

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



المدرسة الوطنية العليا للفلاحة

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE

THESE

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat en

Sciences Agronomiques

Thème

*Campylobactérioses alimentaires : prévalence,  
identification des souches et étude génétique de  
l'antibio-résistance*

par

Mme AL AMIR LAIDOUCI Hanane

Membres du jury :

Président	Mr AMIALI Malek	MCA, ENSA, Alger
Directrice de thèse	Mme HELLAL Amina	Professeur, ENP, Alger
Examineurs	Mme FAZOUANE Fethia	Professeur, Univ. Boumerdes
	Mr KEZZAL Kamal	Professeur, Institut Pasteur d'Algérie
	Mme OUAR KORICHI Mounira	MCA, Institut Pasteur d'Algérie
	Mr BITAM Arezki	MCA, ENSA, Alger

Année universitaire 2014/2015



## Remerciements

Tout d'abord je remercie Allah de m'avoir ouvert toutes les portes et de m'avoir donné le courage et la volonté de poursuivre et d'achever ce travail malgré toutes les contraintes de la vie.

Je remercie en premier lieu mes parents chéris, et surtout ma mère car c'est pour elle et c'est grâce à elle que je suis arrivée ici aujourd'hui, tous les mots de la terre ne vaudront pas le millième de ce qu'ils ont fait pour moi, Merci. Et je remercie mon mari Mohamed pour son aide, son soutien, sa compréhension et ses encouragements.

je ne saurai clôturer ce travail sans avoir remercier au préalable Professeur HELLAL Amina, ma directrice de thèse, qui a toujours été là pour m'orienter et me guider avec ses précieux conseils et me faire profiter de son expérience.

Je remercie l'Institut Pasteur d'Algérie qui m'a ouvert ses portes et m'a permis de travailler au sein de ses laboratoires, représenté par nos anciens directeurs : Professeur BELKAID, Professeur LEBRES, Professeur ABBADI, Professeur TAZIR et par notre directeur actuel ; Professeur KEZZAL.

Je remercie Madame MOUFFOK F., de m'avoir permis de travailler au sein des deux laboratoires de bactériologie des aliments et des eaux et du laboratoire des entérobactéries, et de réaliser mon travail

Je remercie le Professeur KEZZAL de m'avoir encouragé et permis de finaliser ce travail et de le terminer.

Je remercie Docteur OUAR pour son aide si précieuse et sa gentillesse.

Je remercie Professeur AMIALI d'avoir accepté de présider ce jury.

je remercie également Professeur KEZZAL ; Professeur FAZOUANE ; Docteur OUAR KORICHI , et Docteur BITAM d'avoir bien accepté de faire partie de mon jury.

Un remerciement spécial va à mes chères amies et sœurs qui ont toujours cru en moi et m'ont encouragé sans relâche : BELKADER Chafika, SAIBI Nadjet et BENABBOU Amina. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma profonde affection pour elles.

Je remercie vivement Madame Farida TALEB, qui a été mon guide durant la réalisation de ce travail, elle m'a appris et orientée, Merci Farida.

Je remercie le Professeur MEGRAUD responsable du centre national de référence des *Campylobacter* et *Helicobacter* à Bordeaux (en France) de m'avoir permis de réaliser une partie de mon travail au sein de ses laboratoires, je remercie également toute son équipe de travail ; ils étaient tous merveilleux.

Je remercie tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail : MEDJBER Oussama, MERSAOUI Sofiane, BENAICHOUBA Mohamed Lamine, HASSANI Mohamed Amine, AMROUCHE Amel, DAOUADJI Sofiane, BOUBEKEUR Hind, AIOUADJ Sarah, BERKANE Mounira, ZOUAR Razika, KERRAR Zineb, MENKOURA Souad, HAMADOUCHE Yasmine, MALEK Chérifa, OUARED Nassima et HAFIZ Meriem.

Je remercie mes chères collègues de l'Institut Pasteur d'Algérie, tous ceux qui m'ont aidé, encouragé, orienté : Souhila, Mounira, Rafik, Rym Lalliam, Farida assaous, Fatiha Gacem, Nabila, Fatma... et mes collègues de laboratoire : Amel Laib, Lila Azizi, Farid, Amina Bouhraoua, Rachida, Nora, Djamel, AbdelKrim, Chafika Ghaoui, Malika, Abdel Hakim, Boubeker, Fatma Zohra, Rym, Saoussen, Sid Ahmed, Kamel, Yacine et Noureddine Hafferessas, Noureddine, Souad, Farida, Amel, Khalti Houria, Azza, Mohamed, Djaouida ....

Je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## DEDICACES

*Je dédie ce modeste travail*

- *A MES PARENTS CHERIS, pour leur Amour, leur Affection, Attention inlassable, Aide en continu, leurs précieux conseils... pour ce qu'ils sont et ce qu'ils représentent pour moi, JE VOUS AIMES*
- *A mon cher mari MOHAMED, pour tout ce qu'il a fait pour moi, et à mes enfants chéris: ABDALLAH, NADA et NESRINE*
- *A AFAF, ma sœur chérie, pour son Amour, sa patience et son aide, ainsi qu'à son mari et mes chers neveux ABDELHAMID et SARAH*
- *A MES grands mères, mes oncles, tantes, cousins, cousines et tous les membres de ma famille où qu'ils soient, surtout IMENE, AYMEN*
- *A ma famille en Syrie, puisse Dieu lever le mal qui s'est abattu sur ce beau pays*
- *A ma belle mère et à tous les membres de ma belle famille*
- *A mes amies et sœurs*
- *A mes collègues de l'Institut Pasteur d'Algérie*
- *A tous ceux que j'aime*

*A la mémoire de ceux qui me sont chers et qui ne sont plus là*

# Table des Matières

<b>INTRODUCTION</b> í	1
<b>CHAPITRE I : GENERALITES</b>	
<b>I.1. HISTORIQUE</b> í ...	3
<b>I.2. TAXONOMIE DES BACTERIES DU GENRE <i>Campylobacterí</i></b> í í í í ..	4
<b>I.3. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES DES BACTERIES DU GENRE <i>Campylobacterí</i></b> í	6
I.3.1. Caractères morphologiques í ...	6
I.3.2. Caractères métaboliques et biochimiques í í í í í í í í í í í í í í í í í í í	7
I.3.3. Caractères cultureux í	9
I.3.4. Génome í	10
I.3.5. Les caractères antigéniques í ..	11
I.3.6. Viabilité í	11
<b>I.4. ETIOLOGIE DE LA CAMPYLOBACTERIOSE</b> í í í í í í í í í í í í í	12
I.4.1. Epidémiologie í ..	13
I.4.1.1. Incidence í	13
I.4.1.2. Réservoirs et habitat í	15
I.4.1.3. Source de contamination et mode de transmission í í í í í í í í í í í í ...	17
I.4.1.4. Facteur de risque de contamination í ..	18
I.4.2. Physiopathologie í	18
I.4.2.1. Pouvoir pathogène í	18
I.4.2.1.1. Colonisation du tube digestif par <i>Campylobacterí</i> í í í í í í í í í í í í	19
I.4.2.1.2. Adhésion aux cellules intestinales í	20
I.4.2.1.3. La production de toxines í	20
I.4.2.2. Symptômes í	21
I.4.2.3. Pathologie í ...	22
I.4.2.3.1. Entérites de l'enfant í	22
I.4.2.3.2. Complications régionales í	22
I.4.2.3.3. Bactériémies et septicémies í	22
I.4.2.3.4. Complications post infectieuses í	23
I.4.2.4. Prophylaxie et traitement í ..	24
I.4.2.5. Prévention et contrôle í ..	25
<b>I.5. ANTIBIOTIQUES ET ANTIBIORESISTANCE</b> í í í í í í í í í í í í í ..	26
I.5.1. Définition des antibiotiques í ..	26
I.5.1. Classes des antibiotiques et leur mécanisme d'action í í í í í í í í í í í ..	26
I.5.3. La résistance aux antibiotiques í	30
I.5.3.1. Inactivation de l'antibiotique í	30
I.5.3.2. Modification de la cible í	31
I.5.3.3. Excrétion de l'antibiotique par mécanisme d'efflux í í í í í í í í í í í ..	31
<b>I.6. METHODES DE BIOLOGIES MOLECULAIRES</b> í í í í í í í í í í í ..	32
I.6.1. La PCR classique ou standard í	32
I.6.2. La PCR en temps réel í	33
I.6.3. Le séquençage í ..	38
<b>I.7. LES HUILES ESSENTIELLES COMME ALTERNATIVE A L'ANTIBIORESISTANCE</b> í	40
I.7.1. Définition d'une huile essentielle í ..	40
I.7.2. Composition chimique des huiles essentielles í í í í í í í í í í í í í í í	41
I.7.3. Activité antibactérienne des huiles essentielles í í í í í í í í í í í í í í í	42

## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

<b>II.1. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION</b>	44
II.1.1. Matériel biologique	44
II.1.2. Isolements	44
II.1.1.1. Milieux de culture	44
II.1.1.2. Prélèvements	45
II.1.1.2.1. Répartition des prélèvements effectués	45
II.1.1.2.2. Prise d'essai	49
II.1.1.3. Ensemencement et incubation	50
II.1.1.4. Enrichissement	51
II.1.2. Identification	56
II.1.2.1. Identification de <i>Campylobacter</i>	56
II.1.2.2. Identification d'autres bactéries	58
<b>II.2. ANTIBIOGRAMME</b>	58
<b>II.3. CONSERVATION DE SOUCHES</b>	60
<b>II.4. ANALYSES STATISTIQUES</b>	60
II.4.1. Comparaison de deux pourcentages	60
II.4.2. Test du $\chi^2$	61
<b>II.4. ETUDE GENETIQUES DES GENES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES</b>	61
II.4.1. Extraction de l'ADN	61
II.4.2. Identification des <i>Campylobacter</i> par PCR classique et par PCR en temps réel..	61
II.4.2.1. PCR standard pour l'identification de <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> (MULTIPLEX)	61
II.4.2.2. Identification des <i>Campylobacter</i> par PCR en temps réel	62
II.4.3. Détection de la résistance aux antibiotiques par séquençage	63
II.4.3.1. Détection de la résistance aux quinolones chez <i>Campylobacter</i> (PCR QRDR des <i>Campylobacter</i> )	64
II.4.3.1.1. PCR standard : Amplification du gène d'intérêt	64
II.4.3.1.2. Purification par Séphacryl	65
II.4.3.1.3. Réaction de séquence	66
II.4.3.1.4. Séquençage	67
II.4.3.2. Détection de la résistance aux macrolides	67
<b>II.5. TEST DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE CERTAINES HUILES ESSENTIELLES (HE) VIS-A-VIS DE QUELQUES SOUCHES DE <i>Campylobacter</i></b>	69
II.5.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque ou aromagramme	69
II.5.2. Etude du pouvoir bactériostatique de trois HE sélectionnées	71





## LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Morphologie de <i>Campylobacter jejuni</i> (Gx400x400)	6
Figure I.2 : Coloration de Gram de <i>C.jejuni</i> sous microscope photonique (Gx1000)	6
Figure I.3 : Micrographie électronique à transmission de <i>C. jejuni</i> colorée de façon contrastante (Gx616x406)	7
Figure I.4 : Arbre phylogénétique des espèces du genre <i>Campylobacter</i>	10
Figure I.5 : Schématisation de l'entrée à l'état VNC d'une suspension bactérienne	12
Figure I.6 : Incidence des campylobactérioses humaines dans 8 pays européens entre 1993 et 2000	14
Figure I.7 : Réservoirs et modes de transmission des <i>Campylobacters</i> dans l'environnement	15
Figure I.8 : Les étapes de la colonisation du tube digestif par le <i>Campylobacter</i>	19
Figure I.9 : Evolution clinique d'une campylobactériose digestive	23
Figure I.10 : L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance	31
Figure I.11 : Principe de la technologie FRET	36
Figure I.12: les différentes étapes de mesure de la fluorescence pour la courbe de fusion FRET.	36
Figure I.13 : Etapes du séquençage	38
Figure II.1 : Schéma illustrant les différentes étapes suivies lors de l'étude 1	46
Figure II.2 : Répartition des prélèvements alimentaires analysés	48
Figure II.3: Schéma général du protocole utilisé dans l'étude 1 pour l'isolement et l'identification de <i>Campylobacter</i> à partir de prélèvements d'origine animale (enquête poulailler)	52
Figure II.4: Schéma générale du protocole utilisé dans l'étude des prélèvements issus des rôtisseries (étude 2)	53
Figure II.5 : Schéma général de la méthode ISO NF 10272 (modifiée)	54
Figure II.6 : Protocole de recherche, d'isolement et d'identification de <i>Campylobacter</i> dans les selles	55
Figure II.7 : la galerie Api Campy	57
Figure III.1 : Aspect d'une culture de <i>Campylobacter</i> sur gélose Columbia au sang	74
Figure III.2 : Coloration de Gram de <i>Campylobacter</i> (G 10x100)	74
Figure III.3 : Résultat de la galerie api Campy pour <i>Campylobacter jejuni</i>	75
Figure III.4 : Résultat de la galerie api Campy pour <i>Campylobacter coli</i>	75
Figure III.5 : Répartition des cas positifs selon l'âge (poussins/poules) et le type de prélèvement (enquête N°1)	76
Figure III.6 : Répartition des espèces de <i>Campylobacter</i> isolées lors des trois sorties effectuées dans l'enquête N°1 selon l'âge des poussins/poules	77
Figure III.7: Répartition des cas positif selon l'âge (poussins/poules) et type de prélèvement (enquête N°2)	79
Figure III.8: Répartition des espèces de <i>Campylobacter</i> isolées lors des trois sorties effectuées dans l'enquête N°2	80
Figure III.9: Répartition des cas positifs selon les deux enquêtes	81
Figure III.10: Nombre des cas positifs isolés selon le stade d'enrichissement pour l'étude 1	83
Figure III.11 : Profil global d'antibiorésistance des souches de <i>Campylobacter</i> isolées lors de l'étude 1 (poulailler)	84
Figure III.12 : Profil d'antibiorésistance des souches de <i>Campylobacter</i> isolées selon l'espèce durant l'étude 1	86

Figure III.13: Comparaison statistique du profil d'antibiorésistance des souches de <i>Campylobacter</i> isolées (étude 1) selon les familles d'antibiotiques	87
Figure III.14 : Résultats d'un antibiogramme réalisé sur gélose Columbia (incubation à 37°C pendant 48 heures en micro aérobie)	88
Figure III.15 : Répartition des cas positifs selon le milieu d'isolement	91
Figure III.16 : profil d'antibiorésistance des souches de <i>Campylobacter</i> isolées lors de l'étude 2 (rôtisseries de poulets)	92
Figure III.17 : Fréquences de contamination des bactéries isolées lors de l'étude 2	92
Figure III.18 : Résistance (%) des souches de <i>Campylobacter</i> aux antibiotiques, isolées à partir de prélèvements de poulets	100
Figure III.19 : Répartition des cas positifs selon l'âge et le sexe	105
Figure III.20 : Répartition des cas positifs isolés des coprocultures selon le milieu de culture utilisé	106
Figure III.21 : Répartition des cas positifs isolés de coprocultures selon le mois d'isolement	107
Figure III.22 : Profil d'antibiorésistance (global) des <i>Campylobacter</i> isolées des coprocultures.	108
Figure III.23 : Profil d'antibiorésistance des différentes espèces de <i>Campylobacter</i> isolées des coprocultures	110
Figure III.24 : PCR multiplex <i>C.coli C.jejuni</i> : migration sur gel d'agarose	115
Figure III.25 : courbes de fusion pour l'identification des espèces de <i>Campylobacter</i> par PCR en temps réel	117
Figure III.26 : ADN amplifiés après la réaction de séquence avec DNA molecular weight mark (23S)	119
Figure III.27 : ADN amplifiés après purification au S400 avec le 1Kb comme marqueur moléculaire destinés au séquençage (23S)	119
Figure III.28: alignement des séquences 23S des souches de <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> (d'origine animale et humaine) et comparaison avec les séquences 23S de la souche de référence <i>C. jejuni</i> A2075G (GenBank AY 190994) et <i>C. coli</i> wild type (AY190987)	120
Figure III.29 : ADN amplifiés après la réaction de séquence avec DNA molecular weight marker VIII (avant purification) (QRDR)	123
Figure III.30 : ADN amplifiés après purification au S400 avec le 1Kb comme marqueur moléculaire pour l'étude du séquençage (QRDR)	124
Figure III.31 : alignement des séquences d'ADN de la région gyrA QRDR de <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> et <i>C. fetus</i> d'origine humaine et animale avec les séquences de <i>C. jejuni</i> (Gen Bank L04566) et <i>C. jejuni</i> (Gen Bank ATCC 11168)	126
Figure III.32 : photos représentant les zones d'inhibition de quelques HE étudiées sur la culture de <i>Campylobacter</i>	132
Figure III.33 : photos représentant les zones d'inhibition de l'HE de clou de girofle à différentes dilutions sur le <i>Campylobacter</i>	137
Figure III.34 : photos représentant les zones d'inhibition de l'HE d'origan à différentes dilutions sur le <i>Campylobacter</i>	138
Figure III.35 : photos représentant les zones d'inhibition de l'HE de thym à différentes dilutions sur le <i>Campylobacter</i>	139

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1: Différentes espèces et sous espèces du genre <i>Campylobacter</i>	5
Tableau I.2 : Caractères phénotypiques des espèces du genre <i>Campylobacter</i>	8
Tableau I.3 : Conditions de croissance des <i>Campylobacter</i> thermo tolérants	10
Tableau I.4 : Habitat des différentes espèces de <i>Campylobacter</i>	16
Tableau I.5 : Tableau récapitulatif des molécules pouvant servir de facteur d'adhésion	20
Tableau I.6 : Classe des principaux antibiotiques et leur mode d'action	27
Tableau I.7 : Différences entre la PCR classique et les PCR en temps réel	37
Tableau I.8 : Les principaux constituants des huiles essentielles (HEs) à activité Antibactérienne	42
Tableau II.1 : Répartition des échantillons des rôtisseries selon leur provenance	47
Tableau II.2 : Répartition des échantillons des rôtisseries selon l'état de cuisson du poulet/sauce	47
Tableau II.3 : Répartition des échantillons des rôtisseries selon leur nature	47
Tableau II.4: Répartition des coprocultures par groupe	49
Tableau II.5 : Liste des Huiles Essentielles utilisées et leur concentration	69
Tableau II.6. : profils d'antibiorésistances des souches de <i>Campylobacter</i> étudiées	70
Tableau II.7. : Dilutions et concentrations des HE préparées	72
Tableau III.1 : Résultats d'identification des <i>Campylobacter</i>	73
Tableau III.2 : répartition des cas positifs selon les points de prélèvements	89
Tableau III.3: Répartition des cas positifs selon les différents stades de cuisson du poulet	90
Tableau III.1.3.1.4. Répartition des cas positifs selon le milieu d'isolement	90
Tableau III.4 : Fréquences (%) des contaminations par <i>Campylobacter</i> en fonction du type de prélèvements de poulets	96
Tableau III.5 : Fréquences d'isolement des souches de <i>Campylobacter</i> (%) à partir des prélèvements de poulets en fonction des milieux de culture utilisés et des stades d'enrichissements	98
Tableau III.6 : Répartition et taux des prélèvements de selles analysées par groupe	103
Tableau III.7: Résultats de l'aromatogramme des HE sur les 4 souches de <i>Campylobacter</i> .	130
Tableau III.8 : Pouvoir bactéricide des HE d'origan, de thym et de clou de girofle sur <i>Campylobacter</i>	135

## INTRODUCTION

La Campylobactériose est une zoonose, maladie transmise à l'homme par les animaux ou les produits qui en dérivent.

L'agriculture intensive aurait influencé la prévalence de certains pathogènes zoonotiques contribuant probablement à expliquer l'augmentation sensible du nombre de maladies humaines dues à ces micro-organismes, car notre alimentation constitue une source potentielle de toxi-infections alimentaires d'origine bactérienne, tel que le genre *Campylobacter*.

On a longtemps cru que les *Campylobacter* étaient avant tout des pathogènes pour les animaux, mais le développement des techniques d'isolement a abouti à une augmentation de la détection des infections dues à ces bactéries chez l'homme. Depuis les *Campylobacter* sont considérés comme la cause principale de gastro-entérites bactériennes dans le monde.

Vu le grand risque lié à l'alimentation, beaucoup d'études ont contribué à l'élaboration de techniques de plus en plus performantes pour la recherche de ce genre bactérien dans les aliments, et plus particulièrement ceux provenant des volailles.

La découverte d'antibiotiques de stimulation de la croissance et de la protection contre les maladies des animaux d'élevage, a provoqué une montée en flèche de l'utilisation de ces produits en agriculture, en aquaculture et dans les élevages. Aujourd'hui, environ la moitié du tonnage total d'antibiotiques utilisé est destinée à soigner les animaux malades et stimuler leur croissance. Ce qui a engendré le développement de souches microbiennes résistantes à divers antibiotiques. On note notamment une augmentation de souches résistantes à l'acide nalidixique et l'apparition de souches résistantes à l'enrol oxacine. Comme l'apparition de nouvelles résistances aux antibiotiques ne cesse d'augmenter, un système de surveillance a été installé dans certains pays pour y faire face.

Dans les pays en développement, la campylobactériose est répandue et est la cause d'une morbidité élevée, avec un taux de létalité pouvant atteindre 4 % chez les jeunes enfants. On sait que la maladie provoque généralement une gastro-entérite, mais aussi une arthrite et une septicémie chez les sujets immuno-compromis. Le nombre de nouvelles espèces de *Campylobacter* décrites et le nombre croissant de souches antibiorésistantes de l'espèce commune, *C. jejuni*, soulèvent de nouvelles inquiétudes. Par ailleurs, il a été établi que le syndrome paralysant de Guillain-Barré constituait une complication grave des infections à *Campylobacter*.

L'objectif de notre étude est d'isoler le maximum de souches de *Campylobacter* à partir de divers types de prélèvements (animaux, alimentaires et selles).

Une fois les souches isolées, elles seront identifiées et leur profil d'antibiorésistance testé. Nous pourrons avoir dans cette partie une idée sur la prévalence de *Campylobacter* et sur le profil de résistance aux antibiotiques pour les souches humaines et alimentaires et pouvoir les comparer entre eux.

Une confirmation de l'identification par PCR sera faite par la suite, et une étude des gènes de résistance réalisée pour essayer de localiser l'origine de cette résistance aux antibiotiques.

Pour pallier au problème de la résistance aux antibiotiques, une alternative sera testée, celle des plantes et plus précisément les huiles essentielles.

## I.1. HISTORIQUE

Aujourd'hui connue comme la première cause bactérienne de toxi-infections alimentaires de par le monde, dites campylobactérioses, l'histoire nous apprend que les *Campylobacter* ont été d'abord associés à des problèmes de santé animale.

En 1880 on a pu observer pour la première fois des bactéries fines, incurvées et très mobiles, à Gram négatif dans les prélèvements diarrhéiques des nouveau-nés en Allemagne (Moor et al., 2005)

Ainsi dès 1913 Mc Fadyean et Stockman ont pu décrire une bactérie mobile responsable d'avortements épizootiques chez les ovidés et les bovidés (Jorgensen et al., 2002). Elle fut désignée sous le nom de *Vibrio fetus* en 1919 par Smith et Taylor en raison de sa forme incurvée qui rappelait celle de *Vibrio*. Et ce n'est qu'en 1931 que Jones et al. ont pu décrire une nouvelle espèce nommée *Vibrio jejuni* retrouvée dans les selles des bovins (Bourgeois et al., 1996).

Il a fallu attendre 1947 pour pouvoir décrire les premiers cas humains de *V. fetus* par Vinzent et al.. En 1957 Miss King a pu isoler à partir d'échantillons sanguins d'enfants atteints de diarrhées une nouvelle espèce différente de *Vibrio fetus*, qu'elle nomma *Vibrio* qui englobe les deux espèces *Vibrio jejuni* et *Vibrio coli* (Garnier, 1985).

Le genre *Campylobacter* (du grec *kampulos* : incurvé et *bacter* : bâtonnet) a été proposé par Sébald et Veron en 1963 avec *Campylobacter fetus* comme espèce-type. Pour le différencier du genre *Vibrio* ils se sont basés sur C+G (les *Campylobacter* ayant un taux de GC % de 28 à 38%, contre 40 à 52% chez les *Vibrio*). Ce nouveau genre comprenant deux espèces, *Campylobacter fetus* et *Campylobacter bubulus* (devenu plus tard *Campylobacter sputorum*) fut placé dans la famille des *Spirillaceae* (On, 2001).

Pendant la décennie 70, Butzler et Skirrow effectuent des travaux sur le rôle tenu par les *Campylobacter* dans les entérites de l'homme. Ils mettent au point des milieux sélectifs favorisant l'isolement de ces bactéries et permettant l'identification de nouvelles espèces (Garnier, 1985). Ce n'est qu'en 1973 que Véron et Châtelain incluent dans le genre *Campylobacter* de nouvelles espèces (Euzéby, 2007).

En 1993 des modifications taxonomiques ont été apportées se basant sur l'analyse de l'ARN 16S et l'hybridation ADN/ARN ribosomique, individualisant les genres *Helicobacter* et *Arcobacter* (On, 2001). En 1997 Vandamme et al., en utilisant des méthodes phénotypiques et génotypiques et l'hybridation ADN/ADN, démontrent

que *C. hyolei* est identique à *C. coli* et proposent de l'intégrer à cette espèce (Vandamme et On, 2001).

En 2001 Lawson *et al.* décrivent *Campylobacter hominis* comme des bacilles droits et immobiles (Kroger *et al.*, 2005).

En novembre 2007, Inglis *et al.* valident la nomenclature de *Campylobacter canadensis* qui est une nouvelle espèce isolée en 2004 et 2006 à partir de la flore fécale de grues blanches d'Amérique (*Grus americana*) maintenues en captivité au zoo de Calgary (Canada) (Hoar *et al.*, 2007).

## **I.2. TAXONOMIE DES BACTERIES DU GENRE *Campylobacter***

Le genre *Campylobacter* constitue avec les genres *Arcobacter* et *Sulfurospirillum*, la famille des *Campylobacteraceae* (Kroger *et al.*, 2005). Cette dernière forme avec les familles *Helicobacteraceae* et *Hydrogenimonadaceae* l'ordre des *Campylobacterales* (Euzéby, 2007) qui a été proposé dans la deuxième section du Bergey's manual of systematic bacteriology (Kroger *et al.*, 2005). Cette nomenclature sera valablement publiée en janvier 2006 par citation sur la liste de validation 107.

Cet ordre a été défini sur la base des séquences des ARN 16S. Il rassemble des procaryotes ayant le plus souvent une morphologie incurvée ou spiralée, présentant une grande diversité métabolique et écologique et renfermant des espèces pathogènes pour l'homme et les animaux.

L'ordre des *Campylobacterales* est placé dans la classe des *Epsilonproteobacteria* phylum des *Proteobacteria*, domaine des *Eubacteria*, (Dromigny, 1997 ; Euzéby, 2007).

L'espèce du genre *Campylobacter* la plus rencontrée en pathologie humaine est *Campylobacter jejuni*, sa classification est la suivante (On, 2001) :

**Domaine :** *Eubacteria*

**Phylum:** *Proteobacteria*

**Classe :** *Epsilonproteobacteria*

**Ordre :** *Campylobacterales*

**Famille :** *Campylobacteraceae*

**Genre :** *Campylobacter*

**Espèce type :** *Campylobacter jejuni*

Le genre *Campylobacter* compte 22 espèces et sous-espèces (Tang et al., 2014). Certaines espèces sont représentées dans le tableau I.1.

**Tableau I.1:** Différentes espèces et sous espèces du genre *Campylobacter* (Euzeby, 2007).

Espèces	Sous espèces
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>C. jejuni ssp. jejuni</i>
	<i>C. jejuni ssp. doylei</i>
<i>Campylobacter canadensis</i>	
<i>Campylobacter coli</i>	
<i>Campylobacter concisus</i>	
<i>Campylobacter curvus</i>	
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>C. fetus ssp. fetus</i>
	<i>C. fetus ssp. venerealis</i>
<i>Campylobacter gracilis</i>	
<i>Campylobacter helveticus</i>	
<i>Campylobacter hominis</i>	
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	<i>C. hyointestinalis ssp hyointestinalis</i>
	<i>C. hyointestinalis ssp lawsonii</i>
<i>Campylobacter insulaenigrae</i>	
<i>Campylobacter laniana</i>	
<i>Campylobacter lari</i>	
<i>Campylobacter mucosalis</i>	
<i>Campylobacter rectus</i>	
<i>Campylobacter showae</i>	
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	
<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>C. sputorum ssp sputorum</i>
	<i>C. sputorum ssp fecalis</i>
	<i>C. sputorum ssp paraureolyticus</i>

Au sein du genre *Campylobacter* les espèces peuvent être divisées en trois groupes (Lehours et Mégraud, 2003):

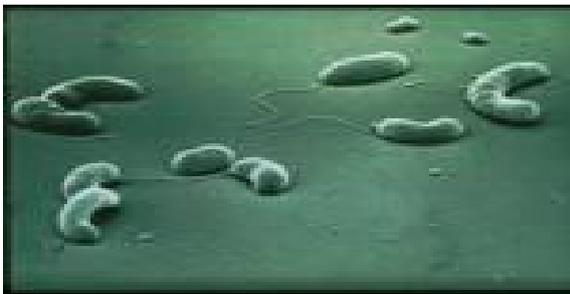
- Le groupe thermophile : c'est le groupe le plus important sur le plan clinique avec notamment les espèces *C. jejuni* et *C. coli*
- Le groupe fetus : ce groupe est de moindre importance que le premier avec l'espèce *C. fetus*
- Le groupe des anaérobies : ce groupe comporte les bactéries qui sont micro-aérobies mais nécessitant moins de 1% d'oxygène. Ces bactéries sont essentiellement saprophytes de la cavité buccale et peuvent parfois être impliqués dans des processus pathogènes

### I.3. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES DES BACTERIES DU GENRE *Campylobacter*

#### I.3.1. Caractères morphologiques

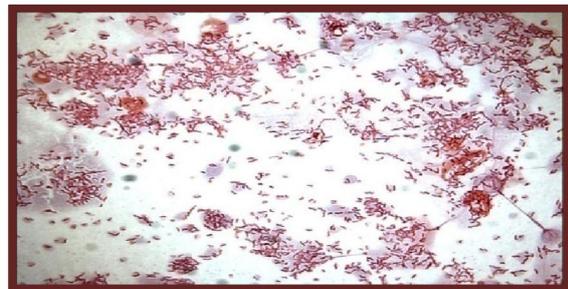
Le genre *Campylobacter*, tel qu'il est défini par Vandamme *et al.* (1991) est constitué de bacilles à Gram négatif, incurvés, en S ou en forme spiralée (Figures I.1, I.2 et I.3), non sporulés de 0,2 à 0,5  $\mu$ m de diamètre sur 0,5 à 5,0  $\mu$ m de longueur. Ils ont un flagelle unique polaire et non engainé qui leur confère une mobilité caractéristique en vol de moucheron. Ils ne sont pas capsulés mais certaines espèces ont des protéines de surface qui confèrent à la cellule une résistance à l'action bactéricide des antibiotiques. Les formes jeunes sont courtes et incurvées alors que les cultures âgées sont de formes coccoïdes probablement viables mais non cultivables dans les conditions habituelles (Fauchère et Avril, 2002). Elles se colorent faiblement et sont assimilées à des formes de dégénérescence impossibles à repiquer (Fauchère, 2002), (Federighi *et al.*, 2005 ; Euzeby, 2007).

*Campylobacter hominis* espèce décrite en mars 2001 présente des caractères bactériologiques différents des autres espèces. En effet les souches de cette espèce sont constituées de bacilles droits, immobiles (dépourvus de flagelles), anaérobies stricts, cependant quelques souches peuvent croître faiblement en micro aérobie (Euzeby, 2007).



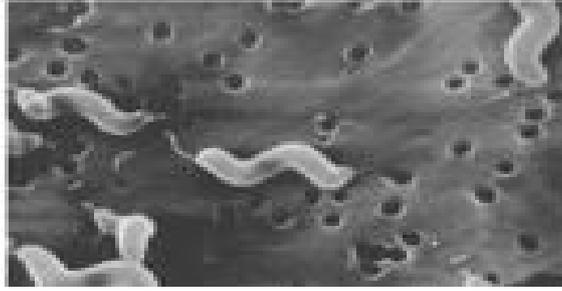
**Figure I.1 :** Morphologie de *Campylobacter jejuni* (Gx400x400)

<http://scooponpets.com/pathogens-in-pet-waste/>



**Figure I.2 :** Coloration de Gram de *C. jejuni* sous microscope photonique (Gx1000)

[www.itusozluk.com](http://www.itusozluk.com)



**Figure I.3 :** Micrographie électronique à transmission de *C. jejuni* colorée de façon contrastante (Gx616x406)

<http://www.planet-techno-science.com/biologie/carcasses-de-poulet-risque-de-contamination-par-la-bacterie-Campylobacter-2/>

### I.3. 2. Caractères métaboliques et biochimiques

Les *Campylobacter* sont chimio-organotrophes (Euzéby, 2007) à métabolisme énergétique oxydatif strict. Les substrats énergétiques sont essentiellement les métabolites du cycle de Krebs, ou des acides aminés (Vandamme, 2000) (Fauchère et Avril, 2002). Ils possèdent les enzymes de la glycolyse mais n'utilisent pas les sucres préférentiellement.

Les *Campylobacter* sont :

- Oxydase positive ;
- Possédant une chaîne cytochromique « cytochrome C oxydase ».
- Les accepteurs finaux d'électrons sont l'oxygène, les nitrates et / ou les acides aminés. (Fauchère, 2002),
- Catalase variable suivant les espèces ou les sous espèces (Euzéby, 2007).
- Uréase négative (à l'exception de quelques cas atypiques de *Campylobacter lari* et des souches de *Campylobacter sputorum* biovar *paraueolyticus*).
- Gélatinase négative.
- Hydrolyse de l'hippurate négative sauf pour *C. jejuni*.
- Lipase négative (Butzler, 2004).
- Nitrate réductase positive pour la grande majorité des souches.

Les principaux caractères permettant de différencier les espèces du genre *Campylobacter* figurent dans le tableau I.2.

Tableau I.2 : Caractères phénotypiques des espèces du genre *Campylobacter* (Nachamkin ,1999).

Espèce	Catalase	Oxydase	Réduction des		Croissance à			uréase	TSI H <sub>2</sub> S	LøHydrolyse de øhippurate	
			Nitrates	nitrites	anaérobiose	15°C	25°C				42°C
<i>C. canadensis</i>	D	+	D	+	-	-	-	+	D	D	-
<i>C. coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	D	-
<i>C. concisus</i>	-	D	(-)	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>C. curvus</i>	-	+	+	-	+	-	-	D	-	(-)	(-)
<i>C. fetus</i>	+	+	+	-	D	-	+	(+)	-	-	-
<i>C. gracilis</i>	(-)	-	(+)	-	D	-	-	-	-	-	-
<i>C. helveticus</i>	(-)	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>C. hominis</i>	-	+	D	-	-	-	-	D	-	-	-
<i>C. hyointestinalis</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>C. insulaenigrae</i>	+	+	+	-	-	-	(-)	-	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>C. lanienae</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. lari</i>	+	+	+	D	+f	-	+	+	-	+	-
<i>C. mucosal.is</i>	-	+	(-)	-	-	-	-	+	D	-	-
<i>C .rectus</i>	(-)	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>C. showae</i>	+	+	+	-	+	-	D	-	-	-	-
<i>C .sputorum</i>	D	+	+	-	+	-	-	(+)	**	***	-
<i>C. upsaliensis</i>	-	+	+	-	-	-	-	(+)	-	+	-

+ : toutes les souches donnent un résultat positif.

- : toutes les souches donnent un résultat négatif.

(+) : 70 à 90% donnent des résultats positifs.

(-) : 7 à 29 % donne des résultats positifs.

D: 40 à 64% donne des résultats positifs; ND : non déterminé ; f: résultat faiblement positive.

\*\* : *C. sputorum* biovar *paraureolyticus* est uréase positive; \*\*\*:10à 30% *C .sputorum sputorum* donnent des résultats négatifs

### I.3. 3. Caractères cultureux

Les *Campylobacter* sont de culture lente et exigeante ce qui les classe fréquemment dans les « germes de culture difficile » nécessitant la présence d'une atmosphère appauvrie en oxygène et enrichie en CO<sub>2</sub>; les *Campylobacter* sont dits capnophiles. L'un des mélanges gazeux le plus souvent utilisé pour la culture est l'atmosphère microaérobie qui comporte : 5% d'oxygène (O<sub>2</sub>), 10% de gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) et 85% d'azote (N<sub>2</sub>) (Fauchère, 2002).

Afin d'atténuer l'action néfaste de l'oxygène, on peut ajouter des produits qui vont neutraliser les peroxydes d'hydrogène comme le métabisulfite de sodium, le sulfate ferreux, le pyruvate de sodium, des agents soufrés réducteurs comme le thioglycolate (Federighi et al., 2005). L'addition de sang de cheval ou de mouton favorise la synthèse d'enzymes qui interviennent dans la destruction des peroxydes d'hydrogène (Dromigny, 1997). Le sang peut être remplacé par du charbon actif (Federighi et al., 2005).

Les *Campylobacter* exigent aussi des facteurs de croissance pour croître (acides aminés, coenzymes) (Fauchère, 2002).

Toutes les espèces du genre *Campylobacter* sont mésophiles c'est-à-dire se développent à 37°C, toutefois les espèces d'intérêt en hygiène alimentaire sont dites thermotolérantes ; elles peuvent croître à 42°C (Federighi et al., 2005).

La durée d'incubation de ces germes est d'au moins 48 heures en raison de la lenteur de leur développement, elle peut atteindre 5 jours pour les souches les plus lentes (Dromigny, 1997).

Les *Campylobacter* peuvent être cultivés sur milieux liquides ou solides. En milieu liquide non agité le trouble occasionné par leur croissance se trouve dans la zone de microaérophilie juste sous la surface. Tandis que sur les milieux solides les colonies peuvent présenter des aspects différents : généralement rondes convexes de faible diamètre, lisses et brillantes avec bord régulier, mais également étalées plates grises en taches de bougie quelque fois granuleuses transparentes avec bord régulier (Federighi et al., 2005). Généralement on n'observe pas d'hémolyse.

A l'exception de *Campylobacter mucosalis* et *Campylobacter hyointestinalis* qui produisent un pigment jaunâtre, les colonies du genre *Campylobacter* sont non pigmentées (Euzeby, 2007).

Les milieux de cultures utilisés sont généralement sélectifs (car ils contiennent certains antibiotiques) tel que Butzler, Skirrow, Karmalií Mais vu que certaines espèces de *Campylobacter* sont sensibles à quelques antibiotiques la méthode par filtration sur milieu non sélectif (notamment Columbia au sang) est utilisée comme complément (Steele et Mc Dermott, 1984 ; Corry et al., 1985 ; Avril et al. , 2000).

Les enrichissements sont utilisés pour les prélèvements alimentaires et selon certains auteurs ils peuvent même être utilisés pour les prélèvements coprologiques (Steele et Mc Dermott, 1984 ; Corry et al., 1985).

Le tableau N°I.3 résume les conditions de croissance des *Campylobacter* thermotolérants.

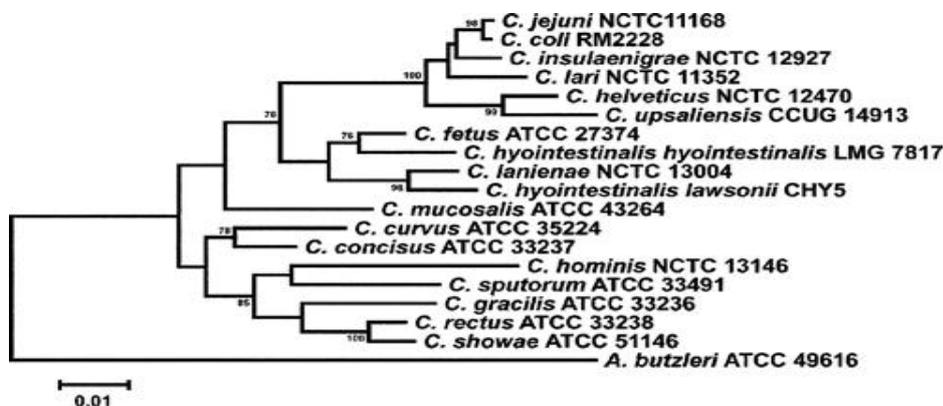
**Tableau I.3 :** Conditions de croissance des *Campylobacter* thermotolérants (Fauchère, 2002 ; Colin, 2006).

Paramètres	Optimum	Inhibition
Température	37 à 41,5 °C	< 30°C ou sup à 48°C
pH	6,5-7,5	<4,7 ou sup à 8,2
O <sub>2</sub>	5-10%	0% ou sup à 15-19%
CO <sub>2</sub>	10%	/
Aw	0,997	< 0,987
NaCl	0,5%	1,5%

### I.3.4. Génome

Le génome des *Campylobacter* est de petite taille (1.6 à 1.7 Mpb), soit environ 80 % de celui de *E coli* avec un GC % de 24 à 46 % .Le génome de *C. jejuni* a été entièrement séquencé (Wren et al., 2001) .

La plupart des souches hébergent des plasmides qui ne sont pas facilement mobilisables en dehors du genre (Fauchère et Avril, 2002). Ces derniers confèrent à ces bactéries une multiple résistance aux antibiotiques (Tee et al., 1995).



**Figure I.4 :** Arbre phylogénétique des espèces du genre *Campylobacter* (www.microbiologybytes.wordpress.com, 2008)

### I.3.5. Les caractères antigéniques

Les antigènes ont été surtout étudiés chez les espèces entéropathogènes.

Les *C. fetus*, *C. jejuni* et *C. coli* ont deux types d'antigènes utilisables comme marqueurs sérotypiques :

Les antigènes protéiques thermolabiles donnent lieu à un système de sérotypage comprenant une centaine de sérovars.

Les antigènes polysaccharidiques (surtout LPS) donnant lieu à un système de sérotypage comprenant une soixantaine de sérovars (Système de Penner) (Fauchère, 2002).

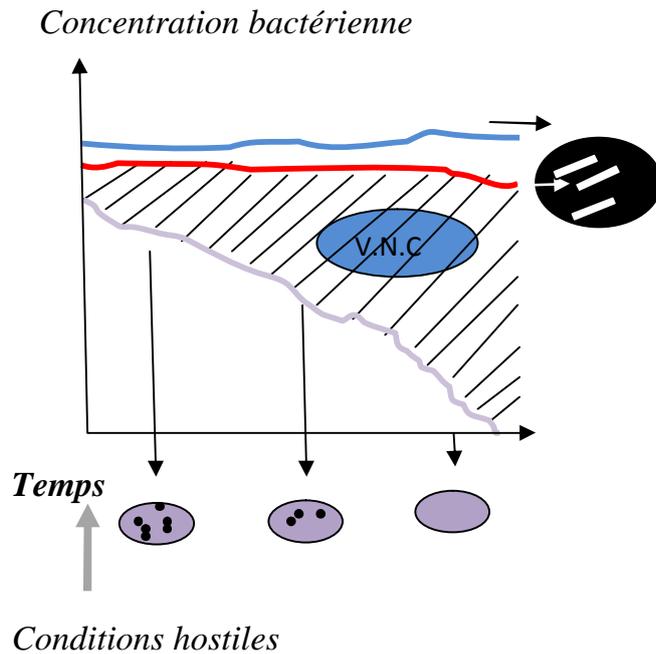
### I.3.6. Viabilité

Dans le milieu extérieur, les conditions de température et d'oxygénation ne sont pas favorables à la survie des *Campylobacter* (Dromigny, 1997). Ces derniers sont incapables de croître en présence d'oxygène (Murphy et al., 2006). Ces germes sont sensibles à la chaleur, à la dessiccation, aux pH acides et au chlore à partir de 3,5% de NaCl. La cuisson les détruit de même que la Pasteurisation. Ils survivent en atmosphère humide à +4°C (21 jours sous vide). La congélation provoque une disparition partielle mais n'assure pas son élimination (survie jusqu'à 85 semaines à 0 18°C) (Pearson et al., 1993)

Les *Campylobacter* ont pu développer divers mécanismes de survie pour résister aux conditions présentes dans le tube digestif des animaux, les aliments et l'environnement. L'un des mécanismes les plus importants est l'état VNC (état viable non cultivable). Ils entrent dans cet état lorsqu'ils sont soumis à des conditions défavorables, les cellules passent alors de la forme spiralée à la forme coccoïde (Murphy et al., 2006). Ce passage fait perdre aux bactéries leur capacité de se multiplier donc de former des colonies sur milieu de culture ; cependant elles restent viables comme l'atteste la persistance d'une activité métabolique mise en évidence par diverses techniques (Cappelier et al., 1994).

Les cellules à l'état VNC échappent à l'investigation microbiologique « traditionnelle », y compris les méthodes incluant une étape de revivification. Elles peuvent redevenir cultivables, donc pathogènes à la faveur d'un passage dans le tube digestif d'un animal à sang chaud (Federighi et al., 2005).

L'état VNC est schématisé sur la figure I.5 (Federighi et al., 2005).



**Figure I.5 :** Schématisation de l'entrée à l'état VNC d'une suspension bactérienne.

- : Dénombrement microscopique total.
- : Dénombrement microscopique des cellules viables
- : Dénombrement des cellules cultivables.

Les *Campylobacter* peuvent aussi augmenter leur capacité de survie dans des extrêmes conditions en formant des biofilms qui les protègent de l'oxygène (Cappelier et al., 1994 ; Murphy et al., 2006).

#### I.4. ETIOLOGIE DE LA CAMPYLOBACTERIOSE

Les espèces du genre *Campylobacter* sont isolées de l'homme et de certains animaux. Certaines sont dotées d'un pouvoir pathogène. Durant les années 90, les *Campylobacter* ont été reconnues comme étant d'importants agents infectieux des infections gastro-intestinales dites également campylobactérioses (Kindhauser, 2003).

## I.4.1. Epidémiologie

### I.4.1.1. Incidence

Les campylobacterioses humaines sont décrites dans le monde entier. Il est aujourd'hui reconnu que la fréquence d'isolements des *Campylobacter* dans les selles diarrhéiques humaines est comparable voire supérieure, à celle des salmonelles (Federighi et al. 2005).

L'incidence exacte ne peut pas être établie, on ne tiendra compte que des cas « réels », c'est-à-dire les personnes infectés et symptomatiques qui auront consulté un médecin et desquels sera identifié le germe. Pour améliorer la surveillance des infections à *Campylobacter*, il est demandé aux laboratoires participant à la surveillance de ces infections de rechercher le *Campylobacter* systématiquement dans les coprocultures (Gallay et al., 2003).

#### ➤ Dans les pays développés :

Les rapports sur les cas de campylobacterioses sont en augmentation constante dans les huit pays mentionnés dans la figure 6 depuis 1993 (Humphrey et al., 2007). Dans plusieurs pays, on ne sait pas encore si l'augmentation constatée est due à un accroissement réel de l'incidence, à l'amélioration du diagnostic, ou à l'un et l'autre à la fois.

La plupart des cas de campylobacterioses signalés se produisent de façon sporadique et sont généralement dues à *Campylobacter jejuni*.

Aux Etats-Unis, les infections à *Campylobacter* confirmées d'origine alimentaire ont été estimées entre 13000 et 18000 par ans (Mégraud, 1994). En 2004, le nombre de cas confirmés était de 12,9 / 100 000 (Murphy et al., 2006).

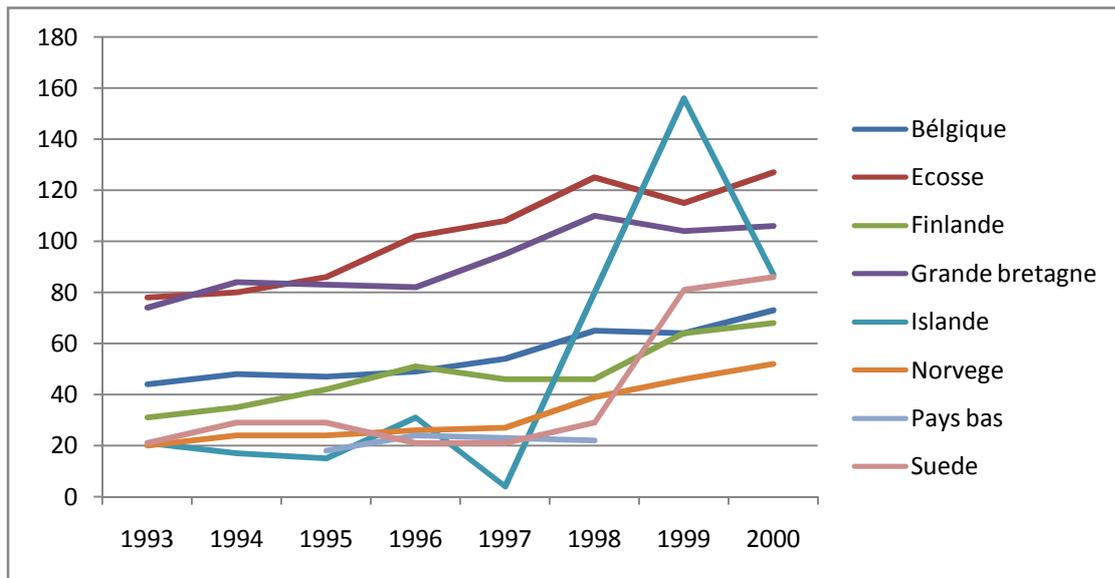
En Grande-Bretagne, pays qui possède sans doute les meilleures statistiques européennes, les *Campylobacter* sont constamment en tête des bactéries isolées dans les infections intestinales avec un nombre d'isolats de 34000 en 1990. En 2003 il était de 73 / 100 000 (Murphy et al., 2006), ... quant aux pays de l'Europe du nord le nombre varie de 60 à 90 /100 000 habitants (Murphy et al., 2006).

La fourchette plausible se situe entre 16000 et 22000 cas d'infections à *Campylobacter* confirmées microbiologiquement par an en France (Gallay et al., 2003).

En 2010, en Europe, le *Campylobacter* a continué à être la cause la plus fréquemment incriminée dans les gastro-entérites chez l'homme. Le nombre de cas signalés confirmés de campylobacterioses humaines a augmenté de 6,7% en 2010 par

rapport à 2009, passant de 45,6 pour 100.000 habitants en 2009 à 48.6 pour 100.000 habitants en 2010. En outre, 266 décès ont été signalés, dus à la campylobactériose (EFSA, 2012).

De 2006 à 2010, une augmentation statistiquement significative de la campylobactériose a été observée pour ces pays : Chypre, Estonie, France, Luxembourg, Malte, Pays-Bas et Pologne. Tandis qu'une tendance à la baisse, statistiquement significative, a été observée en Belgique et en Bulgarie.



**Figure I.6 :** Incidence des campylobactérioses humaines dans 8 pays européens entre 1993 et 2000 (Humphrey et al., 2007).

➤ **Dans les pays en voie de développement :**

Le taux de campylobactérioses est élevé durant la première année de vie de l'individu, suivi d'un portage asymptomatique important. L'incidence peut atteindre 40% durant les premières années de vie, (Garnier, 1985). Ces infections aboutissent parfois au décès (OMS, 2000). La survenue de ces infections chez le nourrisson et de façon répétée finissent par créer une immunité durable (Cabié et al., 1996).

Dans les pays en voie de développement le taux d'infection est plus important pendant la saison humide, à l'inverse dans les pays développés, ces infections sont plus importantes pendant la saison estivale (Cabié et al., 1996).

Pour ce qui est de la situation en Algérie, les études portant sur le *Campylobacter* sont rares et anciennes (Bensid et al., 1988 ; Akitoye et al., 2002). Déjà en 1988 selon l'étude de Bensid et al. sur des coprocultures d'enfants malades, le *Campylobacter* était prédominant par rapport aux salmonelles et shigelles.

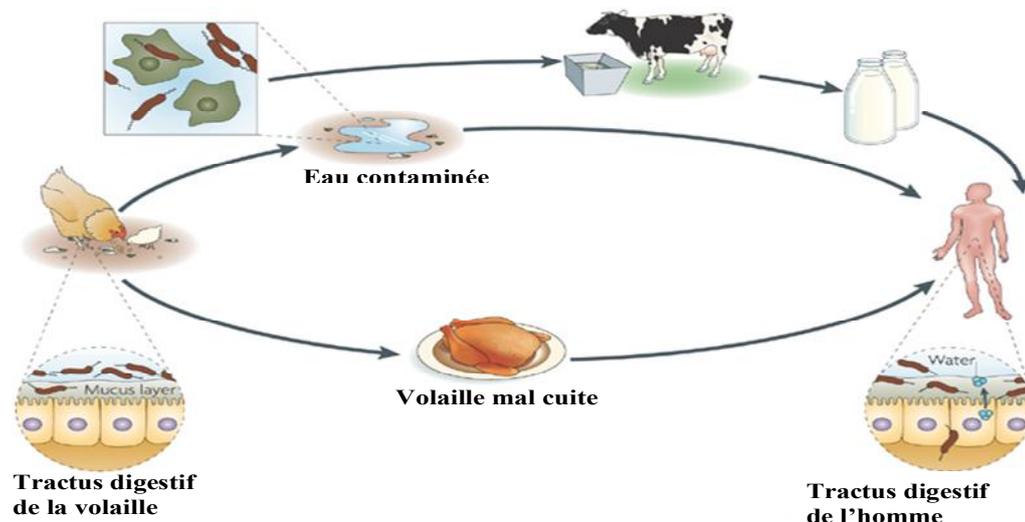
### I.4.1.2. Réservoirs et habitat

Les *Campylobacter* sont largement distribués dans l'environnement. Ils sont retrouvés chez l'homme et les animaux. Ils peuvent se retrouver dans le tube digestif, la cavité buccale et les organes génitaux de l'homme et des animaux. Certaines espèces sont douées d'un pouvoir pathogène important. Celles-ci peuvent toutefois être rencontrées chez des animaux qui interviennent dans la chaîne épidémiologique notamment les animaux d'élevages. Le tube digestif des oiseaux peut être considéré comme le réservoir naturel de *Campylobacter jejuni*, et dans une moindre mesure de *C. coli* (Mégraud, 1994).

Ces bactéries ont un tropisme particulier pour le tube digestif des animaux (Figure I.7) du fait de cette présence asymptomatique dans le tractus digestif des animaux, les déjections peuvent également contaminer les sols et les rivières. Bien que la survie dans cet environnement hydrique soit relativement faible, les eaux de rivières, des étangs et des lacs une fois contaminées peuvent être des réservoirs non négligeables de ces bactéries.

La prévalence des *Campylobacter* est attestée chez les animaux destinés à l'alimentation comme la volaille, les bovins, les moutons, les autruches, ainsi que les crustacés et coquillages et chez les animaux de compagnies, en particulier les chats et les chiens (Inglis et al., 2007).

*Campylobacter coli* est rencontré en général chez le porc, *Campylobacter upsaliensis* chez le chien, *C. lari* chez la mouette (Mégraud, 1994). D'autres réservoirs de *Campylobacter spp* ont été décrits (Tableau I.4).



**Figure I.7 :** Réservoirs et modes de transmission des *Campylobacter* dans l'environnement ([www.microbiologybytes.wordpress.com](http://www.microbiologybytes.wordpress.com))

**Tableau I.4 :** Habitat des différentes espèces de *Campylobacter* (Mégraud, 1994 ; Euzeby, 2007).

<i>Espèce et sous espèce</i>	<i>Hôte préférentiel (non exclusif)</i>	<i>Lieu de portage</i>
<i>C. jejuni ssp. jejuni</i>	Oiseaux	Intestin
<i>C. jejuni ssp. doylei</i>	Homme	
<i>C. coli</i>	Porcins	Intestin
<i>C. lari</i>	Mouette	Intestin
<i>C. upsaliensis</i>	Chien	Intestin
<i>C. fetus ssp. fetus</i>	Bovins, ovins	Intestin
<i>C. fetus ssp. veneralis</i>	Bovins	prépuce
<i>C. hyointestinalis</i>	Porcins	Intestin
<i>C. sputorum ssp. sputorum</i>	Homme	Bouche
<i>C. sputorum ssp. bubulus</i>	Bovins	Prépuce
<i>C. sputorum ssp. faecalis</i>	Ovins	Intestin
<i>C. curvus</i>	Homme	Bouche
<i>C. concisus</i>	Homme	Bouche
<i>C. mucosalis</i>	Porcins	Intestin
<i>C. rectus</i>	Homme	Bouche
<i>C. hominis</i>	Homme	Intestin
<i>C. canadensis</i>	Grues blanches d'Amérique	Intestin

Il existe 3 types de réservoirs pour les *Campylobacter* thermo tolérants :

**Réservoir animal :** le plus important en raison de la fréquence élevée du portage sain chez les animaux d'élevage ou sauvages ( $10^3$  à  $10^7$  cellules /g de fèces).

**Réservoir hydro tellurique :** ce réservoir semble mineur, en effet la charge en germes des boues d'égout non traitées est comprise entre 10 et  $10^3$  cellules /100ml. Celles des eaux de rivières entre 10 et 230 cellules /100ml.

**Réservoir humain :** extrêmement rare dans les pays développés, le portage sain humain se retrouve surtout dans les pays en voie de développement (Eyquem et *al.*, 1998 ; Fauchère, 2002).

#### **I.4.1.3. Source de contamination et mode de transmission**

La campylobacteriose est une zoonose. Cette maladie est transmise à l'homme par les animaux ou les produits contaminés qui en dérivent. Les *Campylobacter* sont rarement pathogènes chez l'animal (OMS, 2000).

Il existe deux grands modes de transmission des *Campylobacter*: transmission directe et transmission indirecte.

##### ➤ **Transmission directe**

Cette transmission se produit par contact direct avec un réservoir. C'est un événement relativement rare touchant principalement les agriculteurs, les vétérinaires et les ouvriers d'abattoirs (Federighi et *al.*, 2005). Des cas de transmission des animaux domestiques vers l'homme ont été signalés. Rares sont les transmissions inter humaines.

##### ➤ **Transmission indirecte**

La transmission indirecte est la principale voie de dissémination (OMS, 2000). Elle se fait par la consommation d'aliments contaminés. C'est le mode observé dans les formes épidémiques et sporadiques de la campylobacteriose. Les principaux aliments incriminés sont la volaille, les viandes et abats rouges de boucherie et le lait cru. A signaler aussi plusieurs cas sporadiques dus à la consommation de coquillages : huîtres et clams (Federighi et *al.*, 2005).

Les épidémies apparaissent à la suite d'une mauvaise cuisson de la volaille ou à la suite de re-contamination après cuisson (contamination croisée). L'eau a été à l'origine des épidémies les plus importantes 2000 à 3000 malades dans le Vermont en 1978, et 2000 en Suède en 1981 (Dromigny, 1997).

Du fait de ces possibilités de transmission; directe ou indirecte de ces bactéries des réservoirs animaux à l'homme, *Campylobacter spp.* doit être considéré comme un agent zoonotique (FAO & OMS, 2002).

#### **I.4.1.4. Facteur de risque de contamination**

Les facteurs de risques de contamination sont :

- Etat physiologique: malnutrition
- Immaturité du système immunitaire (sensibilité du nouveau-né).
- Degré d'exposition aux micro-organismes.
- Produit alimentaire contaminé.
- Contamination croisée.
- Produits alimentaires crus contaminés.
- Consommation d'eau non potable
- Consommation de laits crus ou de produits à base de laits crus

(Forsythe, 2002 ; Megraud et Bultel, 2004).

#### **I.4.2. Physiopathologie**

*C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* et *C. lari* sont tous responsables d'infection digestives chez l'homme. Mais il est généralement admis que *C. jejuni* représente la grande majorité des cas de gastro-entérites provoquées par les *Campylobacter* chez l'homme (Weber, 2003).

La maladie frappe les deux sexes à tout âge et toutes les professions, mais elle a une prédilection pour les adultes débilisés, entre 40 et 70 ans, de sexe masculin (4 hommes pour 1 femme), pour les nourrissons et les femmes enceintes selon Butzler (1978).

##### **I.4.2.1. Pouvoir pathogène**

Les *Campylobacter* thermo tolérants sont la cause majeure d'infections entériques aiguës de gravité variable.

Des études ont été menées chez des sujets volontaires et elles ont permis de montrer que le taux d'infection augmente avec la dose infectieuse (Mégraud, 1994). Cette dose infectieuse peut être très basse de (100 à 500 germes) (Larpen, 1985), déclenchant la maladie expérimentalement ou naturellement (Sutra, 1998), comme elle peut être relativement élevée. Cette variabilité est attribuée à deux facteurs principaux:

➤ **L'hôte :**

En particulier son âge (pics de la maladie chez les 18 à 35 ans et les moins de 4 ans), son sexe (incidence supérieure chez les hommes), son état immunitaire (infection préalable), et son état thérapeutique (traitement divers en cours) (Federighi et al., 2005).

➤ **Le vecteur :**

Le vecteur alimentaire contenant la dose infectieuse de *Campylobacter* semble avoir un effet protecteur, plus ou moins grand, des *Campylobacter* vis-à-vis de l'acidité gastrique.

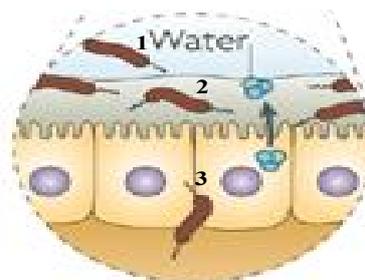
La majorité des expériences ont été réalisées avec le lait, les aliments gras ou simplement l'eau (Cabié et al., 1996; Federighi et al., 2005).

#### **I.4.2.1.1. Colonisation du tube digestif par *Campylobacter***

Le *Campylobacter* a la faculté de se multiplier à l'intérieur du tube digestif comme le montrent les analyses de selles lors de diarrhée, où l'excrétion du germe peut atteindre  $10^6$  à  $10^9$  cellules de *C. jejuni* et *C. coli* par gramme de selles (Federighi et al., 2005).

La colonisation du tube digestif est une faculté commune à de nombreuses bactéries entéropathogènes. Elle s'effectue selon un schéma type (Figure I.8)

- 1- adhésion à la surface.
- 2- pénétration du mucus.
- 3- association aux cellules épithéliales intestinales



#### **1. Figure I.8 : Les étapes de la colonisation du tube digestive par le *Campylobacter* (www.foodpoisoning.com, 2008)**

Pour *Campylobacter*, la colonisation semble facilitée du fait:

- des conditions optimales de développement qu'il trouve dans l'intestin : température élevée (37 °C et 39 °C) et microaérobie.
- des facteurs intrinsèques qui lui procurent un avantage sélectif sur la flore commensale : sa résistance aux sels biliaires, sa morphologie et sa mobilité, son chimiotactisme positif pour le mucus (Federighi, 2005).

#### I.4.2.1.2. Adhésion aux cellules intestinales

La cible privilégiée de *Campylobacter* pour son adhésion semble être la partie distale de l'iléon, mais des colonisations du colon et du jéjunum ont également été décrites.

L'adhésion se fait soit au niveau de la bordure en brosse des entérocytes, soit au niveau des cellules à mucus des cryptes glandulaires.

Cette adhésion est réversible, mobilité dépendante et les adhésines (vraies ou putatives) décrites sont constitutives (Tableau I.5).

**Tableau I.5 :** Tableau récapitulatif des molécules pouvant servir de facteur d'adhésion (Fauchère et al., 1992; Hu et Kopecko, 2000).

Adhésines	Adhésines putatives
CadF ( <i>Campylobacter</i> adhesion to fibronectin )	Pili
PEB1(= CBF1 : <i>Campylobacter</i> binding factor)	Flagelline (Fla A)
	Lipopolysaccharide (LPS)
	Protéines majeures de la membrane externe

De nombreux auteurs émettent l'hypothèse d'un mécanisme d'entéro-invasivité. Cette hypothèse est étayée par les travaux de Konkel et al. (2001) qui mettent en évidence *in vitro* sur des cultures d'entérocytes la translocation de *C. jejuni* à travers (voie transcellulaire) et entre (voie paracellulaire) les cellules épithéliales. Il a été montré une réorganisation du cytosquelette des cellules intestinales (formation des pseudopodes) en réponse, vraisemblablement, à un signal des *C. jejuni* adhérents.

Après pénétration du *Campylobacter* dans les cellules, il peut survivre dans des vacuoles, empêchant la fusion du lysosome-phagosome pour échapper à la phagocytose. Il peut également induire la production de l'interleukine 8 (réaction pro inflammatoire) voir l'apoptose (Konkel et al., 2001).

#### I.4.2.1.3. La production de toxines

Une fois l'internalisation achevée, d'autres déterminants de virulence peuvent se déclarer, notamment la production de toxines ou d'entérotoxines. L'entérotoxine est une protéine de 60 à 70 KD, thermolabile (Véron et Fauchère, 1989), inactivée à 56°C

en 1 heure ou à 96°C en dix minutes. Elle est sensible à la trypsine (Leclerc et Mossel, 1989).

Une entérotoxine semblable à celle de la choléra-toxine n'est pas forcément produite par toutes les souches pathogènes. On distingue deux principaux types d'entérotoxines produites par *Campylobacter*. On citera selon Belbouri et Megraud (1988) :

➤ **Les CDT ( cytolethal distensing toxin )**

Elle peut provoquer la distension des cultures des différentes lignées de cellules intestinales, (CHO, Vero, Hela, Hep2). Cette toxine est codée par trois gènes adjacents *cdt* A B et C. Leurs produits forment une holotoxine impliquée dans l'apoptose, ces gènes sont présents chez pratiquement toutes les souches de *Campylobacter jejuni*.

➤ **Les non CDT**

Ce groupe comprend diverses toxines produites par certaines souches de *Campylobacter jejuni*. Ainsi ont été décrites : les HeLa cell cytotoxin, Hepatotoxin , shiga-like toxin et CLRT (Cyto lethal Rounding toxin). Leur rôle exact dans le phénomène de pathogénicité reste à évaluer précisément.

#### **I.4. 2.2. Symptômes (figure I.9)**

Les symptômes de la campylobacteriose apparaissent en général de deux à cinq jours après l'infection. La période d'incubation est longue, on compte en moyenne de un à dix jours (Garnier, 1985).

D'un point de vue général, les signes cliniques et les symptômes d'infections ne permettent pas un diagnostic différentiel aisé avec les infections digestives provoquées par d'autres entéropathogènes. De plus ils ne s'expriment pas avec la même intensité, ni la même fréquence chez tous les malades, ça va d'un bref épisode de gastro-entérite à une entérocolite sévère durant plusieurs semaines.

Les symptômes cliniques les plus courants des infections à *Campylobacter* comprennent des diarrhées aqueuses ou muqueuses, parfois sanguinolentes, des douleurs abdominales sévères à type de crampes, fièvre, céphalées, nausées, vomissements accompagnés de sensations de malaise, et déshydratation (chez les nourrissons) (Federighi et al., 2005 ; Butzler, 1978). Ces symptômes durent classiquement de trois à six jours. L'issue fatale est rare et ne survient en général que chez de très jeunes ou de vieux patients ainsi que chez les sujets immunodépressifs (OMS, 2000 ; Fauchère, 2002).

Les manifestations cliniques des infections entériques à *Campylobacter* sont identiques quelle que soit l'espèce. Les infections à *C. jejuni* sont habituellement bénignes avec guérison spontanée. Cependant l'infection peut être asymptomatique (25 % des cas) ou au contraire évoluer vers des complications mortelles.

### **I.4.2.3. Pathologie**

Après absorption d'une dose infectante de *Campylobacter*, la survenue des divers symptômes mènent souvent vers le même tableau clinique. Certes la campylobactériose est une infection entérique aiguë de gravité variable, cependant il peut subsister certaines complications. La maladie se prolonge chez environ 20% des malades et peut entraîner la présence de sang, de mucus et de globules blancs dans des selles liquides et nauséabondes, des septicémies, hépatite, pancréatite (Mégraud, 1994 ; Fauchère, 2002).

#### **I.4.2.3.1. Entérites de l'enfant**

On a constaté que *Campylobacter jejuni* altère moins l'état général que *Salmonella spp* et *Shigella spp*, toutefois on a pu décrire des convulsions dans 0,5% des cas. Chez les nouveau-nés et les nourrissons de 2 à 5 mois, ce germe peut entraîner une phase diarrhéique aqueuse de 2 à 4 jours, ainsi que la présence de sang ou de mucus dans les selles (Mégraud, 1994).

#### **I.4.2.3.2. Complications régionales**

Elles sont exceptionnelles, en effet *Campylobacter jejuni* peut parfois atteindre l'appendice lors d'appendicite, et peut aussi se trouver dans le pus de péritonite en cas de perforations intestinales. Il peut également être cultivé à partir du liquide biliaire après une cholécystite. L'atteinte du pancréas reste exceptionnelle (Mégraud, 1994).

#### **I.4.2.3.3. Bactériémies et septicémies**

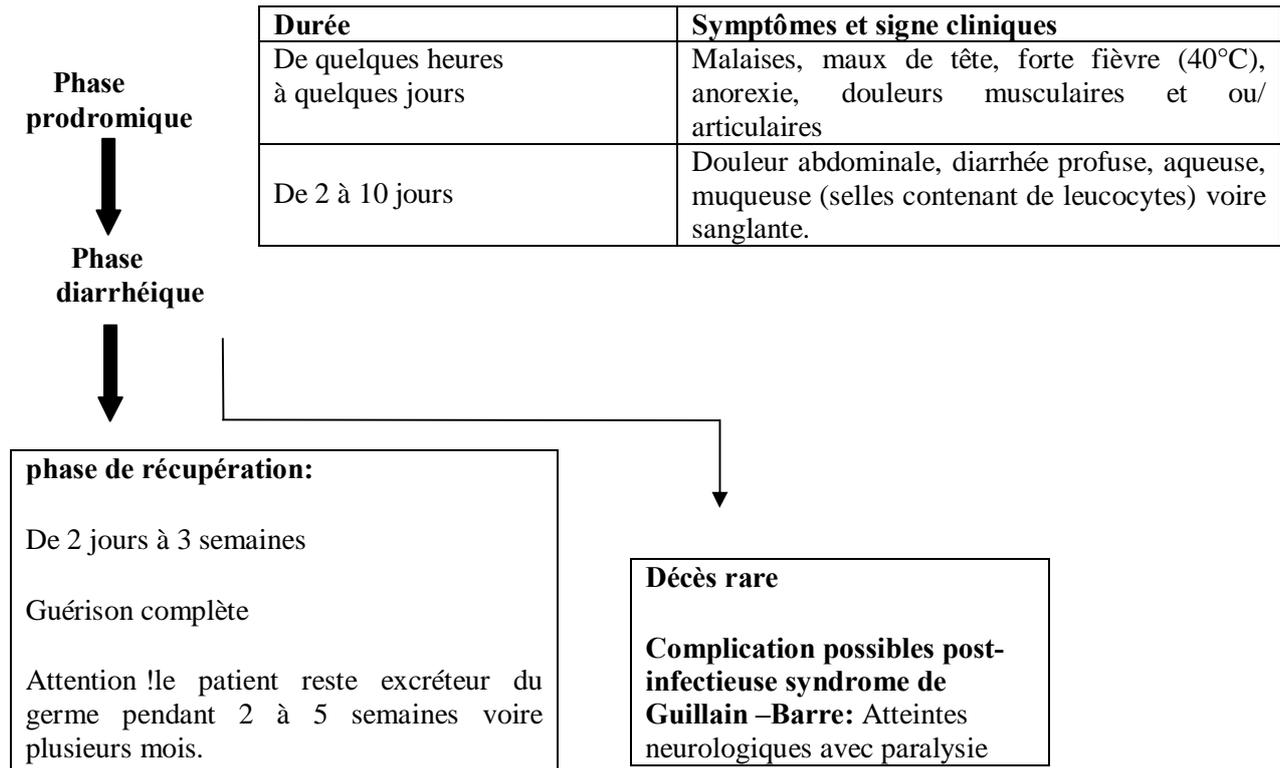
Le germe isolé à partir des hémocultures a été identifié comme *C. fetus intestinalis* et les auteurs considéraient dès lors *C. fetus* comme un agent d'avortement chez la femme. Ce germe rarement isolé des selles est par contre fréquemment retrouvé dans le sang. On l'explique par sa plus forte résistance au pouvoir bactéricide du sérum (Mégraud, 1994 ; Mégraud et Bultel, 2004).

L'expression clinique des septicémies à *Campylobacter* est extrêmement polymorphe. Les formes septicémiques sans métastases sont les plus fréquentes. L'état septicémique peut être associé à une cardiopathie préexistante et les formes méningées surviennent chez les nouveau-nés (Butzler, 1978).

#### **I.4.2.3.4. Complications post infectieuses**

Les complications post-infectieuses peuvent engendrer des arthrites (inflammation douloureuse des articulations pouvant durer plusieurs mois), très rare sont les typhoïdes et les méningites ainsi que les troubles neurologiques. On parle du syndrome de Guillain-Barré, qui est une forme de paralysie de type poliomyélitique pouvant aboutir à des troubles respiratoires et neurologiques graves (convulsions fébriles). Ce dernier se manifeste par une paralysie flasque avec aréflexie et dissociation albumino-cytologique du liquide céphalo-rachidien. Il s'agit d'un mimétisme antigénique entre le ganglioside GM1 présent dans la gaine de myéline et le lipopolysaccharide (LPS) de *Campylobacter jejuni*, plus particulièrement certains sérogroupes, ce qui explique la pathogénie. Ce syndrome est très sévère et représente une cause de décès dans un nombre de cas réduit mais significatif, avec une mortalité de 2 à 3 % et des séquelles neurologiques majeures dans 20% des cas (Mégraud, 1994).

Ce syndrome est considéré comme le résultat d'une réponse immunitaire à une agression le plus souvent virale. Ces dernières années, la responsabilité de diarrhée à *C. jejuni* a été incriminée, en particulier dans certains pays. Sur le plan pathologique, la lésion élémentaire est une démyélinisation segmentaire des fibres périphériques, prédominant au niveau de la partie proximale du système nerveux périphérique, et plus particulièrement au niveau des racines motrices et des nerfs crâniens. Les lésions intéressent souvent les troncs nerveux. Sur le plan clinique, dans sa forme typique, le SGB est caractérisé par l'installation rapide de paralysies touchant habituellement les quatre membres (Saïd et GoulonGoeau, 2002).



**Figure I.9 :** Evolution clinique d'une campylobactériose digestive (Federighi *et al.*, 2005).

#### I.4.2.4. Prophylaxie et traitement

La prophylaxie des infections à *Campylobacter* est celle de toutes les infections intestinales transmises en premier lieu par les aliments. L'aliment à risque le plus évoqué est la viande de volaille. L'idéale serait d'éliminer ces germes en amont de la chaîne alimentaire en désinfectant les élevages et les abattoirs. Cependant, l'essentiel des contaminations surviennent au moment de la préparation des repas. Il conviendrait alors d'observer les règles d'hygiène les plus rigoureuses, notamment le nettoyage des mains et de la paillasse où la volaille a été posée.

Le traitement antibiotique des infections intestinales à *Campylobacter* supprime le portage infectieux, et en cas d'administration précoce il peut également améliorer la symptomatologie (Mégraud, 1994).

Comme pour toutes les diarrhées aiguës infectieuses, le traitement principal est la réhydratation et la rééquilibration électrolytique (Cabié et *al.*, 1996). Les cas d'entérites à *Campylobacter* sans complication septicémique, peuvent guérir sans traitement antimicrobien ; en cas d'autres complications, il semble raisonnable de prescrire une antibiothérapie en cas de fièvre élevée, de diarrhée sanglante ou très abondante (Angulo et Swerclow, 1995) et pour les patients immunodéprimés, notamment infectés par le VIH. Les femmes enceintes doivent recevoir également une antibiothérapie (Allos et Blaser, 1995).

Dans les cas de septicémies à *Campylobacter*, la gentamicine est le traitement de choix mais les tétracyclines, l'érythromycine ainsi que le chloramphénicol ont une bonne activité. L'érythromycine et les fluoroquinolones étaient les antibiotiques de choix pour traiter les entérites (Fauchère et Avril, 2002). Cependant plusieurs résistances surtout vis-à-vis des quinolones sont apparues (Pollet et *al.*, 2012). Pour l'érythromycine le problème de résistance est moins important (King et *al.*, 2010 ; Pollet et *al.*, 2012)

#### **I.4.2.5. Prévention et contrôle**

La prévention et le contrôle des campylobactérioses digestives d'origine alimentaire se fonderont sur :

- le contrôle des sources de contamination (ou de re-contamination) et la décontamination des aliments.
- la détection des *Campylobacter* dans les aliments.

Il faut une bonne connaissance et une bonne application des règles générales d'hygiène, depuis l'élevage jusqu'à la consommation. Ceci doit conduire à diminuer la pression de contamination même pour les denrées à forte prévalence comme la viande de volailles.

Par ailleurs la fragilité relative de *Campylobacter* permet d'envisager son élimination dans les aliments par :

- la simple cuisson, aboutissant en tout point à une température supérieure ou égale à 65°C.
- les techniques usuelles ou innovantes de Pasteurisation.
- La chloration de l'eau.

### Les exemples d'actions de contrôle :

- bonne conception et entretien régulier des réseaux.
- vérifier régulièrement la mise en œuvre et l'efficacité du traitement des eaux.
- respecter les mesures d'hygiène.
- éviter tout contact direct ou indirect entre les viandes de volailles et les autres denrées crues ou cuites (Federighi *et al.*, 2005).

## I.5. ANTIBIOTIQUES ET ANTIBIORESISTANCE

### I.5.1. Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances élaborées par des micro-organismes, ou des substances synthétiques, qui sont bactériostatiques ou bactéricides à faibles doses. Leurs cibles d'action sont des structures moléculaires spécifiquement bactériennes. Elles ont donc une toxicité sélective pour les cellules procaryotes et une toxicité faible pour les cellules eucaryotes (Fauchère et Avril, 2002).

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large.

L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «bactériostatiques» alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits «bactéricides».

L'administration d'antibiotiques bactériostatiques suffit généralement pour arrêter un processus infectieux, le système immunitaire de l'hôte se chargeant d'éliminer les bactéries restantes. Cependant, chez les sujets immunodéprimés, le recours à un antibiotique bactéricide est recommandé (Guinoiseau, 2010).

### I.5.1. Classes des antibiotiques et leur mécanisme d'action

Les principales classes d'antibiotiques ainsi que leur mode d'action sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau I.6 :** Classe des principaux antibiotiques et leur mode d'action (Euzeby, 2007)

<b>Familles ou molécules non classées (Modes d'action)</b>	<b>Principales molécules</b>	<b>Spectre</b>
Aminosides ou aminoglycosides (Inhibition de la synthèse des protéines)	Apramycine (usage vétérinaire) Gentamicine Streptomycine Tobramycine	Large (sauf bactéries anaérobies). Les streptocoques et les <i>Listeria spp.</i> sont peu sensibles.
Bêta-lactamines (Inhibition de la synthèse du peptidoglycane) Penams : aminopénicillines	Amoxicilline Ampicilline et molécules libérant de l'ampicilline <i>in vivo</i> (bacampicilline, pivampicilline, í )	Large mais inactives sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Bêta-lactamines (Inhibition de la ) Clavams ou oxapenam	Acide clavulanique	Inhibiteur des bêta-lactamases (utilisé en association avec une autre bêta-lactamine).
Bêta-lactamines (Inhibition de la synthèse du peptidoglycane) Cephems et oxacephems de 1 <sup>ère</sup> génération	Céfalexine Céfalotine Céfapirine Céfazoline	Large mais inactives sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Diaminopyrimidines (Inhibition de la dihydrofolate réductase)	Baquiloprim (usage vétérinaire) Triméthoprime	Large (sauf les genres <i>Acinetobacter</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Brucella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i> et l'espèce <i>Enterococcus faecalis</i> ).

<p>Imidazolés ou 5-nitroimidazoles (Coupure des brins d'ADN et déroulement de l'ADN)</p>	<p>Métronidazole Ornidazole Secnidazole Tinidazole</p>	<p>Étroit (bactéries anaérobies strictes)</p>
<p>Macrolides (Inhibition de la synthèse des protéines) Se fixent sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S du Ribosome empêchant l'élongation du peptide au cours de la traduction</p>	<p>Azithromycine Clarithromycine Érythromycine Tilmicosine (usage vétérinaire) Tylosine (usage vétérinaire)</p>	<p>Étroit (essentiellement coques à Gram positif, coques à Gram négatif, bacilles à Gram positif)</p>
<p>Nitrofuranes (Inhibition de la synthèse de l'ADN)</p>	<p>Nifuroxazide Nitrofurantoïne Nitrofurazone</p>	<p>Large sauf : <i>Proteus</i>, <i>Serratia</i>, <i>Acinetobacter</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</p>
<p>Phénicolés (Inhibition de la synthèse des protéines)</p>	<p>Chloramphénicol Florfénicol (usage vétérinaire)</p>	<p>Large</p>
<p>Polypeptides (Action sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif et/ou sur la membrane cytoplasmique)</p>	<p>Polymyxine B et colistine</p>	<p>Étroit (bacilles à Gram négatif sauf <i>Proteus</i>, <i>Providencia</i>, <i>Serratia</i>, <i>Bacteroides</i>).</p>
<p>Quinolones de première génération (Inhibition de la synthèse de l'ADN par blocage de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV)</p>	<p>Acide nalidixique Acide oxolinique Acide pipémidique Acide piromidique Fluméquine</p>	<p>Étroit (bacilles à Gram négatif)</p>

<p>Fluoroquinolones, Nouvelles quinolones (Inhibition de la synthèse de l'ADN par blocage de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV)</p>	<p>Ciprofloxacin Danofloxacin (usage vétérinaire) Difloxacin (usage vétérinaire) Enrofloxacin (usage vétérinaire) Levofloxacin</p>	<p>Large</p>
<p>Sulfamides (Blocage de la synthèse de l'acide dihydrofolique par inhibition compétitive de la dihydroptéroate synthétase)</p>	<p>Sulfadiazine Sulfadimérazine Sulfadiméthoxine Sulfaméthoxazole</p>	<p>Large sauf certains entérocoques et les lactobacilles</p>
<p>Tétracyclines (Inhibition de la synthèse des protéines) Bloquent la traduction en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome</p>	<p>Doxycycline Minocycline Tétracycline</p>	<p>Large</p>

### I.5.3. La résistance aux antibiotiques

Une espèce bactérienne peut être résistante à un antibiotique, du fait de sa structure cellulaire ou de son métabolisme. On parle alors de résistance naturelle, intrinsèque ou constitutionnelle et la souche est qualifiée de sauvage car non modifiée.

Chez les *Campylobacter*, il existe une résistance intrinsèque pour : bacitracine, novobiocine, glycopeptides, triméthoprine et sulfaméthoxazole (Mégraud, 1994), l'amphtéricine B et la vancomycine (Vargues et Georges, 1982).

Les espèces de *Campylobacter* sont des bactéries naturellement sensibles à de nombreux antibiotiques (Macrolides, Aminosides et Quinolones)

Une bactérie sensible peut acquérir des moyens nouveaux pour résister à l'action de tel ou tel antibiotique, par mutation ou par transfert de gènes. On parle alors de résistances acquises (Fauchère et Avril, 2002).

Certaines espèces sont néanmoins naturellement résistantes aux Céphalosporines ou aux Quinolones de première génération. Ces résistances sont par exemple utilisées comme marqueurs taxonomiques pour différencier l'espèce *C. fetus* (habituellement résistante à l'acide Nalidixique et sensible à Céfalotine) de l'espèce *jejuni* (habituellement sensible à l'acide Nalidixique et résistante à la Céfalotine).

Des résistances acquises sont apparues ces dernières années, principalement du fait de l'utilisation d'antibiotiques chez les animaux d'élevage (Kindhauser, 2003).

On peut classer les mécanismes d'antibiorésistance chez les *Campylobacter* thermotolérants selon :

#### I.5.3.1. Inactivation de l'antibiotique

C'est l'un des mécanismes le plus souvent mis en cause, impliquant des enzymes d'origine chromosomiques (Lawson et al., 1999) :

- L'élaboration des  $\beta$ -lactamases : qui inactivent les  $\beta$ -lactamines par ouverture de noyau  $\beta$ -lactame (les *Campylobacter* résistent aux  $\beta$ -lactamines aussi par diminution de la perméabilité).
- La résistance aux aminosides : Des enzymes élaborées par les *Campylobacter* modifient des groupements propres à eux sur l'antibiotique, donnant ainsi différents profils de résistance. Les différentes enzymes sont d'origines chromosomiques et parfois elles

peuvent être plasmidiques (Lawson et *al.*, 1999) (Moore et *al.*, 2005), (Singleton, 2005).

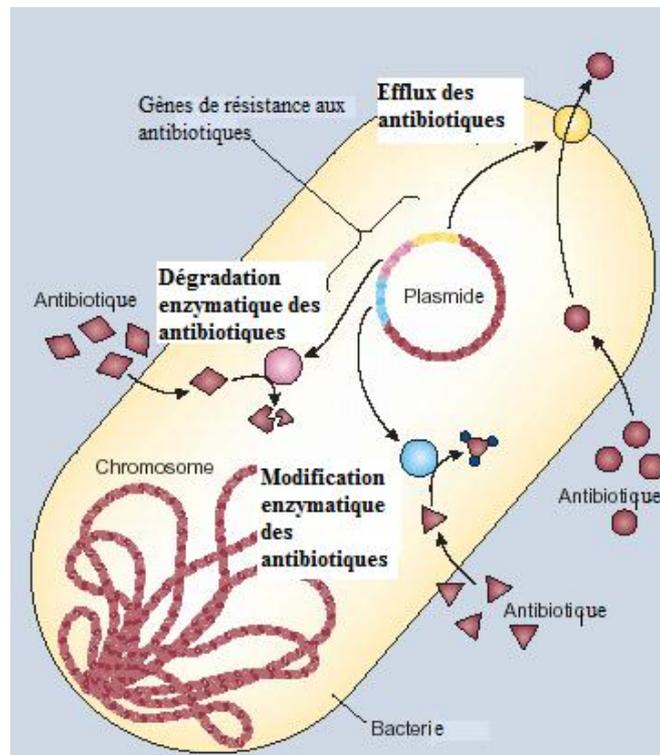
### I.5.3.2. Modification de la cible

- La modification des topo isomérases par des mutations au niveau des gènes de la gyrase entraîne la résistance aux Quinolones. La mutation la plus rencontrée est Thr-86-Ile.
- La modification du ribosome s'effectue au niveau de l'ARN ribosomiale 23S (par mutation du locus correspondant) entraînant ainsi la résistance aux Macrolides. Les mutations les plus rencontrées sont A2075G et A2074C.

Toutes ces mutations sont localisées au niveau des gènes chromosomiques (Lawson et *al.*, 1999 ; Moore et *al.*, 2005 ; Singleton, 2005).

### I.5.3.3. Excrétion de l'antibiotique par mécanisme d'efflux

Cette résistance est due le plus souvent à l'acquisition d'un gène plasmidique responsable de l'apparition de ce mécanisme. Ce dernier entraîne la résistance à la tétracycline (Lawson et *al.*, 1999).



**Figure I.10 :** L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance (Levy et Marshall, 2004)

## **I.6.METHODES DE BIOLOGIES MOLECULAIRES**

Diverses méthodes de biologie moléculaires sont utilisées pour l'identification des souches, pour l'étude des résistances dues à des mutations ou autres, pour la comparaison de souches de différentes origines

Nous pouvons citer : la PCR (Polymerase chain Reaction), la RAPD, la PFGE, le séquençage

### **I.6.1.La PCR classique ou standard (Moulessehoul, 2004)**

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'obtenir par réplification in vitro de multiples copies d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait.

Le mélange réactionnel dans lequel elle est réalisée comprend l'extrait d'ADN, la Taq polymérase, les amorces et les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon. Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température réitérés plusieurs dizaines de fois dans un thermocycleur. L'appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température. Chaque cycle comprend trois périodes de quelques dizaines de secondes.

Ces trois périodes sont :

#### **1° Dénaturation de l'ADN :**

Cette partie s'effectue à une température aux alentours de 94°C. Vu que les liaisons hydrogène ne peuvent pas se maintenir à une température supérieure à 80°C, les ADN double-brin se dénaturent en ADN simple-brin (ADN monocaténares).

#### **2° Hybridation :**

Cette période s'effectue à une température généralement comprise entre 40 et 70°C. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider.

#### **3° Elongation :**

Cette période s'effectue généralement à une température de 72°C, dite température d'élongation. À 72°C, l'enzyme Taq polymérase se lie aux ADN monocaténares amorcés et catalyse la répllication en utilisant les désoxyribonucléosides triphosphates présents dans le mélange réactionnel. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées.

Au cycle suivant, les fragments synthétisés au cycle précédent servent à leur tour de matrice et au bout de quelques cycles, l'espèce prédominante correspond à la séquence d'ADN comprise entre les régions où les amorces s'hybrident. Il faut compter 20 à 40 cycles pour synthétiser une quantité analysable d'ADN (environ 0,1 microgramme). Chaque cycle voit théoriquement doubler la quantité d'ADN présente au cours du cycle précédent.

### **Révélation sur gel d'agarose (0,5 à 3%)**

La détection et l'analyse des produits peuvent être très rapidement réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose (ou d'acrylamide). L'ADN est révélé par une coloration au bromure d'éthidium. Ainsi, les produits sont visibles instantanément par transillumination aux ultraviolets.

Plus le fragment d'ADN est petit plus le pourcentage d'agarose dans le gel doit être élevé pour éviter que les petits fragments d'ADN n'avancent rapidement et se perdent dans le gel. Et plus le fragment d'ADN est grand plus le pourcentage d'agarose est faible pour permettre à ces fragments lourds de se déplacer.

Pour pouvoir lire et interpréter les migrations, un marqueur moléculaire est utilisé. Le choix de 1Kb ou le 100pb se fait selon la taille du réplicon.

### **I.6.2. La PCR en temps réel (Poitras et Houde, 2002 ; Ameziane et al., 2006)**

Le principe de la PCR en temps réel est le même que celui de la PCR standard, avec pour différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale.

Plusieurs systèmes de détection sont utilisés pour la détection ou la quantification du signal fluorescent en temps réel. Ils sont divisés en 2 groupes : les agents intercalants et les sondes.

Le bromure d'éthidium a toujours été utilisé comme agent intercalant, c'est-à-dire une molécule capable de s'insérer entre les bases appariées d'un acide nucléique mais actuellement, l'agent intercalant le plus utilisé est le SYBR®Green ou syber safe, plus sensible et moins toxique que le bromure d'éthidium.

Pour les sondes, il existe 4 technologies: Taqman ou hydrolyse de sondes, HybProbes (FRET) ou hybridation de 2 sondes, Molecular Beacons ou balises moléculaires et Scorpion ou amorces scorpion. Nous citerons à titre d'exemple la technologie FRET (figure I.11).

Dans ce système, on utilise 2 sondes dont l'une est porteuse en 3' d'un fluorochrome émetteur et l'autre en 5' d'un fluorochrome accepteur. Les sondes sont choisies de façon à se hybridier à leurs séquences cibles en n'étant séparées que de 1 à 5 bases. Lorsque les deux sondes sont séparées, le fluorochrome donneur n'émet qu'un bruit de fond de fluorescence alors que lorsqu'elles sont hybridées à moins de 10 nucléotides de distances, la proximité des 2 fluorochromes permet le transfert de l'énergie du fluorochrome donneur vers le fluorochrome accepteur provoquant l'émission fluorescente de ce dernier (FRET : fluorescent resonance energy transfer). On mesure alors l'acquisition de la fluorescence, proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée, au moment de l'hybridation. Les sondes restant intactes (contrairement aux sondes Taqman qui sont hydrolysées), il est possible de réaliser une courbe de fusion en fin de réaction (figure I.12).

Les sondes FRET sont d'une excellente sensibilité et sont dotées d'une grande capacité de multiplexage mais leur prix est élevé et la présence de mutations non identifiées peut déstabiliser leur hybridation et donc l'interprétation de la réaction.

Dans ce système, la spécificité de la réaction ne repose que sur la spécificité des amorces, sans contrôle de la taille des amplicons. Pour vérifier qu'un seul produit PCR a été amplifié, on réalise une courbe de fusion en fin de réaction.

La technique utilisant le Sybr Green ne nécessite aucune expertise, est économique et facile. L'inconvénient principal de cette technique est l'absence totale de spécificité de la fluorescence mesurée.

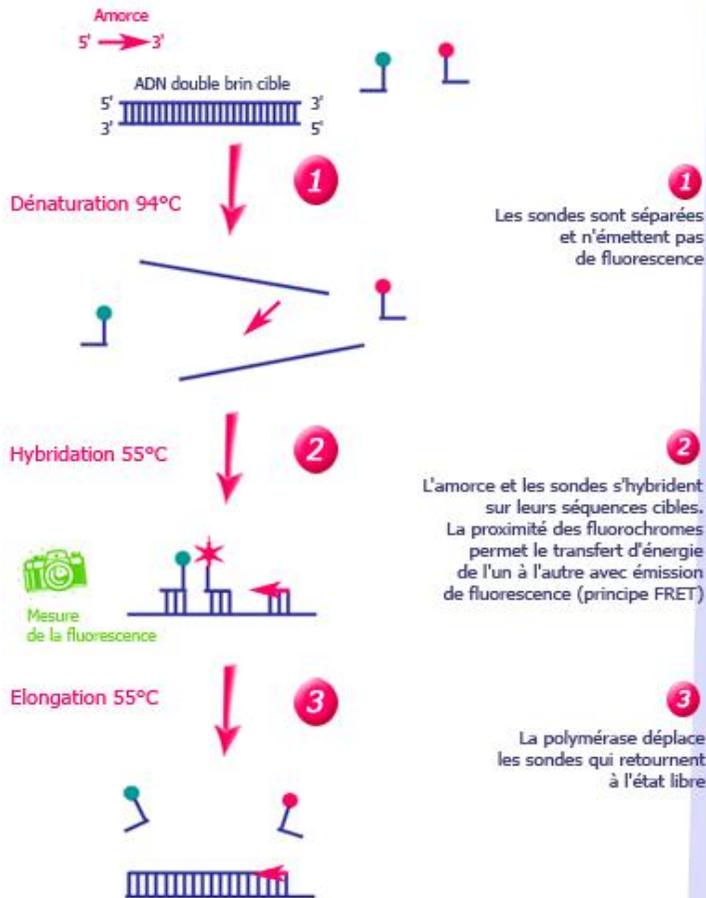
La courbe de fusion permet de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié. Elle est réalisée en soumettant les amplicons à une température progressant de 55°C à 95°C par palier de 0,5°C et en mesurant l'intensité de fluorescence en continu. Elle correspond à la variation de la fluorescence en fonction de la température.

La température de fusion des amplicons appelée  $T_m$  (melting temperature) est représentée par un pic unique sur la dérivée primaire de cette courbe.

Si l'on obtient plusieurs pics à des températures différentes ou des pics décalés par rapport au  $T_m$  attendu, c'est que l'on est en présence d'un mélange d'amplicons ou d'amplicons ayant une séquence différente. Il est recommandé en cas de doute de procéder à une électrophorèse du produit PCR obtenu pour vérifier la présence et la taille des amplicons.

Les méthodes de biologie moléculaires pour l'identification des *Campylobacter* ou pour l'étude de l'antibiorésistance, ont été développées depuis près de 30 ans. Nous pouvons citer les travaux de Tenover et *al.* (1985), Gonzales et *al.* (1997), Inglis et Kalischuk (2003), Lucey et *al.* (2004), Keramas et *al.* (2004)

FRET



Courbe de fusion (FRET)

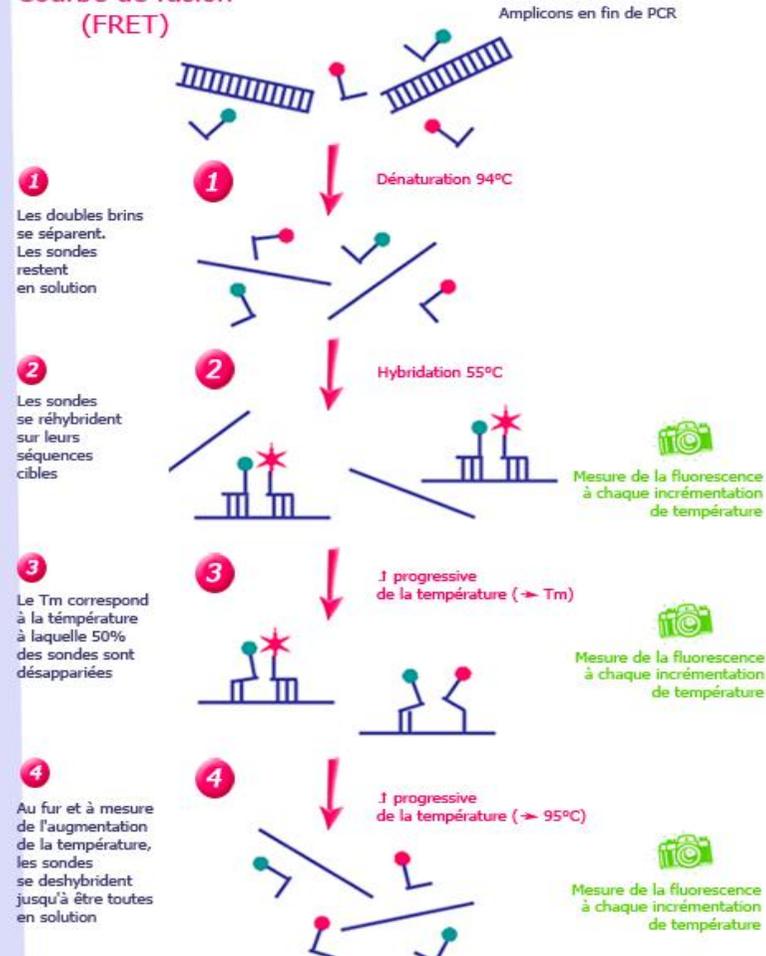


Figure I.11 : Principe de la technologie FRET

[www.ilm.pf/files/u1/CourbefusionFret4.jpg](http://www.ilm.pf/files/u1/CourbefusionFret4.jpg)

Figure I.12: les différentes étapes de mesure de la fluorescence pour la courbe de fusion FRET

[www.ilm.pf/PCRtempsreel#courbefusion](http://www.ilm.pf/PCRtempsreel#courbefusion)

Le tableau suivant montre les différences qui existent entre les différentes PCR (standard et en temps réel).

**Tableau I.7 :** Différences entre la PCR classique et les PCR en temps réel (Poitras et Houde, 2002 ; Ameziane et *al.*, 2006)

	PCR classique	PCR temps réel				
		SybrGreen	Taqman	FRET	Molecular Beacons	Scorpions
Principe	Amplification cyclique d'un fragment d'ADN basée sur une réaction enzymatique					
Détection	Finale	A chaque élongation		A chaque hybridation		
Spécificité	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Amorces</li> <li>* Taille des amplicons</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Amorces</li> <li>* Tm des amplicons</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Amorces</li> <li>* Sondes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Amorces</li> <li>* Sondes</li> <li>* Tm des amplicons</li> </ul>		
Rapidité	1 à 2 H sans la révélation	30 à 60 mn		1H30 à 2 H		30 à 60 mn
Reproductibilité	Bonne	Excellente				
Quantification	Non	Oui				
Avantages		<ul style="list-style-type: none"> <li>* Insensible aux mésappariements</li> <li>* Economique</li> <li>* Facile</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Sensibilité élevée</li> <li>* Grande spécificité</li> <li>* Rapide</li> <li>* Multiplexage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Excellente sensibilité</li> <li>* Grande capacité de multiplexage</li> </ul>	Grande spécificité	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Rapidité supérieure</li> <li>* Grande sensibilité</li> <li>* Grande spécificité</li> <li>* Efficacité supérieure</li> <li>* Augmentation de l'intensité du signal fluorescent</li> </ul>
Inconvénients	Risque élevé de contaminations	Pas de spécificité de la fluorescence	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Hydrolyse des sondes</li> <li>* Manque d'efficacité et de flexibilité pour certaines mutations</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Prix élevé</li> <li>* Pas de reconnaissance des mutations avec le même Tm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Conception délicate</li> <li>* Prix très élevé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Conception délicate</li> <li>* Prix très élevé</li> </ul>
Applications	Détection de produits amplifiés	Détection et quantification de produits amplifiés	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Mutations ponctuelles</li> <li>* Polymorphismes bi-alléliques</li> <li>* Quantification des gènes et d'agents pathogènes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Génotypage</li> <li>* Mutations ponctuelles</li> <li>* Etude des allèles</li> <li>* Détection et quantification d'agents pathogènes</li> <li>* Quantification de l'expression des gènes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Mutations ponctuelles ou polymorphismes bi-alléliques à grande échelle</li> <li>* Quantification d'acide nucléique ou d'agents pathogènes</li> </ul>	

### I.6.3. Le séquençage

La définition donnée par Peltier (2012) pour le séquençage est que c'est un procédé utilisé pour déterminer l'ordre (la séquence) des acides aminés d'une protéine ou des bases dans les acides nucléiques (ADN et ARN).

Les différentes étapes du séquençage sont représentées dans la figure I.13.

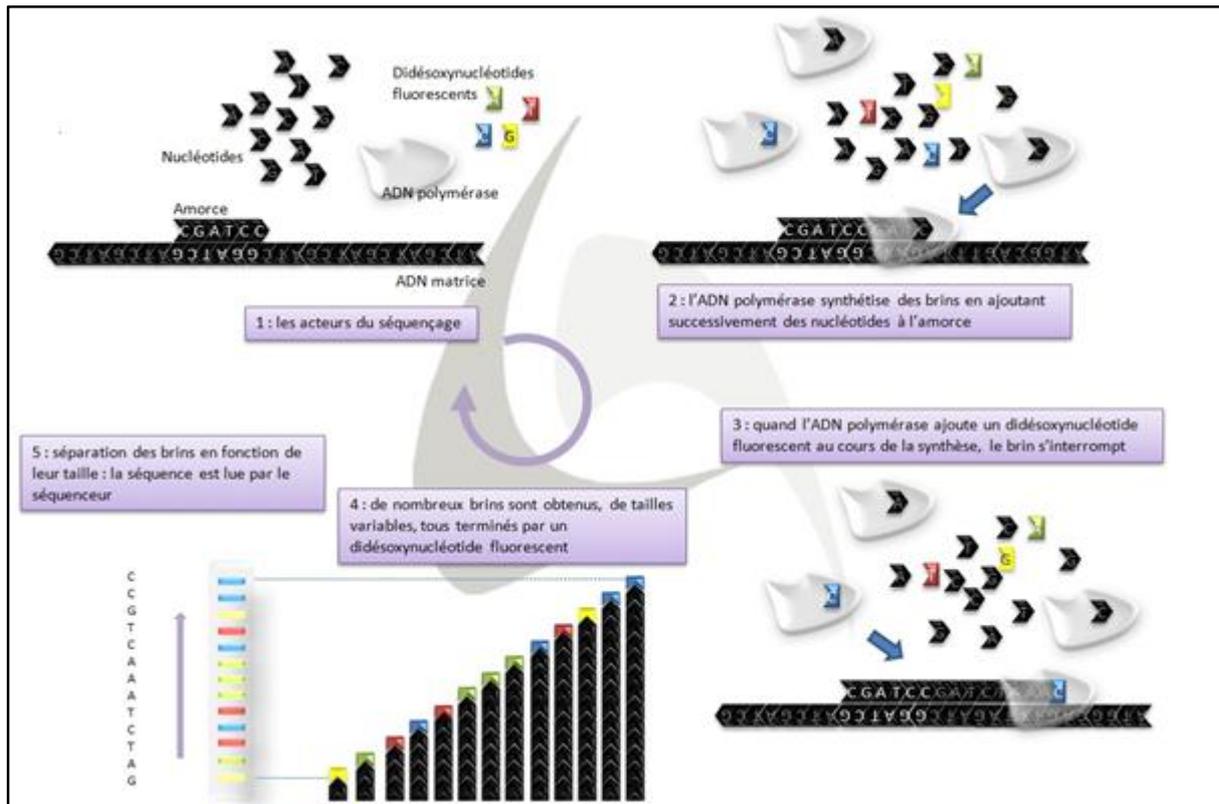


Figure I.13 : Etapes du séquençage (Peltier, 2012)

Après la réalisation d'un séquençage nous pouvons, entre autres, repérer s'il y a présence de mutation(s) ou pas au niveau de l'ADN de notre souche.

Une mutation est le passage d'un organisme d'un état héréditaire à un autre. Les généticiens considèrent deux niveaux différents de mutations. La mutation génique et la mutation chromosomique (Griffiths et al., 2002).

Nous pouvons citer quelques types de mutations (Griffiths et *al.*, 2002):

- Mutations directes : substitution d'une seule paire de nucléotides
  - ✓ au niveau de l'ADN (transition, transversion)
  - ✓ au niveau protéique
    - (mutation silencieuse ou muette : le triplet code le même acide aminé)
    - mutation synonyme : le codon spécifie un acide aminé fonctionnellement équivalent
    - mutation faux-sens
    - mutation non-sens
- Réversions (vraie ou équivalente)

Donc les mutations peuvent induire, ou non, des modifications phénotypiques. Une des modifications les plus importantes est l'acquisition d'une résistance à un antibiotique.

La résistance aux fluoroquinolones chez les *Campylobacter* est principalement causée par des mutations chromosomiques dans la région QRDR du gène codant pour la sous-unité gyrA de l'ADN gyrase. Il existe plusieurs modifications unique de GyrA signalés à être associé à la résistance aux fluoroquinolones chez les espèces de *Campylobacter*: Thr86Ile, Asp90Asn, Thr86Lys, Thr86Ala, Thr86Val et Asp90Tyr. Thr86Ile a été la mutation la plus fréquemment trouvée (Lehtopolku, 2011).

La résistance aux macrolides peut être due, quant à elle, à une mutation ponctuelle dans le gène de l'ARNr 23S. Des mutations au niveau des positions 2074 ou 2075 (correspondant aux positions 2058 et 2059 chez *E. coli*) du gène de l'ARNr 23S sont la cause d'un haut niveau de résistance aux macrolides (Gibreel et *al.*, 2005 ; Vacher et *al.*, 2003). Les espèces de *Campylobacter* contiennent trois copies de ce gène ARNr 23S, et les mutations peuvent être soit homozygotes (les trois allèles mutés) soit hétérozygotes (un ou deux des allèles mutés) (Gibreel et Taylor, 2006). Cependant il n'y a pas de rapports de souches de *Campylobacter* résistantes aux macrolides ne contenant qu'un seul allèle muté (Gibreel et *al.* 2005 ; Ladely et *al.*, 2009).

## **I.7. LES HUILES ESSENTIELLES COMME ALTERNATIVE A L'ANTIBIORESISTANCE**

Vue la montée croissante des résistances bactériennes aux antibiotiques, des chercheurs se sont penchés sur la question afin de trouver de substituts d'antibiotiques pour parer aux problèmes de résistance.

Plusieurs voies ont été testées : les bactériophages (Brussow, 2005), les peptides antimicrobiens (Brogdenet *al.*, 2003), les plantes (Gibbons, 2008) et les huiles essentielles (Nakamura, 1999 ; Burt, 2007).

La médecine dite alternative qui prône le soin naturel connaît un essor de plus en plus grandissant. L'intérêt pour les plantes médicinales, qui a reculé pendant une longue période devant le développement du génie chimique et de l'industrie de synthèse, revient en force dans le domaine de la recherche et prouve l'efficacité des plantes et des huiles essentielles (HE) (Zhiri et *al.*, 2010).

### **I.7.1. Définition d'une huile essentielle**

La définition adoptée par la Commission de la Pharmacopée Européenne pour une huile essentielle serait un :

« Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. » (AFSSAPS, 2008).

Les huiles essentielles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits, mais également à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres. L'hydro distillation et la distillation par la vapeur sont des moyens utilisés pour produire les huiles essentielles, en particulier à des fins commerciales (Burt, 2004 ; Rattanachaikunsopon et Phumkhachorn, 2010).

### I.7.2. Composition chimique des huiles essentielles (tableau I.8)

La composition de nombreuses huiles essentielles a été décrite dans la littérature. Elle varie en fonction de différents facteurs, incluant le type de plante, le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (Burt, 2004).

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique. Le plus souvent l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant, certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des propriétés bactéricides. Le thymol, le carvacrol, des composants actifs d'huiles essentielles, rendent perméable la membrane des bactéries, un effet précurseur de leur mort. Les huiles essentielles ont donc bien des propriétés bactéricides. L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (Nutra News, 2006).

Les composés avec la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre sont des phénols : thymol, carvacrol et eugénol. Les phénols entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leur localisation. Le thymol et l'eugénol sont responsables des activités fongicides et bactéricides des huiles essentielles qui en contiennent. La molécule de thymol exerce un effet inhibiteur et létal sur différentes souches et, parmi elles, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium. Par contre, elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa*. (Nutra News, 2006).

Les alcools avec 10 atomes de carbone (ou monoterpénols) viennent immédiatement après les phénols, en terme d'activité, avec le géraniol, linalool, thujanol, myrcénol, terpinéol, menthol et pipéritol pour les plus connus. Molécules à large spectre, elles sont utiles dans de nombreuses infections bactériennes. Les aldéhydes sont également quelque peu bactéricides. Les plus couramment utilisés sont le néral et le géraniol (des citrals), le citronnellol et le cuminal (Nutra News, 2006).

**Tableau I.8** : Les principaux constituants des huiles essentielles (HEs) à activité antibactérienne (Burt, 2004)

Nom commun des plantes	Nom latin des plantes	Composés majoritaires des HEs	Composition (%)
coriandre	<i>Coriandrum sativum</i> (feuilles immatures)	linalol (E)-2-décanal	26% 20%
	<i>Coriandrum sativum</i> (graines)	linalol	70%
origan	<i>Origanum vulgare</i>	carvacrol thymol -terpinène <i>p</i> -cymène	traces à 80% traces à 64% 2 à 52% traces à 52%
romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	-pinène acétate de bornyle camphre 1,8-cinéole	2 à 25% 0 à 17% 2 à 14% 3 à 89%
clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	eugénol acétate d'eugényle	75 à 85% 8 à 15%
thym	<i>Thymus officinalis</i>	thymol carvacrol -terpinène <i>p</i> -cymène	10 à 64% 2 à 11% 2 à 31% 10 56%

### I.7.3. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont utilisées pour leurs bienfaits. Nous pouvons citer par exemple leurs effets antiseptiques, anti-infectieux voire antibiotiques, leurs effets sur les réponses inflammatoire et immunologique (anti-inflammatoires, antihistaminiques) ; leurs effets sur l'activité neurologique : analgésiques, calmants, anxiolytiques, sédatifs, antispasmodiques, etcí

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est connue de façon empirique depuis l'antiquité. Dès 1885, des études expérimentales ont été entreprises en France. Des médecins et des pharmaciens ont réalisé de nombreuses études in vitro et ont obtenus des résultats concluants. Dans son livre Antiseptiques essentiels publié en 1938, René-Maurice Gattefossé, le père de l'aromathérapie, décrit déjà la considérable avancée de la recherche dans ce domaine. Depuis, de nombreux travaux,

essentiellement de laboratoire, sont venus renforcer ces résultats, expliquer les modes d'actions de certains de leurs composants. (Ramanoelina et *al.*, 1987 ; Bassole et *al.*, 2001 ; Nutra News, 2006 ; Sibanda et Okoh, 2007)

Pour l'activité antibactérienne, les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positives que sur les bactéries à Gram négatives. Toutefois, les bactéries à Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004). Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries Gram négatives *Aeromonas hydrophila* (Wan et *al.*, 1998) et *Campylobacter jejuni* (Wannissorn et *al.*, 2005) ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles.

L'utilisation d'une association de composés isolés d'HE est une nouvelle approche pour augmenter l'efficacité des HE dans les aliments en utilisant entre autre leurs effets de synergie (Bassolé et Juliani, 2012). Lors de leur étude, Bassolé et Juliani (2012) ont testé plusieurs associations. Certaines ont montré un effet de synergie et d'autres un effet antagoniste.

Notre travail a été réalisé aux laboratoires de bactériologie alimentaire et eaux et entérobactéries-vibrions de l'Institut Pasteur d'Algérie et au Centre National de Référence des *Campylobacter* (CNRC) à Bordeaux (France).

Nous avons divisé notre étude en trois parties.

La première partie du travail a consisté à isoler un maximum de souches de *Campylobacter* à partir divers prélèvements. Les prélèvements étaient de trois types. Des prélèvements d'origine animale, alimentaire et humaine (coprocultures). Ces souches ont été identifiées biochimiquement et leurs résistances aux antibiotiques ont été étudiées.

Durant la deuxième partie, nous avons extrait l'ADN des certaines souches multi résistantes, que nous avons caractérisé au CNRC. Nous avons confirmé l'identification des souches par PCR d'une part, et nous avons réalisé un séquençage pour étudier les gènes résistants à deux familles d'antibiotiques d'autre part.

La troisième partie a consisté en une étude de la sensibilité de quelques souches de *Campylobacter* à certaines huiles essentielles en vue d'une éventuelle utilisation de ces dernières comme substitut des antibiotiques.

## **II.1. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION**

### **II.1.1. Matériel biologique**

Le matériel biologique utilisé lors de ce travail est diversifié suivant les différentes parties étudiées :

- Des poussins/poules de 2, 10, 14, 19, 23 et 40 jours, ainsi que leurs fientes.
- Des poulets de rôtisseries.
- Des abats et parties de poulets crus.
- Des selles humaines.

### **II.1.2. Isolements**

#### **II.1.2.1. Milieux de culture**

Tous les milieux utilisés dans cette étude sont préparés au sein même de l'IPA au niveau du service « milieux de culture ». Les bouillons Preston et Cary Blair modifié, le sang de mouton ou de cheval défibrinés ainsi que les additifs des milieux de culture, une fois réceptionnés, sont immédiatement mis dans la chambre froide à +4°C. Quant aux géloses Columbia et autres milieux gélosés et milieux d'identification ils sont stockés à température ambiante.

La préparation des milieux est la même pour les trois types de prélèvements (animaux, aliments et selles) :

L'enrichissement a été effectué en milieu Preston.

Ce dernier est obtenu par addition de 10% de sang stérile de mouton ou de cheval et d'un certain volume du réactif de Butzler à un flacon de 225 du milieu Preston.

La gélose Columbia est un milieu très nutritif permettant la culture et l'isolement d'une grande variété de microorganismes et plus particulièrement des germes très exigeants, à partir de divers prélèvements. Par addition de sang, d'agents sélectifs ou d'accélérateurs de croissance, il est possible de préparer une grande diversité de milieux adaptés à des utilisations spécifiques. Ce milieu est utilisé comme gélose de base pour la préparation de tous les milieux de culture utilisés pour la recherche de *Campylobacter*.

Le milieu Columbia au sang est obtenu par addition de 10% de sang stérile et défibriné de mouton ou de cheval à 225 ml de gélose Columbia préalablement fondue au bain Marie et refroidie à 45°C. La gélose est coulée dans des boîtes de Pétri, puis laissée se solidifier.

Pour les autres milieux (Butzler (B), Skirrow(S) et *Campylobacter* Growth Supplement (CG)) ils sont préparés de la même manière avec l'additif adéquat.

Pour l'enquête réalisée au niveau des rôtisseries, pour pouvoir apprécier la qualité microbiologique des prélèvements réalisés, nous avons recherché d'autres germes en plus des *Campylobacter*, et pour cela nous avons utilisé les milieux gélose nutritive, gélose Chapman et gélose hektoène.

La composition des principaux milieux utilisés se trouve en annexe n°1.

## II.1.2.2. Prélèvements

### II.1.2.2.1. Répartition des prélèvements effectués

La première partie de notre travail est elle-même subdivisée en 3 parties :

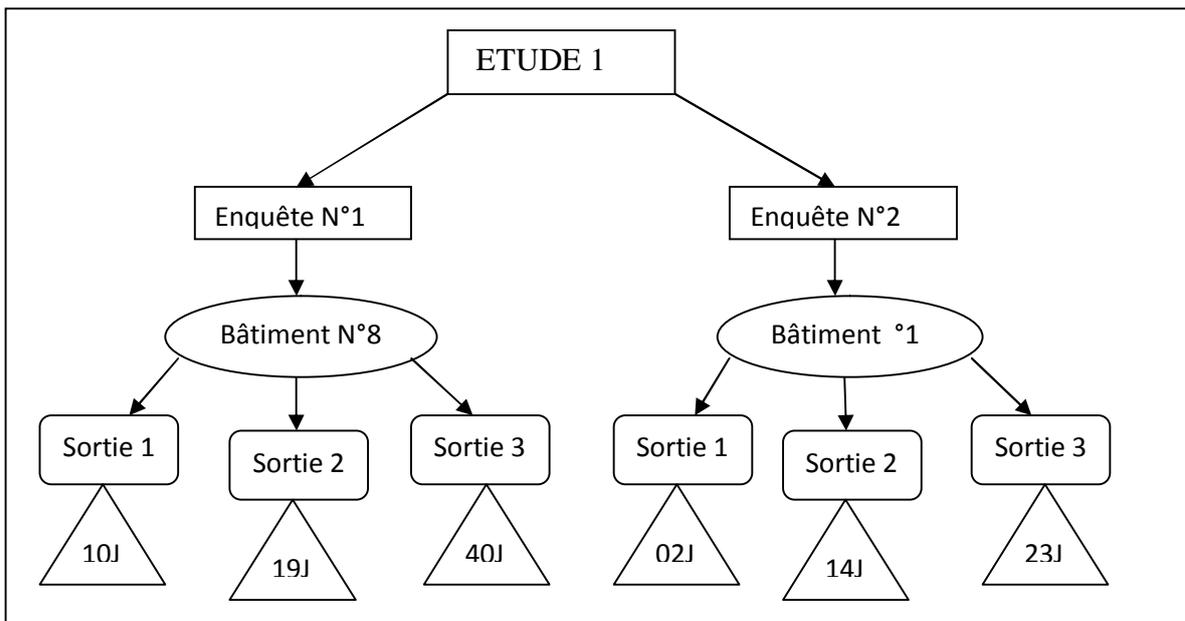
- Microbiologie animale au niveau d'un poulailler.
- Microbiologie alimentaire: divisée en 2 : une au niveau des rôtisseries, l'autre à partir de divers prélèvements alimentaires d'origine avicole.
- Microbiologie humaine : à partir de selles humaines (coproculture).

Les prélèvements pour l'étude 1, proviennent de la société des abattoirs du centre UPC de la commune de Meftah. C'est un poulailler qui se situe au Sud-Est de la wilaya de Blida. Au niveau de ce poulailler, se trouve 8 bâtiments et chaque bâtiment se compose de deux ailes. Le choix s'est porté sur deux bâtiments (N°8 et N°1) selon la disponibilité des poussins pour la période d'étude.

Lors de cette étude deux enquêtes ont été effectuées. Chaque enquête comporte 3 sorties. Lors de chaque sortie, douze (12) prélèvements ont été réalisés : 10 prélèvements par écouvillonnage de cloaques des poussins/poules, et 2 fientes.

Chaque enquête concerne un seul bâtiment et une même population à différents âges (Figure II.1). Au total 74 échantillons ont été réalisés.

Pour chaque prélèvement une fiche de renseignement a été établie (annexe 2).



△ : Âge des poussins/poules

**Figure II.1** : Schéma illustrant les différentes étapes suivies lors de l'étude 1

Pour ce qui est de l'étude 2 au niveau des rôtisseries, les échantillons de notre enquête proviennent de différentes rôtisseries de deux communes situées au centre Ouest de la wilaya d'Alger. Nous avons effectué la recherche de *Campylobacter* ainsi que d'autres germes à partir de 109 échantillons.

Tous les renseignements concernant les prélèvements sont recueillis (cru, cuit, étage dans la rôtisserie, í ).

Les tableaux ci-dessous représentent la répartition des échantillons selon leur provenance, l'état de cuisson du poulet et selon leur nature.

**Tableau II.1:** Répartition des échantillons des rôtisseries selon leur provenance

Lieu	Nombre de rôtisseries	Nombre d'échantillons effectués
Commune I	07	52
Commune II	08	57
Total	15	109

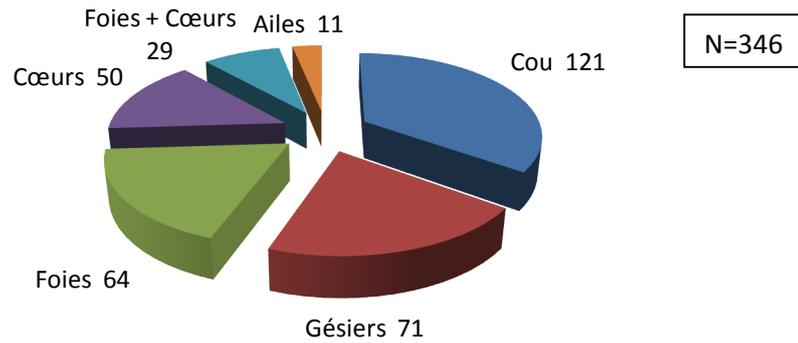
**Tableau II.2:** Répartition des échantillons des rôtisseries selon l'état de cuisson du poulet/sauce

	Nombre d'échantillons
Cru	11
Demi-cuit	59
Cuit	21
Sauce	18

**Tableau II.3:** Répartition des échantillons des rôtisseries selon leur nature

Différentes types de prélèvement	Nombre d'échantillons
Cou et carcasse	49
Croupion	39
Sauce	18

Les prélèvements alimentaires de volailles (foie, cò ur, gésier, cou í ) concernant la 2<sup>ème</sup> étude ont été analysés selon la méthode ISO 10272 (1996). Nous avons analysé un total de 346 prélèvements alimentaires répartis comme suit (voir figure II.2). Ces prélèvements sont réceptionnés au niveau du service de Bactériologie Alimentaire de l'IPA.



**Figure II.2** : Répartition des prélèvements alimentaires analysés

La dernière partie concerne les coprocultures. Nous avons analysé un total de 4309 prélèvements de coprocultures de 2006 à 2012 reçus pour la plupart au niveau du service des Entérobactéries-Vibrions de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Les coprocultures ont été divisées en trois groupes, selon les symptômes des malades ou des demandeurs d'analyse :

- 1<sup>er</sup> groupe : il regroupe tous les malades présentant un ou plusieurs signes de gastro-entérites : diarrhées, vomissement, douleurs abdominales, fièvre
- 2<sup>ème</sup> groupe : nommé enquête, car il regroupe des demandes d'analyses de personnes travaillant dans le domaine de la restauration (fast-food, hôtels, hôpitaux) ou de personne préparant un dossier de visas. Le point commun de toutes ces demandes c'est que le demandeur ne présente aucun symptôme.
- 3<sup>ème</sup> groupe : il regroupe les malades présentant des allergies, des retards staturaux et/ou pondéraux, des suspicions de maladie cœliaque, des anémies

Le tableau ci-dessous, représente le taux de chaque groupe durant la période d'essai.

**Tableau II.4:** Répartition des coprocultures par groupe

	<b>1<sup>er</sup> groupe</b>	<b>2<sup>ème</sup> groupe</b>	<b>3<sup>ème</sup> groupe</b>	<b>Total</b>
<b>Prélèvements de coprocultures</b>	1380	2305	624	<b>4309</b>

#### II.1.2.2.2. Prise d'essai

Pour l'enquête au niveau du poulailler, nous avons effectué des prélèvements par écouvillonnage au niveau du cloaque des poussins/poules de différents âges (de 2 à 40 jours) en plus de quelques prélèvements de fientes. Pour l'autre enquête au niveau des rôtisseries de poulets, nous avons réalisé des prélèvements par écouvillonnages de la carcasse des poulets et par une collecte des sauces issues des poulets rôtis.

Une fois les prélèvements effectués les écouvillons sont rapidement mis dans le milieu de transport. Ce milieu ne permet pas la croissance des *Campylobacter* mais assure leur protection contre la déshydratation et l'effet toxique de l'oxygène. Dans nos enquêtes nous avons utilisé le milieu Cary Blair modifié car il a donné de bons résultats de ré-isolément selon des études menées par Luechtefel et *al.*(1981) et Sjogren et *al.* (1987).

Les prélèvements de fientes sont mis rapidement dans des tubes de B.H.I.B, et les sauces sont recueillies dans des tubes stériles.

Tous les prélèvements sont mis dans une glacière qui contient des poches de glace pour les maintenir à une température basse durant le transport vers le laboratoire dans un délai n'excédant pas les 2 ou 3 heures.

Pour les prélèvements alimentaires de volailles, ils vont subir un morcellement, à l'aide d'un scalpel stérile à lame tranchante en condition aseptique, près du bec Bunsen sur une paille préalablement javellisée. Nous aboutirons à de petits morceaux, qui seront introduits dans un sachet stérile. Chaque prélèvement sera pesé à l'aide d'une balance électronique pour atteindre un poids de 25g à chaque prise d'essai. Un flacon de Preston de 225 ml est directement versé dans le

sachet, celui-ci est mis dans le stomacher, prêt à être broyé pendant 1 à 3 minutes. Une fois la suspension bien homogénéisée elle sera remise dans le flacon soigneusement fermé à l'aide d'un bouchon au près du bec Bunsen. La suspension obtenue représente la solution mère.

La recherche des *Campylobacter* à partir des selles, doit être effectuée sur des selles fraîchement émises dans des pots en plastiques à usage unique. Le prélèvement est accompagné d'une fiche de renseignements comportant plusieurs informations : Nom et Prénom, âge, signes cliniques (Annexe 2).

Une noix de selles est introduite stérilement dans un tube à essai contenant 10ml d'eau physiologie stérile à 0.9%. Ce dernier est homogénéisé à l'aide d'un vortex.

Les protocoles suivis lors de cette étude pour les trois parties sont représentés dans les figures II.3, II.4, II.5 et II.6)

### II.1.2.3. Ensemencement et incubation

Tous les prélèvements doivent être immédiatement acheminés au laboratoire et conservés à + 4°C, au maximum 24 heures. Mais de manière générale, une fois tous ces échantillons réceptionnés nous prélevons, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, un certain volume et nous ensemençons la surface des milieux de cultures (2 milieux au minimum). A l'aide d'une pipette boutonnée, les gouttes sont ensemencées sur toute la surface des géloses par la méthode d'épuisement. Les écouvillons sont quant à eux, directement ensemencés sur les milieux de culture puis mis dans des tubes contenant le bouillon d'enrichissement Preston.

Pour l'étude au niveau des pâtisseries, nous avons recherché en plus de *Campylobacter* d'autres bactéries. Pour cela nous avons utilisé :

- Gélose nutritive : cette gélose permet le développement d'un grand nombre de microorganismes.
- Gélose Hektoen : c'est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des Entérobactéries.
- Gélose Chapman : c'est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des *Staphylococcus*

L'incubation des solutions mères, des tubes de Preston et des boîtes de Pétri ensemencées pour la recherche de *Campylobacter*, se fait à 37°C dans des jarres étanches en plastique ou en métal inoxydable contenant des sachets générateurs d'atmosphère micro aérobie (O<sub>2</sub>=5% ; CO<sub>2</sub>=10% ; N<sub>2</sub>=85%), pendant 48 heures et jusqu'à cinq jours pour les cultures lentes.

Les isolements effectués sur la gélose nutritive, Hektoén sont incubés en aérobiose pendant 24 heures à 37°C.

Les isolements effectués sur la gélose Chapman sont incubés en aérobiose pendant 24 à 48 heures à 37°C.

#### II.1.2.4. Enrichissement

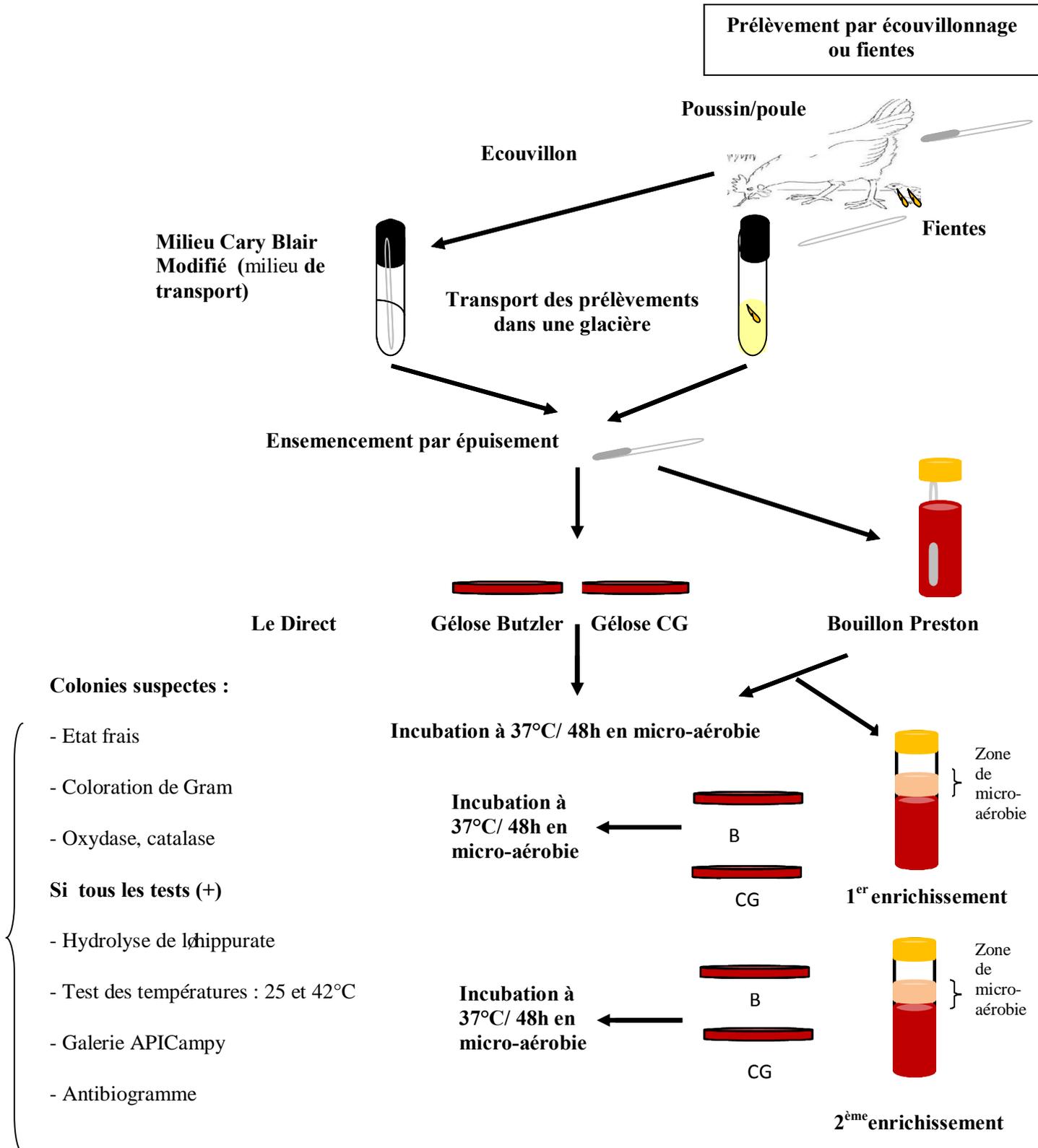
La phase enrichissement ne concerne que les deux enquêtes et les prélèvements alimentaires.

Le premier enrichissement est obtenu après 48 heures d'incubation des solutions mères et des écouvillons (mis dans le bouillon Preston). À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, nous prélevons un volume au niveau de la zone microaérobie située à quelques millimètres sous la surface. Un volume sera déposé sur au moins deux milieux (Butzler (B), Columbia (C), Skirrow (S) ou *Campylobacter* Growth (CG)), puis ces milieux sont ensemencés par épuisement. Ceci est l'isolement du premier enrichissement noté I.

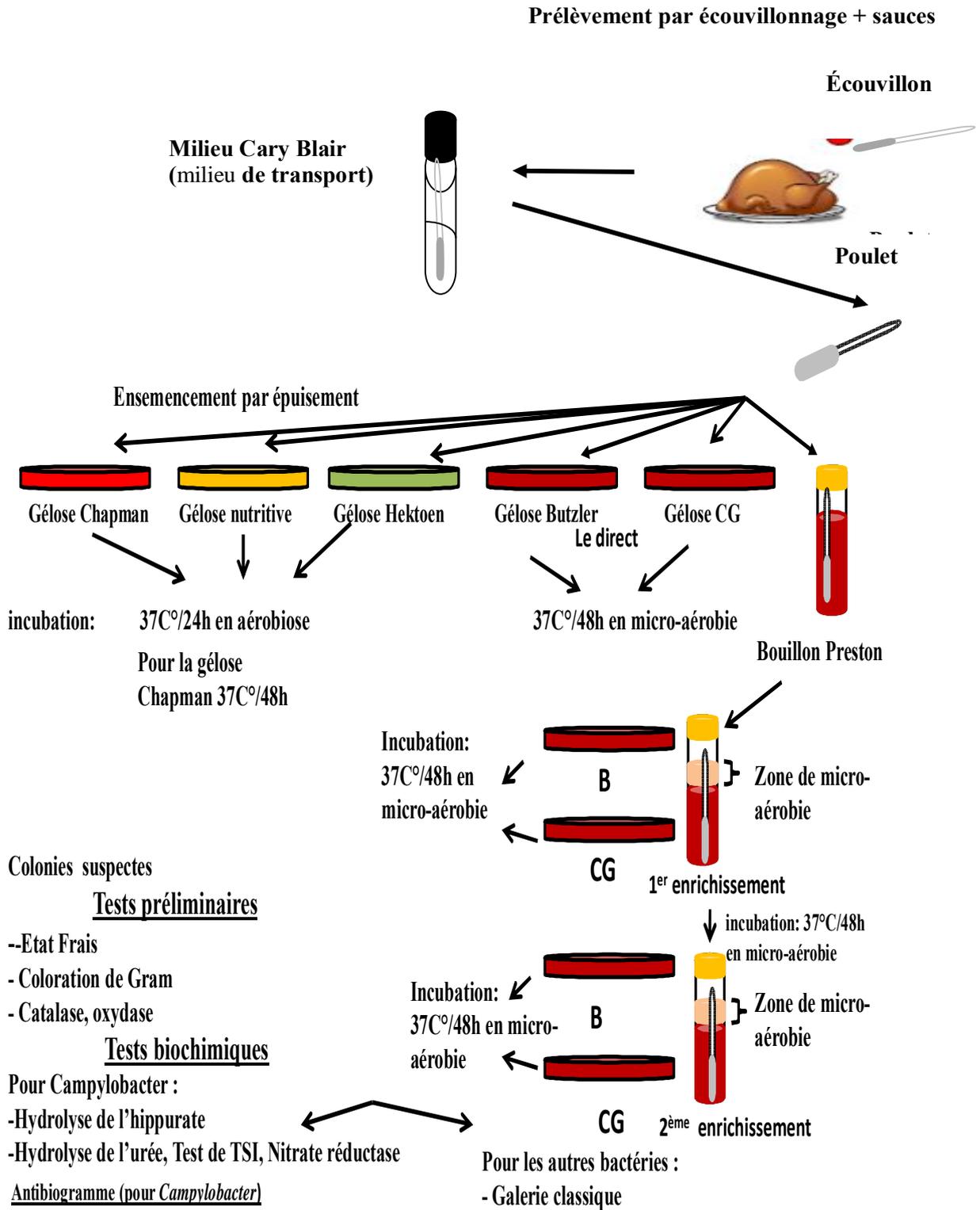
Environ 1 ml de ce premier enrichissement sera versé dans un tube contenant 9ml du bouillon d'enrichissement Preston. Après 48h d'incubation nous retirons les tubes de l'étuve nous aurons un deuxième enrichissement. À partir de ces tubes, nous prélevons un volume au niveau de la zone micro aérobie. Un volume sera déposé sur au moins deux milieux (B, C, S ou CG), puis ces milieux sont ensemencés par épuisement. Ceci est l'isolement du deuxième enrichissement noté II.

La phase du troisième enrichissement, ne concerne que les prélèvements alimentaires.

À partir des tubes de deuxième enrichissement incubés durant 48h, nous obtenons le troisième enrichissement réalisé de la même manière que précédemment.



**Figure II.3:** Schéma général du protocole utilisé dans l'étude 1 pour l'isolement et l'identification de *Campylobacter* à partir de prélèvements d'origine animale (enquête poulailler)



**Figure II.4** : Schéma général du protocole utilisé dans l'étude des prélèvements issus des rôtisseries (étude 2)

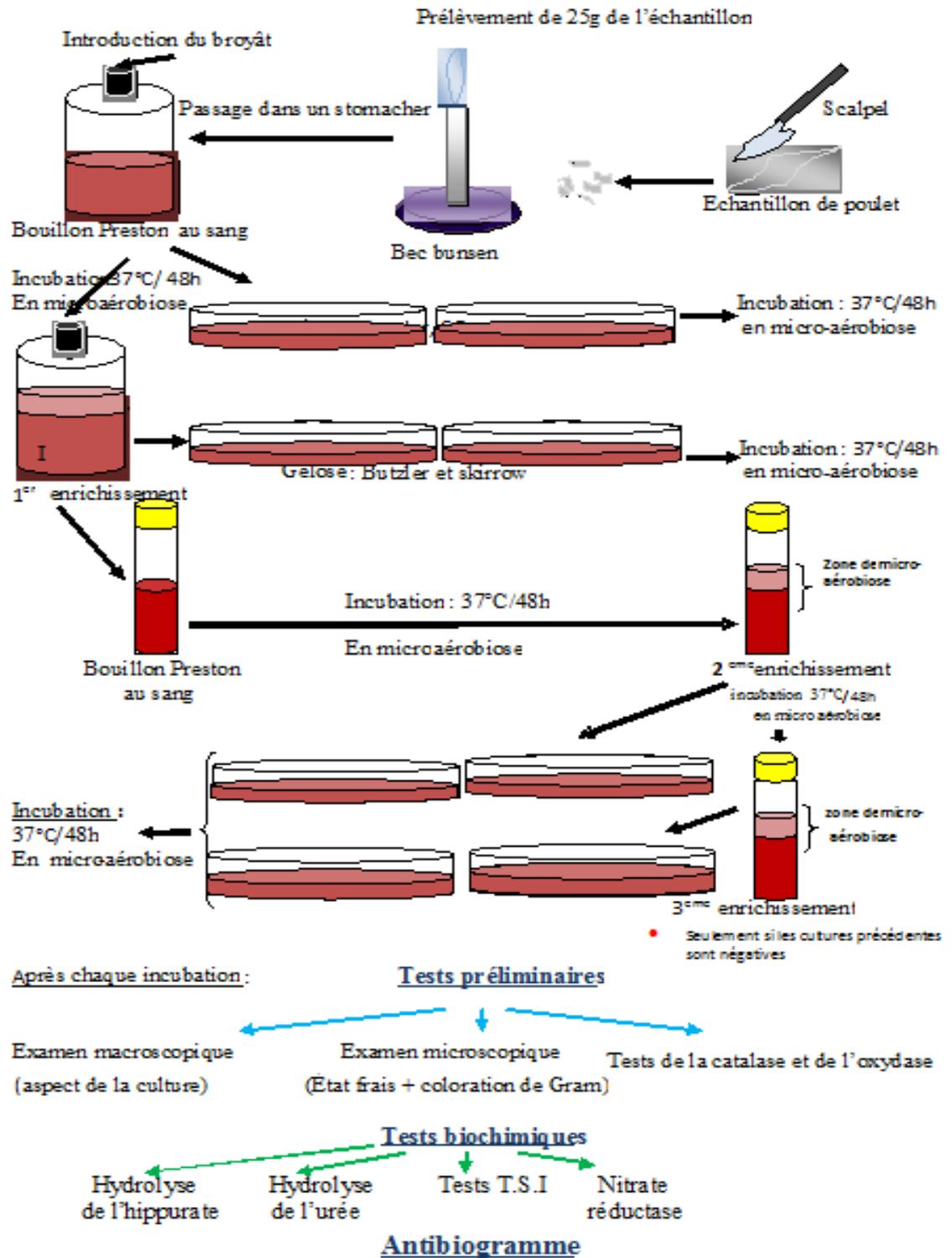


Figure II.5 : Schéma général de la méthode ISO NF 10272 (modifiée)

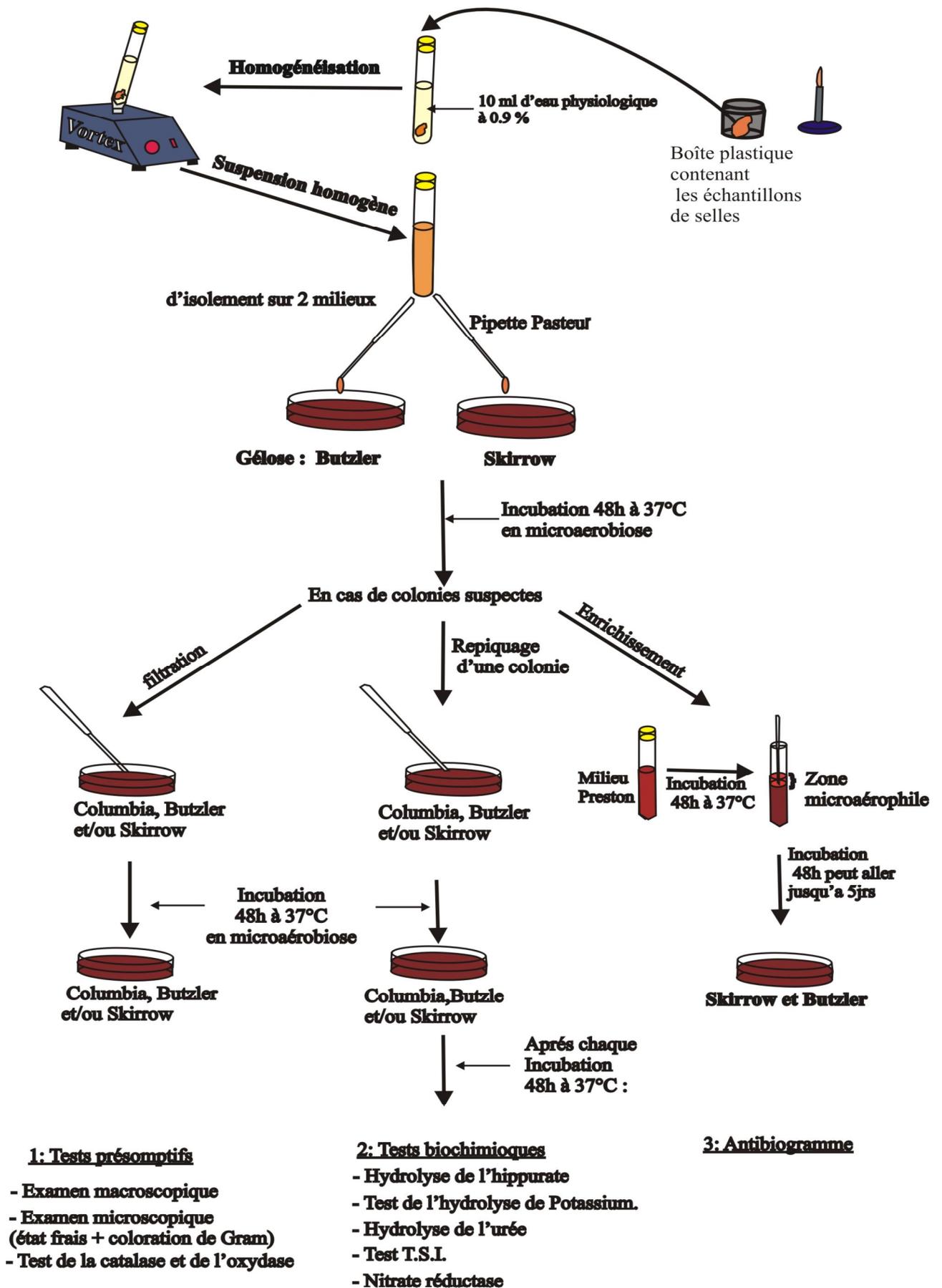


Figure II.6 : Protocole de recherche, d'isolement et d'identification de *Campylobacter* dans les selles

### II.1.3. Identification

#### II.1.3.1. Identification de *Campylobacter*

##### ◆ Etude macroscopique

Les colonies qui ont un bord régulier, de couleur grise ou brunâtre, où une nappe envahissante à un aspect lisse et humide, transparente sous le reflet de lumière du jour, seront retenues.

##### ◆ Etude microscopique

###### ✓ Observation à l'état frais

La lecture microscopique se fait au grossissement G10 100 en immersion. L'état frais oblige une certaine rapidité afin d'observer le mouvement caractéristique des *Campylobacter* en vol de moucheron.

###### ✓ Coloration de Gram

L'observation de la coloration de Gram des *Campylobacter* montre des petits bacilles à Gram négatif incurvés ou en S.

##### ◆ Autres tests

Pour la confirmation du genre les tests de catalase et d'oxydase sont réalisés

Les colonies ou les cultures suspectes sont soumises à des tests plus approfondis :

- ✓ Production de  $H_2S$  (Test du TSI (Triple Sugar Iron))
- ✓ hydrolyse de l'urée
- ✓ Hydrolyse de l'hippurate
- ✓ Teste de réduction des nitrates
- ✓ Test des températures (25 et 42°C)
- ✓ La galerie API Campy

## ✓ La galerie API Campy

API Campy est un système standardisé pour l'identification des *Campylobacter* utilisant des tests miniaturisés, ainsi qu'une base de données spécifiques.

### • Principe

La galerie API Campy comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Elle est composée de deux parties :

La première partie : ce sont des tests enzymatiques et conventionnels inoculés avec une suspension dense qui réhydrate les substrats. Les réactions produites pendant la période d'incubation (en aérobiose) se traduit par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs

La deuxième partie de la galerie : ce sont des tests d'assimilation ou d'inhibition inoculée avec un médium et incubée en atmosphère micro aérobie. Les bactéries ne se cultivent que si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant ou si elles sont résistantes à l'antibiotique testé.

### • Lecture

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture présent dans l'annexe 3, et l'identification est obtenue en consultant la liste des profils de la notice (annexe 3) ou à l'aide d'un logiciel d'identification API WEB.



**Figure II.7** : la galerie Api Campy

### II.1.3.2. Identification d'autres bactéries

L'aspect sur boîte, selon le milieu étudié, nous donne une première orientation surtout pour les deux milieux sélectifs : Hektoène et Chapman. Une coloration de Gram vient par la suite orienter notre identification avant de passer par les tests biochimiques (oxydase, catalase, uréase, ...).

Une Clef d'identification des entérobactéries et des bactéries en général est présente en annexe 4.

## II.2. ANTIBIOGRAMME

La détermination de la sensibilité des *Campylobacter* aux antibiotiques se fait par la méthode de diffusion sur gélose (méthode des disques).

La technique par diffusion ou technique des disques, bien que n'étant pas la méthode de référence, a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, de fournir des données sur l'interaction des différents antibiotiques entre eux et enfin d'avoir été largement évaluée par 56 ans d'utilisation mondiale. Pour cela nous suivons les recommandations de la Société Française de Microbiologie CA SFM en apportant cependant quelques modifications (Soussy et al., 2006 ; Soussy et al., 2010).

Pour réaliser l'antibiogramme nous avons utilisé le milieu Columbia au lieu du Müller Hinton, car il a donné de meilleurs résultats.

Pour les souches présentant une résistance à certains antibiotiques, cette dernière est confirmée par l'utilisation des E-test. Pour cela aussi nous suivons les recommandations du CA SFM (Soussy et al., 2006 ; Soussy et al., 2010).

Le contrôle des antibiotiques s'est fait par l'utilisation des souches de références : *Campylobacter jejuni* NCTC 11168, *Campylobacter jejuni* CCM 6214 et *E. coli* ATCC 25922.

### Technique

Nous préparons une suspension d'inoculum en milieu liquide de B.H.I.B (au lieu de l'eau physiologique) équivalente au standard Mc Farland 0.5 ( $\sim 10^8$  UFC/cm<sup>3</sup>) à partir d'une culture pure de *Campylobacter* (de 24 ou 48h).

L'écouvillon est trempé dans l'inoculum, puis pressé sur la paroi interne du tube afin d'éliminer le liquide en excès retenu dans l'écouvillon. Nous ensemençons l'inoculum bactérien par des stries serrées en trois orientations décalées de 1/3 de tours.

Les disques de papier imprégnés des 17 antibiotiques à tester sont déposés à la surface de la gélose (au maximum 5 disques par boîte de Pétri), uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque antibiotique diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures en micro aérobie.

Dans certains cas nous avons utilisé des bandelettes E test pour déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des antibiotiques testés (cela selon la disponibilité des E test).

La lecture des diamètres des zones d'inhibition et leur interprétation se fait selon les valeurs de CA SFM.

Il faut noter que certaines souches de *Campylobacter jejuni* sont naturellement résistantes à la céfazoline (CZ) et au sulfaméthoxazol/triméthoprime (SXT), c'est pour cela que nous les utilisons comme critères d'identification.

Les quinze antibiotiques testés, les valeurs critiques et les charges standard utilisées lors de cette étude, sont illustrés dans le tableau en annexe 5.

## Lecture

Tout d'abord il faudra vérifier que la croissance forme une surface confluyente.

Si des colonies individuelles sont détectées, l'inoculum est trop faible. Il faut retester l'échantillon. Il faut vérifier que la zone d'inhibition est ronde et non ovale.

La lecture et l'interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Campylobacter spp* sont représentées en annexe 5.

La présence d'une zone d'inhibition, c'est à dire l'absence de culture autour du disque, traduit une certaine sensibilité à l'antibiotique : dans le cas où le diamètre de la zone d'inhibition est égale ou supérieur à la valeur maximale standard d'inhibition, la souche est dite sensible et est notée « S ». La croissance de la souche autour du disque d'antibiotique révèle une certaine résistance : dans le cas où le diamètre de la zone d'inhibition est égal ou inférieur à la valeur minimale standard, la souche est dite alors résistante et on notera « R ». Dans ce cas si nous disposons de E test pour la détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice) (correspondant à l'antibiotique pour lequel nous avons eu une résistance), un autre antibiogramme est lancé avec des bandelettes de E test pour confirmer ou infirmer cette résistance.

L'apparition d'une zone d'inhibition comprise entre les deux valeurs minimales et maximales, traduit une résistance intermédiaire. Les souches sont notées « I ».

### II.3. CONSERVATION DE SOUCHES

Cette étape est indispensable après tout isolement purification et identification, cela nous évitera d'éventuelles pertes de souches et nous permettra de récupérer ou de réutiliser la souche en cas de nécessité. Nous réalisons une dense suspension bactérienne dans du B.H.I.B stérile additionné de quelques gouttes de glycérol à partir des souches qu'on désire conserver. Nous répartissons cette suspension dans des cryotubes. Une fois scellés marqués et remis dans leur boîte (cryobox), les tubes sont mis au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### II.4. ANALYSES STATISTIQUES

#### II.4.1. Comparaison de deux pourcentages

Une comparaison entre les pourcentages observés a été effectuée selon le test statistique, qui permet de calculer le degré de signification « p » entre ces pourcentages en utilisant une variable normale centrée réduite epsilon « z » tel que :

$$Z = \frac{P_a - P_b}{\sqrt{\frac{P_a(1-P_a)}{N_a} + \frac{P_b(1-P_b)}{N_b}}}$$

$P_a$  : pourcentage de la population « a »     $P_b$  : pourcentage de la population « b »

$N_a$  : nombre de la population « a »                       $N_b$  : nombre de la population « b »

A partir de la table de loi normale centrée réduite (voir annexe), « p » est tiré en lisant la valeur de « z » sur la table puis comparé à «  $\alpha$  » (  $\alpha = 0,05$ ).

- Si  $p > \alpha$  : différence non significative
- Si  $p < \alpha$  : différence significative

Ce test permet de dire si la différence entre ces pourcentages est significative ( $H_0$  rejetée).

Plus « p » est faible plus la probabilité de se tromper en rejetant «  $H_0$  » est faible.

#### II.4.2. Test du $\chi^2$

Étape 1: Posez les hypothèses.

$H_0$  : Les variables sont indépendantes.

$H_1$  : Les variables ne sont pas indépendantes

Étape 2: Calculer la valeur théorique pour chaque case du tableau expérimental en utilisant la formule suivante.

Étape 3: Calculer le coefficient du khi-deux pour l'échantillon en utilisant la formule suivante :

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - T)^2}{T}$$

Où  $O$  est la valeur observée

$T$  : la valeur théorique

Étape 4: Déterminer le point critique du khi-deux à l'aide de l'ANNEXE. Utilisez le niveau de signification et le nombre de degré de liberté (ddl) pour établir le point critique.

$$\text{ddl} = (R-1)(C-1)$$

$R$  : nombre de rangées

$C$  : nombre de colonnes de cases du tableau expérimental

La région critique comprend toutes les valeurs du khi-deux à la droite du point critique.

Étape 5: Comparez le coefficient de l'échantillon du khi-deux de l'étape 3 avec le point critique de l'étape 4. Si le coefficient de l'échantillon du khi-deux est plus grand, rejetez l'hypothèse nulle de l'indépendance. Sinon ne rejetez pas l'hypothèse nulle.

## II.4. ETUDE MOLECULAIRE DES *Campylobacter* : IDENTIFICATION ET ETUDE DES GENES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

L'étude moléculaire de *Campylobacter* a consisté d'abord en une identification et une confirmation de nos souches, suivie d'une étude des gènes de résistance à deux familles d'antibiotiques : les macrolides et les quinolones.

La composition des principaux milieux utilisés est donnée en annexe 6.

### II.4.1. Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN est réalisée pour un nombre restreint de souches (annexe 6). Le choix s'est porté sur les souches présentant le plus de résistances aux antibiotiques. Les étapes suivies pour l'extraction d'ADN ont été réalisées au niveau des services de Bactériologie alimentaire et eaux et Entérobactéries, unité Biologie moléculaire.

L'extraction d'ADN est réalisée selon la méthode phénol-chloroforme (annexe 6). Elle est suivie d'une migration sur gel (au bromure d'éthidium) pour le contrôle de notre extraction.

### II.4.2. Identification moléculaire des *Campylobacter* par PCR classique et par PCR en temps réel

Cette partie a été réalisée au sein du centre national de référence des *Campylobacter* et *Helicobacter* (CNRCH) à Bordeaux en France.

Les détails des protocoles utilisés sont donnés en annexe 6.

#### II.4.2.1. PCR standard pour l'identification de *C. jejuni* et *C. coli* (Multiplex)

Une PCR multiplex est réalisée pour l'identification de *C. jejuni* et *C. coli*. Une PCR multiplex permet d'identifier différentes espèces de *Campylobacter* lors d'une même réaction de PCR.

#### Préparation du mix

Protocole :	n=1 (CNRCH)
H <sub>2</sub> O	13,3 µl
Tampon 5X	4 µl
dNTP	0,2 µl
CJ 6027 25µM	0,1 µl
CJ 6028 25µM	0,1 µl
CV 7723 25µM	0,1 µl
CV 7724 25µM	0,1 µl
Taq polymerase	0,1 µl
	-----
	18 µl
Matrice (ADN)	2 µl
	-----
Total	20 µl

◆ Les cycles du thermo cycler sont pour cette PCR (CNRCH) :

95°C	2ø	} 30 X
95°C	30øø	
57°C	30øø	
72°C	20øø	
72°C	5ø	
10°C	inf.	

Amplicons : 358 pb *C. jejuni*  
258 pb *C. coli*

### Préparation des gels

◆ Même technique que précédemment mais au lieu du Bromure d'Ethidium, c'est le SybrSafe DNA gel Strain 10000x qui est utilisé à raison de 50µg/500 ml de gel. Il est beaucoup moins dangereux que le BE et peut être gardé à T° ambiante à l'abri de la lumière.

#### II.4.2.2. Identification des *Campylobacter* par PCR en temps réel (CNRCH)

Vu que *C. jejuni* et *C. fetus* présentent la même température de fusion (melting temperature  $T_m = 48,3^\circ\text{C}$ ), nous avons identifié ce dernier par une PCR à part. Nous avons réalisé une première PCR pour l'identification de *C. jejuni* et *C. coli* et une deuxième PCR pour l'identification de *C. fetus*.

NB : le  $T_m$  correspond à la température où 50% du double brin est déshybridé.

#### Protocole pour l'identification de *C. coli* et *C. jejuni* sur Light Cycler

Eau	3,8
Mg Cl <sub>2</sub>	0,58
F3-GyrA-ccccj	0,49
R4-GyrA-ccccj	0,49
sensor 10µM	0,12
enchor 10µM	0,12
enzyme 10x	0,7
<hr/>	
Mix	6,3µl
<hr/>	
Matrice	0,7µl
<hr/>	
<b>Vol. final</b>	<b>7µl</b>

#### Protocole pour l'identification de *C. fetus* sur Light Cycler

	n = 1
Eau	3,8
Mg Cl <sub>2</sub>	0,58
F2-GyrA-cf	0,49
R2-GyrA-cf	0,49
sensor 10µM	0,12
enchor 10µM	0,12
enzyme 10x	0,7
<hr/>	
Mix	6,3µl
<hr/>	
Matrice	0,7µl
<hr/>	
<b>Vol. final</b>	<b>7µl</b>

Les cycles programmés sur LC pour l'identification des *Campylobacter* sont :  
(CNRCH)

Dénaturation	95°C	10ø	} 50X (T° de transition 20°C/sec)
Amplification	95°C	0ø	
	60°C	10ø	
	72°C	17ø	

Fluorescence mesurée à 640 nm après chaque cycle

Melting programm	95°C	0ø	} T° de transition 20°C/sec
	45°C	30ø	
	85°C	0ø	T° de transition 0,1°C/sec

Continuous monitoring of fluorescence

Cooling de 20°C/sec à 40°C avec maintien 30ø

Une fois la réaction finie, nous ouvrons le fichier où la réaction a été enregistrée et nous lisons nos résultats sur micro-ordinateur sous forme de courbes de fusions.

#### II.4.3. Détection de la résistance aux antibiotiques par séquençage (CNRCH)

Que ce soit pour la détection de la résistance aux quinolones ou aux macrolides, la méthode utilisée suit les étapes suivantes :

- Une PCR classique pour amplifier le gène d'intérêt
- Une purification par Séphacryl
- Réaction de séquence

### II.4.3.1. Détection de la résistance aux quinolones chez *Campylobacter* (PCR QRDR des *Campylobacter*)

#### II.4.3.1.1. PCR standard : Amplification du gène d'intérêt (CNRCH)

On réalise comme précédemment une PCR standard avec le protocole suivant :

Eau	33,25 µl
Tampon 5x	10 µl
dNTP 10 mM	0,5µl
F1-QRDR-Campy 25µm	0,5 µl
R1-QRDR-Campy 25µm	0,5 µl
GoTaq	0,25 µl
	-----
	45 µl
Matrice (ADN)	5 µl
	-----
Volume total	50 µl

Taille du fragment amplifié 554 pb

Le programme utilisé sur thermo cycler est le suivant :

Thermo cycler Gene Amp® PCR System 9700 Applied Biosystems

94°C	5ø	} 40 X
94°C	30øø	
56°C	30øø	
72°C	30øø	
72°C	5ø	
4°C	infini	

#### \* Migration sur gel d'agarose 1%

Nous rajoutons le tampon de charge (vert) au produit de notre PCR qu'on veut faire migrer. Sur un papier parafilm nous déposons 1µl de tampon de charge auquel nous rajoutons 5 µl d'ADN amplifié. Le tout est mélangé et mis dans le puits du gel. Le 1<sup>er</sup> puits ne contient que 5 µl de marqueur moléculaire.

Brancher l'appareil à électrophorèse à 50 V pendant 20 à 25 mn.

Après migration nous devons noter si les ADN ont été amplifiés ou pas pour passer à la 2<sup>ème</sup> étape.

#### II.4.3.1.2. Purification par Séphacryl (CNRCH)

C'est une chromatographie d'exclusion.

##### \* Préparation du Séphacryl

Le Séphacryl arrive au laboratoire mélangé avec de l'alcool. Pour l'utiliser il faut éliminer l'alcool qu'il contient.

Homogénéiser le Séphacryl S400 High Resolution manuellement avant de l'utiliser.

Mettre un volume X dans un tube cône.

Centrifuger 5 mn à 3000 rpm

Répéter  
6X { Enlever le surnageant  
Rajouter un même volume d'eau que le séphacryl (par exemple 15 ml de séphacryl => 15 ml d'eau stérile) et mélanger tout doucement par renversement.  
Centrifuger 5 mn à 3000 rpm.

A la fin de la dernière centrifugation, pipeter le surnageant et rajouter au volume de séphacryl, un volume égal d'eau.

Mélanger tout doucement jusqu'à remettre en suspension le séphacryl.

##### \* Purification de l'ADN (par les colonnes) S400

- Mettre une colonne par microtube de 2 ml (au nombre des ADN à étudier)
- Y verser 700 µl de séphacryl sans toucher les colonnes.
- Centrifuger 1 mn à 3000 rpm
- Récupérer les colonnes (jeter les microtubes) et les mettre dans d'autres microtubes
- Mettre 20 µl d'ADN amplifié sans toucher le gel.
- Centrifuger 2 mn à 3000 rpm.
- Récupérer l'éluat dans le microtube, jeter le séphacryl et récupérer les colonnes

**\* Migration sur gel**

Sur papier film mélanger 1µl de green buffer + 5 µl d'ADN purifié et mettre dans le puits.

1<sup>er</sup> puits 5 µl de marqueur moléculaire.

Si gel et TBE à T° ambiante mettre sur 135 V sinon 100 V pendant 20 mn.

Si après 20 mn la bande n'apparaît pas, prolonger la migration de 15 à 20 mn.

**II.4.3.1.3. Réaction de séquence (CNRCH)**

Refaire une PCR standard mais cette fois-ci avec des DNTP marqués au fluorochrome : BigDye (de Applied Biosystems).

<b>Protocol:</b>	n =1
H <sub>2</sub> O	12 µl
Big Dye Terminator V1,1 ; V1,3- 5X	4 µl
Big Dye Terminator V3,1 Cycle sequencing Kit	1 µl
ou { F1-QRDR Campy 3,2 µM	2 µl
{ R1-QRDR Campy 3,2 µM	
ADN S400	20 µl

Préparer 2 mix, l'un avec l'amorce Forward, l'autre avec la Reverse.

Le programme du thermo cycler :

96°C	1ø	
96°C	10øø	} 25 X
50°C	5øø	
60°C	4ø	
+4°C	inf.	

#### II.4.3.1.4. Séquençage (CNRCH)

Les séquences sont analysées par un logiciel (BLAST) par alignement avec d'autres séquences de référence (nucléotides/nucléotides).

Les deux séquences de référence utilisées sont celles de *C. jejuni* (Gen Bank L04566) et *C. jejuni* (Gen Bank ATCC 11168).

#### II.4.3.2. Détection de la résistance aux macrolides

##### PCR ADNr 23S région résistance aux macrolides (CNRCH)

Nous avons suivi les mêmes étapes que pour la détection de la résistance aux quinolones.

Le protocole suivi est le suivant (CNRCH) :

Protocole :	n=1
H <sub>2</sub> O	17,55 µl
Tampon 5X	6 µl
dNTP	0,3 µl
Camp S 10 µM	1,5 µl
Camp A 10 µM	1,5 µl
Taq	0,15 µl
	-----
	27 µl
Matrice (ADN)	3 µl
	- -----
	30 µl

Le programme du thermo cycler est le suivant (CNRCH) :

Cycles :

94°C	2ø	} 40 X
94°C	30øø	
56°C	30øø	
72°C	30øø	
72°C	7ø	
+4°C	inf.	

Amplicons : 296 pb

Migration : sur gel à 2 % avec le 100 pb comme marqueur moléculaire, 100 V pd 40ø

Seuls les ADN ayant présenté une bonne amplification sont retenus pour la deuxième partie pour réaliser le séquençage par la suite.

La purification par séphacryl

La réaction de séquence est lancée avec une seule amorce

Les séquences sont soumises pour être alignées (nucléotides/nucléotides) avec d'autres séquences de référence à l'aide du logiciel BLAST.

Les séquences de référence utilisées sont celles de la souche de référence *C. jejuni* A2075G (GenBank AY 190994) qui présente la mutation A → G à la position 2075, et *C. coli* wild type (AY190987) qui est une souche sauvage et qui ne présente donc aucune mutation.

## II.5. TEST DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE CERTAINES HUILES ESSENTIELLES VIS-A-VIS DE *Campylobacter*

Les huiles essentielles (HE) testées sont des huiles commerciales et des huiles extraites au niveau du département « génie de l'environnement » de l'École Nationale Polytechnique (ENP). Elles ont été dissoutes dans de l'éthanol.

La liste des HE testées et leurs concentrations sont répertoriés dans le tableau suivant :

**Tableau II.5 : liste des Huiles Essentielles utilisées et leur concentration**

N°	HE	Concentration (ml HE/ml Solvant)
1	orange (commerciale, Algérie)	0,5
2	clou de girofle (mo wpt )(ENP)	0,5
3	orange (ENP)	0,5
4	lavande (ev) (ENP)	0,5
5	clou de girofle (ENP)	0,5
6	origan (ENP)	0,5
7	lavande (ENP)	0,5
8	orange (evmo) (ENP)	0,5
9	citron (commerciale, Algérie)	1,5
10	Thym (ev) (ENP)	0,5
11	Thym (ev as) (ENP)	0,5
12	bois roses (commerciale, France)	1,25
13	bergamote (commerciale, France)	0,5
14	citron (commerciale, France)	1
15	romarin (commerciale, France)	0,5
16	orange (commerciale, France)	0,5
17	badiane (commerciale, France)	0,5

### II.5.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque ou aromatogramme

L'aromatogramme est une technique identique à l'antibiogramme et qui consiste à mesurer l'activité antibactérienne d'une huile essentielle (Nutra News, 2006).

Cette méthode par diffusion par disques est une méthode fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs (Guinoiseau, 2010).

Cette méthode consiste à ensemencer une boîte de Pétri par une suspension bactérienne de *Campylobacter* (par écouvillonnage dans notre cas) et d'y déposer un disque vierge imbibé d'une HE donnée.

Le diamètre d'inhibition traduit l'activité antibactérienne de l'HE testée.

Toutes les HE (les 17) ont été testées sur 4 souches de *Campylobacter* isolées au niveau du laboratoire du service des entérobactéries. Les quatre souches présentaient différents profils d'antibiorésistance (tableau II.6)

**Tableau II.6. : Profils d'antibiorésistances des souches de *Campylobacter* étudiées**

	<b>Souche 1</b>	<b>Souche 2</b>	<b>Souche 3</b>	<b>Souche 4</b>
Profil d'antibiorésistance	NA, Cip, Mtr	NA, Tob	Tob	NA, Cip, Pef, Mtr, Te

NA : acide nalidixique ; Cip : ciprofloxacine ; Tob : tobramycine ; Mtr : métronidazole Pef : pefloxacine ; Te : tétracycline

Une suspension d'inoculum de *Campylobacter* est préparée à 0,5 McFarland et la surface d'une gélose Columbia (additionnée de 10% de sang) est ensemencée par écouvillonnage.

Un disque vierge non imprégné est déposé au centre de la boîte de Pétri.

Environ 10µl d'HE est déposé sur ce disque.

Les boîtes de Pétri sont incubées en micro aérobie à 37°C pendant 24 à 48h.

La lecture et l'interprétation des diamètres se fait par rapport aux diamètres des antibiotiques auxquels nos souches présentent des résistances. Le choix s'est porté sur

le diamètre à partir duquel une souche est dite résistante à la ciprofloxacine, car c'est le plus grand diamètre (annexe 5).

Après incubation le diamètre est mesuré en millimètres (disque inclus).

### II.5.2. Etude du pouvoir bactériostatique des HE sélectionnées

Le principe de cette technique est d'estimer l'activité bactériostatique des HE en mesurant les zones d'inhibition de croissance des *Campylobacter* autour des disques contenant différentes concentrations d'HE.

Trois HE seront retenues pour étudier leur pouvoir bactériostatique sur *Campylobacter*. Le choix se portera sur les HE ayant présenté les meilleures activités.

Deux souches de *Campylobacter* seront testées dans cette partie.

Une série de dilutions en cascade (selon une progression géométrique de raison 1/2) des trois HE sont préparées (Concentrations de 0,5 ml HE/ml solvant à 0,2 µl HE/ml solvant) (tableau II.7).

Une suspension d'inoculum de *Campylobacter* est préparée à 0,5 Mc Farland et la surface d'une gélose Columbia (additionnée de 10% de sang) estensemencée par écouvillonnage.

Un disque vierge non imprégné est déposé au centre de la boîte de Pétri. Pour les dilutions les plus faibles, trois disques sont déposés sur la même boîte de Pétri.

Pour chaque dilution 10 µl d'HE est déposé sur un disque.

Les boîtes de Pétri sont incubées en micro aérobie à 37°C pendant 24 à 48h.

La lecture et l'interprétation des diamètres se fait par rapport aux diamètres des antibiotiques auxquels nos souches présentent des résistances. Le choix se portera sur le diamètre à partir duquel une souche est dite résistante à la ciprofloxacine, car c'est le plus grand diamètre.

Après incubation le diamètre est mesuré en millimètres (disque inclus).

**Tableau II.7. : Dilutions et concentrations des HE préparées**

<b>Dilutions des HE</b>	<b>Concentrations (ml HE/ml Solvant)</b>
1	0,5
½	0,25
¼	0,125
1/8	0,0625
1/16	0,03
1/32	0,015
1/64	0,008
1/128	0,004
1/256	0,002
1/512	0,0009
1/1024	0,0005
1/2048	0,0002

**RESULTATS ET DISCUSSION**

**III. 1. RECHERCHE, IDENTIFICATION ET ANTIBIORESISTANCE DES *Campylobacter***

Pour la recherche de *Campylobacter* nous avons analysé des prélèvements de diverses origines : animale (enquête au niveau d'un poulailler), alimentaire (produits de rôtisserie et produits d'origine avicole) et humaine (coprocultures).

Le premier point concernera l'identification bactériologique et l'étude in vitro de la résistance aux antibiotiques des *Campylobacter*.

**III.1.1. Identification des souches de *Campylobacter***

Les étapes d'identification des souches de *Campylobacter* sont les mêmes quelle que soit l'origine du prélèvement.

Les résultats d'identification des *Campylobacter* sont représentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau III.1:** Résultats d'identification des *Campylobacter*.

Aspect macroscopique	Etat frais	Gram	Catalase	Oxydase	Céfazoline	Cotrimoxazole	Hippurate (-)	Hippurate (+)
	En vol de moucheron	BGN en S	+	+	R	R	<i>C. coli</i> ou autre*	<i>C. jejuni</i> *
								

\* : Test confirmé par les autres tests et/ou par la Galerie API *Campy*.

Certaines espèces de *Campylobacter* présentent une résistance naturelle à la céfazoline et au cotrimoxazole.

◆ **Aspect macroscopique :**

Les colonies de *Campylobacter* ont présenté un bord régulier, de couleur grise ou brunâtre, et la culture une nappe envahissante à un aspect lisse et humide, transparente sous le reflet de lumière du jour (figure III.1).

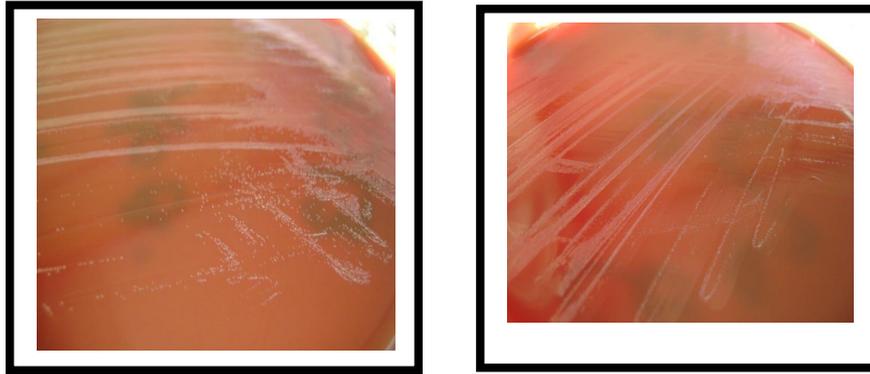


Figure III.1 : Aspect d'une culture de *Campylobacter* sur gélose Columbia au sang

◆ **Aspect microscopique**

◆ **Observation à l'état frais**

Le mouvement caractéristique des *Campylobacter* en vol de moucheron a été observé.

◆ **Coloration de Gram**

La coloration de Gram des *Campylobacter* a montré des petits bacilles à Gram négatif incurvés ou en S (Figure III.2).

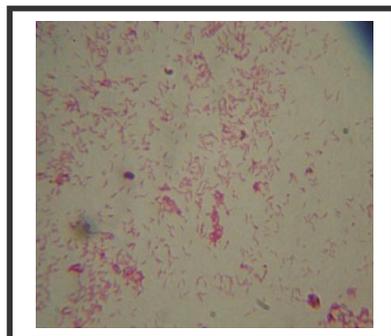


Figure III.2: Coloration de Gram de *Campylobacter* (G 10x100)

◆ La galerie api Campy

Les figures III.3 et III.4 illustrent des résultats de galeries api Campy en faveur de *Campylobacter*.

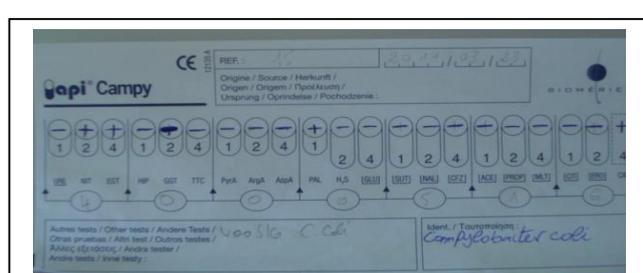
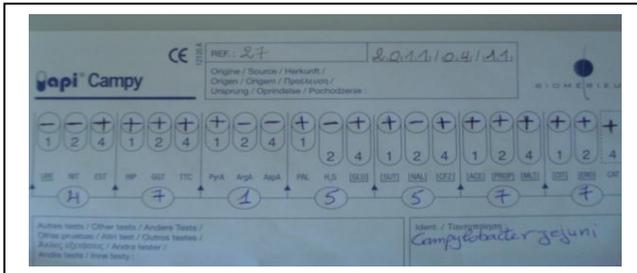


Figure III.3 : Résultat de la galerie api Campy pour *Campylobacter jejuni*

Figure III.4 : Résultat de la galerie api Campy pour *Campylobacter coli*

### III.1.2. Microbiologie animale : enquêtes au niveau d'un poulailler

Pour les deux enquêtes le même nombre de prélèvements a été effectué à savoir 6 prélèvements de fientes et 31 par écouvillonnage au niveau du cloaque.

#### III.1.2.1. Répartition des prélèvements et des cas positifs par enquête

A partir des 74 échantillons analysés, 27 souches de *Campylobacter* ont été isolées. Celles-ci ont été soumises à différents tests d'identification (voir chapitre I.1.).

Des 27 souches de *Campylobacter* isolées, nous en avons identifiées 26:

- 12 souches appartiennent à l'espèce *Campylobacter coli*
- 14 souches appartiennent à l'espèce *Campylobacter jejuni*
- 1 souche appartient à *Campylobacter spp* (non identifiée)

#### III.1.2.2. Enquête N°1

Pour l'enquête N°1, 24 souches ont été isolées. Selon le type de prélèvement ces souches se répartissent comme suit (figure III.5) :

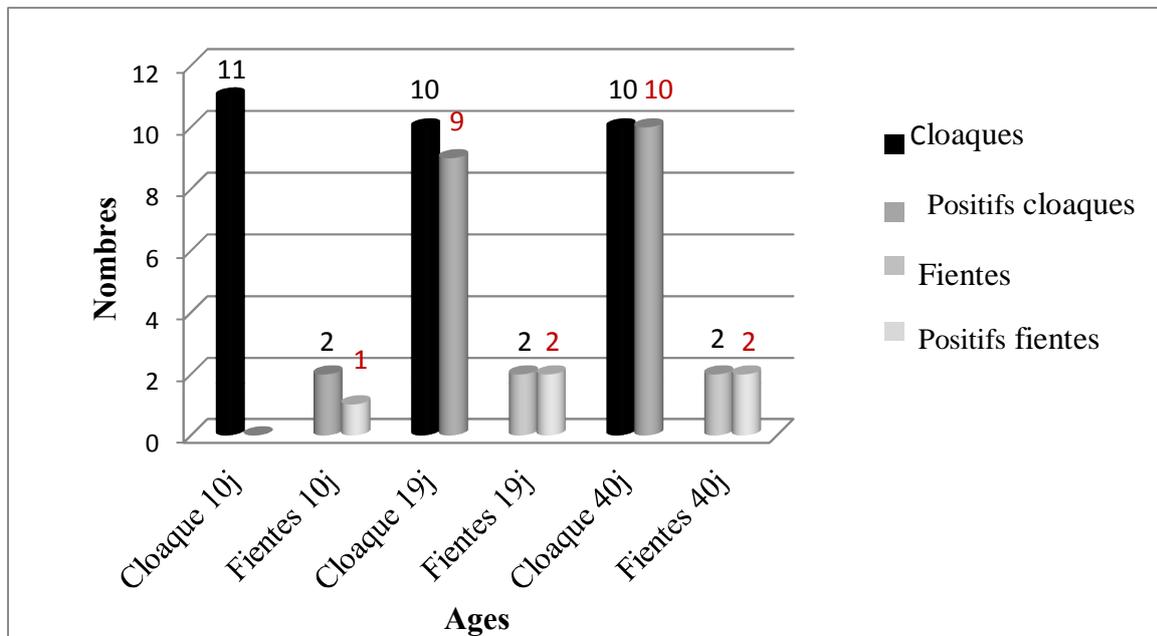


Figure III.5: Répartition des cas positifs selon l'âge (poussins/poules) et le type de prélèvement (enquête N°1)

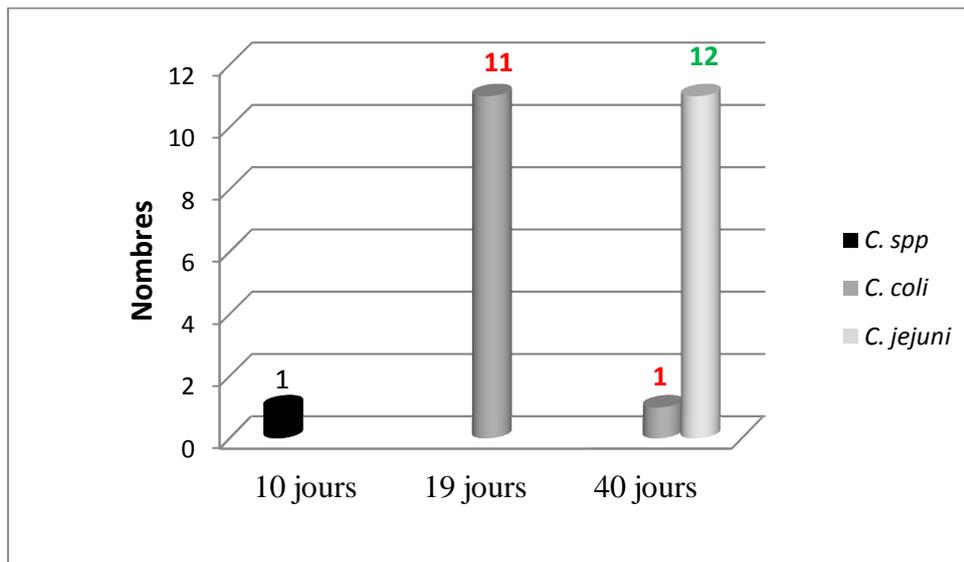
D'après l'histogramme nous pouvons constater qu'à l'âge de 10 jours des poussins aucune souche n'a été isolée au niveau du cloaque, et une souche de *Campylobacter* a été isolée au niveau des fientes.

A 19 jours, 9 prélèvements sur 10 effectués au niveau des cloaques et les 2 prélèvements de fientes étaient contaminés par *Campylobacter*.

A 40 jours, tous les prélèvements qu'ils soient effectués au niveau des fientes ou des cloaques étaient contaminés par *Campylobacter*.

Il est donc clair qu'à partir de la troisième semaine la quasi-totalité des prélèvements sont contaminés par cette bactérie.

Les différentes espèces retrouvées lors de cette enquête sont représentés dans la figure III.6.



**Figure III.6:** Répartition des espèces de *Campylobacter* isolées lors des trois sorties effectuées dans l'enquête N°1 selon l'âge des poussins/poules

Pour ce qui est de la répartition des espèces selon les sorties, nous avons trouvé un seul cas positif de *Campylobacter* issu des fientes des poussins de 10 jours. Nous n'avons pas pu identifier cette souche, cependant l'évolution des cas positifs montre que jusqu'au 19<sup>ème</sup> jour, nous n'avons isolé et identifié que des souches appartenant à

*Campylobacter coli*. Nous pouvons donc suspecter que la souche retrouvée lors de la première sortie appartient à *Campylobacter coli*. Celle-ci s'est propagée par la suite pour contaminer le reste de l'élevage, ce qui explique les résultats du 19<sup>em</sup> jour (tous des *Campylobacter coli*).

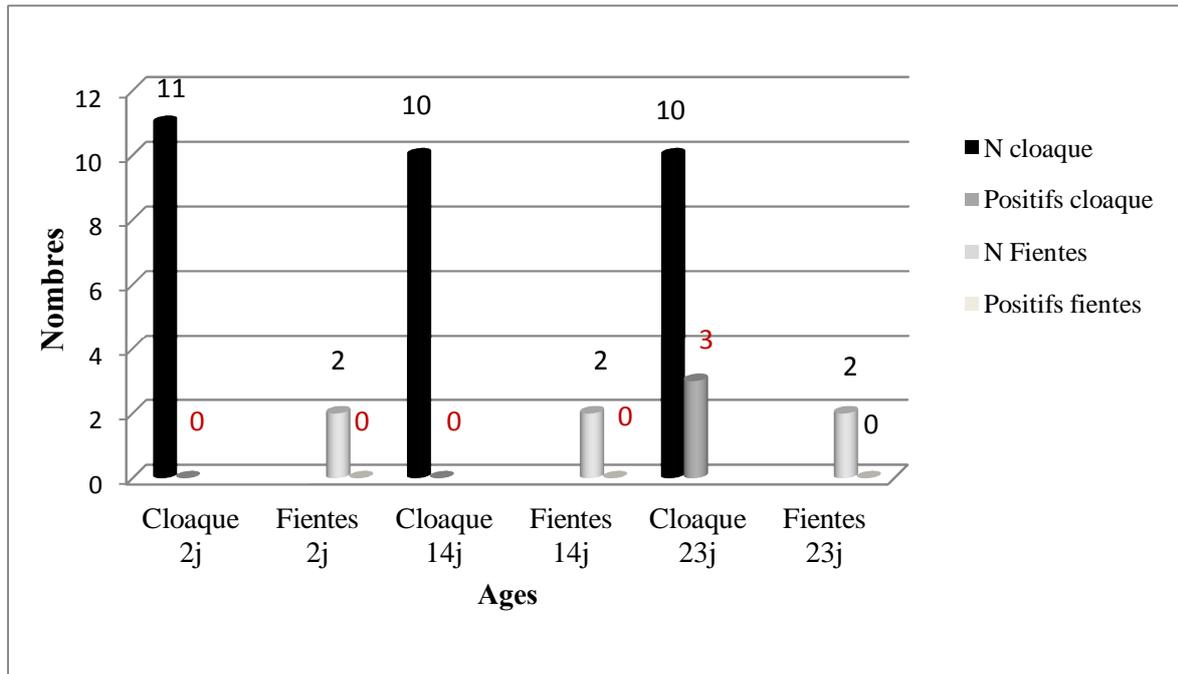
Il s'agirait donc d'une contamination engendrée par les éleveurs (mains, bottes, manipulation d'autres volailles, contact avec d'autres animaux) ou même par la vieille litière (Megraud et Bultel, 2004), car à cet âge on ne devrait trouver aucun *Campylobacter* au niveau du tractus digestif de la volaille.

A 40 jours, 12 souches appartiennent à l'espèce *Campylobacter jejuni*, ce qui correspond à l'apparition naturelle de cette espèce chez la volaille (Megraud et Bultel, 2004), et cependant subsistait une souche appartenant à *C. coli*.

Un autre point semble évident à partir des deux histogrammes (figure III.5, figure III.6) : il s'agit du fait que dès l'apparition de *Campylobacter jejuni* le taux de *Campylobacter coli* a significativement diminué, ceci pourrait être dû au fait que *Campylobacter jejuni* est plus adapté à la colonisation du tube digestif de la volaille (Megraud et Bultel, 2004).

### III.1.2.3. Enquête N°2

Cette enquête s'est effectuée dans un autre bâtiment, en respectant les mêmes conditions que la première. Pour cette enquête 3 souches ont été isolées. Selon le type de prélèvement ces souches se répartissent comme suit (Figure III.7):



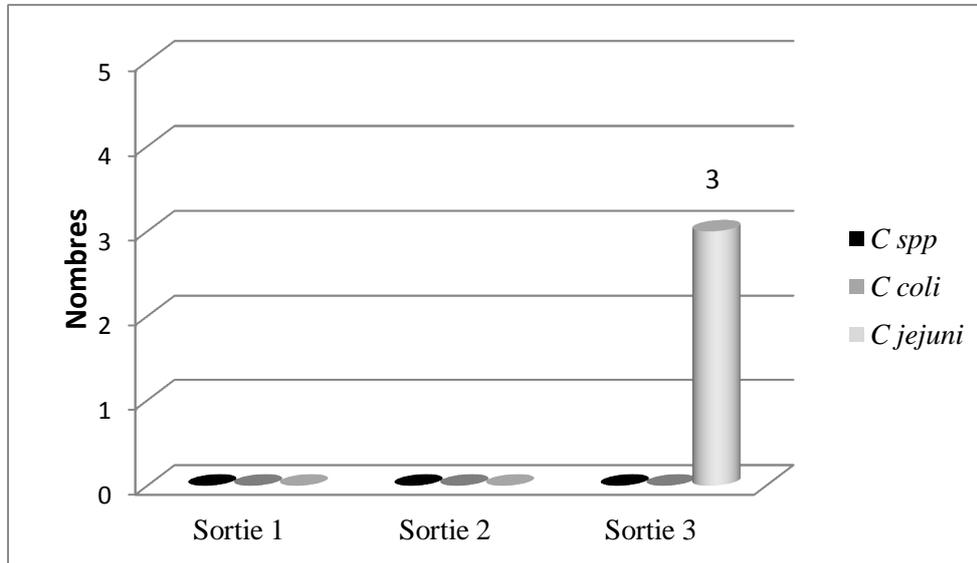
**Figure III.7:** Répartition des cas positif selon l'âge (poussins/poules) et type de prélèvement (enquête N°2)

Aucune souche n'a été isolée lors des deux premières sorties (à 2 jours et 14 jours). Lors de la troisième sortie (23 jours) trois souches ont été isolées au niveau des cloaques uniquement et aucune au niveau des fientes.

Ces résultats correspondent à une évolution normale de l'apparition de *Campylobacter jejuni* chez la volaille, puisque celui-ci apparaît de façon naturelle à partir de la troisième semaine de vie (Megraud et Bultel, 2004).

En effet ce même profil d'évolution est retrouvé lors de la première enquête pour *Campylobacter jejuni*.

Les différentes espèces retrouvées lors de cette enquête sont représentés dans la figure III.8.



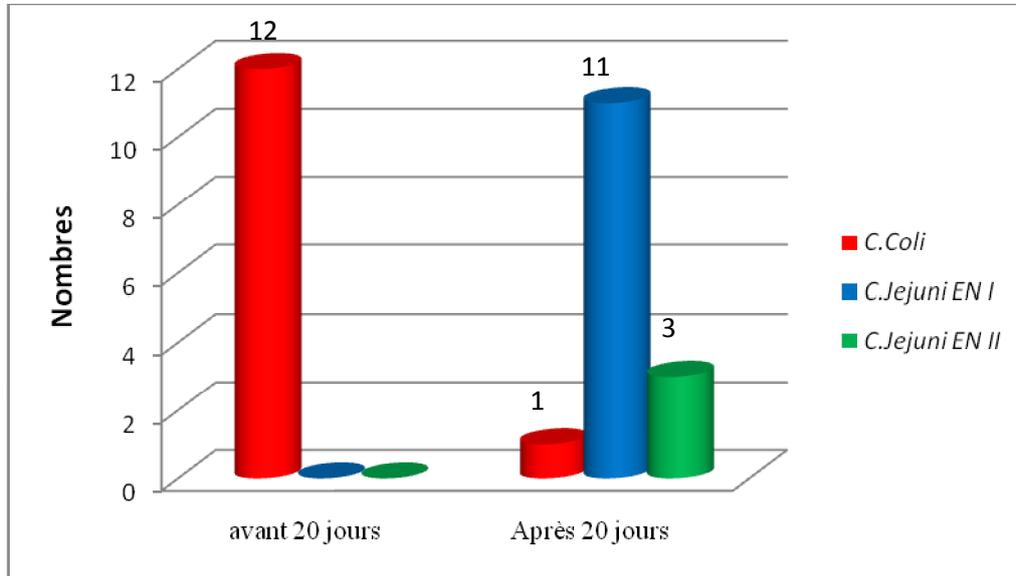
**Figure III.8:** Répartition des espèces de *Campylobacter* isolées lors des trois sorties effectuées dans l'enquête N°2

Pour ce qui est de *Campylobacter coli* aucune souche n'a été retrouvée durant cette enquête, ceci confirme que la présence *Campylobacter coli* de la première enquête était due à une contamination externe localisée dans le bâtiment où celle-ci a été réalisée.

Cette contamination ne s'est pas propagée à l'élevage de la deuxième enquête puisque les deux bâtiments sont séparés par une très grande distance et que celle-ci joue un rôle important dans la transmission de *Campylobacter* (Megraud et Bultel, 2004).

### III.1.2.4. Evolution des cas positifs selon les deux enquêtes

Une comparaison des taux de positivité entre les deux enquêtes a été effectuée. Les résultats sont représentés dans la figure III.9.



EN : enquête.

**Figure III.9:** Répartition des cas positifs selon les deux enquêtes.

Nous pouvons noter qu'avant 20 jours de vie des poussins/poules, aucune souche de *Campylobacter jejuni* n'a été isolée, seul *C. coli* a été retrouvé. Par contre, et à partir du 20<sup>ème</sup> jour de vie, 1 seule souche de *C. coli* a été isolée contre 14 souches de *C. jejuni*. Ceci rejoint les résultats obtenus par Luangtongkum (2005) qui n'a isolé aucune souche de *Campylobacter* chez la volaille avant l'âge de deux semaines. Lors de la troisième semaine de vie, seul *C. jejuni* a été isolé.

Nous avons également noté, à partir des informations recueillies au niveau du poulailler, que le taux de mortalité de la volaille durant l'enquête 1 était plus important que lors de l'enquête 2. La présence de *C. coli* à un âge très bas chez les poussins serait à l'origine de cette mortalité (OIE, 2008) car *C. jejuni* et *C. coli* entraînent de maladie chez la volaille que pour les sujets jeunes.

La prévalence de *Campylobacter* chez la volaille est associée à l'âge des poules. Plus les poules sont âgées, plus le taux de contamination est élevé (Newell and Fearnley, 2003). La colonisation du tube digestif de la volaille par *Campylobacter*, débute en général après la première ou la deuxième semaine de vie du poussin, et

augmente avec l'âge pour atteindre un pic à l'âge de l'abattage qui est de 6 à 7 semaines de vie (Padungton et Kaneene, 2003). Donc les poussins ne sont pas porteurs de *Campylobacter* à l'éclosion, mais ils sont rapidement infectés après une exposition dans leur environnement. Dans les élevages la contamination se fait entre la 2<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> semaine (OIE, 2008).

L'explication de ce phénomène de colonisation n'est pas très claire, cependant, il est possible que la présence des anticorps maternels chez le poussin aurait un rôle protecteur contre les *Campylobacter* durant les deux premières semaines de vie (Newell et Fearnley, 2003). Ou bien encore, et selon l'OIE (2008), les flores caecales des jeunes poussins sont protectrices dans les dix premiers jours, notamment entre J3 et J7, elles inhiberaient l'implantation du *Campylobacter*. Ceci corrobore notre hypothèse disant que la présence de *Campylobacter* dans les fientes à J10 serait due à une contamination étrangère.

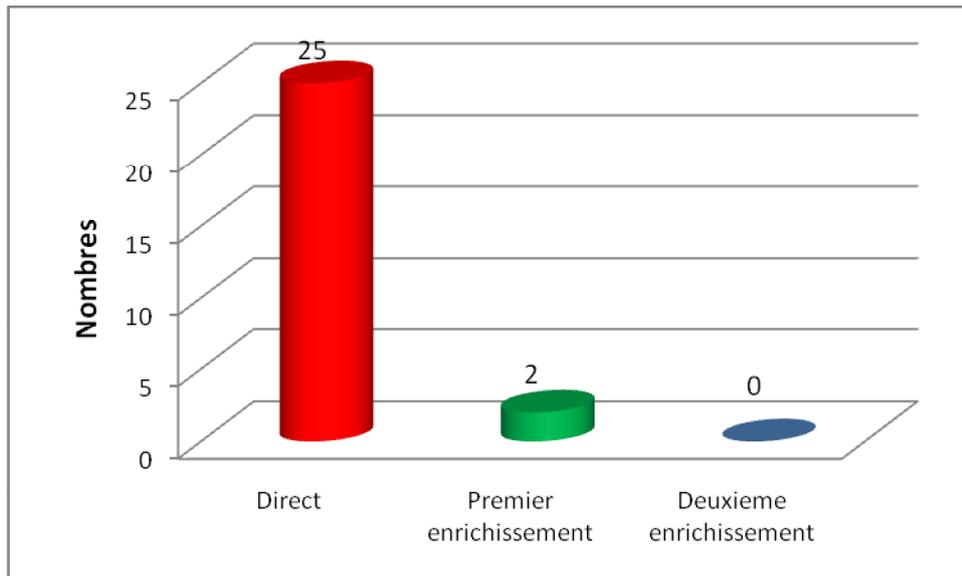
Mais une fois le *Campylobacter* introduit dans l'élevage, la dissémination est rapide (à partir de la troisième semaine de vie en général) et l'environnement est contaminé (Sahin et al., 2002) pouvant atteindre 100% de la population en 24 heures (OIE, 2008). La transmission de ce *Campylobacter* peut être horizontale, à partir de sources environnementales (Newell et Fearnley, 2003), ou verticale, à partir des éleveurs (Pearson et al., 1996).

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que les volailles sont généralement plus contaminées par *C. jejuni* (65 à 95% des cas) que par *C. coli* (Cortez et al., 2006 ; Hussain et al., 2007 ; OIE, 2008). D'ailleurs nous notons une nette diminution de la contamination des poussins/poules par *C. coli* dès l'apparition de *C. jejuni*.

Lors de leur étude, Weber et al. (2014) ont étudié la présence de *Campylobacter* chez la dinde, le canard (2 espèces) et les poulets de chair. Les canards étaient les premiers à être contaminés par *Campylobacter* (20% durant la 1<sup>ère</sup> semaine de vie), suivis par les poules et les dindes (durant la deuxième semaine de vie et jusqu'au 150<sup>ème</sup> jour). Le taux maximum de contamination obtenu était de 59,6%, 68,2% et 76,1% pour le poulet de chair, et les deux espèces de canards, respectivement.

### III.1.2.5. Répartition des cas positifs selon les stades d'enrichissement

Certaines souches ont été isolées à partir du prélèvement direct, d'autres ont nécessité un enrichissement. Ces résultats sont représentés dans la figure III.10.



**Figure III.10:** Nombre des cas positifs isolés selon le stade d'enrichissement pour l'étude 1

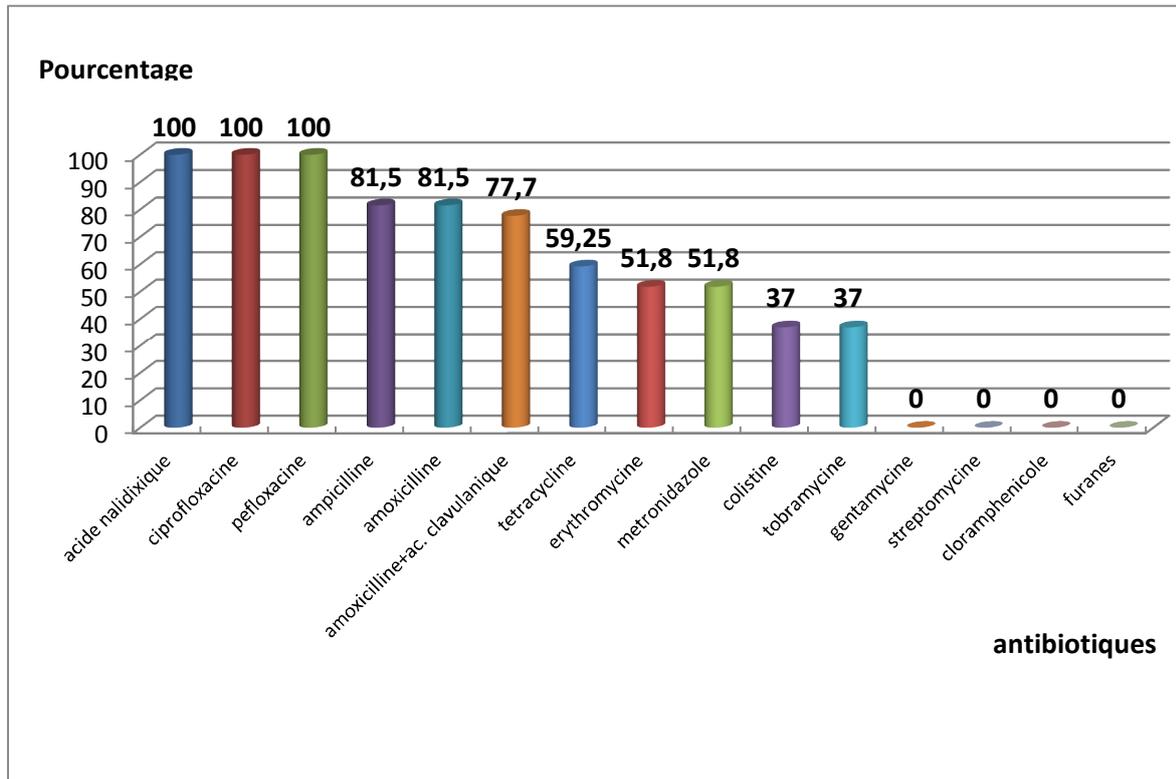
Ces résultats indiquent que la majorité des cas (25/27) des souches ont été isolés du direct, seules deux souches ont été isolées à partir du premier enrichissement.

Les échantillons à partir desquels nous avons isolé les souches *Campylobacter* au direct étaient suffisamment contaminés pour permettre la croissance de *Campylobacter* sans nécessiter un passage par l'enrichissement, contrairement aux deux souches isolées du premier enrichissement qui ont nécessité une phase d'enrichissement pour pouvoir pousser.

Il est de ce fait clair que l'enrichissement permet d'augmenter les chances d'isoler *Campylobacter*, pour les prélèvements faiblement contaminés par *Campylobacter*. Ceci est également préconisé par OIE (2008).

### III.1.2.6. Etude de la résistance des *Campylobacter* aux antibiotiques (figure III.14)

La figure III.11 représente le profil d'antibiorésistance des 27 souches de *Campylobacter* isolées.



**Figure III.11:** Profil global d'antibiorésistance des souches de *Campylobacter* isolées lors de l'étude 1 (poulailler)

Il apparaît d'après la figure III.11 que les *Campylobacter* résistent de façon très importante aux quinolones (Ac.Nalidixique (NA) 100%, Ciprofloxacine (CIP) 100%, Pefloxacine (PEF) 100%).

Aux Etats Unis, en 1995 des études ont montré l'augmentation du profil de résistance des *Campylobacter* aux Quinolones. Cette augmentation de résistance serait due à l'utilisation des antibiotiques de cette famille en élevage de volaille, et selon certaines études à des mutations au niveau de la région dite « Quinolone Resistance Determining Region » (QRDR) du gène gyr A (Megraud et Prouzet-Mauléon, 2004). Selon l'étude de Luangtongkum (2005) les *Campylobacter* issus de l'élevage biologique, où aucun antibiotique n'est utilisé, de poules et de dindes présentaient moins de résistance aux antibiotiques par rapport à ceux isolés des autres élevages.

Ceci démontre clairement l'influence de l'administration des antibiotiques lors des élevages sur le profil d'antibiorésistance des souches de *Campylobacter*.

Une résistance relativement élevée (de 74 à 81%) est également notée pour les -lactamines. Cette résistance concorde avec les résultats observés dans l'étude menée par Megraud et Prouzet en 2004 où la résistance à l'amoxicilline (AMX) variait entre 40 et 50%. Cette résistance est due à la présence d'un gène responsable de la production de  $\beta$ -lactamases.

Pour ce qui est de l'Erythromycine (E) et la Tétracycline (TE), une résistance moyenne est retrouvée (51 à 55%). Celle-ci pourrait être due à l'utilisation de ces deux antibiotiques dans les fermes d'élevages comme additifs alimentaires afin de bien accélérer le développement de la volaille (Lehtopolku, 2011) nous signalons que dans notre cas, l'érythromycine a été administrée dès le premier jour des poussins, ce qui pourrait expliquer ce pourcentage.

Selon l'étude de Guévremontet *al.* au Canada en 2006, le pourcentage de résistance des souches de *Campylobacter* à la tétracycline variait de 50 à 66%, suivi par l'ampicilline avec 12 à 22% de taux de résistance (et ce en fonction des espèces).

Une résistance à la colistine (CS) a été observée avec un taux de 37%. De même que l'érythromycine, la colistine a été administrée dès le premier jour des poussins, ce qui expliquerait l'apparition de résistance à cet antibiotique.

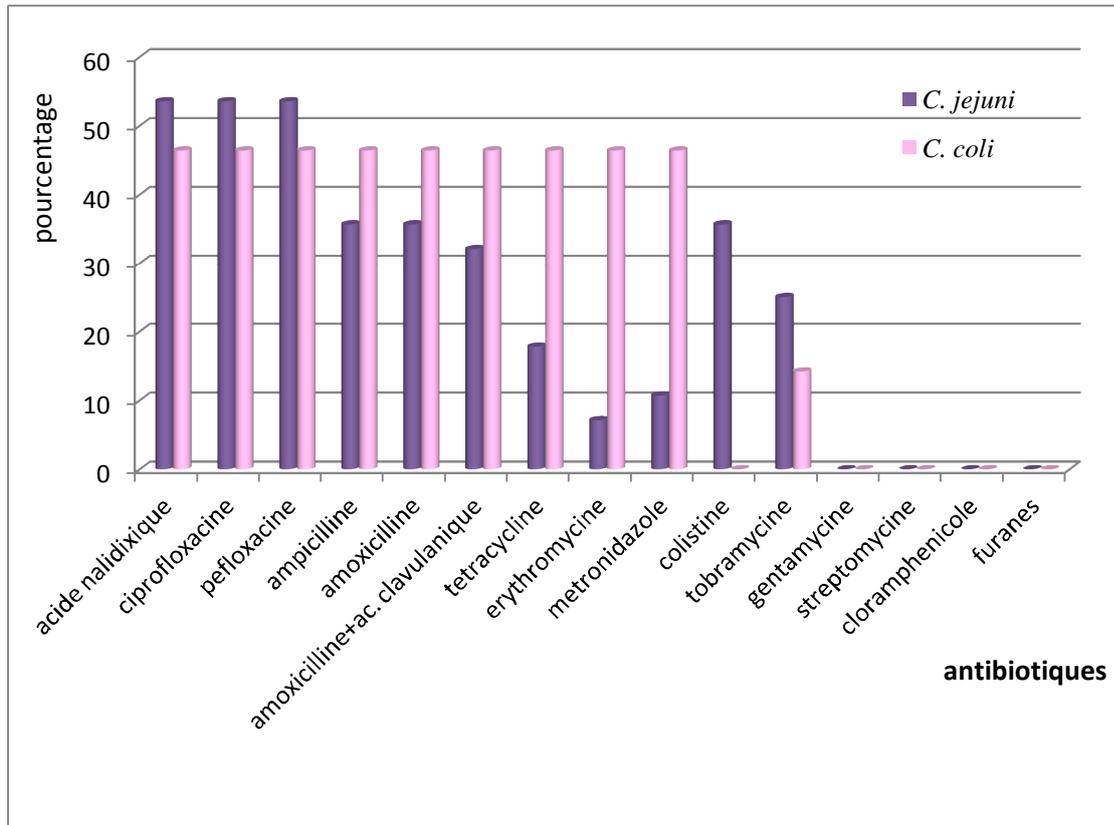
Une autre résistance est à noter : celle de la tobramycine (TB) avec un pourcentage de 37%.

Aucune résistance n'a été constatée pour la streptomycine (S), Gentamicine (CN), Furanes (F) et Chloramphénicoles (C) contrairement à l'étude de Guévremont et *al.* (2006) qui a obtenu un taux de résistance de 50% à la streptomycine.

Pour le Métronidazole (MZ), sur les 27 souches 13 étaient résistantes, elles appartiennent à l'espèce *Campylobacter coli*.

#### **III.1.2.6.1. Etude du profil d'antibiorésistance des souches selon l'espèce**

Une comparaison entre les profils de résistance aux antibiotiques des deux espèces a été effectuée. Les résultats sont donnés par la figure III.12.



**Figure III.12 :** Profil d'antibiorésistance des souches de *Campylobacter* isolées selon l'espèce durant l'étude I

De façon générale il semble que les deux espèces de *Campylobacter* réagissent de la même manière aux différents antibiotiques utilisés à l'exception de quelques-uns : la Tétracycline et l'Érythromycine pour lesquelles les souches de *Campylobacter coli* montrent une plus forte résistance 46% *Campylobacter coli* versus 17% *Campylobacter jejuni* pour la Tétracycline et 46% *Campylobacter coli* versus 7% *Campylobacter jejuni* pour l'Érythromycine. Cette différence est également observée pour le métronidazole et pour la colistine (aucune résistance pour *C. coli*).

Ceci est dû au fait que 95 à 100% des *Campylobacter coli* sont résistants au Métronidazole (Don et al., 2005). Selon certaines études, cette résistance est variable pour *Campylobacter jejuni*, dans notre étude 10% des souches de *Campylobacter jejuni* isolées sont sensibles à cet antibiotique.

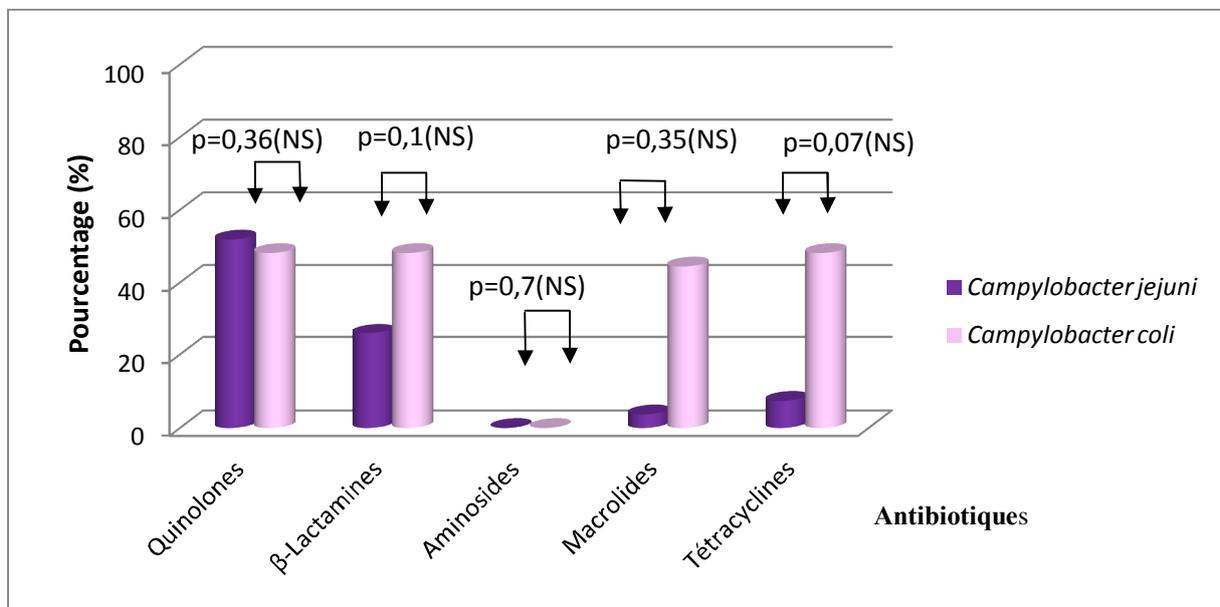
Cette différence est également notée pour la résistance aux  $\beta$ -lactamines, pour lesquelles *Campylobacter coli* semble montrer plus de résistances.

Par ailleurs *Campylobacter jejuni* est plus résistant aux quinolones que *Campylobacter coli*.

Selon l'étude de Guévremont et *al.* au Canada (2006) les souches de *Campylobacter* isolées de volaille présentaient des résistances relativement différentes selon les espèces. Les taux de résistance étaient de 50 et 66% pour la tétracycline, de 50 et 17% pour la streptomycine et de 12 et 9% pour l'ampicilline, pour *C. coli* et *C. jejuni* respectivement pour chaque antibiotique.

Pour vérifier si les différences observées sont significatives, une comparaison entre les pourcentages observés selon le test statistique a été effectuée, ce qui permet de calculer le degré de signification « p » entre ces pourcentages en utilisant une variable normale centrée réduite epsilon « z » (annexe 7).

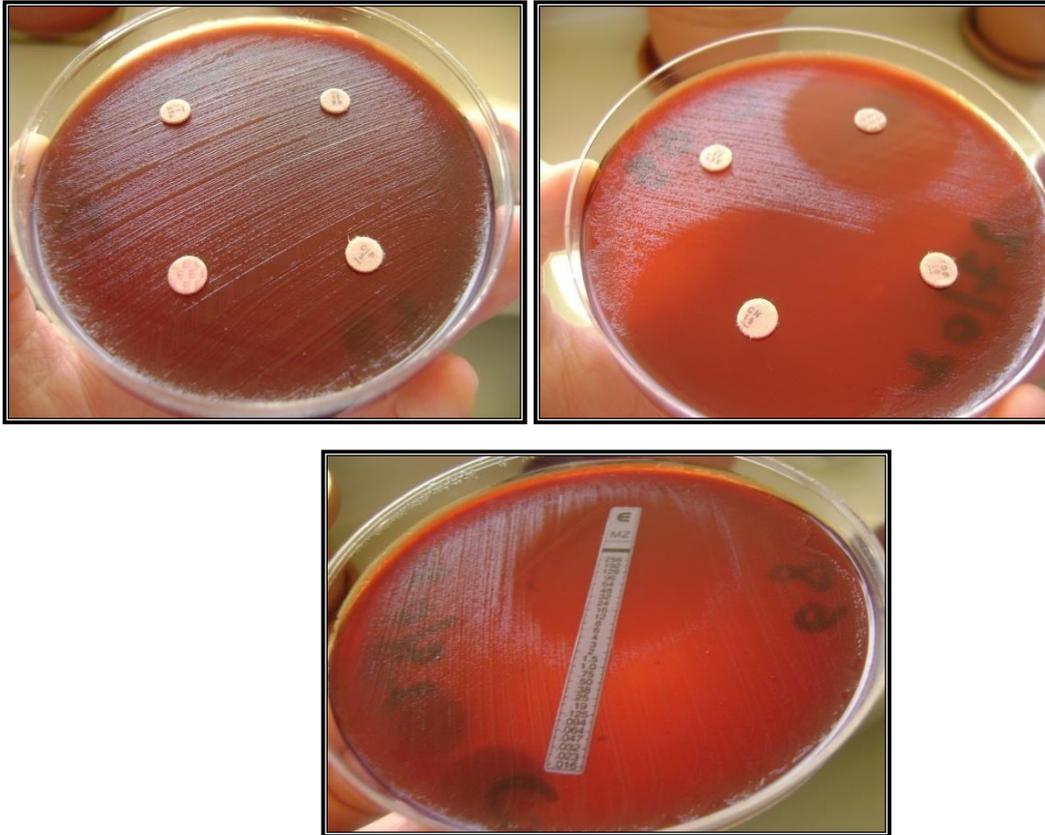
Le résultat du calcul statistique est représenté dans la figure III.13.



**Figure III.13:** Comparaison statistique du profil d'antibiorésistance des souches de *Campylobacter* isolées (étude 1) selon les familles d'antibiotiques

NS : différence non significative.

Dans notre cas, au risque d'erreur de 5%, l'étude statistique montre que cette différence est due au hasard puisqu'il s'agit des β-lactamines, des quinolones ou même des macrolides le degré de signification est supérieur à « 0,05 », cette différence est donc non significative.



**Figure III.14 :** Résultats d'un antibiogramme réalisé sur gélose Columbia (incubation à 37°C pendant 48 heures en micro aérobie).

### III. 1.3. MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

#### III.1.3.1. Enquête 2 au niveau des rôtisseries

A partir des 109 échantillons analysés, 3 souches de *Campylobacter* ont été isolées, celles-ci ont été soumises à différents tests d'identification

##### III.1.3.1.1. Répartition des cas positifs selon les types de prélèvements

Les résultats de nos analyses sur le poulet rôti selon les différents types de prélèvements sont rassemblés dans le tableau suivant :

**Tableau III.2** : répartition des cas positifs selon les points de prélèvements

<b>Différentes types de prélèvement</b>	<b>Nombre d'échantillons</b>	<b>Nombre cas positifs</b>	<b>Le pourcentage de Positivité</b>
<b>Cou et carcasse</b>	49	/	/
<b>Croupion</b>	39	03	7,69
<b>Sauce</b>	18	/	/

Contrairement aux résultats de l'étude menée par Taright et *al.* en 2005 qui ont effectué un échantillonnage par la Méthode NF-ISO-10272 qui consiste à prélever 25g des différentes parties du poulet et qui ont trouvé une fréquence de 44,44% de cas positifs sur des échantillons de cou et de carcasse, nous avons remarqué une absence de *Campylobacter* sur des échantillons effectués par écouvillonnage sur le cou et la carcasse et même la sauce. Cette variation peut être due à :

- La différence entre les deux méthodes est que la méthode ISO-10272 donne des meilleurs résultats que la méthode d'écouvillonnage, car la quantité analysée est plus importante (25g) ce qui augmente le nombre de chance d'isoler la bactérie
- Leurs échantillons étaient tous crus contrairement à nos échantillons dont le taux de poulets crus représente 10,09%

Par contre tous les cas positifs étaient isolés à partir des échantillons effectués sur le croupion. Cela concorde avec les études menées par plusieurs chercheurs. En 2004 Berrang et *al.* ont noté que l'opération d'éviscération et la rupture des viscères conduit à une contamination fécale et donc une présence significative des *Campylobacter* dans la zone du croupion, car l'intestin du poulet est le réservoir naturel de ce genre de germe (Rosenquist et *al.*, 2006).

### III.1.3.1.2. Répartition des cas positifs selon l'espèce

D'après les résultats d'identifications, tous les isolats appartiennent à l'espèce *Campylobacter jejuni*. La majorité des études révèlent que le poulet et la volaille en général représentent la principale source de contamination et de transmission de *Campylobacter jejuni* (Lawson et al., 1999). Cela est dû à la présence naturelle des souches *Campylobacter jejuni* dans les intestins de volaille.

### III.1.3.1.3. Répartition des cas positifs selon les différents stades de cuisson du poulet

Le tableau ci-dessous rassemble les résultats de la répartition des cas positifs selon les différents stades de cuisson du poulet rôti

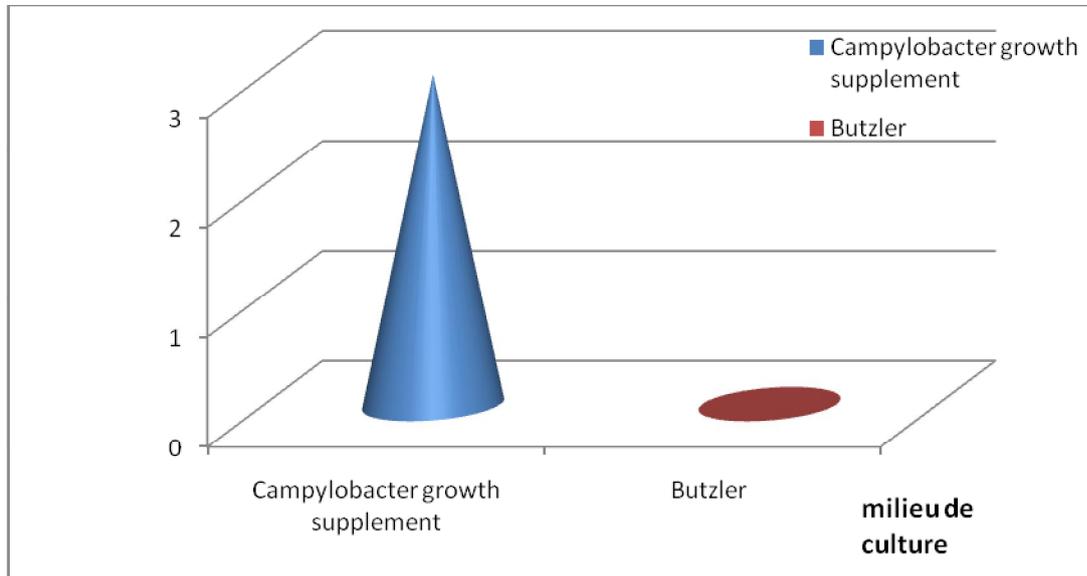
**Tableau III.3:** Répartition des cas positifs selon les différents stades de cuisson du poulet

	Nombre d'échantillons	Nombre de cas positifs	Le taux de positivité
<b>Cru</b>	11	03	27,27
<b>Demi-cuit</b>	59	/	/
<b>Cuit</b>	21	/	/
<b>Sauce</b>	18	/	/

- ↳ Selon le tableau ci-dessus nous avons constaté la présence des *Campylobacter* dans des échantillons de poulet cru, et aucune souche n'a été isolée des échantillons de poulet cuit et demi-cuit, ceci est sans doute dû à l'effet de la température élevée durant la cuisson.
- ↳ En 2007, Corry et al ont montré que l'augmentation de la température pendant la cuisson augmente la réduction de la charge microbienne de 75%. Et des traitements des poulets par une température de 75°C pendant 30 minutes éliminent les bactéries mésophiles, les entérobactéries et les *Campylobacter*.

### III.1.3.1.4. Répartition des cas positifs selon le milieu d'isolement

La figure III.15 représente la fréquence de répartition de *Campylobacter* isolé selon les milieux utilisés.



**Figure III.15 :** Répartition des cas positifs selon le milieu d'isolement

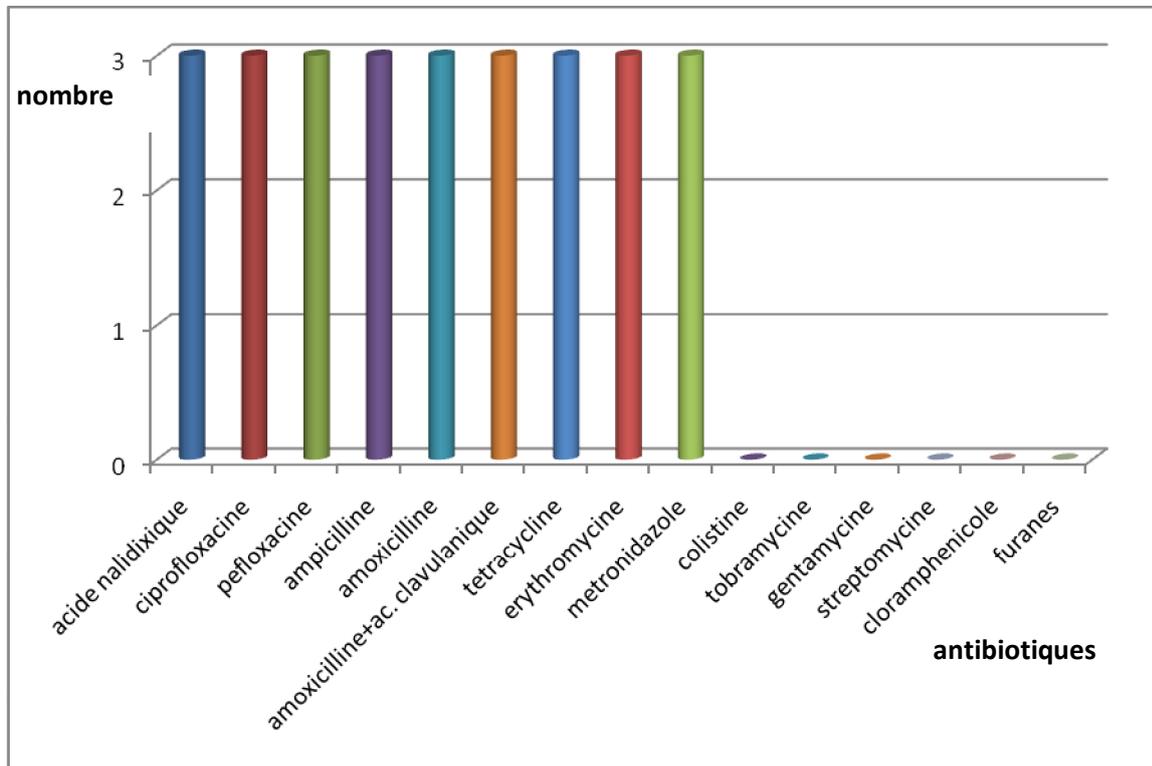
D'après les résultats nous constatons que le milieu CG s'est avéré le plus efficace quant à l'isolement des *Campylobacter*. Ceci est probablement dû à l'association de la solution d'antibiotiques (Butzler) qui réduit la flore compétitive et le supplément qui renforce la croissance des *Campylobacter*.

### III.1.3.1.5. Répartition des cas positifs selon les stades d'enrichissement

Ces résultats indiquent que 2 souches sur 3 que nous avons pu isoler sont issues du direct, et qu'une seule souche a été isolée à partir du premier enrichissement. Les échantillons à partir desquels nous avons isolé les souches de *Campylobacter* au direct étaient suffisamment contaminés pour permettre la croissance de cette bactérie sans nécessiter un passage, à l'enrichissement ; contrairement à la troisième souche isolée du premier enrichissement qui a nécessité une phase d'enrichissement pour pouvoir pousser. Bien que le nombre de souches ne soit pas important, ces résultats montrent que les enrichissements peuvent être utiles pour l'isolement du *Campylobacter* à partir des prélèvements faiblement contaminés par ce germe.

### III.1.3.1.6. Etude de la sensibilité des *Campylobacter* aux antibiotiques

La figure III.16 représente le profil de résistance des souches des *Campylobacter* isolées lors de l'étude 2 aux différents antibiotiques.



**Figure III.16 :** profil d'antibiorésistance des souches de *Campylobacter* isolées lors de l'étude 2 (rôtisseries de poulets)

Vu le nombre réduit de souches isolées sur lesquelles nous avons réalisés les antibiogrammes, il est difficile de comparer ces données aux différentes études précédentes, mais nous pouvons quand même dire que :

La résistance est de 100% (soit 3 souches sur 3) pour la plupart des antibiotiques : les quinolones, les  $\beta$ -lactamines, la Tétracycline, l'Erythromycine et le Métronidazole.

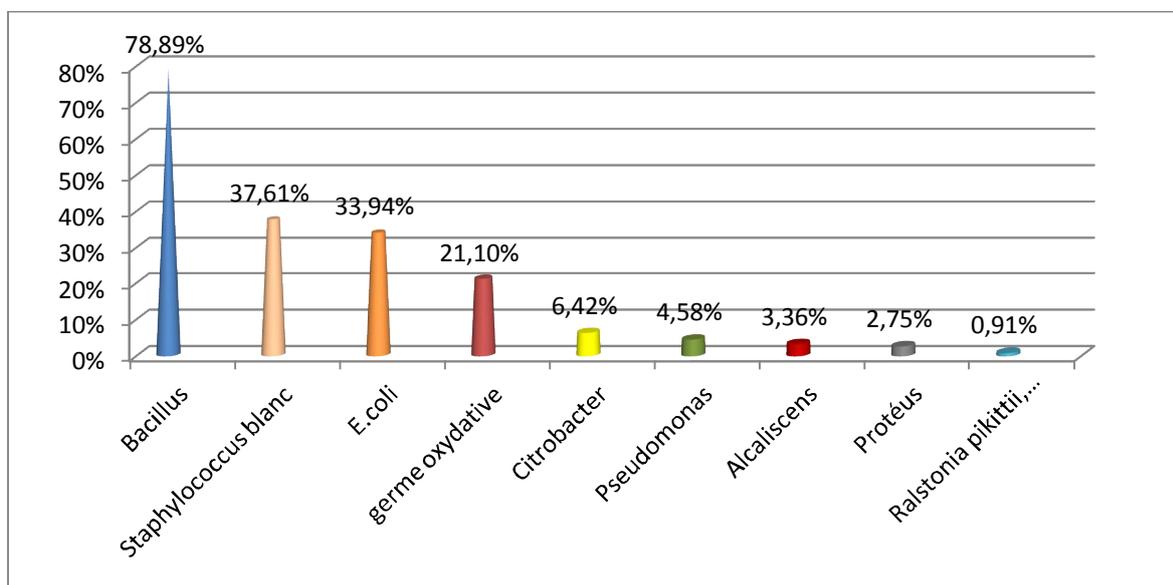
Aucune résistance n'a été observée pour les Aminosides (Tobramicine, Streptomycine, Gentamicine), les Furanes, la Colistine et le Chloramphénicol.

### III.1.3.1.7. Isolement et identification des autres bactéries

Durant notre étude nous avons tenté de rechercher les *Campylobacter* dans le poulet rôti mais aussi d'autres bactéries pathogènes tels que les entérobactéries pathogènes, les staphylocoques qui représentent une cause majeure des toxi-infections alimentaires bactériennes dans la restauration collective.

Les 109 prélèvements analysés ont donné les résultats suivants.

#### ➤ Etude des fréquences de contamination selon le genre ou l'espèce (figure III.17)



**Figure III.17 :** Fréquences de contamination des bactéries isolées lors de l'étude 2

- Nos résultats démontrent une prédominance de contamination par le *Bacillus* avec une fréquence de 78,89%. Cette contamination par cette bactérie ubiquitaire est peut être due aux appareils de rôtissage qui n'étaient pas hermétiquement fermés et exposés à la pollution extérieure sur les trottoirs.
- La fréquence de contamination par le Staphylocoque non pathogène est de 37,6%. Etant donné que cette bactérie est ubiquitaire commensale de la peau, et qu'il est présent chez pratiquement 100% des êtres humains, donc sa présence s'explique par une mauvaise manipulation hygiénique du personnel.

- ↳ La présence des entérobactéries *et E. coli* avec une fréquence de 42,22% et 33,94% respectivement s'avère inquiétante car d'après l'agence canadienne d'inspection ce germe représente un critère de vérification d'hygiène appliquée pour les rôtisseries, et la présence de ce germe est un indice de contamination fécale récente.
- ↳ La présence des bactéries comme *Proteus* et *Alcaliscens* entraînent une altération organoleptique du poulet rôti. Leur présence s'explique par une mauvaise manipulation hygiénique du personnel et/ou contamination par pollution extérieure.

#### ➤ Etude des fréquences de contamination selon l'état du poulet

Notre étude a révélé que 74,86% des échantillons effectués sur le poulet cuit et sur la sauce du poulet rôti étaient contaminés par les mêmes germes des échantillons effectués sur le poulet cru et le poulet insuffisamment cuit (demi cuit). Cela semble être anormal, car un traitement thermique (80°C-100°C) suffit pour détruire tous les micro-organismes sous leurs formes végétatives (Stumbo, 1973). Ceci peut être causé par une re-contamination du poulet cuit et de la sauce par le poulet cru ou celui qui est insuffisamment cuit, car dans la majorité des rôtisseries les poulets sont situés comme suit :

- La rôtissoire la plus haute contient les poulets crus.
- la moyenne rôtissoire contient les poulets demi-cuits ou insuffisamment cuits.
- Et les poulets cuits se situent dans les rôtissoires les plus basses et la sauce en dessous.

Selon les rôtisseurs la rôtissoire qui se situe en haut reçoit plus de chaleur, pour cela ils mettent le poulet cru sur cette rôtissoire pour gagner du temps

D'un autre côté, nous déplorons l'état d'hygiène aussi bien des poulets que des frigos ou paillasse où sont entreposés ces derniers. Il faut dire aussi que si ces poulets présentaient déjà au départ une qualité hygiénique irréprochable, les résultats seraient plus satisfaisants. Pour garantir cet état hygiénique, plusieurs études ont été menées pour limiter les contaminations au niveau des carcasses. Par exemple des études menées par Corry et *al.* en 2007 ont montré que le traitement des carcasses par des détergents chimiques tel que le chlore et les traitements physiques à l'eau chaude au niveau des abattoirs réduit de 75% le nombre de différents microorganismes et *Campylobacter* dans les carcasses du poulet.

### III.1.3.2. Prélèvements alimentaires

Sur les 346 échantillons analysés, 62 souches de *Campylobacter* ont été isolées soit un pourcentage d'isolement de 18%.

Les tests biochimiques réalisés ont permis d'identifier les différentes espèces :

- ✓ 53 souches appartenant à l'espèce *Campylobacter jejuni*
- ✓ 1 souche appartenant à l'espèce *Campylobacter fetus*
- ✓ 1 souche appartenant à l'espèce *Campylobacter coli*
- ✓ 7 souches appartenant à *Campylobacter spp*

#### III.1.3.2.1. Répartition des cas positifs à *Campylobacter* en fonction du type de prélèvements de poulets

Le tableau suivant résume les nombre et fréquence des prélèvements alimentaires contaminés par *Campylobacter*.

**Tableau III.4** : Fréquences (%) des contaminations par *Campylobacter* en fonction du type de prélèvements de poulets

Type de prélèvement	Nombre et Fréquence (%) des prélèvements positifs à <i>Campylobacter</i>
Cou (n = 121)	19 (15,7%)
Gésiers (n = 71)	19 (26,8%)
Foies (n = 64)	6 (9,4%)
Cò urs (n = 50)	10 (20,0%)
Foies + Cò urs (n = 29)	8 (27,6%)
Ailes (n = 11)	0 (0,0%)

Comme le montre le tableau III.4, les *Campylobacter* ont principalement été isolés à partir des prélèvements de gésiers (26,8% d'échantillons positifs) et des abats foie ou cò ur (au total, 16,8% des échantillons, les cò urs étaient légèrement plus souvent positifs mais de façon non significative (20%) que les foies (9,4%)) alors qu'aucune bactérie du genre *Campylobacter* n'a été isolée à partir des prélèvements d'ailes. Les cous se sont avérés contaminés dans 15,7% des cas. Néanmoins, les fréquences d'isolement des *Campylobacter* à partir des différents types de prélèvements (cou, gésiers, foie et cò ur) n'ont pas présenté de différence statistiquement significative.

Dans la présente étude, le pourcentage d'isolement des espèces de *Campylobacter* des différents types de prélèvements de poulets, principalement à partir des abats (gésiers, cò urs et foie) a été globalement de 17,9%, ce qui suggère une contamination relativement large par ces bactéries des poulets en Algérie.

Néanmoins, les dindes seraient plus souvent contaminées comme l'a montré une étude de 1985 menée par Dromigny *et al.* qui ont constaté que 40% des cò urs et 20% des foies contenaient des *Campylobacter*.

En revanche, le taux de positivité des cous observés ici est resté relativement faible (15,7%) alors que des pourcentages nettement plus élevés ont été obtenus dans 2 précédentes études, de 84% et de 80%. D'après Berrang *et al.* (2006), la contamination des cous serait secondaire à une contamination des voies aériennes et de même

Rosenquist *et al.* ont conclu que la contamination des carcasses par *Campylobacter* était plus élevée au niveau du cou lors de l'éviscération des poulets.

En outre, la principale espèce identifiée dans cette étude a été *Campylobacter jejuni*, ce qui corrobore les précédentes enquêtes réalisées chez les volailles (Dromigny *et al.*, 1985), mais *Campylobacter fetus* et *Campylobacter coli* ont également été identifiées de façon tout à fait ponctuelles. Ces résultats concordent avec ceux de Jorgensen *et al.* pour lesquels le pourcentage d'isolement de *Campylobacter jejuni* était de 98% alors que celui de *Campylobacter coli* était de 2%. Néanmoins, 7 autres souches non identifiées ont aussi été isolées à partir des prélèvements de poulets.

### III.1.3.2.2. Répartition des cas positifs à *Campylobacter* en fonction du milieu de culture et du stade d'enrichissement

Le tableau suivant donne les fréquences des cas positifs à *Campylobacter* selon le milieu de culture utilisé et le stade d'enrichissement.

**Tableau III.5** : Fréquences d'isolement des souches de *Campylobacter* (%) à partir des prélèvements de poulets en fonction des milieux de culture utilisés et des stades d'enrichissements.

<b>Fréquence d'isolement de <i>Campylobacter</i> (%)</b>	
<b><i>Milieux de culture</i></b>	
Butzler	52 (84%)
CG	38 (61%)
Columbia avec filtre	16 (26%)
Skirrow	7 (11%)
<b><i>Stade d'enrichissement</i></b>	
Suspension directe	29 (46,7%)
1 <sup>er</sup> enrichissement	21 (13,3%)
2 <sup>ème</sup> enrichissement	8 (13,3%)
3 <sup>ème</sup> enrichissement	4 (6,7%)

La grande majorité des souches (84%) ont été isolées à partir du milieu Butzler et 61% d'entre elles ont pu être isolées à partir du milieu CG alors que les 2 autres milieux de culture utilisés, Columbia avec filtre et Skirrow, ont donné des pourcentages d'isolement statistiquement plus faibles ( $p < 0,05$ ), respectivement de 26% et de 11% (Tableau III.5). Près de 47% (29 cas) des souches ont été isolées à partir de la suspension de base, 13,3% à partir du premier et du 2<sup>ème</sup> enrichissement, 6,7% à partir du 3<sup>ème</sup> enrichissement. Les souches isolées lors du 3<sup>ème</sup> enrichissement étaient issues de prélèvements conservés à +10°C pendant plus de 48 heures. Ainsi, près de 53% des souches n'ont été obtenues qu'après au moins un enrichissement (Tableau III.5).

Les milieux de culture les plus adaptés à la culture de *Campylobacter* ont été le milieu de Butzler et le milieu CG dans cette étude permettant d'isoler respectivement 84 et 61% des souches.

En effet, la présence de certains additifs tels que le pyruvate de sodium, le sulfate ferreux et le métabisulfite de sodium dans le milieu CG favoriserait la croissance des bactéries du genre *Campylobacter*. Il apparaît en effet important de développer des protocoles adéquats d'isolement des bactéries ainsi que les milieux de cultures les plus aptes au développement bactérien pour pouvoir mettre en évidence facilement et rapidement les *Campylobacter* dans les denrées animales (Beuchat, 1985 ; Josefsen et al., 2003).

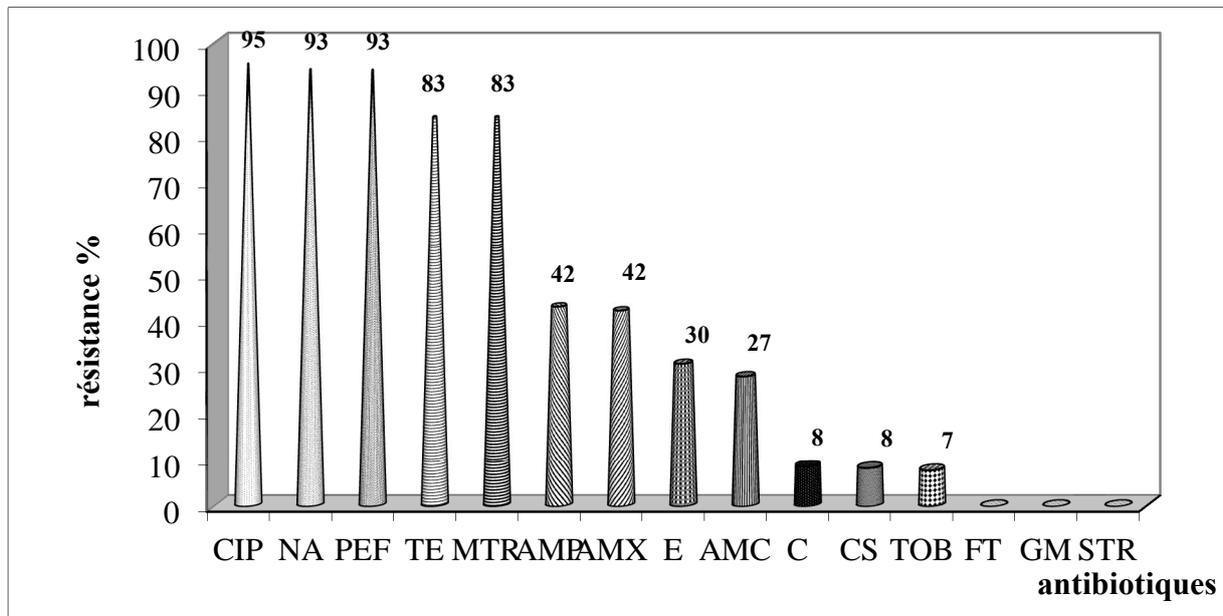
L'isolement direct des *Campylobacter* à partir d'une suspension de base comme cela a été le cas ici dans 47% des prélèvements positifs traduit une forte contamination des prélèvements par *Campylobacter*. Cependant, au moins un enrichissement a été nécessaire pour isoler les bactéries dans environ 53% des cas, les substances sélectives contenues dans les différents milieux favorisant la croissance de *Campylobacter* en diminuant la microflore compétitive.

La température de conservation des suspensions bactériennes et des milieux ensemencés est un paramètre important à prendre en considération, Davis et Connert (2007) ayant noté que la survie de *Campylobacter* était plus élevée à +4°C qu'à +10°C. Au total, plusieurs facteurs peuvent ainsi influencer le taux de contamination des carcasses de poulets par *Campylobacter* tels que l'aération et la température de stockage (Cole et al., 2004), l'âge de la volaille, son transport et la saison d'abattage (Mc Crea et al., 2006). L'abreuvement en eau constitue aussi une source potentielle de contamination par *Campylobacter*, et plusieurs études (Chaveerach et al., 2004 ; Hilmarsson et al., 2006) ont reporté que l'addition dans l'eau de boisson d'acides

organiques ou de glycérol prévenait la présence des *Campylobacter* non seulement dans l'eau de boisson mais aussi diminuer la fréquence de contamination des carcasses de poulets sans aucune contrepartie sur la croissance des animaux. De même, Berrang *et al.* (2003) ont noté que la présence de ces acides organiques dans le cloaque des poulets diminuait la contamination de la peau par *Campylobacter* après éviscération. Corry *et al.* (2007) ont noté que l'immersion des carcasses de poulets dans de l'eau chaude pendant quelques instants, diminuait le nombre de *Campylobacter* sur ces dernières.

### III.1.3.2.3. Profil d'antibiorésistance des souches de *Campylobacter*

La figure III.18 représente les différents taux de résistance des *Campylobacter* aux différents antibiotiques étudiés.



CIP : ciprofloxacine ; NA : acide nalidixique ; PEF : pefloxacine ; TE : tétracycline ; MZ : métronidazole ; AMP : ampicilline ; AMX : amoxicilline ; E : érythromycine ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; C : chloramphénicol ; CS : colistine ; TOB : tobramycine ; FT : furane ; GM : gentamicine ; STR : streptomycine.

**Figure III.18 :** Résistance (%) des souches de *Campylobacter* aux antibiotiques (isolées à partir de prélèvements de poulets)

Lors de la détermination du profil d'antibiorésistance des *Campylobacter* aux différents antibiotiques, il est apparu que les bactéries étaient particulièrement résistantes aux quinolones (plus de 90% de souches résistantes) et notamment à la ciprofloxacine (95% de résistance).

De plus, 83% des souches se sont avérées résistantes aux tétracyclines et au métronidazole.

En ce qui concerne les  $\beta$ -lactamines, 42% des souches étaient résistantes à l'ampicilline ou à l'amoxicilline alors que 27% seulement ont résisté à l'action conjointe de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique.

Un pourcentage similaire (30%) de souches a résisté à l'érythromycine (macrolide).

Aucune résistance aux furanes ainsi qu'aux aminosides streptomycine et gentamicine n'a été observée mais 7% des souches ont montré une résistance à la tobramycine.

Pour la colistine et le chloramphénicol, les taux de résistance étaient de 8% pour les deux.

Dans cette étude, il a été constaté qu'une très forte proportion de souches de *Campylobacter* (plus de 90%) était résistante aux quinolones, en particulier à la ciprofloxacine (95% des souches). Selon un rapport de l'OMS (2001), l'apparition des résistances à ces antibiotiques chez les souches de *Campylobacter* animales et humaines daterait de l'introduction de l'enrofloxacin dans l'alimentation animale en 1987. Depuis, la fréquence des souches résistantes aux quinolones serait en constante augmentation.

Dans cette étude une forte proportion de *Campylobacter* (83%) a résisté aux effets des tétracyclines et du métronidazole. Selon l'étude de Stanley et Jones (1998), déjà 80 à 100% des souches de *Campylobacter* étaient résistantes au métronidazole en 1998. En revanche, Kassa *et al.* ont observé, en 2007, de plus faibles pourcentages (de 1,5 à 5,9%) de souches résistantes aux tétracyclines en Ethiopie.

La fréquence de résistance aux  $\beta$ -lactamines (ampicilline et amoxicilline) des souches de *Campylobacter* isolées dans cette étude (42%) a été similaire à celle précédemment établie par Megraud et Prouzet (2004) (40 à 50% de résistance). Par contre, le pourcentage de résistance est tombé à 27% lorsque l'acide clavulanique a été associé à l'amoxicilline, probablement en raison de l'activité antibactérienne intrinsèque de l'acide clavulanique et de l'inhibition des  $\beta$ -lactamases (Lawson *et al.*, 1999). Le taux de résistance à l'érythromycine (30%) a été comparable avec celui obtenu par Rodrigo *et al.* en 2007.

Enfin, la résistance aux furanes et aux aminosides est apparue faible (7% dans le cas de la tobramycine) à nulle (pour la streptomycine et la gentamicine). Selon Megraud et Bultel (2004), la gentamicine resterait le seul antibiotique pour lequel aucune résistance des *Campylobacter* n'est enregistrée dans le monde mais cependant Rodrigo *et al.* (2007) ont reporté 30% de résistance des *Campylobacter* à la streptomycine et 5,4% à la gentamicine à Trinidad. De même que dans l'étude de Kassa *et al.* (2007), aucune résistance au chloramphénicol n'a été observée. Pris dans leur ensemble, l'antibiogramme des *Campylobacter* montre l'existence d'un pourcentage de résistance parfois très élevé de souches à l'encontre de certains antibiotiques fréquemment utilisés en médecine humaine (quinolones, -lactamines).

En conclusion, pour cette partie, le genre *Campylobacter*, fréquemment impliqué dans les infections intestinales bactériennes, pose un problème de sécurité microbiologique des aliments, notamment issu des volailles.

Cette étude corrobore cette situation en montrant une contamination relativement fréquente du cou et des abats (gésiers, cœurs et foies) des poulets qui résulte probablement d'une dissémination de ces germes lors de l'éviscération et souligne une fréquente résistance des souches aux quinolones (plus de 90%), aux tétracyclines et au métronidazole (83%) ainsi qu'aux -lactamines à un moindre degré (42%).

Il apparaît donc d'autant plus important de disposer de milieux de culture adaptés à la culture des *Campylobacter* tels que celui de Butzler et de limiter les contaminations du vivant des animaux par le strict respect des règles d'hygiène. Etant donné que la prévalence de *Campylobacter* dans les infections intestinales reste méconnue en Algérie, il serait souhaitable d'instaurer une surveillance et un dépistage systématique de ce germe en vue de déterminer sa prévalence et les variations de résistance aux différents antibiotiques.

#### **III.1.4. Microbiologie humaine ; coprocultures**

L'analyse des coprocultures a concerné 4309 échantillons reçus, pour la plupart, au service des Entérobactéries-Vibrions de l'Institut Pasteur d'Algérie (de 2006 à 2012).

Nous avons analysé toutes les coprocultures dans le but de rechercher le *Campylobacter*, quels que soit les symptômes du demandeur d'analyse.

#### III.1.4.1. Répartition des souches isolées selon l'espèce

A partir des 4309 échantillons de coproculture analysés, nous avons isolé 92 souches de *Campylobacter* réparties comme suit :

- ✓ 66 souches appartiennent à *Campylobacter jejuni*
- ✓ 16 souches appartiennent à *Campylobacter coli*
- ✓ 4 souches appartiennent à *Campylobacter fetus*
- ✓ 6 souches appartiennent à *Campylobacter spp*

Selon plusieurs études (King et al., 2010 ; King et Mégraud, 2012 ; Pollet et al., 2012) c'est généralement *C. jejuni* qui prédomine, et de loin, les isollements de cette bactérie à partir des coprocultures, suivi par *C. coli* et à moindre degré *C. fetus*, que ce soit à partir d'enfants (Serichantalergs et al., 2007) ou à partir de patients de différents âges (King et al., 2010 ; Pollet et al., 2012).

#### III.1.4.2. Répartition des prélèvements et des souches isolées selon les symptômes des malades

Les coprocultures ont été divisées en trois groupes, selon les symptômes des malades ou des demandeurs d'analyse :

- ✓ 1<sup>er</sup> groupe : il regroupe tous les malades présentant un ou plusieurs signes de gastro-entérites : diarrhées, vomissement, douleurs abdominales, fièvre
- ✓ 2<sup>ème</sup> groupe : nommé enquête, car il regroupe des demandes d'analyses de personnes travaillant dans le domaine de la restauration (fast-food, hôtels, hôpitaux) ou de personne préparant un dossier de visas. Le point commun de toutes ces demandes c'est que le demandeur ne présente aucun symptôme.
- ✓ 3<sup>ème</sup> groupe : il regroupe les malades présentant des allergies, des retards staturaux et/ou pondéraux, des suspicions de maladie cœliaque, des anémies

Le tableau ci-dessous, représente le taux de chaque groupe durant la période d'essai et le taux de positivité pour chaque groupe à *Campylobacter* :

**Tableau III.6: Répartition et taux des prélèvements de selles analysées par groupe**

	1 <sup>er</sup> groupe	2 <sup>ème</sup> groupe	3 <sup>ème</sup> groupe	Total
<b>Prélèvements analysés</b>	1380	2305	624	<b>4309</b>
<b>Taux de prélèvements positifs à <i>Campylobacter</i></b>	54 (3,9%)	43(1,8%)	16 (2,5%)	<b>92</b>

Il est connu que le *Campylobacter* est généralement associé à des douleurs abdominales, diarrhées parfois sanguinolente, fièvre (Garénaux et al., 2008). Cependant, il arrive qu'on puisse isoler de selles d'individus ne présentant aucun symptôme (Cortez et al., 2006).

D'un point de vue générale, les signes cliniques et les symptômes d'infections aux *Campylobacter* ne sont pas pathognomoniques et ne permettent pas un diagnostic différentiel aisé avec les infections digestives provoquées par d'autres entéropathogènes. De plus, ils ne s'expriment pas avec la même intensité, ni la même fréquence chez les différents malades : d'un bref épisode de gastroentérite (phase prodromique) à une entérocolite sévère durant plusieurs semaines accompagnée de douleurs abdominales (Gallay et al., 2005) d'une diarrhée sanguinolente (Mégraud et Bultel, 2004) de nausées, de vomissements, de fièvres (Cabié, 1996). La durée d'incubation est de 1 à 7 jours (phase diarrhéique). La guérison est obtenue souvent spontanément en 8 jours à peu près.

Nous remarquons que 3,9% des *Campylobacter* sont isolés des patients du 1<sup>er</sup> groupe, suivis par 2,5% du 3<sup>ème</sup> groupe et enfin 1,8% du 2<sup>ème</sup> groupe. L'analyse statistique montre que le  $\chi^2$  calculé (13,93) est supérieur au  $\chi^2$  à 95% de sécurité (annexe 7) à 2 ddl (5,99) ce qui veut dire que la différence entre les groupes est significative et elle n'est pas due à l'échantillonnage, donc le *Campylobacter* est surtout associé aux différents symptômes du 1<sup>er</sup> puis du 3<sup>ème</sup> groupe.

Une étude menée au Japon ciblant des patients hospitalisés « avec un antécédent d'infection à *Campylobacter* » a montré que sur 304 patients avec une infection gastro-intestinale 79 d'entre eux étaient provoqués par les *Campylobacter*, sur 52 patients avec de la fièvre 3 patients étaient infectés par ce germe, sur 152 patients ne présentant aucun signe clinique « enquête » 4 étaient infectés par ce germe et en dernier sur 30 patients avec « autres signes cliniques » aucun patient n'était infecté par ces germes (Van Dessel, 2005).

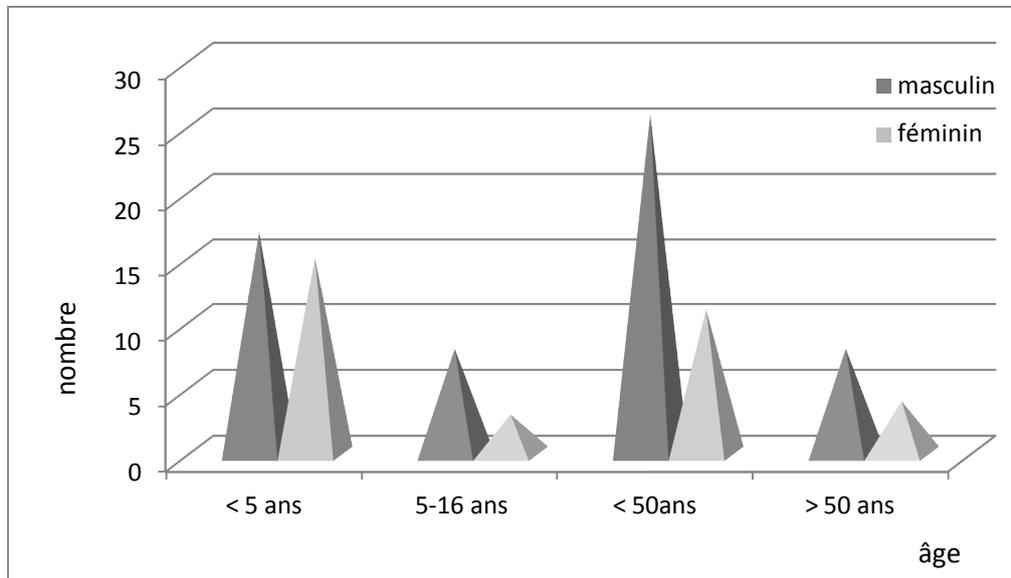
Des études menées au Bangladesh et au Nigeria (Sack et al., 2001) ont montré respectivement que ; 66 cas sur 162 et 15 cas sur 15 de diarrhée aiguë présentaient une infection à *Campylobacter* et 106 cas sur 324 et 8 sur 30 cas de patients présentant des symptômes « vomissements et fièvre » étaient infectés par des *Campylobacter*.

Déjà en 1982, en Thaïlande 6,7% des isollements de *Campylobacter* étaient obtenus à partir de selles diarrhéiques contre 5,5% lors des tests de contrôle (Vargues et Georges, 1982). D'autres études publiées révèlent que 17,7% des isollements des *Campylobacter* en Algérie sont d'origine de selles diarrhéiques contre 14,9% (d'un total de 247 échantillons) sont d'enfants ne présentant aucun symptôme. Au Nigeria 16,5% des cas d'isollements des *Campylobacter* sont de selles diarrhéiques contre 2% de selles non diarrhéiques (Akitoje et al., 2002).

Ces résultats montrent que les *Campylobacter* sont majoritairement responsables de gastro-entérite dans les deux mondes mais aussi que les porteurs asymptomatiques existent (Cortez et al., 2006) et sont plus fréquents dans les pays en voie de développement que dans les pays développés. Cette différence pourra être expliquée par le fait que dans les pays en voie de développement, les jeunes enfants sont fortement exposés à l'infection par *Campylobacter spp* durant leur premier âge donc par la suite ils développent une immunité et deviennent « porteurs asymptomatiques » (Eyquem et al., 1998).

### III.1.4.3. Répartition des cas positifs selon l'âge et le sexe

La figure III.19 nous montre la répartition des cas positifs selon l'âge et le sexe des "malades".



**Figure III.19:** Répartition des cas positifs selon l'âge et le sexe

D'après ces résultats nous remarquons, de manière globale, une prédominance masculine pour toutes les tranches d'âge. Selon King et Mégraud (2012), King et al. (2010) et Gallay et Mégraud (2003) la prédominance des isolats de *Campylobacter* a été retrouvée chez le jeune enfant, plutôt chez les garçons que chez les filles, et de manière générale la prédominance est plutôt masculine, ce qui corrobore nos résultats.

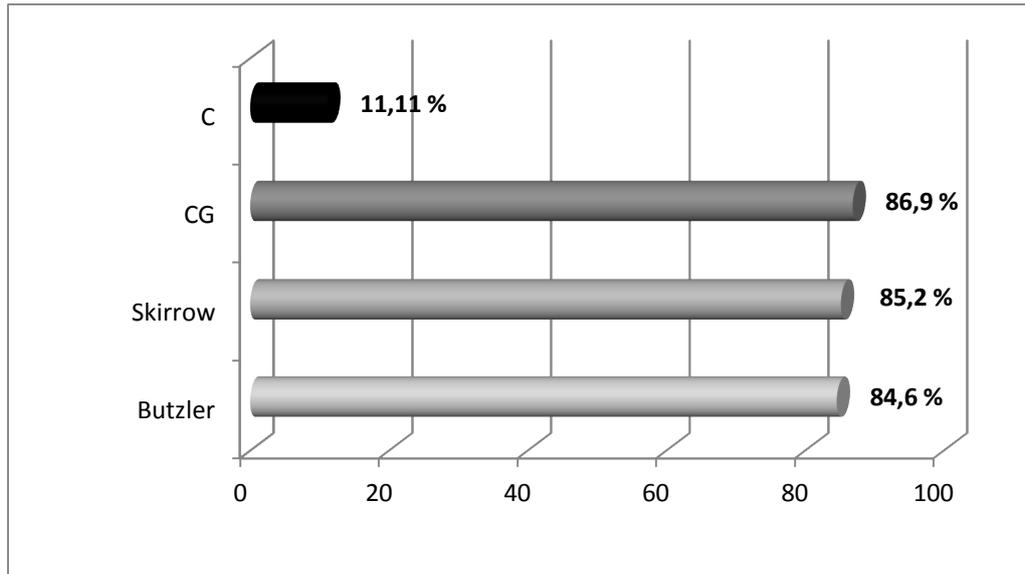
Pour les enfants, la tranche d'âge la plus touchée est celle des enfants ayant moins de 5 ans, ce qui concorde avec le bilan de surveillance de 2009 réalisé par King et al. (2010).

Il faut préciser que durant cette période, de 2006 à 2007, nous recevions les prélèvements à l'IPA de EL Hamma ; lieu proche des citoyens donc durant cette période c'était les prélèvements appartenant au 1<sup>er</sup> groupe qui dominaient. Après 2007, notre laboratoire a déménagé au nouveau site de l'IPA à Dely Brahim. Là, le nombre de prélèvements a baissé, surtout ceux des malades, et une prédominance des

coprocultures du 2<sup>ème</sup> groupe s'est faite ressentir, d'où peut-être l'explication de la prédominance chez les sujets ayant plus de 50 ans.

#### III.1.4.4. Répartition des cas positifs selon le milieu de culture utilisé

La figure III.20 nous donne la répartition des cas positifs à *Campylobacter* selon le milieu de culture utilisé.



**Figure III.20:** Répartition des cas positifs isolés des coprocultures selon le milieu de culture utilisé

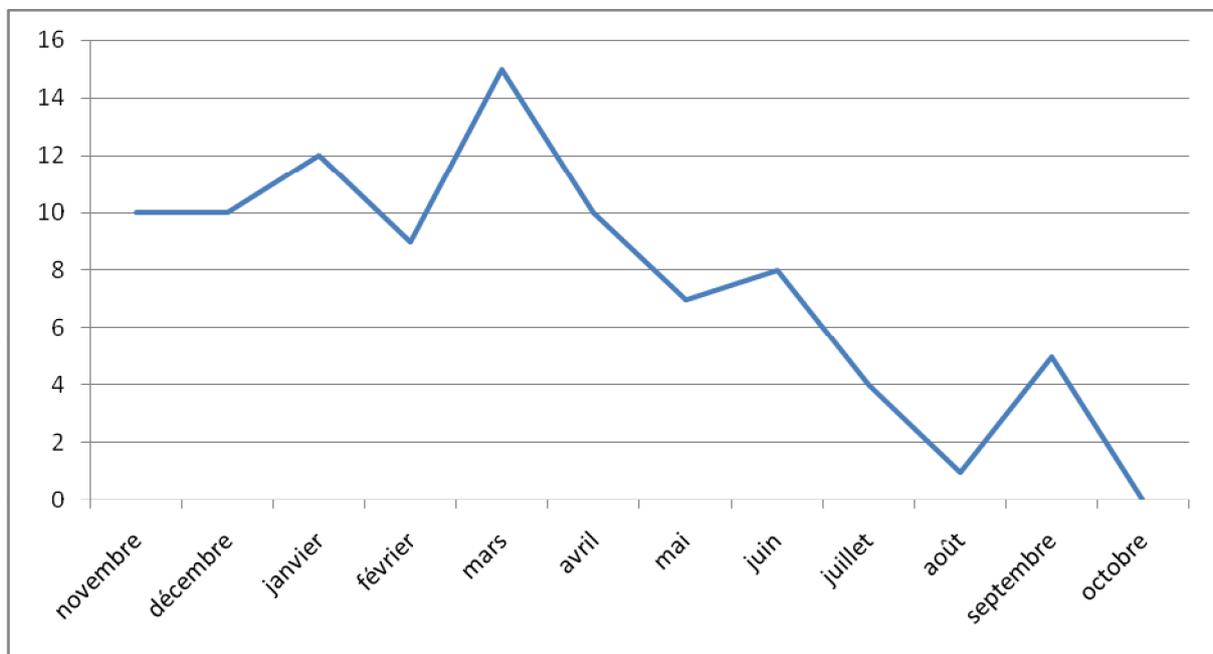
Nous remarquons, d'après la figure III.19, que mis à part le milieu Columbia (C) qui présente un taux de isolement de 11,11%, les autres milieux Butzler (B), *Campylobacter* Growth Supplement (CG) et Skirrow (S), présentent des taux relativement identiques (aux alentours de 85%).

L'analyse statistique du  $\chi^2$  montre que le  $\chi^2$  calculé (5,76) est inférieur au  $\chi^2$  théorique à 95% de sécurité (7,81) donc la différence entre ces pourcentages n'est pas significative, ce qui veut dire qu'il n'y a pas de différence entre les milieux et que la différence observée est due à l'échantillonnage (annexe 7).

De par le monde, plusieurs études ont été entreprises pour rechercher les milieux les plus adéquats quant à l'isolement des *Campylobacter*. Nous pouvons citer déjà pendant les années 80 les travaux de Bolton *et al.* (1982), Goossens *et al.* (1983), Chan et Mc Kenzie (1986) et durant les années 90, Corry *et al.* (1995) et selon leurs résultats les milieux donnant les meilleurs taux d'isolement sont, entre autres, Butzler et Skirrow.

#### III.1.4.5. Répartition des cas positifs selon le mois d'isolement

La figure III.21 reflète le nombre de cas positifs à *Campylobacter* à partir des coproculture selon le mois d'isolement sur toute la période d'étude (de 2006 à 2012).



**Figure III.21 :** Répartition des cas positifs isolés de coprocultures selon le mois d'isolement

Nous remarquons que plus de la moitié des souches est isolée durant la période fin automne, début hiver, autrement dit durant les mois allant de novembre à février, où 24 souches sur 40 ont été isolées (soit 60% des souches). Durant leur étude, Badji et Khelafa (2000) ont isolé des *Campylobacter* à partir des coprocultures et elles ont pu isoler trois souches durant le mois de septembre, aucune souche durant le mois suivant, 5 souches en novembre, 4 souches en décembre et 6 souches durant les deux premiers mois de l'année suivante. Ces résultats concordent avec ceux de Mégraud

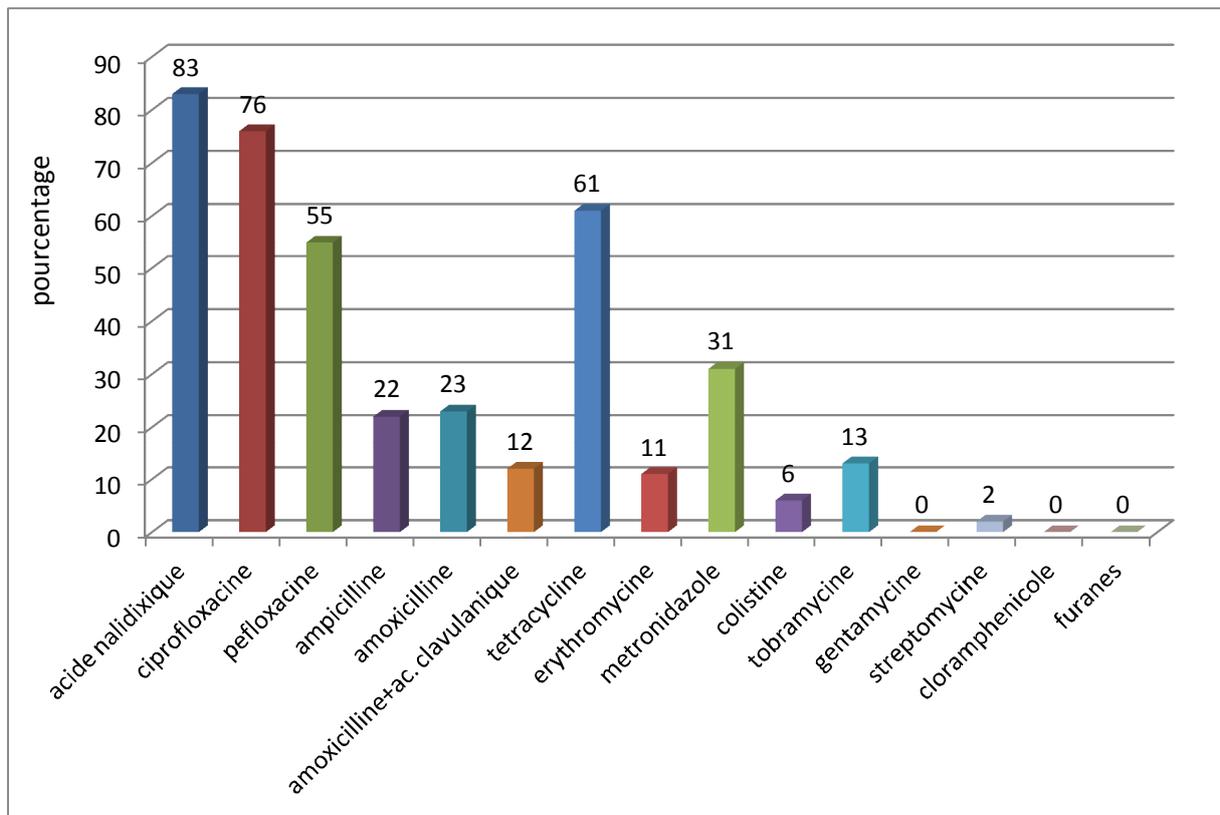
(1994) et Cabié (1996) qui selon eux le taux d'infection à *Campylobacter* dans les pays en voie de développement est plus important durant la saison humide.

Cependant et selon plusieurs auteurs occidentaux cette hypothèse reste à confirmer par des études plus spécialisées car l'aspect saisonnier, pour eux, n'est pas très marqué dans ces pays à la différence des autres pays développés où des pics de contaminations sont observés durant les mois chauds (été, début automne) (King et al., 2010 ; King et Mégraud, 2012). Cette absence de saisonnalité peut être due, selon eux, à l'absence de températures extrêmes ainsi que l'absence d'une surveillance épidémiologique adéquate.

Dans les autres pays en voie de développement aucune hypothèse n'est émise.

#### III.1.4.6. Antibiorésistance des *Campylobacter* isolées des coprocultures

La figure III.22 nous montre les différents profils d'antibiorésistance des différentes espèces de *Campylobacter* isolées des selles.



**Figure III.22** : Profil d'antibiorésistance (global) des *Campylobacter* isolés des coprocultures

De même que pour les antibiogrammes précédemment analysés, les résistances les plus élevées sont observées pour les quinolones, suivies par la tétracycline, le métronidazole et à moindre degré l'ampicilline.

Les taux de résistances les plus élevés ont été observés pour les Quinolones avec 83, 76 et 55% pour l'Acide Nalidixique (NA), la Ciprofloxacine (Cip) et la Pefloxacine (Pef) respectivement. Nous pouvons noter que ce taux a augmenté depuis l'année 2000, où Badji et Khelafa (2000) ont eu un taux de résistance de 19,05% pour ces deux premiers antibiotiques.

De nombreuses études, de par le monde, ont été réalisées dans ce cadre afin d'évaluer la résistance des *Campylobacter* aux antibiotiques. Toutes les études ont noté une augmentation de la résistance des *Campylobacter* aux quinolones.

Selon Lubber et al. (2003), en Allemagne, ce taux a varié de 4,9% en 1991 à 45,1% en 2001 pour la ciprofloxacine. De même pour Mégraud et Prouzet-Mauléon (2004) la résistance des *Campylobacter* à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine en France, est passée de 2,5% en 1986 à près de 29% en 2002 pour atteindre 48,1 et 45,7% pour les deux antibiotiques respectivement, en 2009, selon King et al. (2010). Cependant, et selon l'étude de Mégraud et Prouzet-Mauléon en 2004 ce taux augmentait chez les souches isolées de malades revenant de voyage d'outremer atteignant 70%, ce qui se rapproche plus de nos résultats. Selon l'étude de King et al. (2010) ce taux ne varie pas entre les personnes ayant voyagé ou pas sauf pour les *Campylobacter coli*.

Pour la tétracycline nous avons obtenu un taux de 61%. Selon le rapport de l'OMS (Sack et al., 2001) différents taux de résistance à la tétracycline ont été observés de part le monde (durant les années 80, 1988 au Canada 55,7%, et au nord des USA entre 42 et 43% 84-85) Selon Mégraud et Prouzet-Mauléon (2004) la résistance des *Campylobacter* à la tetracycline est passée de 7,5% en 1986 à 18,5% en 2002. En 2009 c'est la doxycycline qui est testée par King et al. (2010) et un taux de résistance de 35% a été obtenu. Lubber et al. (2003) ont quant à eux noté que les taux variaient de 19,5% en 1991 à 37,8% en 2001.

Pour le métronidazole près de 31% des souches sont résistantes à cet antibiotique plus élevé que celui de Badji et Khelafa (2000) qui était de 19,05%.

Pour ce qui est des -lactamines la résistance des *Campylobacter* est de l'ordre des 20% pour l'ampicilline et l'amoxicilline. Selon l'étude de Lubber et al. (2003) le taux de résistance des *Campylobacter* à l'ampicilline variait de 19,5% en 1991 à

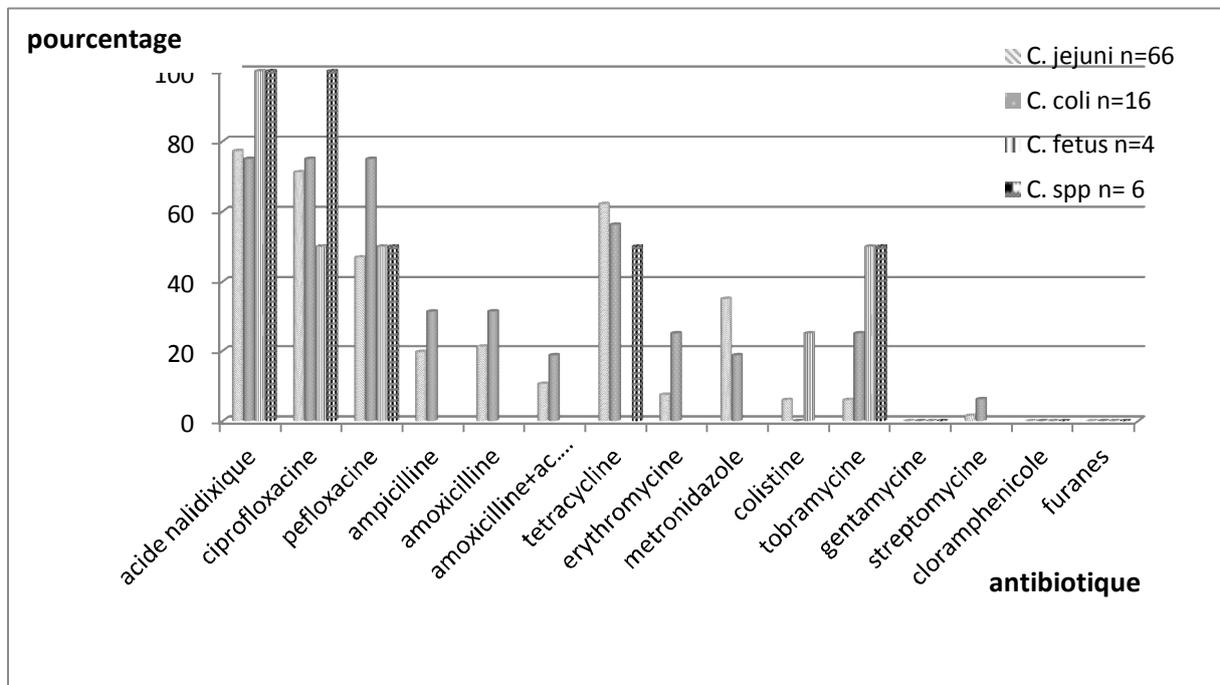
37,8% en 2001. Selon Mégraud (2003) les souches de *Campylobacter* isolées de 1986 à 2000 étaient résistantes à l'ampicilline avec un taux de 68,3%. Le taux le plus important a été obtenu par Yang et al.(2008) au Taiwan avec 85,2% de souches résistantes. Pour ce qui est de l'amoxicilline les taux observés par Mégraud et Prouzet-Mauléon (2004) étaient aux alentours des 40%.

Le taux de 11% a été obtenu pour la résistance à l'érythromycine. Un taux de 3,6% a été obtenu par Mégraud (2003), 6,1% par Luber et al. (2003), 4,3 % par Mégraud et Prouzet-Mauléon (2004), 3,3% par Yang et al. (2008) et 2,3% par King et al. (2010).

Pour les autres antibiotiques nous avons obtenu les taux de résistance suivants : 13,6 et 2% respectivement pour la tobramycine, la colistine et la streptomycine.

Aucune résistance n'a été notée pour la gentamicine, le chloramphénicol et les furanes. Pour la gentamicine aucune résistance n'a été observée par Mégraud et Prouzet-Mauléon (2004), Guévremont et al. (2006) et le faible taux de 0,2% a été obtenu par King et al. (2010). Déjà en 2004, selon Mégraud et Prouzet-Mauléon la gentamicine était le seul aminoside pour lequel aucune résistance n'a été notée et pour la streptomycine le taux variait déjà entre 5 et 10% .

### III.1.4.7. Profil d'antibiorésistance des différentes espèces de *Campylobacter* isolées des coprocultures



**Figure III.23:** Profil d'antibiorésistance des différentes espèces de *Campylobacter* isolées des coprocultures

Pour la résistance aux antibiotiques selon les espèces (figure III.23) nous remarquons que globalement, et surtout pour *C. jejuni* et *C. coli*, le même profil de résistance est observé.

L'analyse statistique a montré que la différence entre les pourcentages de résistances aux antibiotiques suivants n'est pas significative au seuil de risque de 5% donc il n'y a pas de différence entre les deux espèces *C. jejuni* et *C. coli* en ce qui concerne la résistance aux antibiotiques : acide nalidixique, ( $z = 0.145$ ), l'ampicilline ( $z = 0.43$ ), la tétracycline ( $z = 0.22$ ) et l'érythromycine ( $z = 0.043$ ).

Selon plusieurs études en France et au Canada, notamment celles de Mégraud et Prouzet-Mauléon (2004), Guévremont et al. (2006) et King et al. (2010) *C. coli* présentait un taux de résistance plus important que *C. jejuni* en ce qui concerne la résistance aux quinolones, à la Tétracycline/Doxycycline et à l'érythromycine.

Selon Pollet et al. (2012) au Pérou, *C. jejuni* a par contre toujours montré des pourcentages de résistance plus importants que *C. coli* durant cette dernière décennie (selon différentes études) à la Ciprofloxacine avec cependant une "presque" égalité dans les pourcentages pour la dernière étude qui s'est étalée de 2006 à 2010 au Lima (87,4% pour *C. coli* contre 89,9% pour *C. jejuni*).

### **Conclusion de la première partie**

Globalement nous pouvons dire que les points les plus importants pour cette première partie peuvent se résumer comme suit :

- ✓ L'incidence de cette campylobactériose, dans les pays développés, dépasse celle des salmonelloses (Horrocks et al., 2009). En Algérie, cette incidence est mal connue car rare sont les laboratoires qui effectuent la recherche de cette bactérie. Mais au niveau du laboratoire des entérobactéries de l'Institut Pasteur d'Algérie, selon les bilans des années allant de 2006 à 2012, globalement, le nombre de *Campylobacter* isolés des coprocultures dépassait celui des *Salmonella* (IPA de 2006 à 2012).
- ✓ Le *Campylobacter* serait une cause non négligeable dans les intoxications alimentaires. Notre étude comme beaucoup d'autres, nous fait constater de la présence de *Campylobacter* dans les prélèvements d'origine avicole. Ceci doit nous pousser à rechercher des solutions pour limiter le taux de contamination de la volaille par le *Campylobacter*. Tel d'autres travaux, on devrait commencer par une intervention en amont, qui cible l'origine de l'infection pour la réduire, telle que l'application d'une bonne hygiène et des pratiques de biosécurité. Ensuite,

l'utilisation dans l'alimentation de la volaille soit de bactériocines (Cole et al., 2006, Stern et al., 2005), soit de bactériophages (Wagenaar et al., 2005), ou alors des additifs alimentaires chimiques, acides organiques (Horrocks, 2006 ; Horrocks et al., 2007), ou encore addition de chlore à l'eau (Pearson et al., 1993). Enfin, la pasteurisation de la surface des poulets avec de l'eau chaude ou l'utilisation d'eau électrolysée pour le nettoyage des carcasses (Park et al., 2002), ou encore des traitements de froid et une conservation à -20°C (Georgsson et al., 2006) sont d'autres méthodes de réduction du nombre de *Campylobacter*.

- ✓ Il faudrait peut-être penser à instaurer des réglementations de traitement des carcasses au niveau des abattoirs pour limiter les risques liés aux contaminations et imposer les conditions de conservation et de transport des carcasses.
- ✓ L'espèce prédominante des isolements, tous confondus, est *Campylobacter jejuni*. Ceci rejoint plusieurs études (Allos, 2001 ; Han et al., 2009) et confirme cette prédominance. *Campylobacter coli* est quant à lui associé beaucoup plus aux prélèvements de dinde et de porcs selon certaines études (Gebreyes, 2005).
- ✓ D'une manière générale pour les milieux de culture utilisés pour l'isolement de *Campylobacter* nous pouvons expliquer ces résultats en disant que :
  - Les prélèvements à partir desquels nous souhaitons isoler le *Campylobacter* sont, d'une manière générale, poly-microbiens, et le *Campylobacter* est un germe à culture lente. Donc pour favoriser le développement des *Campylobacter* en inhibant celui des autres flores, des antibiotiques sont utilisés dans la composition des milieux de culture sélectifs. Les *Campylobacter* présentent une résistance naturelle à ces antibiotiques utilisés (Sahin et al., 2003).
  - Les agents antimicrobiens qui sont généralement utilisés dans ces milieux sélectifs comprennent une combinaison de céphalosporines telles que céphalothine ou céfopérazone et la vancomycine ou la bacitracine (Ng et al., 1988 ; Nachamkin, 1999).
  - Bien que la plupart des bactéries à Gram négatif soit inhibée par la polymyxine, *Proteus* semble être résistant à cet antibiotique. Puisque le triméthoprime inhibe *Proteus*, ainsi que d'autres bactéries gram-négatives et puisqu'il ne possède pas d'effet inhibiteur sur certaines souches de *Campylobacter* tel que la polymyxine B ou la colistine, il a été utilisé dans plusieurs milieux sélectifs (Corry, 2000).

- La rifampicine est un autre antibiotique utilisé dans la composition des milieux sélectifs. Il est actif contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Corry, 2000).
  - Vu que la composition en antibiotiques est différente d'un milieu de culture à un autre, une association d'au moins deux milieux de culture différents est nécessaire pour augmenter les chances d'isoler le *Campylobacter*.
- ✓ Le nombre de porteurs sains est à prendre en considération, car ils représentent une autre source de contamination par *Campylobacter*.
- ✓ Pour l'antibiorésistance des souches étudiées, nous pouvons conclure en disant que :
- Les profils de résistances aux antibiotiques des souches de *Campylobacter* sont relativement identiques quelle que soit l'origine des souches, sauf pour les  $\beta$ -lactamines et l'érythromycine. Ils sont plus importants chez les souches d'origines animale et alimentaire.
  - Une inquiétante résistance aux quinolones et à la tétracycline est notée pour toutes les souches de *Campylobacter*. Pour les souches d'origine animale, l'autre résistance qui présente un problème est celle aux  $\beta$ -lactamines et à moindre degré pour les souches d'origine alimentaire.
  - Plusieurs études ont relevé cette inquiétante résistance notamment Luangtongkum (2005) ; Kassa et al. (2007), Rodrigo et al. (2007) à partir des animaux ou des aliments et Megraud et Prouzet-Mauleon (2004) ; Nelson et al. (2004) ; Thomas (2009) à partir de prélèvements humains.
  - Ceci nous confirme que la résistance aux antibiotiques est un point très important qui doit être surveillé et que l'utilisation massive et non réglementée des antibiotiques dans les élevages risque de provoquer une augmentation de l'antibiorésistance chez l'homme et de rendre le traitement des infections par ces antibiotiques plus difficile voire impossible.

## **III.2. ETUDE MOLECULAIRE DE *Campylobacter* : IDENTIFICATION ET ETUDE GENETIQUE DE L'ANTIBIORESISTANCE**

Pour cette partie, nous avons analysé un nombre restreint de souches. Le choix s'est porté sur les souches présentant le plus de résistance aux antibiotiques. Un total de 38 souches de *Campylobacter* d'origine humaine et non humaine a été étudié. L'étude a porté sur la résistance aux macrolides et aux quinolones.

### **III.2.1. Identification des souches de *Campylobacter* par différentes techniques de PCR**

Nous avons réalisé cette partie au niveau du Centre National de Référence des *Campylobacter* et *Helicobacter* à Bordeaux (France).

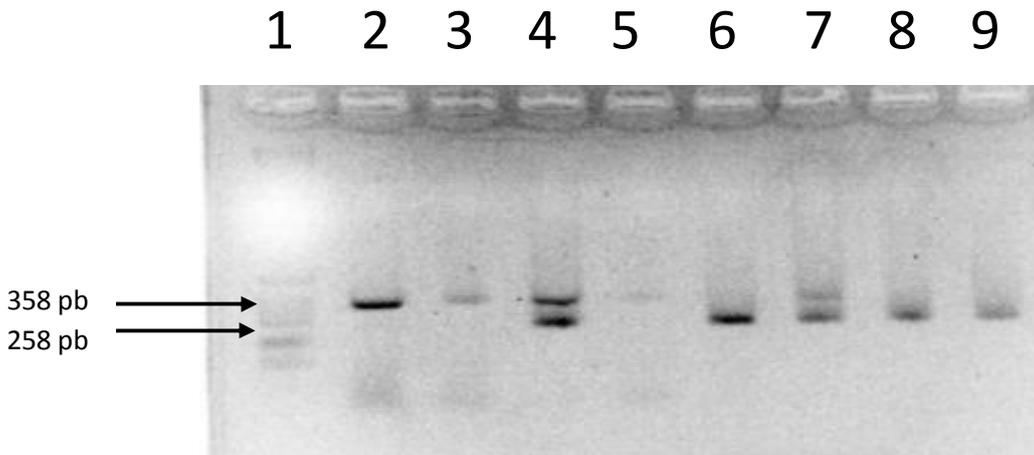
Toutes les souches ont été confirmées par PCR. Pour des raisons pratiques les ADN des souches étudiées ont été notés de 1 à 38 (voir liste en annexe 6).

#### **III.2.1.1. Identification des souches de *Campylobacter* par PCR multiplex**

Nous avons utilisé la méthode PCR Multiplex qui sert à identifier plusieurs espèces de *Campylobacter* par une même PCR classique (figure III.23). Dans notre cas nous avons procédé à l'identification de *C. jejuni* et *C. coli*.

La Figure III.23 montre la migration des ADN. Vu que l'amplicon de *C. jejuni* (358 pb) est plus lourd que l'amplicon de *C. coli* (258 pb), lors de la migration il sera plus lent que ce dernier.

D'après la figure III.24 nous pouvons déduire que certaines souches appartiennent à l'espèce *C. jejuni*, d'autres à *C. coli*. Nous avons trouvé une double population de *C. jejuni* et *C. coli* pour deux prélèvements d'ADN (N°1 et 10). Ceci peut être expliqué par le fait que quelquefois les cultures de *Campylobacter* poussent difficilement et que l'on ne puisse pas repiquer une colonie isolée, donc on repique une partie de la culture et on obtient au final une double population.



**Figure III.24 :** PCR multiplex *C.coli C.jejuni* : migration sur gel d'agarose  
100bp DNA marker  
*C. jejuni* (358 pb)/ *C. coli* (258 pb)

Puits 1 : 100 bp DNA marker ; P2 : Témoin *C. jejuni* ; P3 : N°5 ; P4 : N° 10 ; P5 : N° 21 ; P6 : Témoin *C. Coli*

P7 : N°1 ; P8 : 14 ; P9 : 15

Cette méthode a été étudiée et utilisée déjà en 1999 par Denis et *al.* Et son efficacité était de 100% par rapport aux tests biochimiques (34%). Persson et Olsen (2005) et Al Amri et *al.* (2007) préconisent même d'utiliser cette méthode pour la recherche de ces deux bactéries directement à partir de prélèvements de selles humaines et/ou animales, vus les bons résultats obtenus lors de leur étude.

### III.2.1.2. Identification des souches de *Campylobacter* par PCR en temps réel

Nous avons confirmé l'identification de nos souches par PCR en temps réel en utilisant un « light cycler » de marque ROCHE.

Les résultats de l'identification des souches de *Campylobacter*, sous forme de courbes de fusions (figure III.25), indiquent les souches appartenant à *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, en fonction des températures de fusion de chaque espèce.

Cette méthode, déjà utilisée durant les années 1990 (Gibson et al., 1996) a retenu l'attention de plusieurs chercheurs (Chen et al., 2000 ; Liu et al., 2002 ; Hervé et al., 2007) dans plusieurs domaines . En 2011, Leblanc-Maridor et al. ont étudié cette technique pour une identification et une quantification rapide de *Campylobacter coli* et *Campylobacter jejuni* à partir de cultures pures et de divers prélèvements (alimentaires, coproculture). Buchan et al. (2013) l'ont testée sur le plan clinique et Vondrakova et al. (2014) à partir des aliments. Karlsson (2013) a essayé d'optimiser cette technique.

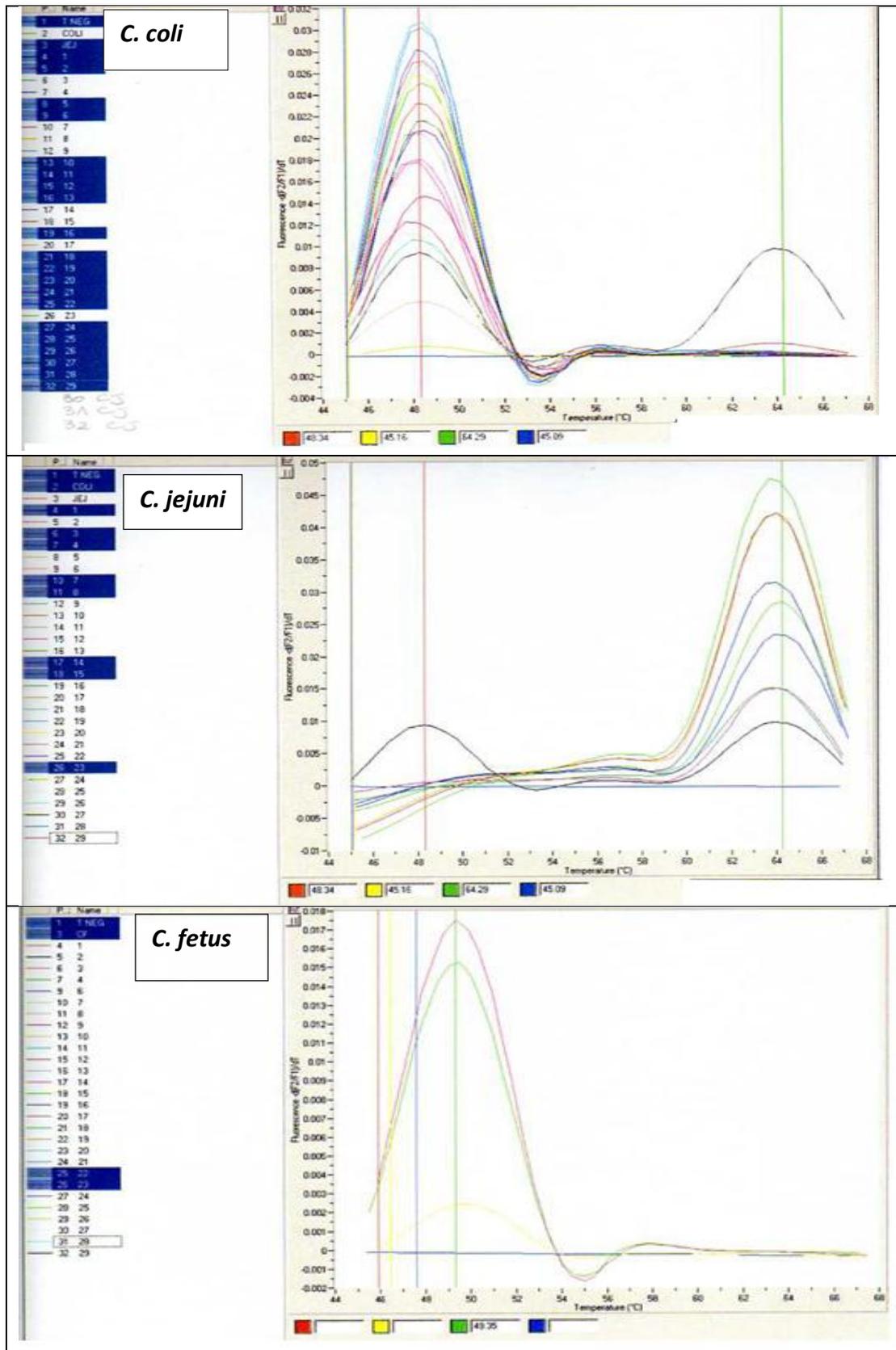


Figure III.25 : courbes de fusion pour l'identification des espèces de *Campylobacter* par PCR en temps réel

### III.2.1.3. Comparaison des résultats de l'identification par PCR classique et par PCR en temps réel

Tous les ADN ont été confirmés comme appartenant au genre *Campylobacter*. Les résultats obtenus pour les espèces, par les deux méthodes se rejoignent.

La méthode par PCR en temps réel est cependant plus rapide et plus précise.

### III.2.2. Détection de la résistance aux macrolides chez *Campylobacter* par séquençage

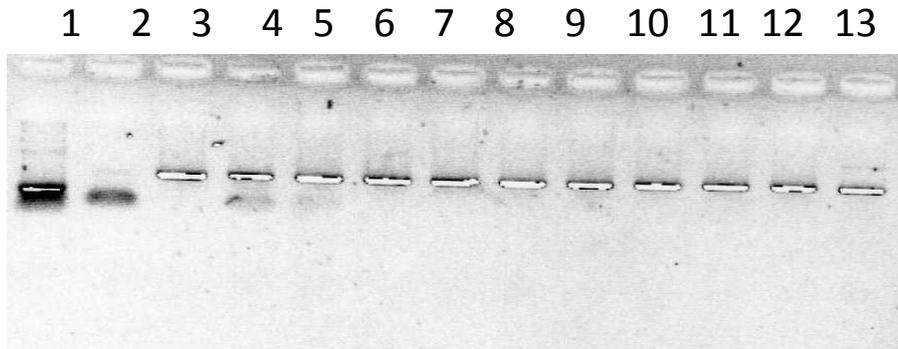
Après purification nous n'avons gardé que les ADN ayant présenté une bonne amplification après la PCR d'amplification du gène concerné.

Les figures suivantes présentent les ADN amplifiés après la réaction de PCR pour l'amplification du gène concerné (figure III.26). Cette amplification nous permet de faire une première sélection des ADN à étudier. De tous les ADN étudiés, seulement 11 seront retenus pour subir une purification.

Après la purification au séphacryl, nous n'avons retenu pour le séquençage que les ADN ayant présenté une bonne migration sur gel, et d'après la figure III.27, il apparaît que seuls les ADN N° 3, 7, 8, 9, 13, 4, 15 ont été retenus.

Après séquençage nous avons obtenu un consensus (annexe 8).

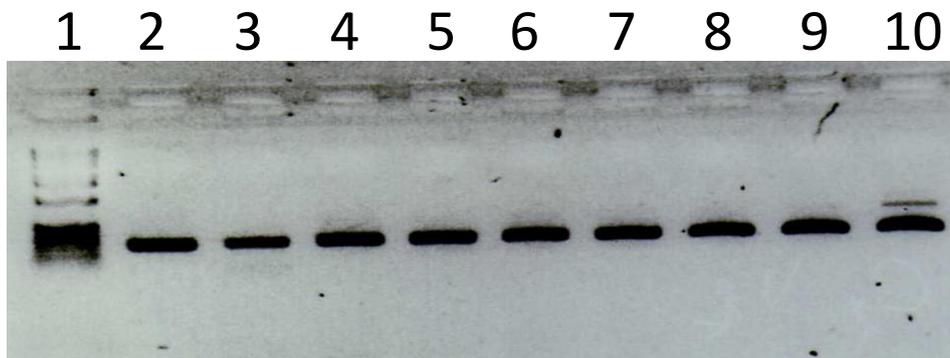
L'alignement des consensus avec l'ADN des souches de référence a conduit aux résultats suivants (figure III.28).



**Figure III.26 :** ADN amplifiés après la réaction de séquence avec DNA molecular weight mark (23S)

Puits1 : 100 bp DNA marker ; P2 : N°2 ; P3 : N°1 ; P4 : N° 3 ; P5 : N° 4 ; P6 : N°7 ; P7 : N°8 ; P8 : N°9

P9 : N°11 ; P10 : N°13 ; P11 : N°14 ; P12 : N°15 ; P13 : N°17



**Figure III.27 :** ADN amplifiés après purification au S400 avec le 1Kb comme marqueur moléculaire destinés au séquençage (23S)

Puits 1 : marqueur moléculaire 1 Kb ; P2 : N°1 ; P3 : N° 3 ; P4 : N°7 ; P5 : N°8 ; P6 : N°9 ; P7 : N°13

P8 : N°14 ; P9 : N°15 ; P10 : N°17 ; P10 : N°17

**N3/ N7 / N8/ N9 *C. coli* (d'origine animale) ; N14 / N15 *C. coli* (d'origine humaine)**

```

N3      ACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAACGAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTTGTAGTGGAGGTGAAAATTCCT
N7      ACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAACGAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTTGTAGTGGAGGTGAAAATTCCT
N8      ACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAACGAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTTGTAGTGGAGGTGAAAATTCCT
N14     ACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAACRAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTTGTAGTGGAGGTGAAAATTCCT
N15     ACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCSTAACRAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTTGTAGTGGAGGTGAAAATTCCT
N9      ACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAACRAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTTGTAGTGGAGGTGAAAATTCCT
AY190994 ACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAACGAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTTGTAGTGGAGGTGAAAATTCCT
AY190987 ACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAACGAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTTGTAGTGGAGGTGAAAATTCCT

N3      CCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGCTATTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAG
N7      CCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGCTATTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAG
N8      CCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGCTATTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGA
N14     CCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGCTATTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAG
N15     CCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGCTATTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAG
N9      CCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGCTAYTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAG
AY190994 CCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGCTATTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAG
AY190987 CCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGCTATTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAG

```

**N13 *C. jejuni* (d'origine humaine)**

```

N13     CTATAACGGTCTTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAAMRAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTTGTAGTGGAGGTGAAAA
AY190994 CTATAACGGTCTTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAACGAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTTGTAGTGGAGGTGAAAA
AY190987      ACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAACGAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTTGTAGTGGAGGTGAAAA

N13     TTCCTCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGCTATTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAGG
AY190994 TTCCTCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGCTATTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAGG
AY190987 TTCCTCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGCTATTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAG

```

**Figure III.28:** alignement des séquences 23S des souches de *C. jejuni* et *C. coli* (d'origine animale et humaine) et comparaison avec les séquences 23S de la souche de référence *C. jejuni* A2075G (GenBank AY 190994) et *C. coli* wild type (AY190987)

La même mutation **A2075G** responsable de la résistance aux macrolides, a été observée pour toutes les séquences d'ADN étudiées pour *C. jejuni* et *C. coli*, qu'elles soient d'origine animale ou humaine, par rapport au type sauvage (WT). Toutes les souches étudiées présentaient une résistance phénotypique aux macrolides. Nos résultats rejoignent ce qui a été décrit dans la bibliographie, car selon plusieurs auteurs cette mutation est la plus fréquente chez les souches de *Campylobacter* résistants aux macrolides, que ce soit *C. jejuni* ou *C. coli* (Vacher et al., 2005 ; Gibreel et Taylor, 2006 ; Luangtongkum et al., 2009).

Pour la N14, une mutation **T2113C** a été notée. Nous n'avons trouvé aucune étude notant la présence de cette mutation.

La résistance des *Campylobacter* aux macrolides est surtout retrouvée chez les souches issues de porcs mais aussi de poulets (Aarestrup et al., 1997). Ces souches peuvent être transmises à l'homme. De plus, la résistance aux macrolides peut se développer au cours des traitements antibiotiques chez l'homme (Funke et al., 1994).

Toutes les souches étudiées dans notre cas présentaient une résistance phénotypique à l'érythromycine, et pour certaines un niveau élevé de résistance a été observé, avec des CMI >256µg/ml. Nos résultats rejoignent ceux de Payot et al. (2006) qui ont noté que la mutation à la position **2075 (A2075G)** de l'ARN 23S était associée à un niveau élevé de résistance phénotypique (CMI > 128µg/ml) chez les souches humaines tandis que la mutation à la position **2074 (A2074C)** était liée à un niveau de résistance plus bas. Cependant une autre étude datant de la même année menée par Gibreel et al. (2005) a montré qu'une mutation **A2074C** chez une souche humaine était associée à une résistance phénotypique encore plus élevée que celle de la **A2075G** (CMI > 512µg/ml).

Lors de l'étude de Vacher et *al.* (2003) sur la résistance des *Campylobacter* aux macrolides, d'origine humaine, par PCR en temps réel, une seule souche sur les 134 cas de résistance présentait une double mutation. Pour toutes les autres, une seule mutation a été observée (soit **A2074C** ou **A2075G**). D'un autre côté, et pour les souches animales (de porcs) étudiées par Keller et Perreten (2006) les souches présentaient une seule mutation **A2075G**.

Certains chercheurs suggéraient déjà en 2001 que la résistance des *Campylobacter* aux macrolides et aux fluoro-quinolones serait le résultat de l'utilisation de ces médicaments dans le traitement humain et non vétérinaire (Engberg et *al.*, 2001).

### **III.2.3. Détection de la résistance aux quinolones chez *Campylobacter* par séquençage**

Résultats de la purification des ADN (migration sur gel d'agarose).

Les images suivantes montrent la migration sur gel de tous les ADN étudiés 5 (figure III.29). Il apparaît d'après la figure III.30 que certains ADN seulement seront retenus pour la purification au séphacryl

Seules les ADN ayant présenté une bonne migration après purification au séphacryl ont été retenus pour le séquençage.

Le consensus obtenu est en annexe 9.

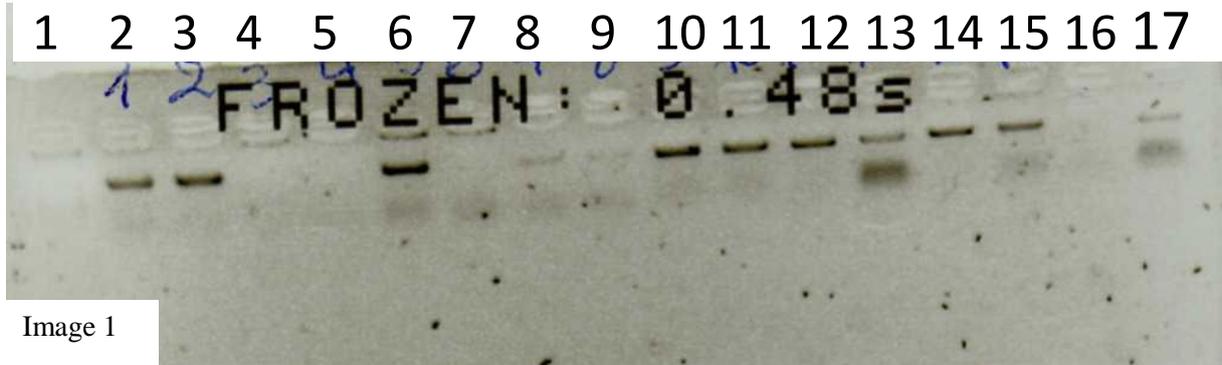


Image 1

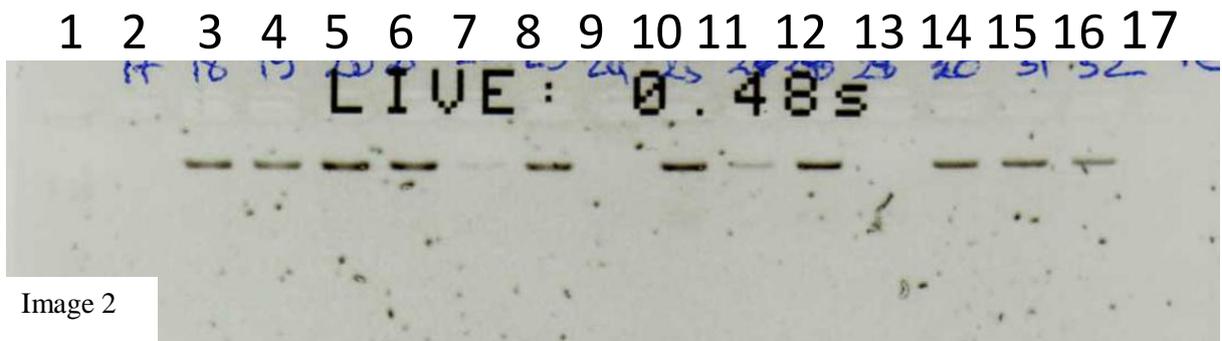
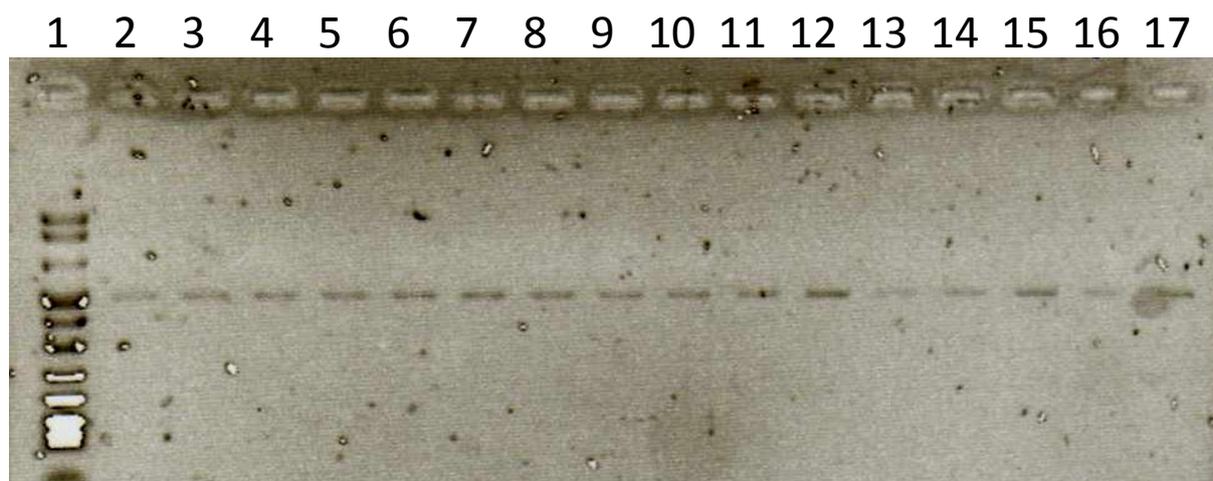


Image 2

**Figure III.29 :** ADN amplifiés après la réaction de séquence avec DNA molecular weight markerVIII (avant purification) (QRDR)

(Les puits allant de 2 à 17 correspondent aux ADN N°1 à 16 pour l'image 1 et de 17 à 32 pour l'image 2)



**Figure III.30 :** ADN amplifiés après purification au S400 avec le 1Kb comme marqueur moléculaire pour l'étude du séquençage (QRDR)

Puits 1 : 100 bp DNA marker ; P 2 : N°1 ; P 3 : N°2 ; P 4 : N° 3 ; P 5 : N° 7 ; P 6 : N°9 ; P 7 : N°10

P 8 : N°11 ; P 9 : N°12 ; P 10 : N°4 ; P 11 : N°8 ; P 12 : N°16 ; P 13 : N°18 ; P 14 : N°19

P 15 : N°20 ; P 16 : N°21 ; P 17 : N°23

L'alignement des séquences obtenues avec des séquences de souches de référence par BLAST nous a donné les résultats suivants (figure 31) :

**N4 C. fetus (d'origine humaine)**

N4 TGAGGCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCACCCACATGGAGATACAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA  
 L04566.1 TGAGGCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCACCCACATGGAGATACAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA  
 11168 TGAGGCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCACCCACATGGAGATACAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA

N4 TTTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGTGCCGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT  
 L04566.1 TTTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGTGCCGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT  
 11168 TTTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGTGCCGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT

N4 AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGCGAACCTGATGTTTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTATTAATGGTTC AAGTGGTATAGC  
 L04566.1 AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGCGAACCTGATGTTTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTATTAATGGTTC AAGTGGTATAGC  
 11168 AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGCGAACCTGATGTTTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTATTAATGGTTC AAGTGGTATAGC

N4 TGTAGGTATGGCGACA AATATCC  
 L04566.1 TGTAGGTATGGCGACAAACATCC  
 11168 TGTAGGTATGGCGACAAACATCC

**N3/ N8/ N7 C. coli (d'origine animale)**

N3 TGAGGCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA  
 N8 TGAGGCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA  
 N7 TGAGGCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA  
 L04566.1 TGAGGCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCACCCACATGGAGATACAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA  
 11168 TGAGGCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCACCCACATGGAGATACAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA

N3 TTTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGCGCTGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT  
 N8 TTTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGCGCTGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT  
 N7 TTTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGCGCTGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT  
 L04566.1 TTTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGTGCCGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT  
 11168 TTTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGTGCCGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT

N3 AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGTGAACCTGATGCTTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTATTAATGGTTC AAGTGGTATAGC  
 N8 AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGTGAACCTGATGCTTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTATTAATGGTTC AAGTGGTATAGC  
 N7 AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGTGAACCTGATGCTTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTATTAATGGTTC AAGTGGTATAGC  
 L04566.1 AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGTGAACCTGATGTTTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTATTAATGGTTC AAGTGGTATAGC  
 11168 AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGTGAACCTGATGTTTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTATTAATGGTTC AAGTGGTATAGC

N3 TGTAGGTATGGCGACA AATATCC  
 N8 TGTAGGTATGGCGACA AATATCC  
 N7 TGTAGGTATGGCGACA AATATCC  
 L04566.1 TGTAGGTATGGCGACAAACATCC  
 11168 TGTAGGTATGGCGACA AATATCC

**N2/ N12/N10/N11 *C. jejuni* (d'origine animale) / N5 *C. jejuni* (d'origine humaine)**

```

N5          CAAAAAGKAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCACCACATGGAGATATAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA
N2          TGAGGCCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCACCACATGGAGATATAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA
N10         TGAGGCCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA
N11         GAGGGCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA
N 12       TGAGGCCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA
L04566.1   TGAGGCCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCACCACATGGAGATACAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA
11168     TGAGGCCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCACCACATGGAGATACAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA

N5          TTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGTGCCGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT
N2          TTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGTGCCGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT
N10         TTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGCGCTGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT
N11         TTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGCGCTGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT
N12         TTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGCGCTGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT
L04566.1   TTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGTGCCGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT
11168     TTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGTGCCGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTT

N5          AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGCGAACCTGATGTTTTACCTTCTAGGGTCCAAATTTATTATTAATGGTTCAAGTGGTATAGC
N2          AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGCGAACCTGATGTTTTACCTTCTAGGGTCCAAATTTATTATTAATGGTTCAAGTGGTATAGC
N10         AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGTGAACCTGATGCTTTACCTTCTAGGGTCCAAATTTATTATTAATGGTTCAAGTGGTATAGC
N11         AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGTGAACCTGATGCTTTACCTTCTAGGGTCCAAATTTATTATTAATGGTTCAAGTGGTATAGC
N12         AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGTGAACCTGATGCTTTACCTTCTAGGGTCCAAATTTATTATTAATGGTTCAAGTGGTATAGC
L04566.1   AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGCGAACCTGATGTTTTACCTTCTAGGGTCCAAATTTATTATTAATGGTTCAAGTGGTATAGC
11168     AAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATATGATGGTTCAGAAAGCGAACCTGATGTTTTACCTTCTAGGGTCCAAATTTATTATTAATGGTTCAAGTGGTATAGC

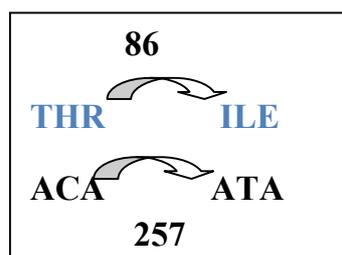
N5          TGTAGGTATGGCGACAAATATCC
N2          TGTAGGTATGGCGACAAATATCC
N12         TGTAGGTATGGCGACAAATATCC
N10         TGTAGGTATGGCGACAAATATCC
N11         TGTAGGTATGGCGACAAATATCC
L04566.1   TGTAGGTATGGCGACAAACATCC
11168     TGTAGGTATGGCGACAAACATCC

```

**Figure III.31** : alignement des séquences d'ADN de la région *gyrA* QRDR de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. fetus* d'origine humaine et animale avec les séquences de *C. jejuni* (Gen Bank L04566) et *C. jejuni* (Gen Bank ATCC 11168).

La comparaison des ADN de nos souches à ceux des souches *C. jejuni* (Gen Bank L04566) et *C. jejuni* (Gen Bank ATCC 11168) a conduit aux résultats suivants :

- ✓ Nous pouvons noter que toutes les séquences d'ADN de *Campylobacter jejuni*, et *C. coli* présentent une mutation **C257T** qui correspond à la mutation thréonine-à--isoleucine de l'acide aminé 86 de la GyrA.
- ✓ Selon plusieurs auteurs la résistance aux fluoroquinolones est généralement causée par cette mutation (notée **Thr-86-Ile**) (Zirnstein et al., 1999 ; Bachoual et al., 2001; Piddock et al., 2003 ; Keller et Perreten, 2006 ; Luangtongkum et al., 2009 ; Lovine, 2013 ; Pérez-Boto et al., 2014). On peut cependant rencontrer d'autres mutations tel que : Ala-70-Thr ou Asp-90-Ala pour la gyr A (Aarestrup et Enberg, 2001).
- ✓ Cette mutation semble être équivalente à la mutation sérine-à-alanine de l'acide aminé 83 de la région gyrA de *E. coli* ou *Salmonella* (Wang et al., 1993 ; Charvalos et al., 1996 ; Gaunt et Piddock, 1996)
- ✓ Toutes les souches ont montré une résistance in vitro par la méthode des disques (< à 6mm) confirmée pour certaines souches par l'étude de la CMI (> 256µg/ml pour l'acide nalidixique et >32 µg/ml pour la ciprofloxacine) par l'utilisation des Etest. Ceci rejoint les résultats de certains auteurs car selon eux la mutation **Thr-86-Ile** est généralement associée à une haute résistance à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine (Oza et al., 2003 ; Lovine, 2013).



- ✓ Donc, dans notre cas, que la souche soit d'origine humaine ou animale, que ce soit *C. jejuni* ou *C. coli*, cette mutation est présente.
- ✓ Pour la souche N4, qui est *C. fetus* (d'origine humaine), elle a présenté une résistance phénotypique (< 6mm par la méthode des disques) mais la mutation Thr-86-Ile n'a pas été détectée. Piddock et al. (2003) ont eux aussi noté que deux souches d'origine humaine présentaient une résistance phénotypique mais pas de mutation sur la région gyrA. Ils suggèrent que dans ce cas il existe une mutation sur d'autres gènes qui confère cette résistance aux fluoroquinolones
- ✓ En plus de la mutation Thr-86-Ile, au moins une mutation muette est évidente dans la région QRDR de la gyrA de toutes les séquences des souches de *Campylobacter* étudiées pour la résistance aux quinolones :
  - position 81 CAC → CAT (HIS)
  - position 119 AGT → AGC (SER)
  - position 120 GCC → GCT (ALA)
  - position 157 AGC → AGT (SER)
  - position 161 GTT → GTC (VAL)
  - position 185 AAC → AAT (ASN)
- ✓ La N4 (*C. fetus*) a présenté une seule mutation muette en position 185 AAC → AAT (ASN).
- ✓ Pour *C. jejuni* et *C. coli* toutes les souches ont présenté toutes les mutations muettes citées ci-dessus, mis à part les N5 (d'origine humaine) et N2 (d'origine animale) qui elles n'ont présenté que la dernière mutation en position 185 AAC → AAT (ASN).

De même, d'autres auteurs ont noté l'apparition de quelques mutations muettes que ce soit pour les souches sensibles que pour les souches de *Campylobacter* résistantes aux quinolones (Zirnstein et al., 1999 ; Beckmann et al., 2004).

### Conclusion de la deuxième partie

- ✓ En conclusion pour cette partie, nous pouvons noter en premier lieu que les ADN des souches N°3, 7 et 8 ont montré les deux mutations liées à la résistance aux macrolides et aux quinolones, ce sont les seules ADN retenus pour les deux études.
- ✓ En deuxième lieu, nous pouvons dire que la plupart des souches, qu'elles soient d'origine humaine ou animale, qu'elles appartiennent à l'espèce *C. coli* ou *C. jejuni*, présentent les mêmes résistances, les plus fréquemment rencontrées pour la résistance aux macrolides et aux quinolones. Ces mutations sont généralement liées à une résistance phénotypique de haut niveau.
- ✓ Nous avons cependant le cas de *C. fetus*, qui lui ne présente aucune mutation en relation avec la résistance phénotypique qu'il a présenté pour les QRDR. D'autres recherches plus approfondies pourraient expliquer cette résistance.
- ✓ Dans l'ensemble nous pouvons dire que la résistance aux antibiotiques est un sérieux problème à prendre en considération surtout lorsque cette résistance est une résistance à deux familles d'antibiotiques importantes tels que les macrolides et les fluoro-quinolones. En effet, ces deux familles regroupent les antibiotiques qui sont généralement administrés en première et seconde intention lors des traitements des infections à *Campylobacter*.

### III.3. LES HUILES ESSENTIELLES

Compte tenu de l'antibiorésistance des souches de *Campylobacter* isolées et étudiées dans la présente thèse, nous avons voulu chercher des substituts d'antibiotiques pour parer aux problèmes de résistance. Notre attention s'est portée sur une source naturelle d'origine végétale : les huiles essentielles.

Actuellement, il est bien établi que les huiles essentielles et autres extraits végétaux possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales, et sont considérés comme des alternatives potentielles aux antibiotiques pour traiter diverses maladies infectieuses.

#### III.3.1. Activité antimicrobienne de quelques huiles essentielles sur *Campylobacter*

17 huiles essentielles ont été testées sur 4 souches antibio-résistantes différentes de *Campylobacter* (Figure III.32) par la méthode des disques.

Les diamètres obtenus (en mm) lors de ces aromagrammes sont représentés dans le tableau III.7. Nous pouvons remarquer globalement que, bien que les souches appartenant à *C. jejuni* présentent plus de résistance aux antibiotiques que *C. coli*, les HE ont montré une action relativement plus importante sur les souches de *C. jejuni* par rapport aux souches de *C. coli*. Bien que ce ne soit pas représentatif, nous pouvons quand même dire dans ce cas que l'antibio-résistance des souches de *Campylobacter* n'est pas un facteur limitant quant à l'action antimicrobienne des HE.

Les diamètres les plus importants ont été obtenus avec les huiles essentielles de clou de girofle, de thym et d'origan, ce qui veut dire que ces huiles essentielles ont montré une activité antibactérienne très importante vis-à-vis des *Campylobacter*.

**Tableau III.7:** résultats de l'aromatogramme des HE sur les 4 souches de *Campylobacter*

N°	HE	<i>C. jejuni.1</i> Ø mm	<i>C. coli.1</i> Ø mm	<i>C.coli.2</i> Ø mm	<i>C. jejuni.2</i> Ø mm
1	orange (commerciale, Algérie)	16	7	13	15
2	clou de girofle (mo wpt)(ENP)	46	33	39	43
3	orange (ENP)	6	6	6	13
4	lavande (ev) (ENP)	19	15	15	16
5	clou de girofle (ENP)	44	39	35	39
6	origan (ENP)	73	55	75	80
7	lavande (ENP)	17	19	17	19
8	orange (evmo) (ENP)	12	6	16	11
9	citron (commerciale, Algérie)	28	18	18	24
10	Thym (ev) (ENP)	80	61	57	82
11	Thym (ev as) (ENP)	76	70	60	82
12	bois roses (commerciale, France)	14	15	15	20
13	bergamote (commerciale, France)	16	12	17	19
14	citron (commerciale, France)	20	17	18	23
15	romarin (commerciale, France)	13	15	14	18
16	orange (commerciale, France)	11	7	11	13
17	badiane (commerciale, France)	20	34	19	43
	Profil d'antibiorésistance de chaque souche	NA, Cip, Mtr	NA, Tob	Tob	NA, Cip, Pef, Mtr, Te

NA : acide nalidixique ; Cip : ciprofloxacine ; Tob : tobramycine ; Mtr : métronidazole Pef : pefloxacine ; Te : tétracycline

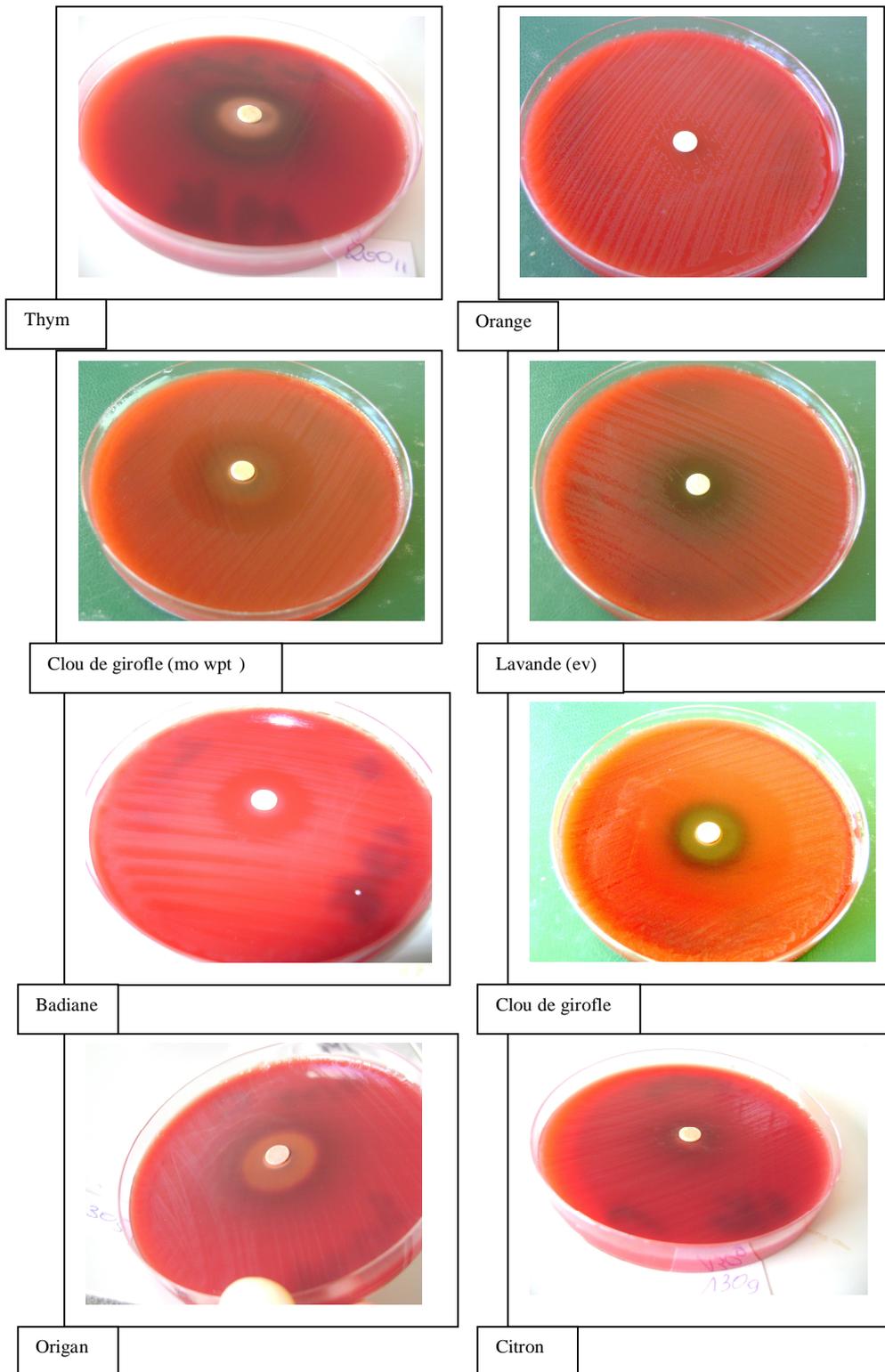


Figure III.32 : photos représentant les zones d'inhibition de certaines HE étudiées sur *Campylobacter jejuni.2*

Rattanachaikunsopon et Phumkhachorn (2010) ont testé l'activité de 12 huiles essentielles (HE) différentes sur le *Campylobacter*. Les deux huiles qui ont donné les meilleurs résultats étaient l'huile essentielle de coriandre suivie par celle du clou de girofle. A noter que les huiles essentielles de thym et d'origan n'ont pas été testées sur le *Campylobacter*. Ce que nous pouvons noter, c'est que le diamètre le plus important obtenu avec ces huiles était de l'ordre de 26mm, alors que les diamètres obtenus dans notre étude dépassent les 33 mm et atteignent les 46 mm pour l'HE de clou de girofle.

Pour les HE de thym et d'origan, les diamètres sont encore plus importants (80mm pour l'origan et 82 mm pour le thym). Ceci démontre l'efficacité de toutes ces HE auxquelles nous pouvons ajouter, à moindre degré, les HE de citron et de badiane.

Une étude de 2011, menée par Hellal a montré que l'HE de citron était efficace contre le *Staphylococcus aureus* ( $\varnothing > 30\text{mm}$ ) par contre aucun effet notable n'a été relevé pour *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli* et *Salmonella enteritidis*.

Selon l'étude de Haddouchi (2009) il apparaît que l'huile essentielle de Thym a présenté une bonne activité antibactérienne sur les souches bactériennes suivantes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus*.

Nous pouvons citer également les travaux de doctorat de Rhayour (2002) qui a étudié le mécanisme de l'action bactéricide des HE d'origan et de girofle sur *E. coli* et *Bacillus*. Elle a noté que ces huiles conduisaient à une lyse importante des cellules bactériennes.

Dans son travail publié en 2004, Burt a souligné l'efficacité, entre autres, des HE de thym, d'origan et de clou de girofle. Dorman et Deans (2000) ont étudié différentes huiles essentielles contre 25 genres bactériens (à Gram + et Gram -). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les huiles essentielles de thym et d'origan. De même Burt et Reinders (2007) ont obtenu ces résultats en testant quelques HE sur

*E. coli* O157.H7. A noter que dans les deux dernières études citées, le clou de girofle n'a pas été testé.

L'efficacité des huiles essentielles a été prouvée sur des bactéries pathogènes d'origine alimentaire (Burt, 2004) ou humaine (Rattanachaikunsopon et Phumkhachorn, 2010). Elle a même été prouvée sur des aliments artificiellement contaminés (Burt, 2004 ; Rattanachaikunsopon et Phumkhachorn, 2010 ; Hellal, 2011).

Nous pouvons noter également que l'activité des HE sur les *Campylobacter* est indépendante du niveau de résistance aux antibiotiques. Zhiri et al. (2010) ont noté également que l'activité des HE étudiées sur les bactéries (sensibles, intermédiaires ou résistantes) était indépendante de leur niveau d'antibiorésistance.

### **III.3.2. Etude du pouvoir bactéricide de trois HE sélectionnées (Figures III.33, III.34, III.35)**

Pour l'étude du pouvoir bactéricide nous avons testé la méthode sur milieu solide en utilisant des disques vierges qu'on imbibe avec l'huile essentielle voulue à la dilution voulue. Nous avons testé les deux souches de *Campylobacter coli* 1 et 2.

Après incubation nous avons obtenu les diamètres suivants (en mm) (tableau III.8)

On peut noter que le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à la dilution de l'huile essentielle testée.

Le diamètre le plus important toléré pour dire qu'une souche est résistante à un antibiotique est 22 mm pour la ciprofloxacine.

Si on compare les diamètres obtenus avec ceux tolérés pour l'antibiogramme (19 mm) nous pouvons remarquer que les dilutions varient selon l'HE étudiée :

- Pour l'HE d'origan, la plus faible concentration à partir de laquelle les diamètres d'inhibition sont <19mm. Elle est de 0,03 ml/ml
- Pour l'HE de thym, la plus faible concentration à partir de laquelle les diamètres d'inhibition sont <19mm est de 0,004 ml/ml

**Tableau III.8** : pouvoir bactéricide des HE d'origan, de thym et de clou de girofle sur *Campylobacter coli* 1 et 2

<b>Huile essentielle d'origan</b>		
Concentrations (ml HE/ml Solvant)	souche 1 (Ømm)	souche 2 (Ø mm)
0,5	67	67
0,25	66	60
0,125	66	36
0,0625	33	32
<b>0,03</b>	<b>17</b>	<b>19</b>
0,015	10	12
0,008	10	11
0,004	9	11
0,002	9	9
0,0009	7	7
0,0005	7	7
0,0002	6	6
<b>Huile essentielle de thym</b>		
Concentrations (ml HE/ml Solvant)	souche 1(Ø mm)	souche 2 (Ø mm)
0,5	85	74
0,25	80	65
0,125	60	56
0,0625	54	50
0,03	39	34
0,015	26	20
0,008	23	17
<b>0,004</b>	<b>20</b>	<b>16</b>
0,002	20	16
0,0009	10	13
0,0005	9	12
0,0002	7	11
<b>Huile essentielle de clou de girofle</b>		
Concentrations (ml HE/ml Solvant)	souche 1(Ø mm)	souche 2(Ø mm)
0,5	45	38
0,25	40	33
0,125	33	18
<b>0,0625</b>	<b>19</b>	<b>13</b>
0,03	16	13
0,015	16	13
0,008	15	10
0,004	13	10
0,002	11	10
0,0009	8	8
0,0005	8	6
0,0002	6	6

- Pour l'HE de clou de girofle, la plus faible concentration à partir de laquelle les diamètres d'inhibition sont <19mm est 0,625ml/ml

Nous remarquons que la plus faible concentration a été obtenue avec l'HE de thym et qui est 0,004 ml/ml. Ceci était relativement prévisible, car les diamètres les plus importants lors de l'aromatogramme ont été obtenus avec cette HE. Ce qui revient à souligner que l'HE de thym présente la meilleure activité antibactérienne vis-à-vis de *Campylobacter* puisqu'elle présente la plus faible concentration « inhibitrice ».

Selon l'étude de Ramanoelina et *al.* (1987) l'huile essentielle de Girofle a empêché le développement des huit souches testées. L'inhibition s'est faite à des teneurs en essence de l'ordre de (0,250 à 0,750 mg/ml) sauf pour *Branhamella catarrhallis* qui est inhibé à une dose très faible (0,025 mg/ml).

Les valeurs de CMI des huiles essentielles du thym et de girofle démontrent une bonne activité antibactérienne, avec un spectre d'action relativement large. et la classification des huiles essentielles selon leurs performances permet de démontrer que, parmi les essences testées, celle du Thym possède le plus grand pouvoir antibactérien puisqu'elle inhibe toutes les souches à une concentration moyenne de 0,200 mg/ml (Ramanoelina et *al.*, 1987). Ceci rejoint nos résultats qui démontrent que l'HE de thym est celle qui a donné les meilleurs résultats.

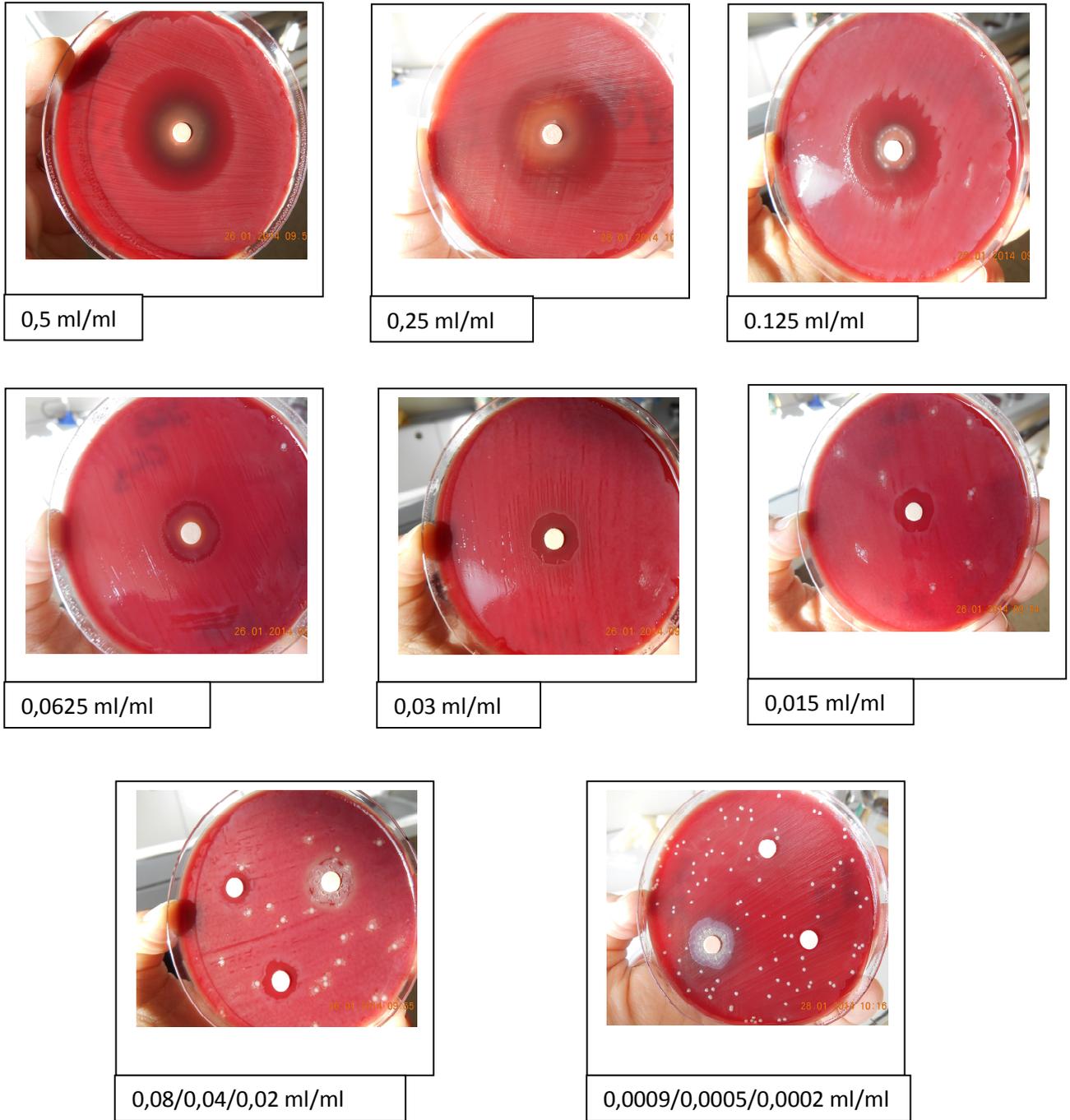


Figure III.33 : photos représentant les zones d'inhibition de l'HE de clou de girofle à différentes concentrations sur *Campylobacter coli*

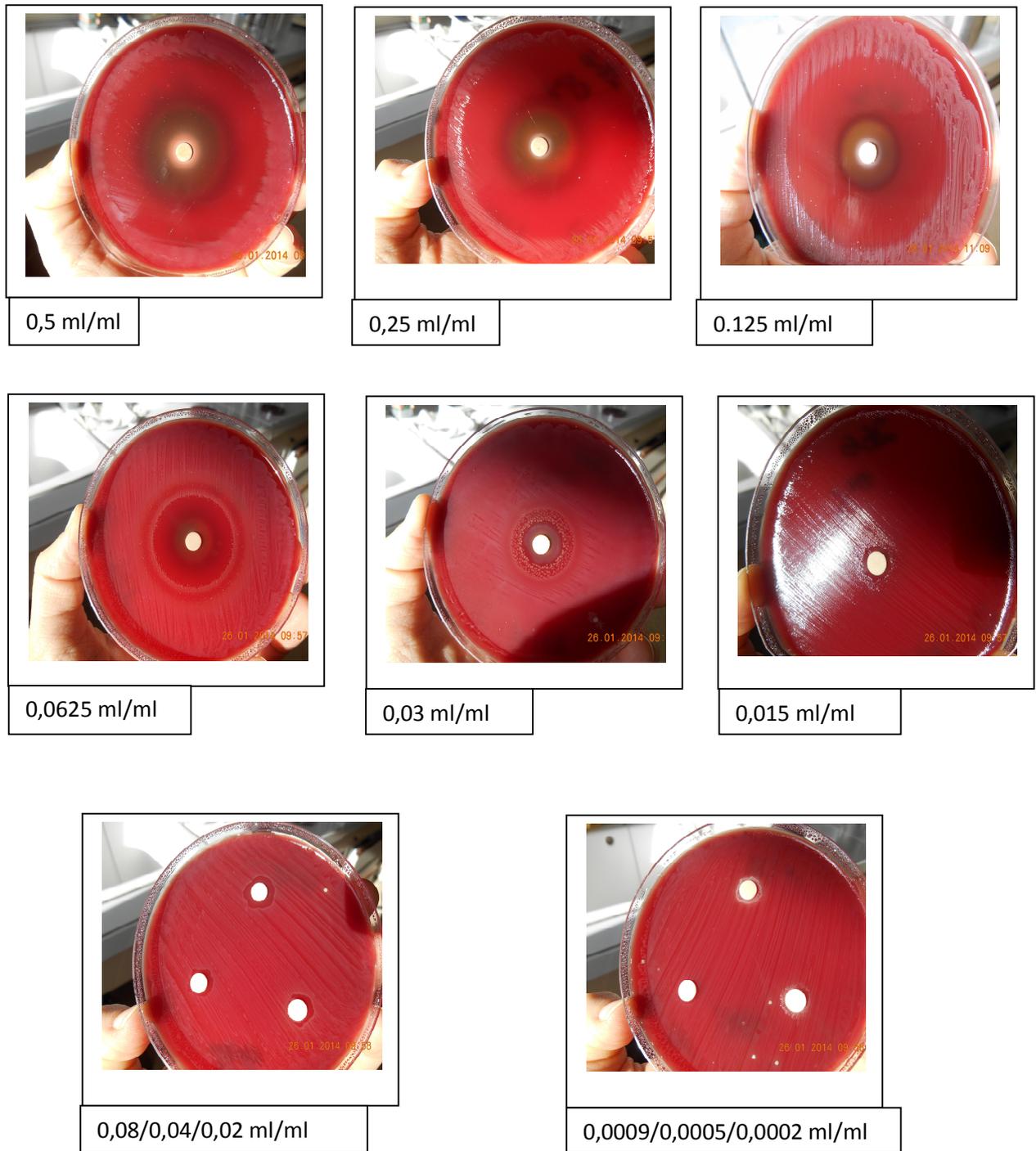


Figure III.34 : photos représentant les zones d'inhibition de l'HE d'origan à différentes concentrations sur *Campylobacter coli*

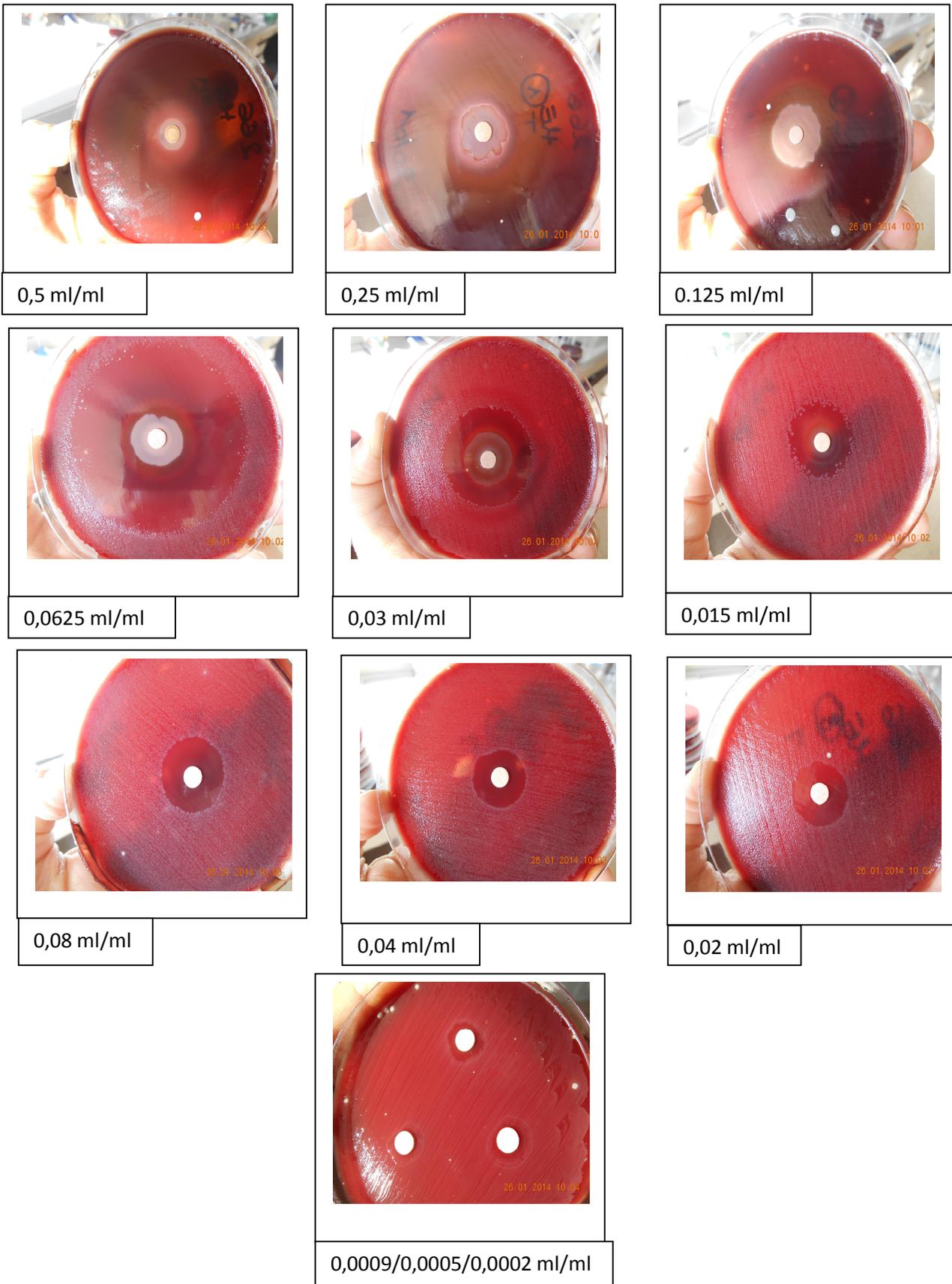


Figure III.35 : photos représentant les zones d'inhibition de l'HE de thym à différentes concentrations sur *Campylobacter coli*

## Conclusion de la troisième partie

- ✓ De nombreuses études ont montré que certaines plantes constituaient une alternative non négligeable pour palier au problème de résistance des bactéries aux antibiotiques (Samie et *al.*, 2005 ; Samie, 2007 ; Samie et *al.*, 2009 ; Ramalivhana et *al.*, 2010).
- ✓ En conclusion pour cette troisième partie, nous pouvons dire que cette étude nous démontre l'efficacité de l'action antibactérienne des huiles essentielles sur le *Campylobacter*, notamment celles du thym, de l'origan et du clou de girofle.
- ✓ L'utilisation de ces huiles nous permet de proposer une alternative aux antibiotiques, d'autant plus qu'elles présentent en général plusieurs vertus et font partie des habitudes alimentaires des algériens.
- ✓ Ces résultats justifient l'utilisation thérapeutique de ces plantes dans le traitement de certaines pathologies. Elles pourraient être utilisées en agroalimentaire comme additif alimentaire et comme conservateur. Des études plus approfondies sur les composés des HE seraient intéressantes. Les composés présentant la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre sont les phénols: thymol, carvacrol et eugénol. Les phénols entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires. Le thymol et l'eugénol sont responsables des activités fongicides et bactéricides des huiles essentielles qui en contiennent. La molécule de thymol exerce un effet inhibiteur et létal sur différentes souches bactériennes (Nutra News, 2006).
- ✓ De tout cela, il en ressort qu'il serait souhaitable de poursuivre l'étude sur ces HE qui deviennent une alternative à l'utilisation des antibiotiques.

Les *Campylobacter*, connus depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle comme agents pathogènes de maladies animales, n'ont été reconnus responsables de maladies chez l'homme que bien plus tard, avec la volaille comme source non négligeable de cette bactérie.

L'incidence de la campylobactériose, méconnue chez nous, dépasse celle des salmonelloses dans les pays développés. Dans notre cas nous pouvons affirmer que durant cette période d'étude le nombre de *Campylobacter* isolés des coprocultures dépassait celui des *Salmonella*.

En plus de cette incidence, l'autre problème lié aux *Campylobacter*, est l'apparition de plus en plus de résistance aux antibiotiques, notamment aux quinolones et aux macrolides.

Au terme de ce travail, nous pouvons noter plusieurs points :

- Notre étude confirme la présence de *Campylobacter* dans les prélèvements d'origine avicole. Ceci nous pousse à réfléchir et à proposer des moyens de réduction des contaminations des poules et des carcasses de poulets à différents stades de la chaîne alimentaire. En amont, la contamination peut être réduite en respectant et en appliquant les bonnes pratiques d'hygiène. Durant l'élevage des poules, différentes méthodes peuvent être proposées pour réduire la contamination à l'intérieur du tube digestif des poules ; soit par addition à l'alimentation ou à l'eau des abreuvoirs des additifs alimentaires chimiques, des probiotiques ou autres, soit par application d'acides organiques au niveau des cloaques. Après abattage, une pasteurisation des carcasses par de l'eau chaude ou bien leur conservation à très basses températures peuvent réduire cette contamination.
- L'espèce prédominante des isollements, tous confondus, est *Campylobacter jejuni*. Ceci est confirmé par plusieurs études. *Campylobacter coli* est quant à lui présent en deuxième position.
- Le nombre de porteurs sains est à prendre en considération, car ils représentent une autre source de contamination par *Campylobacter*. Pour cela il serait intéressant d'exiger des analyses de coprocultures pour la recherche de *Campylobacter*, notamment pour le personnel de restauration pour limiter les risques liés à cette bactérie.

- Le point le plus important de cette étude est la résistance de *Campylobacter* aux antibiotiques, notamment aux quinolones, aux  $\beta$ -lactamines, à la tétracycline et aux macrolides. Cependant nous pouvons noter que les taux de résistance les plus remarquables ont été obtenus chez les souches animales par rapport aux souches humaines. Ceci prouve l'implication directe de l'utilisation des antibiotiques dans les élevages sur les souches animales, d'où la nécessité de réduire cette pratique abusive.
- La confirmation génétique de cette résistance a été réalisée pour deux familles d'antibiotiques, les quinolones et les macrolides, par une mise en évidence de mutations au niveau des gènes par séquençage. La résistance aux macrolides est due à la mutation **A2075G**, et la résistance aux quinolones est quant à elle, due à la mutation notée **Thr-86-Ile**. La compréhension des mécanismes responsables de la résistance aux antimicrobiens aidera à faciliter la mise en place de stratégies de lutte contre résistance des *Campylobacter* aux antibiotiques.
- L'augmentation de la résistance des microorganismes aux antibiotiques a nécessité la recherche de nouveaux moyens efficaces pour réduire les maladies infectieuses. Nous pouvons dire que les HE étudiées lors de notre travail se sont avérées efficaces contre les *Campylobacter* présentant des multirésistances.
- Les HE qui ont montré le plus d'efficacité sur le *Campylobacter* sont l'HE de thym suivie par l'HE d'origan et celle du clou de girofle. Il serait souhaitable de poursuivre cette partie de l'étude pour approfondir les connaissances et cibler les composés responsables de cette propriété antibactérienne.

Bien que le *Campylobacter* soit une cause importante de maladies infectieuses dans le monde, et bien qu'il présente de plus en plus de résistance à certaines familles d'antibiotiques, les HE de certaines plantes pourraient s'avérer efficaces quant à son éradication, notamment par leur utilisation comme additifs alimentaires.

Les résultats de ces travaux soulignent bien les risques que peuvent engendrer les contaminations par *Campylobacter* et l'utilisation massive et non réglementée des antibiotiques dans les élevages. Ce qui peut se répercuter directement sur la santé humaine au vu des entraves de traitements des intoxications alimentaires. D'où l'urgence d'une prise de conscience raisonnable.

- A.F.N.O.R. : Méthode horizontale pour la recherche de *Campylobacter* thermo tolérants. Association Française de Normalisation. 1996, NF ISO 10272.
- AARESTRUP F.M., ENGBERG J. : antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. Vet. Res., 2001, 32, 311-321.
- AARESTRUP F.M., NIELSEN E.M., MADSEN M., ENGBERG J. : Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. Antimicrob Agents Chemother., 1997, 41, 2244-2250.
- AFSSAPS : Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. AFSSAPS, Mai 2008. 17p.
- AKITOYE O.C., RAPHAEL D.I., BOLAJI N.T., KEHINDE O. A.: Human Campylobacteriosis in Developing Countries. Emerg. Infect. Dis., 2002, 8, 237-243.
- AL AMRI A., SENOK A.C., ISMAEEL A.Y., AL-MAHMEED A.E., BOTTA G.A. : Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. J. Medic. Microb., 2007, 56, 135061355.
- ALLOS B.M. et BLASER M.J. : *Campylobacter jejuni* and the expanding spectrum of related infections., Clin. Infect. Dis., 1995, 20, 1092-1099.
- ALLOS, B. M., TAYLOR D. N. : *Campylobacter* Infections, p. 169-190. In EVANS A. S., BRACHMAN P.S., Bacterial infections of humans: epidemiology and control, 3rd ed. Plenum Medical Book Company, 1998, New York, p. 169-190.
- ALTEKRUSE F., STERN J., FIELDS P., SWERDLOW D.: *Campylobacter jejuni* ó an emerging food borne pathogen. Emerg. Infect. Dis., 1999, 5, 28-35.
- AMEZIANE N., BOGARD M., LAMORIL J. : Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Ed. Elsevier. 2006; 705 p.
- ANGULO F.J. ET SWERDLOW D.L.: bactériel Bactériel enteric infections in persons infected with human immunodeficiency virus. Clin. Infect. Dis., 1995, 2, 584-593.
- AVRIL J.L. DABERNAT H. DENIS F., MONTEIL H. : *Campylobacter-Helicobacter*. Bactériologie clinique. Ed. Ellipses, 2000, 331-335.
- BACHOUAL R., OUABDESSELAM S., MORY F., LASCOLS C., SOUSSY C.J., TANKOVIC J. : Single or double mutational alterations of gyrA associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Microb. Drug Resist., 2001,7, 257-61.
- BADJI S., KHELAFI N. : mise Mise au point d'une technique de recherche de *Campylobacter* dans les selles humaines. Mémoire D.E.S. en microbiologie, 2000, 83p. Algérie.
- BASSOLE H. N., KABORE Z.I., TRAORE A.S. : étude Etude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale. Pharm. Méd. Trad. Afr., 2001, 11, 11113-1122.
- BASSOLÉ I.H.N., JULIANI H.R.: Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. Molecules, 2012, 17, 3989-4006.
- BECKMANN L., MÜLLER M., LUBER P., SCHRADER C., BARTELT E., KLEIN G.: Analysis of gyrA mutations in quinolone-resistant and-susceptible *Campylobacter*

- jejuni* isolates from retail poultry and human clinical isolates by non-radioactive single-strand conformation polymorphism analysis and DNA sequencing. J. Appl. Microbiol., 2004, 96, 104061047.
- BELBOURI A., MEGRAUD F. : enterotoxin-like activity produced by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from patients and healthy controls in Algeria. FEMS. Microbiol. Let., 1988, 51, 25-28.
  - BENSID S., MEGRAUD F., AGUERCIF M., REFFSA C., BOUDRAA G., TELIDJI Z., BESSADOUK K. et TOUHAMI M. : *Campylobacter* : expérience pédiatrique à Oran. Arch. de L'Institut Pasteur d'Algérie, 56, 1988, 7-13.
  - BERRANG M.E., MEINERSMANN R.J., BUHR R.J., REIMER N.A., PHILIPS R.W., HARRISON M.A.: Presence of *Campylobacter* in the respiratory tract of broiler carcasses before and after commercial scalding. Poult. Sci., 2003, 82, 1995-1999.
  - BERRANG M.E., SMITH D.P., HINTON A. Jr.: Organic acids placed into the cloaca to reduce *Campylobacter* contamination of broiler skin during defeathering. J. Appl. Poult. Res., 2006, 15, 287-291.
  - BERRANG M.E., SMITH D.P., WINDHAM W.R., FELDNER P.W. : effect of intestinal content contamination on broiler carcass *Campylobacter* counts. J. Food Protec., 2004, 67, 235-238.
  - BEUCHAT L.R.: Efficacy of media and methods for detecting and enumerating *Campylobacter jejuni* in refrigerated chicken meat. Appl. Environ. Microbiol., 1985, 50, 934-939.
  - BOLTON FJ, ROBERTSON L.: A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. J Clin. Pathol., 1982,35, 4626467.
  - BOURGEOIS C.M., MESCLE J.F., ZUCCA J. : Microbiologie alimentaire : Aspects Microbiologiques de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome I. Editions Ed. Lavoisier, 1996, 241- 251.
  - BROGDEN K.A., ACKERMANN M., MCCRA Y.P.B., TACK B.F. : Antimicrobial peptides in animals and their role in host defenses. Int. J. Anti microb. Agents., 2003 , 22, 465-478.
  - BRUSSOW H : Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. Microbiology, 2005, 151, 2133-2140.
  - BUCHANB.W., OLSONW .J., PEZEWSKIM., MARCON M.J., NOVICKIT., UPHOFFT.S., CHANDRAMOHAN L., REVELL P., LEDEBOERN.A. : Clinical Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Identification of *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* (*Campylobacter jejuni* and *C. coli*), and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates in Stool Specimens. J. Clin. Microbiol., 2013, 51, 4001-4007.
  - BURT S. A.: Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food. Ed. Ridderprint Offsetdrukkerijb.v., Ridderkerk. 2007, 142 p.
  - BURT S. : Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods; a review. Int. J. Food Microbiol., 2004,1, 94, 223-53.
  - BURT S., REINDERS R.D.: Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. Chapter 2 in BURT S. A. : Antibacterial activity of

- essential oils: potential applications in food. Ed. Ridderprint Offsetdrukkerijb.v., Ridderkerk., 2007, 49-51.
- BUTZLER J.P. : *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin. Microbio. Infect. Dis., CMI, 2004, 10, 868-876.
  - BUTZLER J.P. : la La campylobactériose humaine . 1978, 8027 A10, 11- ,1-3.
  - CABIE A., BOUCHAUD O., COULAUD J.P. ; Infections à *Campylobacter*. Encycl. Med. Chir. Malad. Infec., 8-027-A-10, 1996, 1-6.
  - CAPPELIER J.M., DELATTRE G., FEDERIGHI M., JUGIAU F., RAMA F., THOLOZAN J.L. : Physiologie cellulaire des formes viables mais non cultivables de *Campylobacter jejuni*. Unité associée INRA Hygiène Alimentaire ENVN ; 1994.
  - CHAN F. T., MACKENZIE A. M.: Evaluation of primary selective media and enrichment methods for *Campylobacter* species isolation. Europ. J. Clin. Microbiol., 1986, 5, 162-164.
  - CHARVALOS E., PETEINAKI E., SPYRIDAKI I., MANETAS S., TSELENTIS Y. : detection of ciprofloxacin resistance mutations in *Campylobacter jejuni* gyrA by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism and direct DNA sequencing. J. Clin. Lab. Anal., 1996, 10, 129-133.
  - CHAVEERACH P., KEUZENKAMP D.A., LIPMAN L.J.A., VAN KNAPEN F.: Effect of organic acids in drinking water for young broilers on *Campylobacter* infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. Poultry Sci., 2004, 83, 330-334.
  - CHEN W., MARTINEZ G., MULCHANDANI A. : molecular beacons : a real time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. Analyt. Bioch., 2000, 280, 166-172.
  - COLE K., DONOGHUE A.M., BLORE P.J., HOLLIMAN J.S., COX N.A., MUSGROVE M.T., DONOGHUE D.J.: Effects of aeration and storage temperature on *Campylobacter* concentrations in poultry semen. Poultry Sci., 2004, 83, 1734-1738.
  - COLE K., FARNELL M. B., DONOGHUE A. M., STERN N. J., SVETOCH E. A., ERUSLANOV B. N., VOLODINA L. I., KOVALEV Y. N., PERELYGIN V. V., MITSEVICH E. V., MITSEVICH I. P., LEVCHUK V. P., POKHILENKO V. D., BORZENKOV V. N., SVETOCH O. E., KUDRYAVTSEVA T. Y., REYES-HERRERA I., BLORE P. J., SOLIS DE LOS SANTOS F., DONOGHUE D. J. : Bacteriocins Reduce *Campylobacter* Colonization and Alter Gut Morphology in Turkey Poults. Poultry Sci., 2006, 85, 1570-1575.
  - COLIN M.P. : coordination scientifique. M.R. Lailier, 2006, 3p.
  - CORRY J.E., POST D.E., COLIN P., LAISNEY M.J. : Culture media for the isolation of *Campylobacters*. Int. J. Food Microbiol., 1995, 26, 43-76.
  - CORRY J.E.L. : *Campylobacter* : Detection by Cultural and Modern Techniques, p. 341-347. In BATT C.A., PATEL P.D., Encyclopedia of food microbiology. Ed. Academic Press, 2000, San Diego, CA, p. 341-347.
  - CORRY J.E.L., JAMES S.J., PURNELL G., BARBEDOPINTO C.S., CHOCHOIS Y., HOWELL M., JAMES C.: Surface pasteurisation of chicken carcasses using hot water. J. Food Eng., 2007, 79, 913-919.

- CORTEZ A.L.L., CARVALHO A.C.F.B., SCARCELLI E., MIYASHIRO S., VIDAL-MARTINSI A.M.C., BÜRGER K.: survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. REV. Inst. Med. Trop. S. Paulo., 2006, 48, 307-310.
- DAVIS M.A., CONNER D.E.: Antimicrobial effects of *Pseudomonas aeruginosa* on survivability and recovery of *Campylobacter jejuni* on poultry products. Poult Sci., 2007, 86, 760-764.
- DENIS M., SOUMET C., RIVOAL K., ERMEL G., BLIVET D., SALVAT G., COLIN P. : Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C.coli*. Lett. Appl. Microb., 1999, 29, 406-410.
- DON J.B., NOEL R.K., JAMES T.S.: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon proteobacteria. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Springer, 2005, 1156-1170.
- DORMAN H.J.D., DEANS S.G. : Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microb., 2000, 88, 308-316.
- DROMIGNY E. : Méthode de recherche, de dénombrement et d'identification de *Campylobacter jejuni*. In : LARPENT J.P. Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire. Ed. Technique et documentation ; 1997, 78-110.
- DROMIGNY E., LOUVE J.L., VACHINE I.: *Campylobacter* chez la dinde à l'abattoir : fréquences et marqueurs épidémiologiques. Rev. Méd. Vét., 1985, 136, 541-546.
- EFSA : scientific report of EFSA AND and ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. EFSA Journal, 2012, 10(3), :2597, 442p.
- ENGBERG J., AARESTRUP F.M., TAYLOR D.E., GERNER-SMIDT P., NACHAMKIN I. : Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. Emerg. Infect. Dis., 2001, 7, 491.
- EUZEBY J.P. : Dictionnaire de bactériologie vétérinaire (2007). www.bacterio.cict.fr
- EYQUEMA., ALOUFJ.E., MONTAGNIER L.: Traité de microbiologie clinique. Premières mises à jour, Edité par Ed. Piccin-Nuova Libreria, 1998. 1596p.
- FAO & OMS : statistiques sur les maladies d'origine alimentaire en Europe : risques microbiologiques et cliniques. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et Organisation Mondiale de la Santé. PEC01/04 (rev) 2002, 15p.
- FAUCHÈRE J.L., AVRIL J.L.: *Campylobacter, Helicobacter, Arcobacter*, pp: 332-335. In FAUCHÈRE J.L. et AVRIL J.L. : Bactériologie générale et médicale. Edition. Ellipses, 2002, p: 332-335.
- FAUCHÈRE J.-L., KERVELLA M., PAGES J.M., FENDRI C. : In vitro study of virulence factors of enteric *Campylobacter spp.*, pp168-175, In NACHAMKIN I., BLASER M. J., TOMPKINS L. S., *Campylobacter jejuni*: Current Status and Future Trends. Ed. Washington, DC : American Society for Microbiology, 1992, p168-175.

- FAUCHERE J-L. : Autres bacilles à Gram négatif, pp : 267-273. In : FAUCHERE J-L. ET AVRIL J-L. : Bactériologie générale et médicale. Edition Ellipses, 2002.
- FEDERIGHI M., MAGRAS C., FILET M-F.: *Campylobacter*, pp.: 145-172. In: Bactériologie Alimentaire. Compendium d'hygiène des aliments, FEDERIGHI M., Ed. Economica, 2005.
- FORSYTHE S.J. : The microbiological risk assessment of food. Edition Ed. Wiley-Blackwell, 2002, 216p.
- FUNKE G., BAUMANN R., PENNER J.L., ALTWEGG M.: Development of resistance to macrolide antibiotics in an AIDS patient treated with clarithromycin for *Campylobacter jejuni* diarrhea. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1994, 13, 612-615.
- GALLAY A, MEGRAUD F. : Mise en place d'un système de surveillance des infections à *Campylobacter* en France. Revue Française des Laboratoires, juin/juillet 2003, N° 354.
- GALLAY A., PROUZET-MAULEON V., VALK H.D., VAILLANT V., LABADI L., DESENCLOS J.-C. , MEGRAUD F. : Les infections à *Campylobacter* chez l'homme en France : bilan des trois années de surveillance 2001-2003. Bull. Acad. Vét. Fr., 2005, 158, 369-376.
- GARENAUX A., JUGIAU F., RAMA F., DE JONGE R., DENIS M., ? FEDERIGHI M., RITZ M. : survival Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions : effect of temperature. Curr. Microbiol., 2008, 56, 293-297.
- GARNIER J.M. : Recherche de *Campylobacter jejuni*. Feuillet de biologie. Bactériologie. Edit. Varia-Paris, 1985, 26, 19-23.
- GAUNT P.N., PIDDOCK J.V. : ciprofloxacin Ciprofloxacin resistant *Campylobacter* spp in humans: an epidemiological and laboratory study. J. Antimicrob. Chemother., 1996, 37, 747-757.
- GEBREYES W. A., THAKUR S., MORROW W.E.M.: *Campylobacter coli*: prevalence and antimicrobial resistance in antimicrobial-free (ABF) swine production systems. J. Antimicrob. Chemother., 2005, 56, 765-768.
- GEORGSSON F., THORNORKESSON A.E., GEIRSDÓTTIR M., REIERSEN J., STERN N.J. : The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. Food Microbiol., 2006, 23, 677-83.
- GIBBONS S.: Phytochemicals for bacterial resistance strengths , weaknesses and opportunities. Planta Med., 2008, 74, 594 -602.
- GIBREEL A., KOS V.N., KEELAN M., TRIEBER C.A., LEVESQUE S., MICHAUD S., TAYLOR D.E.: Macrolide Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Molecular Mechanism and Stability of the Resistance Phenotype. Antimicrob. Agents Chemother., 2005, 49, 2753-2759.
- GIBREEL A., TAYLOR D.E.: Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J. Antimicrob. Chemother., 2006, 58, 243-255.
- GIBSON U.E., HEID C.A., WILLIAMS P.M.: a novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res., 1996, 6, 995-1001.

- GONZALEZ I., GRANT K.A., RICHARDSON P.T., PARK S.F., COLLINS M.D. : Specific Identification of the Enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using a PCR Test Based on the *ceuE* Gene Encoding a Putative Virulence Determinant. J. Clin. Microbiol., 1997, 35, 7596763.
- GOOSSENS H., DE BOECK M., BUTZLER J.P.: A new selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from human faeces. Eur. J. Clin. Microbiol., 1983, 2, 389-394.
- GRIFFITHS A.J.F., MILLER J.H., SUZUKI D.T., LEWONTIN R.C., GELBART W.M. : introduction Introduction à l'analyse génétique. 3<sup>ème</sup> édition Ed., De Boeck, 2002 ;, 860p.
- GUEVREMONT E., NADEAU E., SIROIS M., QUESSY S. : antimicrobial Antimicrobial susceptibilities of thermophilic *Campylobacter* from humans, and chicken broilers. Can. J. Vet. Res., 2006, 70, 81-86.
- GUINOISEAU E. : Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse présentée pour l'obtention du grade de docteur, décembre 2010 ; 143p. Corse.
- HADDOUCHI F., LAZOUNI H.A., MEZIANE A. et BENMANSOUR A. : Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. Afr. Sci., 2009, 05, 246 ó 259.
- HELLAL Z. : contribution à l'étude des propriétés antibactériennes antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites de Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magister, 2011, 120p. Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie.
- HERVE C., AMEZIANE N., GUIET P. : Mise en òuvre de la biologie moléculaire dans un laboratoire de biologie médicale : l'expérience du CH de Sens. Spect. Biol., 2007, 162, 94-98.
- HILMARSSON H., THORMAR H., THRÁINSSON J.H., GUNNARSSON E.: Effect of glycerol monocaprinate (monocaprin) on broiler chickens : an attempt at reducing intestinal *Campylobacter* infection. Poult Sci., 2006, 85, 588-592.
- HOAR B.M., WHITESIDE D.P., WARD L., INGLIS G.D., MORCK D.W. : Evaluation of the enteritic microflora of captive whooping cranes (*Grus americana*) and sandhill cranes (*Grus canadensis*). ZooBiol. 2007, 26, 141-153.
- HORROCKS S.M. : effects of short-chain nitrocompounds against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in vitro. These de master, 64p. Etat du Texas, Etats Unis d'Amérique.
- HORROCKS S.M., ANDERSON R.C., NISBET D.J., RICKE S.C. : Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. Anaerobe., 2009, 15, 18-25.
- HORROCKS S.M., JUNG Y.S., HUWE J.K., HARVEY R.B., RICKE S.C., CARSTENS G.E., CALLAWAY T.R., ANDERSON R.C., RAMLACHAN N., NISBET D.J. : Effects of short-chain nitrocompounds against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in vitro. J. Food Sci., 2007, 72, M50-5.
- HU L., KOPECKO D.J.: Interactions of *Campylobacter* with eukaryotic cells; gut luminal colonization and mucosal invasion mechanisms, pp191-215. In

- NACHAMKIN I., BLASER M.J., *Campylobacter*. 2<sup>nd</sup> Edition ASM Press, 2000, Washington.
- HUMPHREY T., O'BRIEN S., MADSEN M. : *Campylobacter* as zoonotic pathogens : a food production perspective. Int J Food Microbiol., 2007, 15, 237-57.
  - HUSSAIN I., MAHMOOD M.S., AKHTAR M., KHAN A.: prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. Food Microbiol., 2007, 24, 219-222.
  - INGLIS G.D., HOAR B.M., WHITESIDE D.P., MORCK D.W.: *Campylobacter* Canadensis sp. nov., from captive whooping cranes in Canada. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2007, 57, 2636-2644.
  - INGLIS G.D., KALISCHUK L.D. : use Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69, 3435-3447.
  - IPA : Institut Pasteur d'Algérie : rapport d'activité 2006, p 81-89.
  - IPA : Institut Pasteur d'Algérie : rapport d'activité 2007, p 95-104.
  - IPA : Institut Pasteur d'Algérie : rapport d'activité 2008, p 105-112.
  - IPA : Institut Pasteur d'Algérie : rapport d'activité 2009, p 135-142.
  - IPA : Institut Pasteur d'Algérie : rapport d'activité 2010, p 125-132.
  - IPA : Institut Pasteur d'Algérie : rapport d'activité 2011, p 123-128.
  - IPA : Institut Pasteur d'Algérie : bilan du service des entérobactéries, 2012.
  - JORGENSEN F., BAILEY R., WILLIAMS S., HENDERSON P., WAREING D.R.A., BOLTON F.J., FROST J.A., WARD L., HUMPHREY T.J.: Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw milk, whole chicken in relation to sampling methods. Int. J. Food Microbiol., 2002, 76, 151-164.
  - JOSEFSEN M.H., LUBECK P.S., AALBAEK B., HOORFAR J.: Preston and Parkó Sanders protocols adapted for semi-quantitative isolation of thermotolerant *Campylobacter* from chicken rinse. Int. J. Food Microbiol., 2003, 80, 177-183.
  - KARLSSON M. : Optimization and validation of a triplex real-time PCR assay for thermotolerant *Campylobacter* species associated with foodborne disease. Thèse de master, 2013, 40p. Université des Sciences de l'agriculture, Suède.
  - KASSA T., GEBRE-SELASSIE S., ASTRAT D.: Antimicrobial susceptibility patterns of thermotolerant *Campylobacter* strains isolated from food animals in Ethiopia. Vet. Microbiol., 2007, 119, 82-87.
  - KELLER J., PERRETEN V. : Genetic diversity in fluoroquinolone and macrolide-resistant *Campylobacter coli* from pigs. Vet. Microbiol., 2006, 10, 103-108.
  - KERAMAS G., BANG D.D., LUND M., MADSEN M., BUNKENBORG H., TELLEMAN P., CHRISTENSEN C.B.: Use of culture, PCR analysis, and DNA microarrays for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from chicken feces. J. Clin. Microbiol., 2004, 42, 3985-91.
  - KINDHAUSER M.K. : Défense mondiale contre la menace des maladies infectieuses : Maladies transmissibles 2002. Organisation mondiale Mondiale de la Santé ; WHO/ C DS/ 2003.15 ; 170p.

- KING L., LEHOURS P., MEGRAUD F.: bilan Bilan de la surveillance des infections à *Campylobacter* chez l'homme en France en 2009 - synthèse. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire, décembre 2010. 6p. disponible à partir de l'URL : [www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr)
- KING L.A., MEGRAUD F.: surveillance Surveillance des infections à *Campylobacter* chez l'Homme en France, 2003-2010. BEH Hors série, 9 mai 2012, 11-13.
- KONKEL M.E., MONTEVILLE M.R., RIVERA-AMILL V., JONES L. : the The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediates enteritis. Curr. Issues Intest. Microbiol., 2001;, 2 (2), 55-71.
- KROGER A., KLIMMEK O., VANDAMME P., DEWHIRST F.E. ET PASTEUR B.J. : *Genus III*. In : BRENNER D.J., KRIEG N.R., STALEY J.T. ET GARRITY G.M.: Bergey's Manual of Systematic bacteriology. Second Ed., vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria), Springer, New york ; 2005. p. 1191-1194.
- LADELY SR, MEINERSMANN RJ, ENGLER MD, FEDORKA-CRAY PJ, HARRISON MA. : 23S rRNA gene mutations contributing to macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Foodborne Pathog. Dis., 2009, 6, 91-98.
- LARPEN J.P. : Manuel pratique de microbiologie. Edition Hermann, 1985, 220p.
- LAWSON A.J., LOGAN J.M., O'NEILL G.L., DESAI M., STANLEY J.: Large-scale survey of *Campylobacter* species in human gastroenteritis by PCR and PCR Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay. J. Clin. Microbiol., 1999, 37, 3860-3864.
- LEBLANC-MARIDOR M., BEAUDEAU F., SEEGERS H., DENIS M., BELLOC C.: Rapid identification and quantification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by real-time PCR in pure cultures and in complex samples. BMC Microbiology 2011,11, 16p.
- LECLERC H., MOSSEL D.A.A. : Le tube digestif, ; pp 205-242. In LECLERC H., MOSSEL D.A.A., FOURNIER A., BERNIER J.J., microbiologie Microbiologie : le tube digestif, l'eau et les aliments. Edition DOIN, 1989, p 205-242.
- LEHTOPOLKU M. : Antimicrobial Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. ANNALES UNIVERSITATIS TURKUENSIS, SARJA - SER. D OSA - TOM. 976;, 2011;, 74p. Turquie.
- LEUCHTEFELD N.W., WANG W.L., BLASER M.J. ET RELLER L.B.: evaluation Evaluation of transport and storage techniques for isolation of *Campylobacter fetus* subsp *jejuni* from turkey cecal specimens. J. Clin. Microbiol., 1981, 13, 438-443.
- LEVY S.B., MARSHALL B.: Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat. Med., 2004, 10, 122 -129.
- LIU J., FELDMAN P., CHUNG T.D.Y. : realReal-time monitoring *in vitro* transcription using molecular beacons. Analytical Biochemistry, 2002;, 300, 40-45.
- LOVINE N.M. : resistance Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. Virulence, 2013, 4, 230-240.

- LUANGTONGKUM T., JEON B., HAN J., PLUMMER P., LOGUE C.M., ZHANG Q. : Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol.*, 2009, 4, 1896200.
- LUANGTONGKUM T.: *Campylobacter spp.* In conventional and organic poultry operations. Thèse de doctorat, 2005, 304p. Etat de l'Ohio, Etats Unis d'Amérique.
- LUBER P., WAGNER J., HAHN H., BARTELT E. : Antimicrobial Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Strains Isolated in 1991 and 2001-2002 from Poultry and Humans in Berlin, Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, 47, 382563830.
- LUCEY B., O'HALLORAN F., FANNING S.: Molecular-based identification and typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Methods Mol. Biol.*, 2004, 268, 33-47.
- Mc CREA B.A., TONOOKA K.H., VANWORTH C., BOGGS C.L.: Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* species on farm, after transport, and at processing in specialty market poultry. *Poult. Sci.*, 2006, 85, 136-143.
- Mc DERMOTT P.F., SIMALA-GRANT J.L., TAYLOR D.E.: Antimicrobial resistance in *Helicobacter* and *Campylobacter*, pp. 847-863. In MAYERS D., *Antimicrobial drug resistance*, Vol. 2, EDEd. Humana Press, 2009, p 847-863.
- MEGRAUD F. : *Campylobacter* P. 1297-1310. In : FRENEY J., RENAUD F., HASEN W. BOLLET C. *Manuel de bactériologie clinique*. Ed. Elsevier, Vol. 3, n° 2 ; 1994.
- MEGRAUD F., BULTEL C. : Appréciation des risques alimentaires liés aux *Campylobacter*. Application au couple poulet/ *Campylobacter jejuni*. Rapport AFSSA, 2004, 20-47.
- MEGRAUD F., PROUZET-MAULEON V. : Évolution de la résistance des *Campylobacter* aux antibiotiques en France (1986-2002). *BEH* n° 32-33/2004
- MOORE J.E., CORCORAN D., DOOLEY J.S.G., FANNING S., LUCEY B., MATSUDA M., MCDOWELL D.A., MÉGRAUD F., MILLAR B.C., O'MAHONY R., O'RIORDAN L., O'ROURKE M., RAO J.R., ROONEY P.J., SAILS A., WHYTE P. : *Campylobacter*. *Vet. Res.*, 2005, 36, 3516382. Review article
- MOULESSEHOUL S. : *Biologie moléculaire*. Ed., OPU, 2004, 97p.
- MURPHY C., CAROLL C., JORDAN K.N. : Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *The society for applied Microbiology, J. Appl. Microbiol.*, 2006, 100, 623-632.
- NACHAMKIN I.: *Campylobacter* and *Arcobacter*. In : MURRAY P.R., BARRON E.J., PFALLER M.A., TENOVER F.C., YOLKEN R.H. *Manuel of clinical microbiology*. 7<sup>ème</sup> édition Ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 1999, pp 716-725.
- NAKAMURA C.V., UEDA-NAKAMURA T., BANDO E., MELO A. F. N., CORTEZ D. A. G., FILHO B. P. D. : Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. *Essential Oil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 1999, 94, 675-678.
- NELSON J.M., SMITH K.E., VUGIA D.J., RABATSKY-EHR T., SEGLER S.D., KASSENBERG H.D., ZANSKY S.M., JOYCE K., MARANO N., HOEKSTRA

- R.M., ANGULO F.J. : Prolonged diarrhea due to ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* infection. *J Infect Dis.*, 2004, 15,1150-1157.
- NEWELL D. G., FEARNLEY C.: Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69 ;, 4343-4351.
  - NG L.K., TAYLOR D.E., STILES M.E. : Characterization of freshly isolated *Campylobacter coli* strains and suitability of selective media for their growth. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, 26, 518-523.
  - NUTRA NEWS : les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. NUTRA NEWS, oct. 2006, 8-15.
  - OIE : *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. OIE Terrestrial Manual 2008, CHAPTER 2.9.3.;, 1185- 1191.
  - OMS, 2000 : *Campylobacter*. Organisation mondiale de la santé. Aide mémoire n° 255. [www.who.it](http://www.who.it)
  - ON S.L.W. : Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria : current status, future prospects and immediate concerns. *J. Appl. Microbiol.*, Symposium Supplement, 2001, 90, 1S-15S.
  - OZA A. N., MCKENNA J. P., MCDOWELL S. W. J., MENZIES F. D., NEIL S. D.: Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp. isolated from broiler chickens in Northern Ireland. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003, 52, 2206-223.
  - PADUNGTON P., KANEENE J. B. : *Campylobacter* spp. in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. *J. Vet. Med. Sci.*, 2003, 65;, 161-170.
  - PARK H., HUNG Y.C., BRACKETT R.E. : Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, 30, 77-83.
  - PAYOT S, BOLLA JM, CORCORAN D, FANNING S, MÉGRAUD F, ZHANG Q.: Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect.* 2006, 8, 8, 1967-1971.
  - PEARSON A. D., GREENWOOD M., HEALING T. D., ROLLINS D., SHAHAMAT M., DONALDSON J., COLWELL R. R. : Colonization of Broiler Chickens by Waterborne *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Apr. 1993, 59, 987-996.
  - PEARSON A. D., GREENWOOD M. H., FELTHAM R. K., HEALING T. D., DONALDSON J., JONES D. M., COLWELL R. R. : Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission, and amplification by flock propagation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62, 4614-4620.
  - PELTIER C., 2012 Futura-Sciences : <http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dico/d/genetique-sequencage-1974/>
  - PÉREZ-BOTO D., HERRERA-LEÓN S., GARCÍA-PEÑA F.J., ABAD-MORENO J.C., ECHEITA M.A.: Molecular mechanisms of quinolone, macrolide, and tetracycline resistance among *Campylobacter* isolates from initial stages of broiler production. *Avian Pathol.*, 2014, 43, 176-82.

- PERSSON S., OLSEN K.E.P.: Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. J. Med. Microbiol., 2005, 54, 1043-1047.
- PIDDOCK L.J.V., RICCI V., PUMBWE L., EVERETT M.J., GRIGGS D.J.: Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. J. Antimicrob. Chemother., 2003, 51, 196-206.
- POITRAS E., HOUDE A. : La PCR en temps réel : principes et applications. Reviews in Biology and Biotechnology, 2002, 2, 2-11.
- POLLETT S., ROCHA C., ZERPA R., PATIÑO L., VALENCIA A., CAMIÑA M., GUEVARA J., LOPEZ M., CHUQUIRAY N., SALAZAR-LINDO E., CALAMPA C., CASAPIA M., MEZA R., BERNAL M., TILLEY D., GREGORY M., MAVES R., HALL E., JONES F., ARRIOLA C.S., ROSENBAUM M., PEREZ J. AND , KASPER M. : *Campylobacter* antimicrobial resistance in Peru: a ten-year observational study. BMC Infect. Dis., 2012, 12, 193, 7p.
- RAMALIVHANA J. N., MOYO S. R., OBI C. L. : The possible role of medicinal plants in tackling resistant microbial pathogens in Limpopo Province, South Africa. J. Med. Plants Res., 2010, 4, 999-1002.
- RAMANOELINA A.R.P., TERROM G.P., BIANCHINI J.P., COULANGES P. : contribution à l'étude de l'action antibactérienne de quelques huiles essentielles extraites de plantes malgaches. Arch. Inst. Pasteur Madagascar., 1987, 53, 217 -226
- RATTANACHAIKUNSOPON P, PHUMKHACHORN P : Potential of coriander (*Coriandrum sativum*) oil as a natural antimicrobial in inhibiting *Campylobacter jejuni* in raw meat. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 2010, 74, 31-35.
- RHAYOUR K. : Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de Doctorat National, 2002. 170p. Fès, Maroc.
- RODRIGO S., ADESIYUN A., ASGARALI Z., SWANSTON W.: Antimicrobial resistance of *Campylobacter spp.* isolated from broilers in small poultry processing operations in Trinidad. Food Cont., 2007, 18, 321-325.
- ROSENQUIST H., SOMMER M., NIELSEN N.L., CHRISTENSEN B.B.: The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. Int. J. Food Microbiol., 2006, 108, 226-232.
- SACK D.A., LYKE C., McLAUGHLIN C., SUWANAVANICHIJ V.: antimicrobial resistance in shigellosis, cholera and Campylobacteriosis. World Health Organization, 2001, 51p.
- SAHIN O., MORISHITA T. Y., ZHANG Q.: *Campylobacter* colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. Anim. Health Res. Rev., 2002, 3, 95-105.
- SAHIN O., ZHANG Q., MORISHITA T. Y. : Detection of *Campylobacter*, p. 183-193. In TORRENCE M.E., ISAACSON R.E., Microbial food safety in animal agriculture: current topics. EDEd. Iowa State Press, 2003, Ames, IA, p. 183-193.

- SAÏD G., GOULON-GOEAU C.: syndrome Syndrome de Guillain Barré. Encyclopédie Médico-chirurgicale. Ed. Elsevier, 2002, 17-095-A-10 ; 1-6.
- SAMIE A., HOUSEIN A., LALL N., MEYER J.J.M. : Crude extracts of, and purified compounds from, *Pterocarpus angolensis*, and the essential oil of *Lippia javanica*: their in-vitro cytotoxicities and activities against selected bacteria and *Entamoeba histolytica*. Ann. Trop. Med. Paras., 2009, 103, 4276439.
- SAMIE A., OBI C.L., BESSONG P.O., NAMRITA L.: Activity profiles of fourteen selected medicinal plants from Rural Venda communities in South Africa against fifteen clinical bacterial species. Afr. J. Biot., 2005, 4, 1443-1451.
- SAMIE A., OBI C.L., LALL N., J.J.M. : determination Determination of cytotoxic activity and antimicrobial effects of selected medicinal plants against clinical isolates of *Campylobacter* species and *Entamoeba histolytica*. South Afr. J. Botany, 2007, 02, 111.
- SEBALD M., VÉRON M. : Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. Annales de l'Institut Pasteur (Paris), 1963, 105, 897-910.
- SERICHANTALERGS O., DALSGAARD A., BODHIDATTA L., KRASAESUB S., PITARANGSI C., SRIJAN A., MASON C. : Emerging fluoroquinolone and macrolide resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates and their serotypes in Thai children from 1991 to 2000. Epidemiol. Infect. 2007, 13, 12996 1306.
- SIBANDA T., OKOH A. I.: The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. Review. Afr. J. Biotech., 2007, 6, 2886-2896.
- SIMMONS N.A., GIBBS F.J.: *Campylobacter* spp. In oven-ready poultry. J. Infect., 1979, 1, 159-162.
- SINGLETON P. : Bactériologie : pour la médecine, la Biologie et les Biotechnologies: cours. 6<sup>ème</sup> édition, Ed. DUNOD, 2005, 542p.
- SJÖGREN E, LINDBLOM GB, KAIJSER B.: Comparison of different procedures, transport media, and enrichment media for isolation of *Campylobacter* species from healthy laying hens and humans with diarrhea. J. Clin. Microbiol., 1987, 25, 1966-1968.
- SMITH T., TAYLOR M.S.: Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*) associated with disease of the fetal membranes in cattle. J. Exp. Med., 1919, 30 : 299-311. www.jem.rupress.org
- SOUSSY C.J., J.D. CAVALLO, H. CHARDON, C. CHIDIAC, P. CHOUTET, P. COURVALIN, H. DABERNAT, H. DRUGEON, L. DUBREUIL, F. GOLDSTEIN, V. JARLIER, R. LECLERCQ, M.H. NICOLAS-CHANOINE, A. PHILIPPON, C. QUENTIN, B. ROUVEIX, J. SIROT : Comité de l'antibiogramme l'Antibiogramme de la société Société française Française de microbiologieMicrobiologie. Société Française de Microbiologie, 2006, 49 p.
- SOUSSY C.J., R. BONNET, J.D. CAVALLO, H. CHARDON, C. CHIDIAC, P. COURVALIN, H. DABERNAT, H. DRUGEON, L. DUBREUIL, B. GUERY, V. JARLIER, F. JEHL, T. LAMBERT, R. LECLERCQ, M.H. NICOLAS-CHANOINE,

- P. PLESIAT, C. QUENTIN, B. ROUVEIX, E. VARON, P. WEBER : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Société Française de Microbiologie, 2010, 49 p.
- STANLEY K.N., JONES K.: High frequency of metronidazole resistance among strains of *Campylobacter jejuni* isolated from birds. Soc. Appl. Microbiol., Lett. Appl. Microbiol., 1998, 27, 247-250.
  - STEELE TW, Mc DERMOTT SN. The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. Pathology. 1984, 16, 263-265.
  - STERN N.J., SVETICH E.A., ERUSLANOV B.V., KOVALEV Y.N., VOLODINA L.I., PERELYGIN V.V., MITSEVICH E.V., MITSEVICH I.P., LEVCHUK V.P. : *Paenibacillus polymyxa* purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens. J. Food Prot., 2005, 68, 1450-1453.
  - STUMBO C.R.: Thermobacteriology in food processing. Ed. Academic press, New York, 1973, 320p.
  - SUTRA L. : Manuel de bactériologie alimentaire. Ed. Polytechnique, 1998 ; 308p.
  - TANG Y., SUSSMAN M., LIU D., POXTON I., SCHWATZMAN J. : Molecular medical microbiology. Ed. Elsevier-Science, 2014, 2<sup>nd</sup> edition, livre électronique.
  - TARIGHT Y., ABAD N., ET BENSALAH R.I. : Recherche des *Campylobacter* dans les aliments. Mémoire D.E.S. Microbiologie. U.S.T.H.B ; 2005. 54p. Algérie.
  - TEE W, MIJCH A, WRIGHT E, YUNG A.: Emergence of multidrug resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from three patients infected with human immunodeficiency virus. Clin. Infect. Dis., 1995, 21, 634-638.
  - TENOVER F.C., WILLIAMS S., GORDON K.P., NOLAN C., FLORDE J.J. : Survey of Plasmids and Resistance Factors in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Antimicrob. Agents Chemother., 1985, 27, 37-41.
  - THOMAS G. : les infections à *Campylobacter* , S'agit-il d'une nouvelle zoonose ?. Thèse de doctorat, 2009, 96p. France
  - VACHER S., MENARD A., BERNARD E., SANTOS A., MEGRAUD F.: Detection of Mutations Associated with Macrolide Resistance in Thermophilic *Campylobacter* spp. by Real-Time PCR. Microbial Drug Resist., 2005, 11, 40-47.
  - VACHER S., MÉNARD A., BERNARD E., MÉGRAUD F. : PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for detection of point mutations associated with macrolide resistance in *Campylobacter* spp. Antimicrob. Agents Chemother., 2003, 47, 1125-1128.
  - VAILLANT V., DE VALK H., SAURA C.: les Les systèmes de surveillance des maladies d'origine alimentaire : sources, méthodes, apports, limites. BEH Hors série; 9 mai 2012, pp. 3-6.
  - VAN DESSEL P.: Qualité sanitaire des produits de porcs et de volailles - Évolution en matière de santé publique. In : Compte-rendu des 5<sup>èmes</sup> Journées de productions porcines et avicoles, Gembloux, 19 octobre 2005. Gembloux, Belgique: Centre wallon de Recherches agronomiques.

- VANDAMME P. et DE LEY J.: Proposal for a New Family, *Campylobacteraceae*. Int. J. Syst. Bacterio., 1991, 41, 451-455.
- VANDAMME P., ON S.L.W. : Recommendations of the Subcommittee on the taxonomy of *Campylobacter* and related bacteria. Int. J. Syst. Evolutionary Microbio., 2001, 51, 719-721.
- VANDAMME P.: taxonomy of the family Campylobacteraceae. In NACHAMKIN I., BLASER M.J.: *Campylobacter*. 2<sup>nd</sup> edition Ed., Ed. ASM Press, 2000, 3-26.
- VARGUES R. et GEORGES P. : la nouvelle bactériologie médicale des régions développées. Ed. Ellipses, 1982, 128p.
- VERON M., FAUCHERE J.L. : *Campylobacter*. In : Bactériologie médicale. Ed. Flammarion, 1989, pp 694-730.
- VINZENT R., DUMAS J., PICARD N. : Septicémie grave au cours de la grossesse due à un vibron. Avortement consécutif. Bull. Acad. Natl. Med., 1947, 131, 906-92.
- VONDRAKOVA L., PAZLAROVA J., DEMNEROVA K.: Detection, identification and quantification of *Campylobacter jejuni*, *coli* and *lari* in food matrices all at once using multiplex qPCR. Gut Pathogens, 2014, 6, 9p.
- WAGENAAR J.A., VAN BERGEN M.A., MUELLER M.A., WASSENAAR T.M., CARLTON R.M. : Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. Vet Microbiol., 2005, 109, 275-283.
- WAN J. , WIL COCK A., COVENTRY M.J. : The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* . J. Appl. Microbiol., 1998, 84 , 152 -158.
- WANG Y., HUANG M., TAYLOR D.E.: cCloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni* *gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. Antimicrob. Agents Chemother., 1993, 37, 457-463.
- WANNISSORN B., JARIKASEM S., SIRIWANGCHAI T., THUBTHIMTHED S.: Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. Fitoterapia., 2005, 76, 233 -236.
- WEBER R., AUERBACH M., JUNG A., GLÜNDER G.: *Campylobacter* infections in four poultry species in respect of frequency, onset of infection and seasonality. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., 2014, 127, 2576-266.
- WEBER RM, NOGOSSEK M, SANDER I, WANDT B, NEUMANN U, GLÜNDER G: Investigations of laying hen health in enriched cages as compared to conventional cages and a floor pen system. Wien. Tierärztl. Monatsschr., 2003, 90, 2576-266.
- WHO : WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. World Health organization, 2001, 99 pages.
- WREN BW, LINTON D, DORRELL N, KARLYSHEV AV.: Post genome analysis of *Campylobacter jejuni*. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol., 2001, 30, 36S-44S.
- YANG J.R., WU H.S., CHIANG C.S., MU J.J.: Pediatric Campylobacteriosis in northern Taiwan from 2003 to 2005. BMC Infect. Dis., 2008, 8, 151.

- ZHIRI A., MAYAUD L., BOUHDID S., BAUDOUX D., ABRINI J., AUBERT G.: Evaluation de l'activité bactéricide et bactériostatique des huiles essentielles vis-à-vis des souches d'origine clinique résistantes aux antibiotiques. Conférence lors du Congrès Francophone De Phytothérapie Au Liban. Du 20 au 25 juin 2010 ; Place de la phytothérapie dans les systèmes de Santé.
- ZIRNSTEIN G., LI Y., SWAMINATHAN B., ANGULO F.: Ciprofloxacin Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolates: Detection of *gyrA* Resistance Mutations by Mismatch Amplification Mutation Assay PCR and DNA Sequence Analysis. J Clin. Microbiol., 1999, 37, 3276-3280.
- Sites internet :
- [www.bacteriologie.net/general.e/antibiotique.html](http://www.bacteriologie.net/general.e/antibiotique.html)
- [www.microbiologybytes.wordpress.com](http://www.microbiologybytes.wordpress.com)
- [www.foodpoisoning.com](http://www.foodpoisoning.com)
- [www.ilm.pf/files/u1/CourbefusionFret4.jpg](http://www.ilm.pf/files/u1/CourbefusionFret4.jpg)
- [www.ilm.pf/PCRtempsreel#courbefusion](http://www.ilm.pf/PCRtempsreel#courbefusion)
- [www.itusozluk.com](http://www.itusozluk.com)
- [www.planet-techno-science.com/wp-content/uploads](http://www.planet-techno-science.com/wp-content/uploads)
- [www.scooponpets.com/Images/Campylobacter.jpg](http://www.scooponpets.com/Images/Campylobacter.jpg)

## *Composition des principaux milieux de culture et réactifs*

### 1. COMPOSITION DU MILIEU DE TRANSPORT

#### Milieu Cary Blair modifié :

##### Composition

- Hydrogénophosphate de sodium í í í í í í í í í í í í í .1,1g
- Thioglycolate de sodium í í í í í í í í í í í í í í í 1,5g
- Chlorure de sodium í í í í í í í í í í í í í í í í 5g
- Chlorure de calcium í í í í í í í í í í í í í í í í 0,09g
- Agar í í í í í í í í í í í í í í í í í í í .5,6g
- Eau distillée í í í í í í í í í í í í í í í í í í ..1000ml.

#### Préparation de milieu :

- Verser 13,3de poudre dans un litre d'eau distillée et porter doucement à l'ébullition pour dissoudre la gélose.
- Repartie en petits tubes à vis et stériles pendant 15 minutes.
- Laisser refroidir et visser les bouchons pour préserver l'humidité du milieu.

Le milieu est modifié pour améliorer le transport et la survie des *Campylobacter*

- Par addition de 1% de pyruvate de sodium (10g/l) à la formule
- En réduisant la quantité d'agar de 5g à 16g/18.

### 2. COMPOSITION DU MILIEU D'ENRICHISSEMENT

#### Bouillon d'enrichissement Preston :

##### Composition du milieu de base :

- Extrait de viande í í í í í í í í í í í í í í í í í í .10.0 g.
- Peptone í í í í í í í í í í í í í í í í í í .....10.0 g.
- Chlorure de sodium í í í í í í í í í í í í í í í í í í ...5.0 g.
- Agar-agar í ..1.0 g.
- Eau distillée í í í í í í í í í í í í í í í í í í í ..1000ml.

#### Préparation du bouillon Preston :

Dissoudre les composants de base ou le milieu de base complet déshydraté dans de l'eau, en chauffant jusqu'à dissolution complète.

Si nécessaire ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de  $7.5 \pm 0.2$  à  $25^{\circ}\text{C}$ .

Repartir le milieu de base dans des flacons de 250 ml.

Stériliser à l'autoclave réglé à  $121^{\circ}\text{C}$  pendant 15 min.

#### Solution d'antibiotiques :

La solution d'antibiotique ajoutée au milieu de base est le Butzler modifié.

#### Composition du milieu complet :

Milieu de base bouillon Preston í í í í í í í í í í í í í í í í í í .940ml.

Sang de cheval lysé défibriné stérile í í í í í í í í í í í í í í í í í í í .50ml.  
 Solution d'antibiotiques (Butzler modifié) í í í í í í í í í í í í í í í í í í í ...10ml.

### Préparation du milieu complet :

Ajouter le sang stérilement au milieu de base puis la solution d'antibiotiques et enfin mélanger.

## 3. COMPOSITION DES MILIEUX D'ISOLEMENT

### 1. Gélose Columbia au sang :

#### Composition du milieu de base :

- Extrait de levure í í í í í í í í í í í í í í í í í í í ...í í .3g.
- Peptone bactériologique í í í í í í í í í í í í í í í í í í í .í í í 5g.
- Peptone de soja í í í .í .3g.
- Tryptone í 5g.
- Cò ur-cerveau í .8g.
- Amidon í .1g.
- chlorure de sodium í 5g.
- Agari í ...18g.
- Eau distillée í ..1000ml.
- pH=7,3

#### Préparation du milieu de base :

Dissoudre 48g dans un litre d'eau distillée.

Autoclaver 15 min à 121°C.

Refroidir vers 45 ó 50°C.

#### Composition du milieu complet :

Milieu de base í 950 ml.

Sang de mouton défibriné stérile í ..50ml.

#### Préparation du milieu complet :

Ajouter le sang stérilement au milieu de base et mélanger.

### 2. Gélose Butzler modifiée

#### Composition du milieu complet

- Gélose au sang Columbia í ...250ml
- Milieu additif de Butzler í ..0, 25ml

#### Composition de la solution d'antibiotique (additif Butzler modifié) :

- Céfoperazone í 0,03g
- Rifampicine í ...0,02g
- Colistine í ...20000UI
- Amphotéricine B í .0,004g
- Eau/Ethanol (V/V) í ..20ml

### 3. Gélose Skirrow

#### Composition du milieu complet

- Gélose au sang Columbia í í í í í í í í í í í í í í í í í ..250ml
- Milieu additif de Skirrow í í í í í í í í ..í í í í í í í í ..í 0,,25ml

#### Composition de la solution d'antibiotique (additif Skirrow modifié)

- Vancomycine í í í í í í í í í í í í í í í í í ..í 0,02g
- Lactate triméthoprimé í í í í í í í í í í í í í í í í í ..í 0,01g
- Polymyxine B í í í í í í í í í í í í í í í í í ..í ..5000UI
- Eau í 20ml

### 4. Gélose à base de Campylobacter Growth Supplement

#### Composition du milieu complet

- Gélose au sang Columbia í í í í í í í í í í í í í í í í í ..250ml
- Milieu additif de Campylobacter Growth Supplement í í í í ..í 0,,25ml

#### Composition de la solution C.G.S.

- \* Pyruvate de sodium í í í í í í í í í í í í í í í í í ..0,125g
- \* Sulfate de fer í ..0,125g
- \* Méta bisulfite de sodium í 0,125g

## 4. COMPOSITION DES REACTIFS ET SOLUTION

### Réactif pour la recherche de l'hydrolyse de l'hippurate

#### I. Composition de la solution d'hippurate de sodium :

- Hippurate de sodium í í í í í í í í í í í ..í í í í í í í í í í í í í í 10g
- Tampon phosphate salin (PBS) consistant en :
- ✓ Chlorure de sodium (NaCl) í ..8,5g
- ✓ Hydrogénophosphate disodique dihydraté ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) í ..í ..í í í í í ..8,98g
- ✓ Dihydrogénophosphate monosodique monohydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) í ...í í í ..2.71g
- Eau (q.s.p) í ..í í í ..í ..1000ml.

#### Préparation de la solution d'hippurate :

Ajouter 05 ml de la solution d'hippurate dans 10 ml de solution tampon P.B.S.  
Stériliser par filtration  
Conserver au réfrigérateur.

#### II. Solution de Ninhydrine à 3.5%

- Ninhydrine í 1,75g
- Acétone í ..25ml
- Butanol í ..25ml

#### Préparation de la Ninhydrine

Dissoudre la Ninhydrine dans le mélange acétone/butanol.  
Conserver à l'abri de la lumière et au réfrigérateur.

**FICHE DE RENSEIGNEMENT DES PRELEVEMENTS (Poulailler)**

Société des abattoirs du centre UPC Meftah.

-Date :

-Bâtiment :

-Nombre de prélèvement :

-Age :

-Nombre de population :

-Origine :

-Type de prélèvement :

-ATB reçu :

-Agencement :

## LA GALERIE Api Campy

- **Mode opératoire**

- a. **Sélection des colonies**

1. Isoler et vérifier l'appartenance de la souche au groupe des bacilles à gram négatif, incurvés ou spiralés, microaérophile, oxydase positive.
2. Prélever une colonie bien isolée et préparer une subculture par isolement à la surface d'une gélose au sang. Pour les germes à croissance lente, plusieurs géloses seront nécessaires.
3. Incuber la boîte 24-48 heures à  $36\text{ C}^\circ \pm 2\text{ C}^\circ$  en atmosphère microaérophile (jusqu'à 72 heures pour les germes à croissance lente)

Les souches dont la croissance est suffisante en 24 heures ne doivent pas être réincubées.

- b. **Préparation de la galerie**

1. Sortir la galerie de son emballage
2. Séparer la galerie en deux parties, selon la pliure centrale, en évitant de poser les doigts sur les cupules.
3. Préparer deux boîtes d'incubation (fond et couvercle).
4. Incrire la référence de la souche sur les languettes latérales des boîtes. (ne pas inscrire la référence sur les couvercles, ceux-ci pouvant être déplacés lors de la manipulation)
5. Répartir environ 3 ml d'eau distillée ou déminéralisée (ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex :  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{CO}_2$  )) dans les alvéoles du fond.
6. Déposer les galeries dans les boîtes d'incubation.
7. Jeter le sachet déshydratant.

- c. **Préparation de l'inoculum**

Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 Medium (3ml) comme indiqué au paragraphe « précautions d'utilisation ».

A l'aide d'un écouvillon stérile, prélever toute la culture préalablement préparée.

Réaliser une suspension d'opacité égale à 6 de McFarland, cette suspension doit être utilisée extemporanément.

#### d. Inoculation de la galerie

**Premièrement :** Tests URE à PAL de la première partie de la galerie et test H<sub>2</sub>S de la deuxième partie de la galerie :

1. Délivrer environ 80-100 µl de la suspension précédente dans chaque tube, en évitant la formation de bulles (incliner la boîte d'incubation vers l'avant).
2. Remplir la partie tube du test H<sub>2</sub>S.
3. Recouvrir le test URE d'huile de paraffine en créant un léger ménisque convexe.
4. Refermer la boîte d'incubation de la première partie de la galerie.
5. Incuber 24 heures ( $\pm 2$  heures) à  $36\text{ C}^\circ \pm 2\text{ C}^\circ$  en atmosphère aérobie.

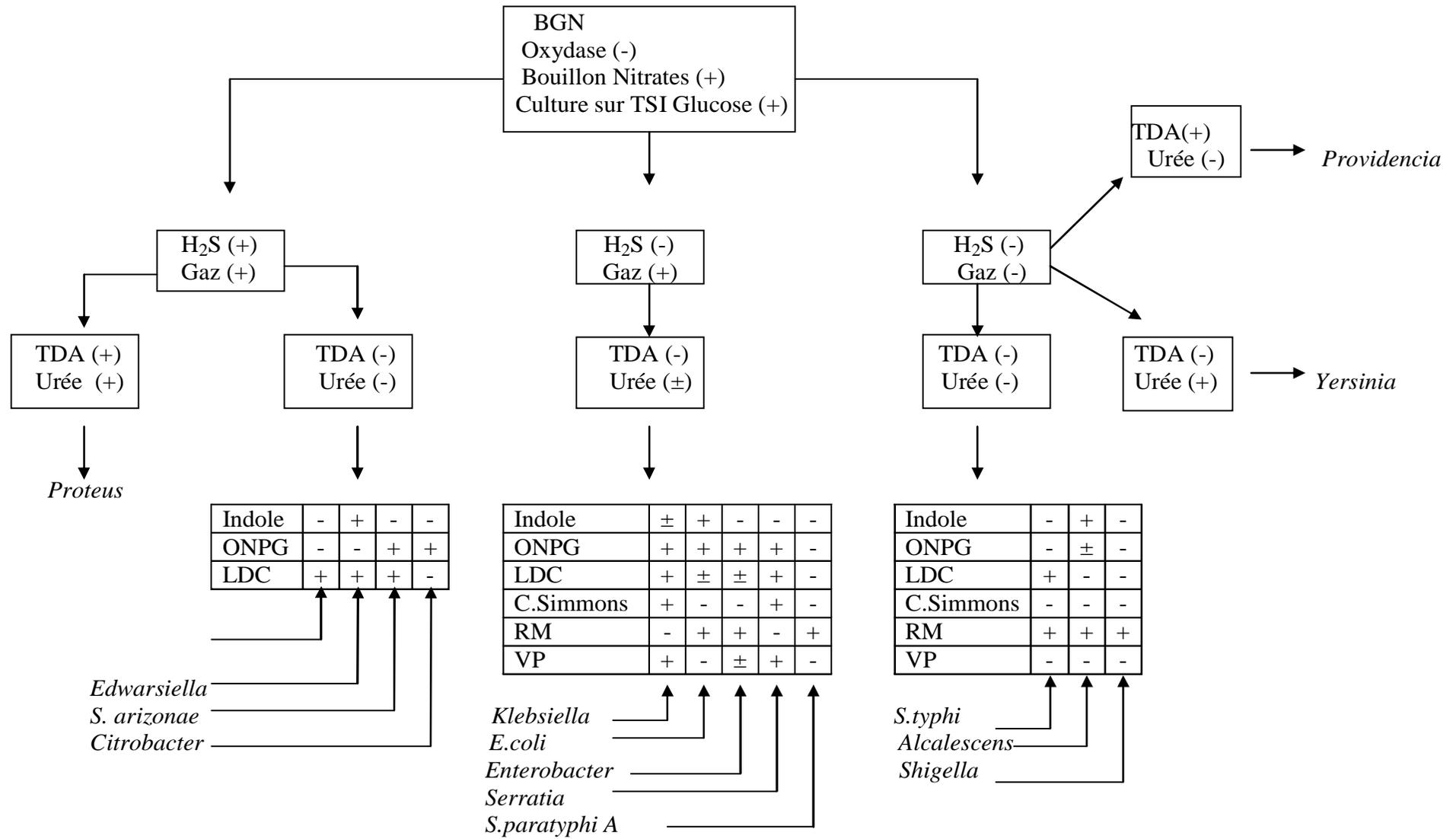
**Deuxièmement :** Test GLU à ERO de la deuxième partie de la galerie :

1. Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium et y transférer environ 150 µl de la suspension précédente (transférer la totalité de la suspension bactérienne restante pour les souches à croissance lente).
2. Bien homogénéiser
3. Répartir cette nouvelle suspension dans les tubes et cupules, en évitant la formation d'un ménisque convexe ou concave.
4. Refermer la boîte d'incubation de la deuxième partie de la galerie.
5. Incuber 24 heures ( $\pm 2$  heures) à  $36\text{ C}^\circ \pm 2\text{ C}^\circ$  en atmosphère microaérophile.

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
<b>URE</b>	urée	0,216	UREase	jaune	orange/rouge
<b>NIT</b>	potassium nitrate	0,1	réduction des NITrates	<u>NIT 1 + NIT 2/5 min</u>	
				incoloré	rose/rouge
<b>EST</b>	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-acétate	0,029	ESTérase	incoloré bleu-pâle	turquoise
<b>HIP</b>	sodium hippurate	0,2	HIPpurate	<u>NIN / 5 min</u>	
				incoloré gris-bleuté	violet
<b>GGT</b>	acide $\gamma$ -L-glutamique-naphtylamide $\beta$ -	0,0272	Gamma Glutamyl Transférase	<u>FB /5 min</u>	
				incoloré	orange intense
<b>TTC</b>	triphényltétrazolium chlorure	0,02	réduction du chlorure de triphényl-tétrazolium (TriphénylTétrazolium Chlorure)	incoloré rose pâle	rose/rouge ou dépôt au fond de la cupule
<b>PyrA</b>	acide pyroglutamique-naphtylamide $\beta$ -	0,038	Pyrrolidonyl Arylaldase	<u>FB /5 min (PyrA <math>\rightarrow</math> PAL)</u>	
<b>ArgA</b>	L-arginine-4-méthoxy-naphtylamide $\beta$ -	0,056	L-Arginine Arylamidase	incoloré	orange
<b>AspA</b>	acide aspartique-naphtylamide $\beta$ -	0,039	L-Aspartate Arylamidase	incoloré	orange
<b>PAL</b>	naphtyl phosphate 2-	0,024	Phosphate Alcaline	incoloré	pourpre
<b>H<sub>2</sub>S</b>	sodium thiosulfate	0,076	production d'H <sub>2</sub> S	incoloré	noire
<b>GLU</b>	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)		
<b>SUT</b>	sodium succinate	1,36	assimilation (sodium SuccinaTe)		
<b>NAL</b>	acide nalidixique	0,084	inhibition de croissance (acide NALidixique)		
<b>CFZ</b>	sodium céfazoline	0,224	inhibition de croissance (sodium CéFaZoline)	transparence (absence de croissance ou sensibilité)	trouble même très faible (croissance ou résistance)
<b>ACE</b>	sodium acétate	1,1	assimilation (sodium ACETate)		
<b>PROP</b>	acide propionique	1,16	assimilation (PROPionate)		
<b>MLT</b>	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)		
<b>CIT</b>	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)		
<b>ERO</b>	érythromycine	0,014	sensibilité- prédiction thérapeutique (ERYthrOmycine)		

### Clé d'identification des Entérobactéries



Charge des disques, diamètre des zones d'inhibition et règle de lecture interprétative pour *Camylobacter spp.* (Soussy et al ; 2010)

Antibiotique	Charge de disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)		Remarque
		S	R	S	R	
Ampicilline	10 g	Ö4	> 16	× 19	< 14	(1).
Amoxicilline	20	Ö4	> 16	× 21	< 14	(1).
Amoxicilline/ac clavulanique	10 g	Ö2	> 2	× 21	< 14	
Colistine	50 g	Ö2	> 2	× 15	>15	
Streptomycine	10 UI	Ö8	> 16	× 15	< 13	(1) et (2).
Gentamicine	15 g	Ö2	> 4	× 18	< 16	(1) et (2).
Tobramycine	10 g	Ö2	> 4	× 18	< 16	(1) et (2).
Erythromycine	15 UI	Ö1	> 4	× 22	< 17	(1).
Metronidazole	16 g	Ö4	> 4	-	< 21	
Acide nalidixique	30 g	Ö8	> 16	× 20	< 15	(1).
Ciprofloxacine	5 g	Ö0.5	> 1	× 25	< 22	(1).
Pefloxacine	5 g	Ö1	> 4	× 22	<16	
Tétracycline	30 UI	Ö4	> 8	×19	< 17	
Chloramphénicol	30 g	Ö8	> 16	× 23	< 19	
Furanes	300 g			× 17	<14	

(1\*) Une absence d'une zone d'inhibition autour des disques de -Lactamine, aminosides, macrolides ou quinolones traduit une résistance de haut niveau.

(2\*) Compte tenue des conditions d'incubation (micro aérobiose). Les diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'aminosides sont toujours réduits

**BIOLOGIE MOLECULAIRE****I. COMPOSITION DES SOLUTIONS POUR BIOLOGIE MOLECULAIRE**

## 1. Tris HCl 1M ; pH 8

Ajuster le pH avant de compléter le volume à 100 ml		
Tris		12,11 g
HCl 12 N	q.s.p.	pH 8
H <sub>2</sub> O	q.s.p.	100 ml

## 2. EDTA 1M ; pH 8

EDTA di-sodique		37,2 g
H <sub>2</sub> O	q.s.p.	100 ml
Ajuster à pH 8 (avec du NaOH 10 M)		

## 3. EDTA 0,5M ; pH 8

EDTA di-sodique		18,6 g
H <sub>2</sub> O	q.s.p.	100 ml
Ajuster à pH 8 (avec du NaOH 10 M)		

## 4. TBE 5X

Tris HCl (Trizma)		54 g
Acide borique		27,5g
EDTA 0,5 M		20 ml
H <sub>2</sub> O stérile		1000 ml
Pour la cuve, il faut TBE 1X		

## 5. TE = Tris EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1mM) ; pH 8 : → à stériliser

Tris HCl 1 M		10 ml
EDTA 1M		1 ml
H <sub>2</sub> O		1000 ml

## 6. S.D.S 10%

SDS		10 g
H <sub>2</sub> O	q.s.p.	100 ml
(chauffer à 68°C)		

La préparation de ces solutions se fait grâce à un agitateur magnétique, en veillant à régler le pH correspondant à chaque solution.

La plupart des solutions ne nécessitent pas de stérilisation, sauf pour le TE, à 120°C pendant 20ø

## II. EXTRACTION DE L'ADN

### 1. Liste des souches ayant subi une extraction

N°	N° de souche	origine
1	V22.11	animale
2	V16.11	animale
3	V07.11	animale
4	C04.11	humaine
5	C08.11	humaine
6	C08.11	humaine
7	V08.11	animale
8	V10.11	animale
9	V22.11	animale
10	V24.11	animale
11	V25.11	animale
12	V27.11	animale
13	C09.08	humaine
14	C09.09	humaine
15	C01.11	humaine
16	C.10.11	humaine
17	V05.05	animale
18	V19.09	animale
19	V22.09	animale
20	C04.10	humaine
21	C13.10	humaine
22	C07.07	humaine
23	C11.11	humaine
24	C14.07	humaine
25	C05.11	humaine
26	C08.11	humaine
27	C08.08	humaine
28	C12.09	humaine
29	V07.08	animale
30	V03.10	animale
31	V18.09	animale
32	V27.09	animale
33	C09.12	humaine
34	C07.12	humaine
35	C06.12	humaine
36	C04.12	humaine
37	C05.12	humaine
38	C08.12	humaine

## 2. Extraction de l'ADN : Méthode phénol-chloroforme

Cette partie a été réalisée au service des entérobactéries-vibrions de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Jour 1

- ◆ Sortir les cryotubes contenant la suspension de *Campylobacter* du congélateur et laisser se décongeler. Ou préparer des suspensions denses de *Campylobacter* dans des microtubes à partir des cultures.
- ◆ Centrifuger les micros tubes contenant une suspension de *Campylobacter* pendant 10 minutes (mn)
- ◆ Vider les microtubes
- ◆ Mettre 800µl de Tris EDTA (TE) en remettant le culot en suspension
- ◆ Centrifuger 10 mn à 2000 tr/mn
- ◆ Mettre 800µl de TE en remettant le culot en suspension
- ◆ Centrifuger 10 mn à 2000 tr/mn
- ◆ Rajouter 100 µl de lysosyme
- ◆ Mélanger par retournement à la main
- ◆ Incuber 30 mn à 37°C
- ◆ Rajouter 5 µl de Proteinase K
- ◆ Secouer
- ◆ Incuber 1h à 56°C
- ◆ Rajouter un volume égal de phénol chloroforme
- ◆ Agiter manuellement jusqu'à ce que le mélange devienne laiteux
- ◆ Centrifuger 10 mn à 2000 tr/mn
- ◆ Récupérer le surnageant dans un autre microtube
- ◆ Rajouter un volume égal de phénol chloroforme
- ◆ Agiter manuellement jusqu'à ce que le mélange devienne laiteux
- ◆ Centrifuger 10 mn à 2000 tr/mn
- ◆ Récupérer le surnageant dans un autre microtube
- ◆ Rajouter un volume égal de chloroforme
- ◆ Agiter manuellement jusqu'à ce que le mélange devienne laiteux
- ◆ Centrifuger 10 mn à 2000 tr/mn
- ◆ Récupérer le surnageant dans un autre microtube
- ◆ Mettre un volume égal d'éthanol absolu et 20 µl d'acétate de sodium
- ◆ Retourner tout doucement
- ◆ Mettre à -20°C toute une nuit

Jour 2

- ◆ Retirer les microtubes du congélateur
- ◆ Centrifuger 20 mn à 2000 tr/mn
- ◆ Eliminer le surnageant
- ◆ Laisser sécher tubes ouverts inclinés.
- ◆ Une fois séchés, rajouter un certain volume d'eau distillée par microtube.
- ◆ Garder à +4°C.

Jour 3 : Préparation du gel de migration et lecture

Plusieurs gels à différentes concentrations ont été préparés et testés pour vérifier s'il y a présence d'ADN ou pas. Nous avons opté à la fin pour le gel à 1% car nous avons eu de meilleurs résultats avec.

### III. Réalisation des PCR

Cette partie a été réalisée au Centre National de Référence des *Campylobacter* à Bordeaux en France.

Pour la réalisation des différentes PCR nous avons utilisés ce qui suit :

#### AMORCES (5' → 3')

##### 1. Pour l'Identification

###### 1.1.PCR classique

<i>CJ-6027</i> : GAATGAAATTTTAGAATGGGG	}	pour l'identification de <i>Campylobacter jejuni</i>
<i>CJ-6028</i> : GATATGTATGATTTTATCCTGC		
<i>CC-7723</i> : ATATTTCCAAGCGCTACTCCCC	}	pour l'identification de <i>Campylobacter coli</i>
<i>CC-7724</i> : CAGGCAGTGTGATAGTCATGGG		

###### 1.2.PCR en temps réel

<i>F3-gyrA-CJ-CC</i> : GTACTTTTGGTGTGATTATG	}	pour l'identification de <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i>
<i>R4-gyrA-CJ-CC</i> : TTATCTCTTTTAATTCATCGCG		
<i>F2-gyrA-CF</i> : GATGCTATGAGTGAGATCGT	}	pour l'identification de <i>Campylobacter fetus</i>
<i>R2-gyrA-CF</i> : GTTTGTATCGGCG		

##### 2. Pour le Séquençage

###### 2.1.Macrolides (23S)

Camp A : CCTCCCACCTATCCTGCAC

Camp S : AGCATTAGCGAAGCTCTTGAT

###### 2.2 QRDR

*F1-QRDR-Campy*: ATAGGTCGTGCTTTGCCWGA

*R1-QRDR-Campy*: GGGATATTTGCTGCCATACC

#### SONDES DE FRET

**Sensor-CJF** : GTTCGTCTGATAATCACTGTTTTTCTATG

**Anchor-CJF** : GCTCTTGCTCTTGCTTTTTGAAGTTCAA

## **BASES NUCLEIQUES**

- ✓ Les dNTP : Un dNTP est l'appellation courante du mélange des quatre désoxyribonucléotides (A, C, T et G : Adénine, Cytosine, Thymine et Guanine)
- ✓ Les Big Dye Terminators : ce sont des ddNTPs modifiés par des groupes fluorescents transmetteur d'énergie. A chaque base (A, T, G, C) est associée une longueur d'onde différente qui se retrouve symboliquement sur le chromatogramme sous forme de rouge pour T, noir pour G, bleu pour C, vert pour A.

## **ENZYME**

La Taq polymérase est une enzyme, plus particulièrement une ADN polymérase qui agit dans une certaine gamme de température

## **TAMPON**

Il est généralement associé avec la Taq polymérase

## **ADN S400**

C'est l'ADN purifié par le séphacryl

Pour l'interprétation des séquences nous avons utilisé les tableaux suivants :

		Second nucleotide					
		U	C	A	G		
U	U	UUU Phe	UCU	UAU Tyr	UGU Cys	U	
	C	UUC	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys		C
	A	UUA Leu	UCA Ser	UAA STOP	UGA STOP		A
	G	UUG Leu	UCG	UAG STOP	UGG Trp		G
C	U	CUU Leu	CCU	CAU His	CGU	U	
	C	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg		C
	A	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg		A
	G	CUG Leu	CCG	CAG Gln	CGG		G
A	U	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U	
	C	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser		C
	A	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg		A
	G	AUG Met	ACG	AAG Lys	AGG Arg		G
G	U	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U	
	C	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly		C
	A	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly		A
	G	GUG Val	GCG	GAG Glu	GGG		G

Tableau 1 : Table d'utilisation des codons

Alanine	A	Ala
Cysteine	C	Cys
Aspartic acid	D	Asp
Glutamic acid	E	Glu
Phenylalanine	F	Phe
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Lysine	K	Lys
Leucine	L	Leu
Methionine	M	Met
Asparagine	N	Asn
Proline	P	Pro
Glutamine	Q	Gln
Arginine	R	Arg
Serine	S	Ser
Threonine	T	Thr
Valine	V	Val
Tryptophan	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Cysteine	C	Cys
Aspartic acid	D	Asp

Tableau 2 : abréviation des acides aminés

## Calculs statistiques

### 1. Etude 1

Pour confirmer la différence entre les deux espèces de *Campylobacter* (pour la résistance aux antibiotiques) une comparaison entre les pourcentages observés a été effectuée selon le test statistique, qui permet de calculer le degré de signification « p » entre ces pourcentages en utilisant une variable normale centrée réduite epsilon « z » tel que :

$$Z = \frac{P_a - P_b}{\sqrt{\frac{P_a * (1 - P_a)}{N_a} + \frac{P_b * (1 - P_b)}{N_b}}}$$

$P_a$  : pourcentage de la population « a »     $P_b$  : pourcentage de la population « b »

$N_a$  : nombre de la population « a »                       $N_b$  : nombre de la population « b »

A partir de la table de loi normale centrée réduite (voir annexe), « p » est tiré en lisant la valeur de « z » sur la table puis comparé à « » ( = 0,05).

- Si  $p >$  : différence non significative
- Si  $p <$  : différence significative

Ce test permet de dire si la différence entre ces pourcentages est significative ( $H_0$  rejetée).

Plus « p » est faible plus la probabilité de se tromper en rejetant «  $H_0$  » est faible.

## 2. Microbiologie humaine : coproculture

### 1° Répartition des souches selon le groupe

	<i>Campylobacter</i> +	<i>Campylobacter</i> -	Total	
1 <sup>er</sup> groupe	54      k1	1326	1380	n1
2 <sup>ème</sup> groupe	43      k2	2262	2305	n2
3 <sup>ème</sup> groupe	16      k3	608	624	n3
Total	113	4196	<b>4309</b>	

L'hypothèse  $H_0$  : il n'y a pas de différence entre les groupes

La question : la différence serait-elle due au hasard ou non ?

On calcul les taux théoriques positifs  $x_n$  tel que  $x_n = P_0 n_n$

$$\text{Tel que } P_0 = \frac{K1+k2+k3}{N1+n2+n3} = \frac{113}{4309} = 0.026$$

	<i>Campylobacter</i> +	<i>Campylobacter</i> -	Total	
1 <sup>er</sup> groupe	35,88      x1	1344,12	1380	n1
2 <sup>ème</sup> groupe	59,93      x2	2245	2305	n2
3 <sup>ème</sup> groupe	16,22      x3	607,78	624	n3
Total	112,03	4196,9	<b>4309</b>	

$$\chi^2 = \frac{(k1-x1)^2}{x1} + \frac{(k2-x2)^2}{x2} + \frac{(k3-x3)^2}{x3}$$

$$= \frac{328,33}{35,88} + \frac{286,62}{59,93} + \frac{0,0048}{16,22}$$

$$= 9,15 + 4,78 + 0,0029$$

$$= 13,93$$

$$ddl = n-1 = 3-1 = 2$$

Sur la table de  $\chi^2$  à 2 ddl et à 95% de sécurité nous pouvons lire  $\chi^2_{0,05} = 5,99$   
 le  $\chi^2_{calculé} > \chi^2_{0,05}$  donc la différence entre les groupes est significative et elle n'est pas due au hasard. Ce qui veut dire que le premier groupe est le plus touché par le *Campylobacter* suivi du 2<sup>ème</sup> groupe.

## 2° Répartition des souches selon le milieu d'isolement

	Positif	Négatif	Total
Butzler	75	17	92
CG	11	3	14
Skirrow	57	12	69
Columbia	1	8	9
Total	144	40	184

$$P_0 = \frac{144}{184} = 0,76 \quad x_1 = P_0 n_1$$

	Positif	Négatif	Total
Butzler	69,92	22,08	92
CG	10,64	3,36	14
Skirrow	52,44	16,56	69
Columbia	6,84	2,16	9
Total	139,84	44,16	184

$$\chi^2 = \frac{(k_1 - x_1)^2}{x_1} + \frac{(k_2 - x_2)^2}{x_2} + \frac{(k_3 - x_3)^2}{x_3} + \frac{(k_4 - x_4)^2}{x_4}$$

$$\chi^2 = \frac{25,8}{69,92} + \frac{0,1296}{10,64} + \frac{20,79}{52,44} + \frac{34,10}{6,84}$$

$$\chi^2 = 0,369 + 0,0121 + 0,396 + 4,98$$

$$\chi^2 = 5,76 \text{ à } 3 \text{ ddl} \quad \chi^2_{0,05} \text{ à } 3 \text{ ddl} = 7,81$$

$\chi^2_{\text{calculé}} < \chi^2_{0,05}$  donc la différence entre les milieux est non significative ce qui veut dire qu'il n'y a pas de différence entre les milieux.

**Loi de Khi-deux**

Le tableau donne x tel que  $P(K > x) = p$

<b>p</b>	<b>0,999</b>	<b>0,995</b>	<b>0,99</b>	<b>0,98</b>	<b>0,95</b>	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>	<b>0,005</b>	<b>0,001</b>
ddl														
1	0,0000	0,0000	0,0002	0,0006	0,0039	0,0158	0,0642	1,6424	2,7055	3,8415	5,4119	6,6349	7,8794	10,8276
2	0,0020	0,0100	0,0201	0,0404	0,1026	0,2107	0,4463	3,2189	4,6052	5,9915	7,8240	9,2103	10,5966	13,8155
3	0,0243	0,0717	0,1148	0,1848	0,3518	0,5844	1,0052	4,6416	6,2514	7,8147	9,8374	11,3449	12,8382	16,2662
4	0,0908	0,2070	0,2971	0,4294	0,7107	1,0636	1,6488	5,9886	7,7794	9,4877	11,6678	13,2767	14,8603	18,4668
5	0,2102	0,4117	0,5543	0,7519	1,1455	1,6103	2,3425	7,2893	9,2364	11,0705	13,3882	15,0863	16,7496	20,5150
6	0,3811	0,6757	0,8721	1,1344	1,6354	2,2041	3,0701	8,5581	10,6446	12,5916	15,0332	16,8119	18,5476	22,4577
7	0,5985	0,9893	1,2390	1,5643	2,1673	2,8331	3,8223	9,8032	12,0170	14,0671	16,6224	18,4753	20,2777	24,3219
8	0,8571	1,3444	1,6465	2,0325	2,7326	3,4895	4,5936	11,0301	13,3616	15,5073	18,1682	20,0902	21,9550	26,1245
9	1,1519	1,7349	2,0879	2,5324	3,3251	4,1682	5,3801	12,2421	14,6837	16,9190	19,6790	21,6660	23,5894	27,8772
10	1,4787	2,1559	2,5582	3,0591	3,9403	4,8652	6,1791	13,4420	15,9872	18,3070	21,1608	23,2093	25,1882	29,5883
11	1,8339	2,6032	3,0535	3,6087	4,5748	5,5778	6,9887	14,6314	17,2750	19,6751	22,6179	24,7250	26,7568	31,2641
12	2,2142	3,0738	3,5706	4,1783	5,2260	6,3038	7,8073	15,8120	18,5493	21,0261	24,0540	26,2170	28,2995	32,9095
13	2,6172	3,5650	4,1069	4,7654	5,8919	7,0415	8,6339	16,9848	19,8119	22,3620	25,4715	27,6882	29,8195	34,5282
14	3,0407	4,0747	4,6604	5,3682	6,5706	7,7895	9,4673	18,1508	21,0641	23,6848	26,8728	29,1412	31,3193	36,1233
15	3,4827	4,6009	5,2293	5,9849	7,2609	8,5468	10,3070	19,3107	22,3071	24,9958	28,2595	30,5779	32,8013	37,6973
16	3,9416	5,1422	5,8122	6,6142	7,9616	9,3122	11,1521	20,4651	23,5418	26,2962	29,6332	31,9999	34,2672	39,2524
17	4,4161	5,6972	6,4078	7,2550	8,6718	10,0852	12,0023	21,6146	24,7690	27,5871	30,9950	33,4087	35,7185	40,7902
18	4,9048	6,2648	7,0149	7,9062	9,3905	10,8649	12,8570	22,7595	25,9894	28,8693	32,3462	34,8053	37,1565	42,3124
19	5,4068	6,8440	7,6327	8,5670	10,1170	11,6509	13,7158	23,9004	27,2036	30,1435	33,6874	36,1909	38,5823	43,8202
20	5,9210	7,4338	8,2604	9,2367	10,8508	12,4426	14,5784	25,0375	28,4120	31,4104	35,0196	37,5662	39,9968	45,3147
21	6,4467	8,0337	8,8972	9,9146	11,5913	13,2396	15,4446	26,1711	29,6151	32,6706	36,3434	38,9322	41,4011	46,7970
22	6,9830	8,6427	9,5425	10,6000	12,3380	14,0415	16,3140	27,3015	30,8133	33,9244	37,6595	40,2894	42,7957	48,2679
23	7,5292	9,2604	10,1957	11,2926	13,0905	14,8480	17,1865	28,4288	32,0069	35,1725	38,9683	41,6384	44,1813	49,7282
24	8,0849	9,8862	10,8564	11,9918	13,8484	15,6587	18,0618	29,5533	33,1962	36,4150	40,2704	42,9798	45,5585	51,1786
25	8,6493	10,5197	11,5240	12,6973	14,6114	16,4734	18,9398	30,6752	34,3816	37,6525	41,5661	44,3141	46,9279	52,6197
26	9,2221	11,1602	12,1981	13,4086	15,3792	17,2919	19,8202	31,7946	35,5632	38,8851	42,8558	45,6417	48,2899	54,0520
27	9,8028	11,8076	12,8785	14,1254	16,1514	18,1139	20,7030	32,9117	36,7412	40,1133	44,1400	46,9629	49,6449	55,4760
28	10,3909	12,4613	13,5647	14,8475	16,9279	18,9392	21,5880	34,0266	37,9159	41,3371	45,4188	48,2782	50,9934	56,8923
29	10,9861	13,1211	14,2565	15,5745	17,7084	19,7677	22,4751	35,1394	39,0875	42,5570	46,6927	49,5879	52,3356	58,3012
30	11,5880	13,7867	14,9535	16,3062	18,4927	20,5992	23,3641	36,2502	40,2560	43,7730	47,9618	50,8922	53,6720	59,7031
40	17,9164	20,7065	22,1643	23,8376	26,5093	29,0505	32,3450	47,2685	51,8051	55,7585	60,4361	63,6907	66,7660	73,4020
50	24,6739	27,9907	29,7067	31,6639	34,7643	37,6886	41,4492	58,1638	63,1671	67,5048	72,6133	76,1539	79,4900	86,6608
60	31,7383	35,5345	37,4849	39,6994	43,1880	46,4589	50,6406	68,9721	74,3970	79,0819	84,5799	88,3794	91,9517	99,6072
70	39,0364	43,2752	45,4417	47,8934	51,7393	55,3289	59,8978	79,7146	85,5270	90,5312	96,3875	100,4252	104,2149	112,3169
80	46,5199	51,1719	53,5401	56,2128	60,3915	64,2778	69,2069	90,4053	96,5782	101,8795	108,0693	112,3288	116,3211	124,8392
90	54,1552	59,1963	61,7541	64,6347	69,1260	73,2911	78,5584	101,0537	107,5650	113,1453	119,6485	124,1163	128,2989	137,2084
100	61,9179	67,3276	70,0649	73,1422	77,9295	82,3581	87,9453	111,6667	118,4980	124,3421	131,1417	135,8067	140,1695	149,4493
120	77,7551	83,8516	86,9233	90,3667	95,7046	100,6236	106,8056	132,8063	140,2326	146,5674	153,9182	158,9502	163,6482	173,6174
140	93,9256	100,6548	104,0344	107,8149	113,6593	119,0293	125,7581	153,8537	161,8270	168,6130	176,4709	181,8403	186,8468	197,4508
160	110,3603	117,6793	121,3456	125,4400	131,7561	137,5457	144,7834	174,8283	183,3106	190,5165	198,8464	204,5301	209,8239	221,0190
180	127,0111	134,8844	138,8204	143,2096	149,9688	156,1526	163,8682	195,7434	204,7037	212,3039	221,0772	227,0561	232,6198	244,3705
200	143,8428	152,2410	156,4320	161,1003	168,2786	174,8353	183,0028	216,6088	226,0210	233,9943	243,1869	249,4451	255,2642	267,5405
250	186,5541	196,1606	200,9386	206,2490	214,3916	221,8059	231,0128	268,5986	279,0504	287,8815	298,0388	304,9396	311,3462	324,8324
300	229,9634	240,6634	245,9725	251,8637	260,8781	269,0679	279,2143	320,3971	331,7885	341,3951	352,4246	359,9064	366,8444	381,4252
400	318,2596	330,9028	337,1553	344,0781	354,6410	364,2074	376,0218	423,5895	436,6490	447,6325	460,2108	468,7245	476,6064	493,1318
500	407,9470	422,3034	429,3875	437,2194	449,1468	459,9261	473,2099	526,4014	540,9303	553,1268	567,0698	576,4928	585,2066	603,4460
600	498,6229	514,5289	522,3651	531,0191	544,1801	556,0560	570,6680	628,9433	644,8004	658,0936	673,2703	683,5156	692,9816	712,7712
700	590,0480	607,3795	615,9075	625,3175	639,6130	652,4973	668,3308	731,2805	748,3591	762,6607	778,9721	789,9735	800,1314	821,3468
800	682,0665	700,7250	709,8969	720,0107	735,3623	749,1852	766,1555	833,4557	851,6712	866,9114	884,2789	895,9843	906,7862	929,3289
900	774,5698	794,4750	804,2517	815,0267	831,3702	846,0746	864,1125	935,4987	954,7819	970,9036	989,2631	1001,6296	1013,0364	1036,8260

**Consensus obtenu après séquençage des ADN de souches de *Campylobacter* pour l'étude de la résistance aux macrolides.**

>3\_B12\_2011-10-05-15-19-45(209pb) : *C. coli* (d'origine animale) (2011)

ACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAA  
CGAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTGTAGTGGAGGTGAAAATTCC  
TCCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGCTAT  
TTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAG

>7\_C12\_2011-10-05-15-19-45(213pb) : *C. coli* (d'origine animale) (2011)

TATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAAACG  
AGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCG  
CGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGCTATTTGGATAAGAATGTG  
CAGGATAGGTGGGAG

>8\_D12\_2011-10-05-15-19-45(211pb) : *C. coli* (d'origine animale) (2011)

ATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCG  
TAACGAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTGTAGTGGAGGTGAAAAT  
TCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGC  
TATTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGA

>13\_F12\_2011-10-05-15-19-45(215pb) : *C. jejuni* (d'origine humaine) (2008)

CTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGG  
CGTAAMRAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTGTAGTGGAGGTGAAA  
ATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACT  
GCTATTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAGG

>14\_G12\_2011-10-05-15-19-45(209pb) : *C. coli* (d'origine humaine) (2009)

ACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAA  
CRAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTGTAGTGGAGGTGAAAATTCC  
TCCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACACTGCTAC  
TTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAG

>15\_H12\_2011-10-05-15-19-45(216pb) : *C. coli* (d'origine humaine) (2011)

AACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAAT  
GGCSTAACRAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTGTAGTGGAGGTGA  
AAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACA  
CTGCTATTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAG

>9\_E12\_2011-10-05-15-19-45(214pb) *C. coli* (d'origine animale) (2011)

```
CTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGG
CGTAACRAGATGGGAGCTGTCTCAAAGAGGGATCCAGTGAAATTGTAGTGGAGGTGAAA
ATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGGARAGACCCCGTGGACCTTTACTACAGCTTGACT
GCTAYTTGGATAAGAATGTGCAGGATAGGTGGGAG
```

NB : Les lettres autres que C, G, T et A sont des erreurs de lecture du séquenceur.

**Consensus obtenu après séquençage des ADN de souches de *Campylobacter* pour l'étude de la résistance aux quinolones.**

>QRDR4-BACTERIO\_D12\_2011-09-29-10-31-54(383pb)

TGAGGCCAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGG  
TCGTTATCACCCACATGGAGATACAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGA  
TTTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGA  
TAGTGCCGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTTCTCATGAGCTTTT  
AAAAGATATAGATAAAGATACGGTTCGATTTTGTTCCAAATTATGATGGTTCAGAAAGCGA  
ACCTGATGTTTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTATTAATGGTTCAAGTGGTATAGCT  
GTAGGTATGGCGACAAATATCC

>QRDR3-BACTERIO\_C12\_2011-09-29-10-31-54(401pb)

ATATGCTATGCAAAATGATGAGGCCAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTAT  
AGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTTATGATGCTTTG  
GTTAGAATGGCTCAAGATTTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTT  
GGATCTATAGATGGTGATAGCGCTGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAA  
CTTTCTCATGAGCTTTTAAAAGATATAGATAAAGATACGGTTCGATTTTGTTCCAAATTATG  
ATGGTTCAGAAAGTGAACCTGATGTCTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTATTAATGG  
TTCAAGTGGTATAGCTGTAGGTATGGCGACAAATATCC

>QRDR2-BACTERIO\_B12\_2011-09-29-10-31-54(408pb)

AGATTTTATATGCTATGCAAAATGATGAGGCCAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAG  
CCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCACCCACATGGAGATATAGCAGTTTATG  
ATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGATTTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAG  
GCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGTCCCGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAA  
TGAGTAAACTTTTCTCATGAGCTTTTAAAAGATATAGATAAAGATACGGTTCGATTTTGTTC  
AAATTATGATGGTTCAGAAAGCGAACCTGATGTTTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTA  
TTAAATGGTTCAGTGGTATAGCTGTAGGTATGGCGACAAATATCC

>QRDR12-BACTERIO\_H11\_2011-09-29-10-31-54(407pb)

GATTTTATATGCTATGCAAAATGATGAGGCCAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGC  
CCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTTATGAT  
GCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGATTTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGC  
AACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGCGCTGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATG  
AGTAAACTTTTCTCATGAGCTTTTAAAAGATATAGATAAAGATACGGTTCGATTTTGTTC  
CAATTATGATGGTTCAGAAAGTGAACCTGATGTCTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTAT  
TAAATGGTTCAGTGGTATAGCTGTAGGTATGGCGACAAATATCC

>QRDR11-BACTERIO\_G11\_2011-09-29-10-31-54(408pb)

GATTTTATATGCTATGCAAAATGATGAGGGCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAG  
 CCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTTATG  
 ATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGATTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAG  
 GCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGCGCTGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAA  
 TGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTTAAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTC  
 AAATTATGATGGTTCAGAAAGTGAACCTGATGTCTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTA  
 TTAAATGGTTC AAGTGGTATAGCTGTAGGTATGGCGACAAATATCC

>QRDR10-BACTERIO\_F11\_2011-09-29-10-31-54(391pb)

AATGATGAGGGCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGT  
 TATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCT  
 CAAGATTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGAT  
 GGTGATAGCGCTGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAG  
 CTTTTAAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATTATGATGGTTCAGAA  
 AGTGAACCTGATGTCTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTATTAAATGGTTC AAGTGGTA  
 TAGCTGTAGGTATGGCGACAAATATCCAC

>QRDR9-BACTERIO\_E11\_2011-09-29-10-31-54(349pb)

AATGATCCTGGCGTAGGAAGTAGAAGTGCATATAAAAAATCTGCYCGTATAGTAGGGGA  
 TGTTATCGGTAAGTATCATCCACATGGCGATATTGCTGTTTACGATGCCTTAGTAAGAATG  
 GCACAAGATTTCTCTATGCGTTATCCAAGTATCGATGGACAAGGAACTTTGGTTCTATC  
 GATGGTGATGGCGCTGCTGCAATGCGTTATACTGAAGCTAGAATGACAATTTTAGCAGAA  
 GAGCTTTTACGCGATATAGATAAAGATACGGTAGATTTTGTTCCAAACTACGATGATTCT  
 ATGAGTGAGCCCGATGTTTTACCTGCTAGGGTGCCAAATTTATTATTAA

>QRDR8-BACTERIO\_H12\_2011-09-29-10-31-54(389pb)

AAATGATGAGGCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGT  
 TATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCT  
 CAAGATTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGAT  
 GGTGATAGCGCTGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAG  
 CTTTTAAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTGTTCCAAATTATGATGGTTCAGAA  
 AGTGAACCTGATGTCTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTATTAAATGGTTC AAGTGGTA  
 TAGCTGTAGGTATGGCGACAAATATCC

>QRDR7-BACTERIO\_G12\_2011-09-29-10-31-54(411pb)

GAAGATTTTATATGCTATGCAAAATGGATGAGGCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAAT  
 CAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTT  
 ATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGATTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGAC  
 AAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGCGCTGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAA  
 AAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTTAAAAGATATAGATAAAGATACGGTCGATTTTG  
 TTCCAAATTATGATGGTTCAGAAAGTGAACCTGATGTCTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTT  
 ATTATTAAATGGTTC AAGTGGTATAGCTGTAGGTATGGCGACAAATATCC

>QRDR1-BACTERIO\_A12\_2011-09-29-10-31-54(406pb)

ATTTTATATGCTATGCAAAATGATGAGGCCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCGGCC  
CGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTTATGAT  
GCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGATTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGC  
AACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGCGCTGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATG  
AGTAAACTTTCTCATGAGCTTTTAAAAGATATAGATAAAGATACGGTTCGATTTTGTTC  
AATTATGATGGTTCAGAAAGTGAACCTGATGTCTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTAT  
TAAATGGTTCAAGTGGTATAGCTGTAGGTATGGCGACAAATATCC

>QRDR6-BACTERIO\_F12\_2011-09-29-10-31-54(407pb)

GATTTTATATGCTATGCAAAATGATGAGGCCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGC  
CCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTTATGAT  
GCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGATTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGC  
AACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGCGCTGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATG  
AGTAAACTTTCTCATGAGCTTTTAAAAGATATAGATAAAGATACGGTTCGATTTTGTTC  
AATTATGATGGTTCAGAAAGTGAACCTGATGTCTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTAT  
TAAATGGTTCAAGTGGTATAGCTGTAGGTATGGCGACAAATATCC

>QRDR5-BACTERIO\_E12\_2011-09-29-10-31-54(378pb)

CAAAAAGKAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTT  
ATCACCCACATGGAGATATAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGATTTTTC  
TATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGTGC  
CGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAAAATGAGTAAACTTTCTCATGAGCTTTTAAAAGA  
TATAGATAAAGATACGGTTCGATTTTGTTCAAATTATGATGGTTCAGAAAGCGAACCTGA  
TGTTTTACCTTCTAGGGTTCCAAATTTATTATTAATGGTTCAGTGGTATAGCTGTAGGT  
ATGGCGACAAATATCC

NB : Les lettres autres que C, G, T et A sont des erreurs de lecture du séquenceur.

## RESUME

La campylobactériose est une affection bactérienne due principalement à *Campylobacter jejuni*. Les *Campylobacter* sont des bactéries qui se trouvent partout dans l'environnement et qui font partie de la flore intestinale normale des mammifères et des oiseaux. La résistance aux antibiotiques, est due à leur usage abusif dans les productions avicoles ou autres, ce qui procure à *Campylobacter* une résistance de plus en plus élevée aux différents antimicrobiens

La première partie de la thèse a porté sur :

- É Microbiologie animale : deux enquêtes ont été menées au niveau de deux bâtiments de poulailler, à des âges différents des poussins/poules. L'isolement de *C. coli* lors de la 1<sup>ère</sup> enquête à des âges très bas des poussins nous pousse à croire qu'il s'agit d'une contamination, d'autant plus que *C. coli* disparaît avec l'apparition de *C. jejuni*.
- É Microbiologie alimentaire : A partir des 109 échantillons analysés, provenant de rôtisseries, 3 souches appartenant à *Campylobacter jejuni* ont été isolées à partir de prélèvements crus (2,75%).
- É Microbiologie humaine : A partir des 4309 échantillons de coproculture analysés, 92 souches de *Campylobacter* ont été isolées dont 66 appartiennent à *Campylobacter jejuni* (72%). Une prédominance masculine est observée pour toutes les tranches d'âge. Plus de la moitié des souches est isolée durant la période fin automne, début hiver.

D'une manière globale, les *Campylobacter* issus des prélèvements animaux et alimentaires présentaient des taux de résistance plus élevés par rapport à ceux isolés des coprocultures. La résistance la plus importante a été observée d'une manière générale, pour les quinolones (jusqu'à 100%), les -lactamines (81%), la tétracycline (près de 60%), l'érythromycine et le métronidazole (près de 52% pour les deux derniers).

La seconde partie a concerné l'étude génétique de l'antibiorésistance. L'identification biochimique des *Campylobacter* au laboratoire a été confirmée par PCR. La détection de la résistance aux macrolides et aux quinolones chez *Campylobacter* a été réalisée par séquençage des gènes. L'alignement des séquences obtenues avec des séquences de référence a conduit aux résultats suivants :

- É La même mutation **A2075G** responsable de la résistance aux macrolides, a été observée pour toutes les séquences d'ADN étudiées pour *C. jejuni* et *C. coli*, qu'elles soient d'origine animale ou humaine, par rapport au type sauvage. Toutes les souches étudiées présentaient une résistance phénotypique aux macrolides.
- É Pour la résistance aux quinolones, toutes les séquences d'ADN de *Campylobacter jejuni*, et *C. coli* présentent une mutation **C257T** qui correspond à la mutation thréonine-à-isoleucine de l'acide aminé 86 de la GyrA.

La troisième partie de cette étude a porté sur l'activité antibactérienne de quelques huiles essentielles sur *Campylobacter*. 17 huiles essentielles ont été testées sur des souches de *Campylobacter* et les activités inhibitrices les plus importantes ont été observées avec les huiles essentielles de clou de girofle, de thym et d'origan. Le pouvoir bactéricide est beaucoup plus accentué avec l'HE de thym.

Cette étude montre l'efficacité de l'action antibactérienne des huiles essentielles sur le *Campylobacter*, notamment celles du thym d'origan et du clou de girofle. L'utilisation de ces huiles permet de proposer une alternative aux antibiotiques, d'autant plus qu'elles présentent en général plusieurs vertus.

Les résultats de ces travaux soulignent bien les risques que peuvent engendrer les contaminations par *Campylobacter* et l'utilisation massive et non réglementée des antibiotiques dans les élevages. Ce qui peut se répercuter directement sur la santé humaine au vu des entraves de traitements des intoxications alimentaires. D'où l'urgence d'une prise de conscience raisonnable.

## SUMMARY

Campylobacteriosis is a bacterial infection mainly due to *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter* are bacteria that are found everywhere in the environment and are part of the normal intestinal flora of mammals and birds. Antibiotic resistance, is due to their abusive use in poultry or other products, provides *Campylobacter* increasingly high resistance to different antimicrobials.

The first part of the thesis focused on:

**Animal Microbiology :** Two surveys were conducted at two poultry buildings at different ages of chicks / chickens. The isolation of *C. coli* during the first investigation at very young ages chicks leads us to believe that this contamination, especially as *C. coli* disappears with the appearance of *C. jejuni*.

**Food Microbiology:** From the 109 samples analyzed, from rotisseries, 3 strains of *Campylobacter jejuni* was isolated from raw samples (2,75%).

**Human Microbiology:** From the 4309 stool samples analyzed, 92 *Campylobacter* strains were isolated of which 66 belong to *Campylobacter jejuni* (72%). A male predominance was observed for all ages groups. More than half of the strains were isolated during the period late autumn, early winter.

Overall, *Campylobacter* from animals and food samples had higher resistance rates compared to those isolated from stool cultures. The largest resistance was observed for quinolones (up to 100%), -lactams (81%), tetracycline (nearly 60%), erythromycin (52%) and metronidazole (52%).

The second part concerned the genetic study of antibiotic resistance. Biochemical identification laboratory of *Campylobacter* was confirmed by PCR.

The detection of resistance to macrolides and quinolones *Campylobacter* was performed by sequencing the genes. The alignment of the sequences obtained with the reference sequences led to the following results:

- ✓ The same mutation A2075G responsible of macrolide resistance was observed for all studied DNA sequences for *C. jejuni* and *C. coli*, whether animal or human, relative to wild type. All the strains studied showed a phenotypic resistance to macrolides.
- ✓ To quinolone resistance, all of the DNA sequences of *Campylobacter jejuni*, *C. coli* show C257T mutation corresponding to the mutation to threonine isoleucine amino acid 86 of the GyrA.

The third part of the study focused on the antibacterial activity of some essential oils on *Campylobacter*. 17 Essential oils have been tested on *Campylobacter* strains and the most important inhibitory activities were observed with the essential oils of clove, thyme and oregano. The bactericidal power is more accented with thyme.

This study shows the effectiveness of antibacterial action of essential oils on *Campylobacter*, including thyme oregano and clove. The use of these oils makes it possible to offer an alternative to antibiotics, especially since they several virtues.

The results of this work well highlight the risks that may arise from contamination with *Campylobacter* and the massive and uncontrolled use of antibiotics in livestock. Which can directly impact human health in light of the treatment barriers food poisoning. Hence we notice the urgency of taking reasonable consciousness.

داء العطائف من العدوى البكتيرية الراجعة أساسا إلى العطيفة الصانمية. *Campylobacter jejuni*

هذه العطيفة موجودة في كل مكان في البيئة و هي جزء من الجراثيم المعوية الطبيعية عند الثدييات والطيور.

المقاومة للمضادات الحيوية، الراجعة إلى إساءة استعمالها في تربية الدواجن أو غيرها من المنتجات تعطي العطيفة مقاومة عالية على نحو متزايد لمضادات الميكروبات المختلفة

ركز الجزء الأول من الأطروحة على

. ميكروبيولوجيا للحيوان : أجريت مسوحات في مبنائين للدواجن في أعمار مختلفة للدجاج . أثناء التحقيق عزل *Campylobacter coli*

في سن مبكرة جدا مما قادنا إلى الاعتقاد بأنه تلوث، خاصة أن *Campylobacter coli*

يختفي مع ظهور *Campylobacter jejuni*

ميكروبيولوجيا الأغذية: تم تحليل 109 عينة من محلات شواء الدجاج , و تم عزل *C. jejuni* من عينات نيئة.

. ميكروبيولوجيا الإنسان: تم تحليل 4309 من عينات البراز، و تم عزل 92 *Campylobacter* منها 66 (72%) تنتمي إلى *Campylobacter jejuni* لوحظ وجود هيمنة الذكور لجميع الفئات العمرية. و أكثر من نصف السلالات معزولة خلال فترة أواخر الخريف وأوائل الشتاء

على العموم، أظهرت هذه السلالة البكتيرية المعزولة الطعام و من الحيوانات مقاومة أعلى للمضادات الحيوية مقارنة بتلك المعزولة من البراز للكينولون (100%)،  $\beta$ كتامين (81%)، التتراسيكلين (60%)، الإريثروميسين (52%) وميترونيدازول (52%) ،

الجزء الثاني يتعلق بدراسة وراثية للمقاومة للمضادات الحيوية. تم تأكيد هوية السلالات ب PCR

:تم إجراء الكشف لمقاومة *Campylobacter* للماكروليدات والكينولون بواسطة تسلسل الجينات .

أدت محاذاة تسلسل تم الحصول عليها تسلسل المرجعية إلى النتائج التالية

لوحظ الأمر نفسه و هو طفرة A2075G المسؤولة عن المقاومة للماكرولايد لجميع تسلسل الحمض النووي. وأظهرت كل السلالات المدروسة مقاومة المظهرية للماكروليدات

المقاومة الكينولون، كانت بسبب طفرة C257T والتي تتطابق مع الطفرة ثريونين إلى أيسولوسين لأحماض الأمينية 86 من *GyrA*

ركز الجزء الثالث من هذه الدراسة على النشاط المضاد للبكتيريا لبعض الزيوت الأساسية. وقد تم اختبار 17 زيت عطري على سلالات *Campylobacter* ولوحظت أهم أنشطة مثبطة مع الزيوت الأساسية للقرنفل والزعتر والأوريغانو، خصوصا الزعتر

وتبين هذه الدراسة فعالية الإجراءات المضادة للبكتيريا من الزيوت الأساسية على العطيفة، بما في ذلك توابل الزعتر والقرنفل. استخدام هذه الزيوت يجعل من الممكن لتقديمها بديل للمضادات الحيوية، وخاصة لأن لديهم عموما عدة فضائل

نتائج هذا العمل تسلط الضوء على المخاطر التي قد تنشأ من التلوث مع العطيفة والاستخدام المكثف وغير المنضبط من المضادات الحيوية في الماشية. والتي يمكن أن تؤثر مباشرة على صحة الإنسان في ظل الحواجز في علاج التسمم الغذائي. ومن هنا جاءت الحاجة الملحة لاتخاذ وعي معقول لمكافحة هذا الخطر