & Kowalczyk, B. (2013). Long-term consequences of foodborne infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, *27*(3), 599-616. doi: 10.1016/j.idc.2013.05.003
- Bellini, M., Gambaccini, D., Stasi, C., Urbano, M. T., Marchi, S., & Usai-Satta, P. (2014). Irritable bowel syndrome: a disease still searching for pathogenesis, diagnosis and therapy. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(27), 8807-8820. doi: 10.3748/wjg.v20.i27.8807
- Bhaskaran, H., Donoghue, A., Arsi, K., Wooming, A., Reyes-Herrera, I., Bielke, L., . . . Hargis, B. (2011). In vitro selection of enteric microflora for potential use as a

- competitive exclusion culture against *Campylobacter* in poultry. *International Journal of Poultry Science*, 10(12), 940-945.
- Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P., & Blaser, M. J. (1988). Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *Journal of Infectious Diseases*, 157(3), 472-479.
- Bolton, D. J. (2015). *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology*, 48, 99-108. doi: 10.1016/j.fm.2014.11.017
- Burnens, A., Stucki, U., Nicolet, J., & Frey, J. (1995). Identification and characterization of an immunogenic outer membrane protein of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(11), 2826-2832.
- Chalghoumi R., Beckers Y., Portetelle D., & A., T. (2009). Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 13(2), 295-308.
- Chemaly, M., Magras, C., Madec, J.-Y., Santolini, J., & Denis, M. (2012). *Campylobacter* dans les filières de production animale. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire Hors-série (9 mai 2012)*, 17-19.
- Cocero, M. J., Martín, Á., Mattea, F., & Varona, S. (2009). Encapsulation and coprecipitation processes with supercritical fluids: fundamentals and applications. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 546-555.
- 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(16), 819-829. doi: 10.1098/rsif.2007.1015
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3857-3867. doi: 10.1128/aem.02835-07
- Cróinín, T. Ó., & Backert, S. (2012). Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism? *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 25.
- Dasti, J. I., Tareen, A. M., Lugert, R., Zautner, A. E., & Groß, U. (2010). *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(4), 205-211.
- Debruyne, L., Broman, T., Bergstrom, S., Olsen, B., On, S. L., & Vandamme, P. (2010). *Campylobacter volucris* sp. nov., isolated from black-headed gulls (*Larus ridibundus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 8), 1870-1875. doi: 10.1099/ijs.0.013748-0
- Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J. P., & Sternon, J. (1972). Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *Journal of Infectious Diseases*, 125(4), 390-392.
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, 23(7), 1361-1394.
- EFSA. (2011). Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production. *EFSA Journal*, 9(4), 2105. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2105
- EFSA. (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10(3), 2597.
- El-Shibiny, A., Scott, A., Timms, A., Metaweia, Y., Connerton, P., & Connerton, I. (2009). Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. *Journal of Food Protection*, 72(4), 733-740.



- Epps, S. V., Harvey, R. B., Hume, M. E., Phillips, T. D., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2013). Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *10*(12), 6292-6304.
- Fravallo, P., Laisney, M. J., Gillard, M. O., Salvat, G., & Chemaly, M. (2009). *Campylobacter* transfer from naturally contaminated chicken thighs to cutting boards is inversely related to initial load. *Journal of Food Protection*, *72*(9), 1836-1840.
- Ganan, M., Silván, J. M., Carrascosa, A. V., & Martínez-Rodríguez, A. J. (2012). Alternative strategies to use antibiotics or chemical products for controlling *Campylobacter* in the food chain. *Food Control*, *24*(1), 6-14.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. (2005). Class V. Epsilonproteobacteria class. nov (*Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (p. 1145-1194). USA: Springer.
- 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. *Poultry Science*, *91*(8), 1825-1832. doi: 10.3382/ps.2012-02168
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, *40*(9), 1107-1121.
- Gill, C. P. (2014). *Investigating the vector competence of the house fly (Musca domestica) for Campylobacter jejuni*. (Science: Biological Sciences Department).
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in food science & technology*, *15*(7), 330-347.
- Grilli, E., Vitari, F., Domeneghini, C., Palmonari, A., Tosi, G., Fantinati, P., . . . Piva, A. (2013a). Development of a feed additive to reduce caecal *Campylobacter jejuni* in

- broilers at slaughter age: from in vitro to in vivo, a proof of concept. *Journal of Applied Microbiology*, *114*(2), 308-317.
- Grilli, E., Vitari, F., Domeneghini, C., Palmonari, A., Tosi, G., Fantinati, P., . . . Piva, A. (2013b). Development of a feed additive to reduce caecal *Campylobacter jejuni* in broilers at slaughter age: from in vitro to in vivo, a proof of concept. *Journal of Applied Microbiology*, *114*(2), 308-317. doi: 10.1111/jam.12053
- Gruntar, I., Biasizzo, M., Kušar, D., Pate, M., & Ocepek, M. (2015). *Campylobacter jejuni* contamination of broiler carcasses: Population dynamics and genetic profiles at slaughterhouse level. *Food Microbiology*, *50*, 97-101.
- Guyard-Nicodeme, M., Tresse, O., Houard, E., Jugiau, F., Courtillon, C., El Manaa, K., . . . Chemaly, M. (2013). Characterization of *Campylobacter spp.* transferred from naturally contaminated chicken legs to cooked chicken slices via a cutting board. *International Journal of Food Microbiology*, *164*(1), 7-14. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.009
- Hald, B., Sommer, H. M., & Skovgård, H. (2007). Use of fly screens to reduce *Campylobacter spp.* introduction in broiler houses. *Emerging Infectious Diseases*, *13*(12), 1951.
- Hanning, I., Jarquin, R., & Slavik, M. (2008). *Campylobacter jejuni* as a secondary colonizer of poultry biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, *105*(4), 1199-1208. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03853.x
- Hara-Kudo, Y., & Takatori, K. (2011). Contamination level and ingestion dose of foodborne pathogens associated with infections. *Epidemiology and Infection*, *139*(10), 1505-1510. doi: 10.1017/s095026881000292x
- Havelaar, A. H., Haagsma, J. A., Mangen, M. J., Kemmeren, J. M., Verhoef, L. P., Vijgen, S. M., . . . van Pelt, W. (2012). Disease burden of foodborne pathogens in the

- Netherlands, 2009. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3), 231-238. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.029
- Hazeleger, W. C., Wouters, J. A., Rombouts, F. M., & Abee, T. (1998). Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3917-3922.
- Hermans, D., Pasmans, F., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Rasschaert, G., . . . Haesebrouck, F. (2012). Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 12(2), 89-98. doi: 10.1089/vbz.2011.0676
- Hermans, D., Steendam, K. v., Verbrugge, E., Verlinden, M., Martel, A., Seliwiorstow, T., . . . Pasmans, F. (2014). Passive immunization to reduce *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens. *Veterinary Research*, 45(27).
- Hermans, D., Van Deun, K., Martel, A., Van Immerseel, F., Messens, W., Heyndrickx, M., . . . Pasmans, F. (2011). Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Veterinary Research*, 42, 82. doi: 10.1186/1297-9716-42-82
- Hoang, K., Stern, N. J., & Lin, J. (2011). Development and stability of bacteriocin resistance in *Campylobacter spp.* *Journal of Applied Microbiology*, 111(6), 1544-1550.
- Hodgins, D. C., Barjesteh, N., Paul, M. S., Ma, Z., Monteiro, M. A., & Sharif, S. (2015). Evaluation of a polysaccharide conjugate vaccine to reduce colonization by *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *BMC Research Notes*, 8(1), 204.
- Hoelzl, C., Mayerhofer, U., Steininger, M., Bruller, W., Hofstadter, D., & Aldrian, U. (2013). Observational trial of safe food handling behavior during food preparation using the example of *Campylobacter spp.* *Journal of Food Protection*, 76(3), 482-489. doi: 10.4315/0362-028x.jfp-12-231

- Hofreuter, D. (2014). Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni*. *Front Cell Infect Microbiol*, 4, 137. doi: 10.3389/fcimb.2014.00137
- Holser, R. A. (2013). Lipid encapsulated phenolic compounds by fluidization. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 3(1), 13-15. doi: 10.4236/jeas.2013.31002.
- Hue, O., Le Bouquin, S., Laisney, M. J., Allain, V., Lalande, F., Petetin, I., . . . Chemaly, M. (2010). Prevalence of and risk factors for *Campylobacter spp.* contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. *Food Microbiology*, 27(8), 992-999. doi: 10.1016/j.fm.2010.06.004
- 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. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(11), 1666-1671. doi: 10.1128/cvi.00255-10
- Joshua, G. W., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A. V., & Wren, B. W. (2006). Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 152(Pt 2), 387-396. doi: 10.1099/mic.0.28358-0
- Kaakoush, N. O., Castano-Rodriguez, N., Mitchell, H. M., & Man, S. M. (2015). Global Epidemiology of *Campylobacter Infection*. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 687-720. doi: 10.1128/cmr.00006-15
- Kalischuk, L. D., Inglis, G. D., & Buret, A. G. (2009). *Campylobacter jejuni* induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts. *Gut Pathogens*, 1(1), 2. doi: 10.1186/1757-4749-1-2
- Kassaify, Z., & Mine, Y. (2004a). Effect of food protein supplements on *Salmonella* Enteritidis infection and prevention in laying hens. *Poultry Science*, 83(5), 753-760.

- Kassaify, Z., & Mine, Y. (2004b). Nonimmunized egg yolk powder can suppress the colonization of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Campylobacter jejuni* in laying hens. *Poultry Science*, *83*(9), 1497-1506.
- Kist, M. (1986). [Who discovered *Campylobacter jejuni/coli*? A review of hitherto disregarded literature]. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, *261*(2), 177-186.
- Konkel, M. E., Klena, J. D., Rivera-Amill, V., Monteville, M. R., Biswas, D., Raphael, B., & Mickelson, J. (2004). Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *Journal of Bacteriology*, *186*(11), 3296-3303. doi: 10.1128/jb.186.11.3296-3303.2004
- Konkel, M. E., Samuelson, D. R., Eucker, T. P., Shelden, E. A., & O'Loughlin, J. L. (2013). Invasion of epithelial cells by *Campylobacter jejuni* is independent of caveolae. *Cell Commun Signal*, *11*, 100. doi: 10.1186/1478-811x-11-100
- Kowalczyk, K., Daiss, J., Halpern, J., & Roth, T. (1985). Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology*, *54*(4), 755-762.
- 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*. *Phytotherapy Research*, *26*(2), 186-190. doi: 10.1002/ptr.3526
- Lai, C. H., Chang, C. S., Liu, H. H., Tsai, Y. S., Hsu, F. M., Yu, Y. L., . . . Hsieh, J. T. (2014). Sensitization of radio-resistant prostate cancer cells with a unique cytolethal distending toxin. *Oncotarget*, *5*(14), 5523-5534.

- Laisney, M. J., Gillard, M. O., & Salvat, G. (2004). Influence of bird strain on competitive exclusion of *Campylobacter jejuni* in young chicks. *British Poultry Science*, 45(1), 49-54.
- Lehtola, M. J., Pitkanen, T., Miebach, L., & Miettinen, I. T. (2006). Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: a comparative study with different detection methods. *Water Science and Technology*, 54(3), 57-61.
- Levin, R. E. (2007). *Campylobacter jejuni*: a review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. *Food Biotechnology*, 21(4), 271-347.
- Lin, J. (2009). Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7), 755-765.
- Lin, J., Michel, L. O., & Zhang, Q. (2002). CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(7), 2124-2131.
- Luber, P., Brynestad, S., Topsch, D., Scherer, K., & Bartelt, E. (2006). Quantification of *campylobacter* species cross-contamination during handling of contaminated fresh chicken parts in kitchens. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 66-70. doi: 10.1128/aem.72.1.66-70.2006
- Maal-Bared, R., Bartlett, K. H., Bowie, W. R., & Hall, E. R. (2012). *Campylobacter spp.* distribution in biofilms on different surfaces in an agricultural watershed (Elk Creek, British Columbia): using biofilms to monitor for *Campylobacter*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 215(3), 270-278. doi: 10.1016/j.ijheh.2011.12.004
- Messaoudi, S., Manai, M., Federighi, M., & Dousset, X. (2013). *Campylobacter* dans la filière poulet: étude bibliographique des stratégies de maîtrise au stade de l'élevage. *Révue de Médecine Vétérinaire*, 2(164), 90-99.

- Mohan, V. (2015). The role of probiotics in the inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization and virulence attenuation. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(8), 1503-1513. doi: 10.1007/s10096-015-2392-z
- Murray, C. J., Vos, T., Lozano, R., Naghavi, M., Flaxman, A. D., Michaud, C., . . . Memish, Z. A. (2012). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380(9859), 2197-2223. doi: 10.1016/s0140-6736(12)61689-4
- Nauta, M. J., Jacobs-Reitsma, W. F., Evers, E. G., Van Pelt, W., & Havelaar, A. H. (2005). Risk assessment of *Campylobacter* in the Netherlands via broiler meat and other routes. Repéré le 16 Mai 2015 à <http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/7248/1/250911006.pdf>
- Newell, D. G., & Fearnley, C. (2003). Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4343-4351.
- Ng, L., Sherburne, R., Taylor, D., & Stiles, M. (1985). Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. *Journal of Bacteriology*, 164(1), 338-343.
- Nielsen, H. L., Ejlersen, T., Engberg, J., & Nielsen, H. (2013). High incidence of *Campylobacter concisus* in gastroenteritis in North Jutland, Denmark: a population-based study. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(5), 445-450. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03852.x
- Nielsen, L. N., Luijkx, T. A., Vegge, C. S., Johnsen, C. K., Nuijten, P., Wren, B. W., . . . Krogfelt, K. A. (2012). Identification of immunogenic and virulence-associated *Campylobacter jejuni* proteins. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(2), 113-119.

- Nyati, K. K., & Nyati, R. (2013). Role of *Campylobacter jejuni* infection in the pathogenesis of Guillain-Barre syndrome: an update. *Biomed Res Int*, 2013, 852195. doi: 10.1155/2013/852195
- Park, S. F. (2002). The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 74(3), 177-188.
- Paul, N. C., Al-Adwani, S., Crespo, R., & Shah, D. H. (2014). Evaluation of passive immunotherapeutic efficacy of hyperimmunized egg yolk powder against intestinal colonization of *Campylobacter jejuni* in chickens. *Poultry Science*, 93(11), 2779-2787.
- Percival, S. L., Yates, M. V., Williams, D., Chalmers, R., & Gray, N. (2013). *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks*. Elsevier Science.
- Peyrat, M. B., Soumet, C., Maris, P., & Sanders, P. (2008). Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: analysis of a potential source of carcass contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 188-194. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.030
- Poropatich, K. O., Walker, C. L., & Black, R. E. (2010). Quantifying the association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barre syndrome: a systematic review. *Journal of Health, Population, and Nutrition*, 28(6), 545-552.
- Rivoal, K., Denis, M., Salvat, G., Colin, P., & Ermel, G. (1999). Molecular characterization of the diversity of *Campylobacter spp.* isolates collected from a poultry slaughterhouse: analysis of cross-contamination. *Letters in Applied Microbiology*, 29(6), 370-374.
- Rose ME, O. E. (1981). Immunoglobulins in the egg, embryo, and young chick. *Developmental and Comparative Immunology*, 5(1), 15-20.
- Rose, M. E., Orlans, E., & Buttress, N. (1974). Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *European journal of Immunology*, 4(7), 521-523.



- Rosenquist, H., Nielsen, N. L., Sommer, H. M., Nørrung, B., & Christensen, B. B. (2003). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 83(1), 87-103.
- Sable, S., Pons, A.-M., Gendron-Gaillard, S., & Cottenceau, G. (2000). Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4595-4597.
- Sahin, O., Luo, N., Huang, S., & Zhang, Q. (2003). Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5372-5379.
- Sahin, O., Morishita, T. Y., & Zhang, Q. (2002). *Campylobacter* colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. *Animal Health Research Reviews*, 3(02), 95-105.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3951-3957.
- Sattar Khan, M., Nakamura, S., Ogawa, M., Akita, E., Azakami, H., & Kato, A. (2000). Bactericidal action of egg yolk phosphovitin against *Escherichia coli* under thermal stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1503-1506.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., . . . Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7-15. doi: 10.3201/eid1701.091101p1

- Scharff, R. L. (2012). Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *Journal of Food Protection*®, 75(1), 123-131.
- Selmi, C., & Gershwin, M. E. (2014). Diagnosis and classification of reactive arthritis. *Autoimmunity reviews*, 13(4), 546-549.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A., & Teixeira, P. (2011). *Campylobacter spp.* as a Foodborne Pathogen: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 2, 200. doi: 10.3389/fmicb.2011.00200
- Skirrow, M. B. (1977). *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. *British Medical Journal*, 2(6078) 9-11
- Solanki, H. K., Pawar, D. D., Shah, D. A., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., & Thakar, P. M. (2013). Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMed research international*, 2013, 1-21. doi: 10.1155/2013/620719
- Sørensen, M. C. H., Van Alphen, L. B., Fodor, C., Crowley, S. M., Christensen, B. B., Szymanski, C. M., & Brøndsted, L. (2012). Phase variable expression of capsular polysaccharide modifications allows *Campylobacter jejuni* to avoid bacteriophage infection in chickens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2(11). doi: 10.3389/fcimb.2012.00011
- Spiller, R., & Lam, C. (2012). An Update on Post-infectious Irritable Bowel Syndrome: Role of Genetics, Immune Activation, Serotonin and Altered Microbiome. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 18(3), 258-268. doi: 10.5056/jnm.2012.18.3.258
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(17), 7194-7199. doi: 10.1073/pnas.1014125108

- Stern, N. J., Bailey, J. S., Blankenship, L., Cox, N., & McHan, F. (1988). Colonization characteristics of *Campylobacter jejuni* in chick ceca. *Avian Diseases*, 330-334.
- Stern, N. J., Eruslanov, B. V., Pokhilenko, V. D., Kovalev, Y. N., Volodina, L. L., Perelygin, V. V., . . . Levchuk, V. P. (2008). Bacteriocins reduce *Campylobacter jejuni* colonization while bacteria producing bacteriocins are ineffective. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 20(2), 74-79.
- Svetoch, E. A., & Stern, N. J. (2010). Bacteriocins to control *Campylobacter spp.* in poultry-- A review. *Poultry Science*, 89(8), 1763-1768. doi: 10.3382/ps.2010-00659
- Teunis, P., Van den Brandhof, W., Nauta, M., Wagenaar, J., Van den Kerkhof, H., & Van Pelt, W. (2005). A reconsideration of the *Campylobacter* dose-response relation. *Epidemiology and Infection*, 133(4), 583-592.
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Garneau, P., Masson, L., Laurent-Lewandowski, S., Quessy, S., . . . Letellier, A. (2013). Distribution of colonization and antimicrobial resistance genes in *Campylobacter jejuni* isolated from chicken. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(4), 382-391.
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Gauthier, R., Guévremont, E., Bergeron, N., Laurent-Lewandowski, S., . . . Letellier, A. (2014). Modification of *Campylobacter jejuni* Broiler Colonization by a Feed Additive Composed of Encapsulated Organic Acids and Essential Oils. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 4, 853-864 doi: 10.17265/2161-6256/2014.10.008
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Laurent-Lewandowski, S., Guévremont, E., Quessy, S., & Letellier, A. (2011). Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Quebec. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(4), 298-307.

- Thibodeau, A., Fravallo, P., Taboada, E. N., Laurent-Lewandowski, S., Guévremont, E., Quessy, S., & Letellier, A. (2015). Extensive characterization of *Campylobacter jejuni* chicken isolates to uncover genes involved in the ability to compete for gut colonization. *BMC Microbiology*, *15*(1), 97.
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Yergeau, E., Arsenault, J., Lahaye, L., & Letellier, A. (2015). Chicken Caecal Microbiome Modifications Induced by *Campylobacter jejuni* Colonization and by a Non-Antibiotic Feed Additive. *PloS One*, *10*(7), e0131978. doi: 10.1371/journal.pone.0131978
- 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. *Canada Communicable Disease Report*, *34*(5), 8-15.
- Torpy, J. M., & Golub, R. M. (2011). Irritable bowel syndrome. *Journal of the American Medical Association*, *306*(13), 1501-1501.
- Tsubokura, K., Berndtson, E., Bogstedt, A., Kaijser, B., Kim, M., Ozeki, M., & Hammarström, L. (1997). Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni*-infected chickens. *Clinical and Experimental Immunology*, *108*(3), 451-455.
- 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*(7), 795-802.
- Umaraw, P., Prajapati, A., Verma, A. K., Pathak, V., & Singh, V. (2015). Control of *Campylobacter* in Poultry Industry from Farm to Poultry Processing Unit-a Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*(just-accepted), 00-00.
- Van Deun, K., Haesebrouck, F., Heyndrickx, M., Favoreel, H., Dewulf, J., Ceelen, L., . . . Pasmans, F. (2007). Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry

- and human origin. *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 10), 1284-1289. doi: 10.1099/jmm.0.47342-0
- Van Vliet, A., & Ketley, J. (2001). Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 90(S6), 45S-56S.
- Vandamme, P., Debruyne, L., De Brandt, E., & Falsen, E. (2010). Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 9), 2016-2022. doi: 10.1099/ij.s.0.017152-0
- Wassenaar, T. M. (2011). Following an imaginary *Campylobacter* population from farm to fork and beyond: a bacterial perspective. *Letters in Applied Microbiology*, 53(3), 253-263. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03121.x
- WHO. (2013). The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, 9-11 July 2012 (p. 68). Geneva, Switzerland.
- Wine, E., Chan, V. L., & Sherman, P. M. (2008). *Campylobacter jejuni* mediated disruption of polarized epithelial monolayers is cell-type specific, time dependent, and correlates with bacterial invasion. *Pediatric Research*, 64(6), 599-604. doi: 10.1203/PDR.0b013e31818702b9
- Yeh, H. Y., Hiett, K. L., Line, J. E., & Seal, B. S. (2014). Characterization and reactivity of broiler chicken sera to selected recombinant *Campylobacter jejuni* chemotactic proteins. *Archives of Microbiology*, 196(5), 375-383. doi: 10.1007/s00203-014-0969-z
- Young, K. T., Davis, L. M., & DiRita, V. J. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 5(9), 665-679.
- Yuki, N., & Hartung, H.-P. (2012). Guillain–Barré syndrome. *New England Journal of Medicine*, 366(24), 2294-2304.