

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**Évaluation de la virulence et de la persistance dans le sol des
Arcobacter spp.**

Par

Jenni Whiteduck Léveillée

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Philippe Constant
INRS-IAF

Examineur externe

Philippe Fravalo
Faculté de médecine vétérinaire
Université de Montréal

Directeur de recherche

Richard Villemur
INRS-IAF

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier Dr Martin Lanthier d'Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC) pour m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire en tant qu'étudiante COOP et par la suite comme étudiante à la maîtrise. Il est la raison pour laquelle j'ai entrepris ce chemin vers la microbiologie, plus spécifiquement vers la microbiologie environnementale. Malheureusement le Dr Lanthier nous a quitté beaucoup trop tôt et j'aimerais lui dédier ce travail. J'aimerais aussi remercier Dr Richard Villemur pour son support au cours de ma maîtrise, initialement comme codirecteur et ensuite comme directeur de recherche.

J'aimerais remercier Dr Izhar Khan, Dr Michèle Marcotte, Ulrica McKim, Dr Shea Miller, Graham Wilkes, Dr André Lévesque, Dr James Tambong, Dr David Lapen, et Denise Chabot du Centre de recherche de l'Est sur les céréales et les oléagineux (CRECO) situé à Ottawa, ON; Dr Guylaine Talbot du Centre de recherche et développement sur le bovin laitier et porc (CRDBLP) à Sherbrooke, Québec; ainsi que Dr Edward Topp du Centre de recherche du Sud sur la phytoprotection et les aliments (CRSPA) à London, ON pour leurs expertises et conseils scientifiques.

J'aimerais également remercier mes collègues de travail, principalement Kerri Whiteduck Léveillé et Natacha Laprade; et Michel Cloutier pour son aide en tant que technicien sénior du laboratoire. Merci à Cynthia Anna Keneza et Kareem Shareefa comme étudiant bénévole et stagiaire sur un de mes projets.

J'apprécie énormément le support financier du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et la Fondation Armand-Frappier ainsi que AAC pour le financement de mon projet de maîtrise.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille et mon conjoint qui m'ont offert un support inégalé ainsi que l'Institut national de la recherche scientifique.

RÉSUMÉ

Les *Arcobacter* sont omniprésents dans l'environnement, on les retrouve dans l'eau potable et salée, l'eau souterraine, les eaux de surface, les matières fécales d'origine animale et humaines, les récoltes, les abattoirs et les usines de transformation des produits d'origine animales.

Peu est connu sur leur mécanisme de pathogénicité et on commence graduellement à comprendre leur persistance dans l'environnement. Cependant, leur persistance dans le sol a été très peu étudiée, car aucune méthode d'isolement standard n'existe pour ce type d'échantillon pour les *Arcobacter*.

Nous avons développé une méthode rapide et efficace afin de détecter huit gènes de virulence hypothétiques chez des isolats *Arcobacter* provenant de matières fécales animales et humaines. Les *Arcobacter* provenant de ce type de source ont une présence élevée de gènes de virulence hypothétiques associés à l'adhésion à la cellule hôte et de la motilité chez d'autres espèces, soit *ciaB* (91 %) et *mviN* (78 %). Les six autres gènes ont tous été observés individuellement chez les isolats *Arcobacter* provenant de matières fécales animales et humaines en proportion plus faible.

Dans l'étude suivante, nous avons tenté d'élucider la persistance dans le sol des *Arcobacter* naturellement retrouvés dans le fumier de porcs et de vaches laitières, soit deux types de fumier abondamment utilisés en agriculture. Les *Arcobacter* naturellement retrouvés dans ces deux types de fumier ont persisté au moins 49 jours dans le sol amendé avec ceux-ci et plus de 91 jours pour les *Arcobacter* provenant du fumier de vaches laitières. Ces résultats suggèrent que la source du fumier pourrait avoir un effet sur la persistance de ceux-ci. Donc, les *Arcobacter* retrouvés dans les fumiers utilisés comme fertilisant persistent suffisamment longtemps dans le sol, suite à l'épandage, leur permettant de contaminer les récoltes, les animaux de ferme et l'humain par la consommation des récoltes.

De même, nous avons déterminé la persistance d'*Arcobacter butzleri*, l'espèce la plus dominante et associée le plus souvent aux infections humaines, dans un sol entreposé à deux températures différentes. Cette espèce possède également tous les gènes de virulence hypothétiques analysés dans cette étude. Les résultats montrent une persistance dans le sol de plus de 42 jours à la température ambiante (20 ± 1 °C) et plus de 105 jours à 4°C.

En somme, cette étude a démontré que les *Arcobacter* provenant de matières fécales d'origines animales variées et d'origines humaines ont une présence évidente de plusieurs gènes de virulence hypothétiques et qu'ils ont la capacité de persister dans le sol pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois. De plus, la température semble avoir un impact majeur sur leur capacité à persister dans le sol. Nous avons également déterminé que les *Arcobacter* naturellement retrouvés dans différentes sources de fumiers persistent dans le sol pendant des durées distinctes, donc la source pourrait avoir un effet sur la persistance de ceux-ci. Cette persistance dans le sol pourrait contribuer à l'ubiquité des *Arcobacter* dans l'environnement.

TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION	1
1.1	OBJECTIFS ET HYPOTHESES	2
2	REVUE DE LITTÉRATURE	5
2.1	ORIGINE ET DESCRIPTION GENERALE DES <i>ARCOBACTER</i>	5
2.2	LES ESPECES CONNUES	6
2.3	OU SONT-ILS ET QU'EST-CE QU'ILS CAUSENT?	6
2.3.1	<i>Chez les humains</i>	6
2.3.2	<i>Chez les animaux</i>	6
2.3.3	<i>Autres environnements</i>	7
2.4	LES GENES DE VIRULENCE CHEZ LES <i>ARCOBACTER</i>	8
2.5	FACTEURS QUI INFLUENCENT LA PERSISTANCE DES MICROORGANISMES DANS L'ENVIRONNEMENT	12
2.5.1	<i>Facteurs biotiques</i>	12
2.5.2	<i>Facteurs abiotiques</i>	13
2.5.3	<i>Facteurs génétiques</i>	15
3	MATERIELS ET METHODES	18
3.1	SOUCHES BACTERIENNES	18
3.2	ISOLEMENT, PURIFICATION ET EXTRACTION D'ADN DES ISOLATS <i>ARCOBACTER</i> DE MATIERES FECALES	20
3.3	CARACTERISATION PAR PCR DES ISOLATS <i>ARCOBACTER</i> PROVENANT DE MATIERES FECALES	22
3.4	OPTIMISATION ET IDENTIFICATION DES GENES DE VIRULENCES HYPOTHETIQUES CHEZ <i>ARCOBACTER</i> PROVENANT DE MATIERES FECALES	24
3.4.1	<i>Programme de PCR</i>	24
3.4.2	<i>PCR multiplex et combinaison de gènes de virulences</i>	24
3.4.3	<i>Optimisation des réactions PCR</i>	25
3.4.4	<i>Spécificité des amorces aux espèces Arcobacter</i>	25
3.4.5	<i>Identification des gènes de virulences chez des isolats Arcobacter provenant de matières fécales</i>	28
3.5	OPTIMISATION D'UNE METHODE DU NOMBRE LE PLUS PROBABLE (NPP) POUR L'ISOLEMENT ET LE DENOMBREMENT D' <i>ARCOBACTER BUTZLERI</i> DANS LE SOL	28
3.5.1	<i>Milieux utilisés pour les dilutions sérielles</i>	28

3.5.2	Détermination de la concentration d' <i>Arcobacter</i> dans le sol par la méthode du nombre le plus probable (NPP)	29
3.6	ÉTUDE DE PERSISTANCE DES <i>ARCOBACTER</i> DANS UN SOL AGRICOLE	32
3.6.1	Persistence des <i>Arcobacter</i> indigène du fumier dans un sol agricole.....	32
3.6.2	Persistence d' <i>Arcobacter butzleri</i> dans un sol agricole à différentes température ..	33
4	RESULTATS	35
4.1	OPTIMISATION ET DETECTION DES GENES DE VIRULENCES CHEZ <i>ARCOBACTER</i>	35
4.2	PRESENCE DE GENE DE VIRULENCE CHEZ <i>ARCOBACTER</i>	38
4.3	ÉVALUATION DE LA PERSISTANCE DANS UN SOL AGRICOLE DES ESPECES <i>ARCOBACTER</i>	43
4.3.1	Étude 1 : Persistence dans un sol agricole des <i>Arcobacter</i> spp. en fonction de la source de fumier	43
4.3.2	Étude 2 : Persistence dans un sol agricole d' <i>Arcobacter butzleri</i> en fonction de la température 44	
5	DISCUSSION	49
5.1	LES <i>ARCOBACTER</i> PROVENANT DE MATIERES FECALES ONT UN POTENTIEL DE VIRULENCE	49
5.2	LES <i>ARCOBACTER</i> INDIGENES DU FUMIER PERSISTENT DANS LE SOL	52
5.3	<i>ARCOBACTER BUTZLERI</i> SURVIT LONGTEMPS DANS LE SOL A TEMPERATURE FROIDE	54
6	CONCLUSION	57
7	REFERENCES	59

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 2.1	GENES DE VIRULENCE HYPOTHETIQUES CHEZ <i>ARCOBACTER</i> SPP.....	10
TABLEAU 3.1	LISTE DES AMORCES UTILISEES AINSI QUE LES GENES CIBLES DANS CETTE ETUDE POUR LES PCR MULTIPLEX ET SIMPLEX.....	19
TABLEAU 3.2	TYPE ET ORIGINE DES ECHANTILLONS DE MATIERES FECALES ECHANTILLONNES DURANT LA PERIODE ESTIVALE 2010.....	22
TABLEAU 3.3	LISTE DES ESPECES <i>ARCOBACTER</i> POUR LA VALIDATION DE LA SPECIFICITE DES AMORCES POUR L'IDENTIFICATION DES GENES DE VIRULENCE CHEZ LES ESPECES <i>ARCOBACTER</i>	25
TABLEAU 4.1	COMBINAISON DE GENES DE VIRULENCE TESTES DURANT L'OPTIMISATION DES MPCR POUR LA DETECTION DE GENES DE VIRULENCES CHEZ <i>ARCOBACTER</i>	35
TABLEAU 4.2	ÉVALUATION DE LA CONCENTRATION EN <i>ARCOBACTER</i> DE FUMIER PORCIN ET DE VACHE LAITIERE.....	45

LISTE DES FIGURES

FIGURE 2.1	<i>ARCOBACTER BUTZLERI</i> SOUS MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE SUR FILTRE AVEC PORES DE 0,45 µM.	5
FIGURE 3.1	SCHEMATISATION DE LA METHODE NPP POUR L'ISOLEMENT ET LE DENOMBREMENT DES <i>ARCOBACTER</i> A PARTIR D'UN MICROCOSME DE SOL.	31
FIGURE 3.2	INTERFACE DU PROGRAMME « MPN CALCULATOR » BUILT 23 DE MIKE CURIALE.	32
FIGURE 4.1	AMPLICONS DES GENES DE VIRULENCE CHEZ <i>ARCOBACTER BUTZLERI</i>	37
FIGURE 4.2	DISTRIBUTION DES HUIT GENES DE VIRULENCE HYPOTHETIQUES CHEZ LES <i>ARCOBACTER</i> ISOLEES.	39
FIGURE 4.3	PRESENCE DE GENES DE VIRULENCE HYPOTHETIQUES CHEZ DES ISOLATS D'ESPECES <i>ARCOBACTER</i> VARIEES ISOLEES DE SOURCES FECALES.	40
FIGURE 4.4	PRESENCE DES GENES DE VIRULENCE HYPOTHETIQUES CHEZ DES ISOLATS <i>ARCOBACTER</i> PROVENANT DE SOURCES FECALES VARIEES.	42
FIGURE 4.5	PERSISTANCE DANS UN SOL AGRICOLE DES <i>ARCOBACTER</i> PROVENANT DE FUMIER D'ORIGINE ANIMALE.	46
FIGURE 4.6	PERSISTANCE DANS UN SOL AGRICOLE DE L'ESPECE <i>ARCOBACTER BUTZLERI</i> A DIFFERENTES TEMPERATURES	47

LISTE DES ABRÉVIATIONS

spp. : Espèces

pb : Paire de bases

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

A: Arcobacter

C: Campylobacter

ATCC: American Type Culture Collection

NCTC: National Culture Type Collection

BCCM/LMG: Laboratory for Microbiology Collection

M-AAM: modified Agarised *Arcobacter* medium

AM: *Arcobacter* medium

CAT: Cefoperazone, Amphotericine B et Teicoplanine

JM: Johnson-Murano

ASIA: *Arcobacter* selective isolation agar

V: volt

UFC: unité formatrice de colonie

NPP : Nombre le Plus Probable

rpm : rotation par minute

L : Litre

1 INTRODUCTION

L'utilisation de fumier d'origine animale comme fertilisant sur les terres agricoles engendre un problème au niveau de la santé publique. Des études ont prouvé que la contamination des eaux de surface est directement reliée à l'épandage du fumier sur les terres agricoles. Après de fortes pluies, le ruissellement du fumier contenant une multitude de pathogènes achemine ceux-ci et les polluants chimiques vers les eaux de surface et les eaux réservées aux activités récréatives (Doran *et al.*, 1979, Pell, 1997). Le fumier, un réservoir important de pathogènes comme *Arcobacter* (Wesley *et al.*, 2000a, Wesley *et al.*, 2000b), contient de grandes quantités de bactéries capables de contaminer d'autres environnements comme le sol, les récoltes, les bassins d'eau, en plus d'infecter les animaux et les humains. Le sol pourrait donc être un intermédiaire de la contamination des bassins d'eau potable par les pathogènes contenus dans le fumier. Afin de causer une contamination des eaux, les pathogènes doivent être capables de persister suffisamment longtemps entre chaque environnement. Plusieurs facteurs biotiques et abiotiques peuvent influencer la survie des pathogènes dans l'environnement.

Plusieurs gènes de virulence ont récemment été observés dans la séquence du génome d'*Arcobacter butzleri* (Miller *et al.*, 2007) et des amorces ont été décrites (Doudah *et al.*, 2012) permettant une évaluation plus approfondie de leur présence chez les espèces *Arcobacter*. Très peu est connu sur le mécanisme de pathogénicité des *Arcobacter* ainsi que le rôle des gènes de virulences hypothétiques chez *A. butzleri*. Il n'est encore pas connu si ces gènes de virulences hypothétiques ont des rôles similaires aux homologues retrouvés chez plusieurs autres espèces bactériennes.

Les espèces *Arcobacter* sont des microorganismes fréquemment isolés du milieu agricole. On les retrouve dans les matières fécales d'origine animales (Driessche *et al.*, 2003, Inglis *et al.*, 2004) qui sont ensuite utilisées pour la production de fumier; ainsi que dans les usines de transformation des produits animaux (Nieva-Echevarria *et al.*, 2013, Shah *et al.*, 2012) et les abattoirs (Duffy *et al.*, 2012, Ferreira *et al.*, 2013a). D'ailleurs, leur présence dans l'environnement et leur impact sur la santé sont parfois sous-estimés comparativement au genre *Campylobacter* qui est beaucoup plus étudié. Seulement quelques études ont démontré leur persistance dans l'eau salée et potable (Collado *et al.*, 2010, Ertas *et al.*, 2010, Moreno *et al.*, 2004). Par contre, très peu d'études ont été entreprises sur la persistance dans le sol, un réservoir potentiel de pathogènes humains. La raison pourrait être le manque de méthodes d'isolement des *Arcobacter* dans ce type d'échantillon. Le sol est une matrice beaucoup plus difficile à manipuler et très

diversifiée en contenu. La grosseur des particules dans le sol est souvent un obstacle pour un étalement direct sur milieu de culture. Donc, de nouvelles méthodes d'isolement des *Arcobacter* sont nécessaires afin d'étudier leur persistance dans le sol et ainsi savoir si le sol est un réservoir potentiel pour *Arcobacter* et déterminer les facteurs qui influencent cette persistance. Ces études de persistance pourraient également permettre de conseiller les fermiers sur l'utilisation et l'entreposage du fumier contenant des pathogènes comme *Arcobacter* sur leurs terres agricoles, ainsi que de sensibiliser ceux-ci sur l'impact de l'utilisation du fumier d'origine animale sur la santé publique.

1.1 Objectifs et hypothèses

L'hypothèse initiale de cette étude était que les *Arcobacter* ne persisteraient que quelques jours dans un sol agricole, car selon une étude sur la survie de *Campylobacter jejuni* celle-ci a persisté que 5 jours dans un sol agricole (Brandl *et al.*, 2004), *Campylobacter jejuni* étant une espèce de la même famille que les *Arcobacter*. Et que les isolats provenant de matières fécales variées ont un potentiel de virulence par la présence de plusieurs gènes de virulence hypothétiques, car des études récentes ont prouvées que leur présence est élevée chez des isolats *Arcobacter* provenant de cette source (Doudah *et al.*, 2012, Karadas *et al.*, 2013, Tabatabaei *et al.*, 2014). Les objectifs principaux sont de développer une méthode d'isolement et de dénombrement des *Arcobacter* dans le sol afin d'analyser leur persistance sous différentes conditions retrouvées dans le domaine de l'agriculture, ainsi que l'évaluation de la présence de gènes de virulences hypothétiques chez des isolats *Arcobacter* provenant de matières fécales comme le fumier. Les objectifs spécifiques sont (1) l'évaluation de la présence de huit gènes de virulence hypothétiques chez des isolats *Arcobacter* isolés de matières fécales agricoles et humaines par PCR multiplex développées dans notre laboratoire, (2) l'optimisation d'une méthode du nombre le plus probable (NPP) pour l'isolement des *Arcobacter* provenant du sol suivi de (3) l'évaluation de la persistance dans le sol de l'espèce la plus dominante dans l'environnement, *Arcobacter butzleri*, à différentes températures ainsi que la persistance dans le sol des *Arcobacter* naturellement retrouvés dans les fumiers agricoles en utilisant la méthode NPP. L'évaluation de la présence des gènes de virulence hypothétiques chez des isolats *Arcobacter* provenant de matières fécales permettra d'évaluer la pathogénicité potentielle d'isolats provenant de ces types d'échantillons dans les régions d'Ottawa (ON) et Sherbrooke (QC). Le développement d'une nouvelle méthode d'isolement des *Arcobacter* du sol permettra une meilleure évaluation de l'occurrence des *Arcobacter* dans l'environnement. Les études de la

persistance des *Arcobacter* dans le sol permettront de démontrer leur capacité de survie dans cet environnement et mieux comprendre le risque de l'utilisation de déchets organiques sur les terres agricoles.

2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Origine et description générale des *Arcobacter*

Le genre *Arcobacter* a été défini en 1991 par le groupe de Vandamme (Vandamme *et al.*, 1991b) et les espèces de ce genre étaient préalablement classifiées comme des espèces du genre *Campylobacter*. Ce genre provient de la classe des *Epsilonproteobacteria*, de l'ordre des Campylobacterales et de la famille des *Campylobacteraceae* (Vandamme *et al.*, 1991a). Ce sont des microorganismes à Gram négatif, ayant une forme légèrement courbée et motile grâce à un flagelle polaire (Figure 2.1). Les *Arcobacter* sont considérés comme étant aérotolérants, donc ils ont la capacité de croître en conditions aérobies, mais leur croissance optimale est dans une atmosphère microaérophile. Ils ont aussi l'habileté de croître à 15°C contrairement au genre *Campylobacter* de la même famille, mais leur température de croissance optimale est 30°C pour la majorité des espèces (Vandamme *et al.*, 1991b).

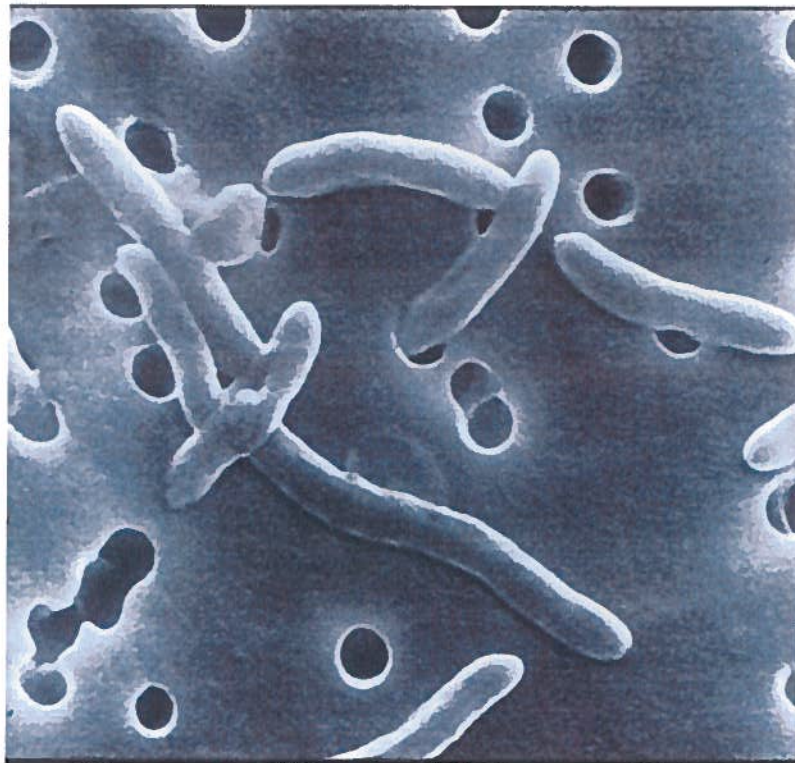


Figure 2.1 *Arcobacter butzleri* sous microscope électronique à balayage sur filtre avec pores de 0,45 µm.

Source : (Manke *et al.*, 1996)

2.2 Les espèces connues

Le genre *Arcobacter* contient actuellement 17 espèces publiées provenant de sources variées, soit *A. butzleri* (Kiehlbauch *et al.*, 1991), *A. cryaerophilus* (Neill *et al.*, 1985), *A. skirrowii* (Vandamme *et al.*, 1992b), *A. nitrofigilis* (McClung *et al.*, 1983), *A. cibarius* (Houf *et al.*, 2005), *A. thereius* (Houf *et al.*, 2009), *A. trophiarum* (De Smet *et al.*, 2011), *A. defluvii* (Collado *et al.*, 2011b), *A. mytili* (Collado *et al.*, 2009), *A. halophilus* (Donachie *et al.*, 2005), *A. marinus* (Kim *et al.*, 2010), *A. molluscorum* (Figueras *et al.*, 2010), *A. ellisii* (Figueras *et al.*, 2011), *A. venerupis* et *A. bivalviorum* (Levican *et al.*, 2012a), ainsi que *A. cloacae* et *A. suis* (Levican *et al.*, 2013). Quatre espèces sont actuellement considérées comme des pathogènes humains, soit *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* et *A. cibarius*, car elles ont été isolées de personnes ayant une infection. Cependant, *A. butzleri* est de loin l'espèce la plus couramment associée aux infections humaines et animales; elle est d'ailleurs l'espèce la plus étudiée.

2.3 Où sont-ils et qu'est-ce qu'ils causent?

2.3.1 Chez les humains

Comme mentionné précédemment, les *Arcobacter* sont retrouvés autant chez les humains que chez les animaux. Chez les humains, les selles de patients malades sont l'endroit où on les retrouve le plus souvent (Vandenberg *et al.*, 2004). Les espèces *A. butzleri* et *A. cryaerophilus* sont reconnues pour causer quelques cas de bactériémie (Hsueh *et al.*, 1997, Lau *et al.*, 2002, On *et al.*, 1995, Woo *et al.*, 2001, Yan *et al.*, 2000) et majoritairement de gastroentérites (Burnens *et al.*, 1992, Fernández *et al.*, 2004, Lerner *et al.*, 1994, Tee *et al.*, 1988, Wybo *et al.*, 2004) avec des crampes abdominales récurrentes (Lerner *et al.*, 1994, Vandamme *et al.*, 1992a). Par ailleurs, *A. skirrowii* est seulement reconnu responsable de cas de diarrhées (Wybo *et al.*, 2004). Ces trois espèces et *A. cibarius* sont les seules identifiées jusqu'à maintenant comme pathogènes humains (Mansfield *et al.*, 2000).

2.3.2 Chez les animaux

Chez les animaux et leur environnement, on retrouve aussi *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* et *A. skirrowii* dans les fèces d'animaux malades et en santé (Driessche *et al.*, 2003, Driessche *et al.*, 2005, Ho *et al.*, 2006, Van Driessche *et al.*, 2004) et de fœtus provenant d'avortements

spontanés (Houf *et al.*, 2009, On *et al.*, 2002). L'espèce *Arcobacter cibarius* ainsi que les trois espèces mentionnées ci-dessus ont été retrouvées dans la viande animale comme les volailles (Atabay *et al.*, 1997, Atabay *et al.*, 2003, Atabay *et al.*, 2008, Atabay *et al.*, 2006, Pentimalli *et al.*, 2009). Chez les animaux, les *Arcobacter* causent des mastites (Logan *et al.*, 1982) et des cas de diarrhées (Rice *et al.*, 1999, Vandamme *et al.*, 1992b). Les *Arcobacter* se retrouvent aussi chez les animaux domestiques comme le chien (Houf *et al.*, 2008), les chats (Fera *et al.*, 2009) et d'autres primates que l'homme (Higgins *et al.*, 1999). Les espèces suivantes sont également retrouvées: *A. thereius* isolé de porcs et de canards (Houf *et al.*, 2009); *A. cibarius* sur les viandes de poulet à rôti (Atabay *et al.*, 1997) et les effluents de porcherie (Chinivasagam *et al.*, 2007); et *A. trophiarum* retrouvé chez les porcs à l'engraissement (De Smet *et al.*, 2011, Hume *et al.*, 2001) et le fumier d'origine animale (Vandamme *et al.*, 1992b). Récemment, les espèces *A. suis* et *A. cloacae* ont été récupérées des eaux usées et de la viande de porc (Levican *et al.*, 2013).

2.3.3 Autres environnements

Dans l'environnement, on les retrouve également dans les eaux de surface (Stampi *et al.*, 1999), les eaux souterraines (Rice *et al.*, 1999), l'eau potable (Assanta *et al.*, 2002, Collado *et al.*, 2010, Jacob *et al.*, 1993), l'eau de mer (Fera *et al.*, 2004) et les eaux usées (Jacob *et al.*, 1998, Stampi *et al.*, 1999). En ce qui concerne les produits de consommation, la contamination par les *Arcobacter* est présente sur les légumes (Hausdorf *et al.*, 2008) et les œufs de poule (Lipman *et al.*, 2008). On retrouve d'autres espèces en moins grande quantité chez certains organismes marins comestibles comme les mollusques (*A. molluscorum*) (Figueras *et al.*, 2010), les mytiloïdes plus couramment appelées moules (*A. ellisii* et *A. cloacae*) (Figueras *et al.*, 2011, Levican *et al.*, 2012b) et autres fruits de mer (*A. venerupis*, *A. bivalvorum*, *A. marinus*) (Kim *et al.*, 2010, Levican *et al.*, 2012a).

En d'autres mots, il est évident que les espèces *Arcobacter* sont un danger pour la santé publique vu leur ubiquité dans l'environnement et leur caractère pathogène. Cette ubiquité offre

à ce pathogène humain une grande étendue de possibilité d'infection. Dernièrement, on les a retrouvés dans des environnements nouveaux comme les récoltes et les environnements marins. Que ce soit de la naissance de l'animal à l'abattoir ou de la semence à la récolte des légumes, la contamination par *Arcobacter* est potentiellement présente. À ce jour, il n'existe toujours pas de méthode d'isolement normalisée pour les *Arcobacter* et ceux-ci ne sont actuellement pas détectés de manière routinière dans les hôpitaux. Ces aspects contribuent fort probablement à leur sous-estimation dans l'environnement (Wesley *et al.*, 2000a).

De plus, il existe d'autres réservoirs potentiels qui n'ont toujours pas été étudiés en profondeur, comme le sol où les *Arcobacter* pourraient persister jusqu'à leur transfert vers les récoltes ou les eaux de surface utilisées pour les activités récréatives.

2.4 Les gènes de virulence chez les *Arcobacter*

La présence de gènes de virulence contribue à la pathogénicité de certaines espèces bactérienne. Certains gènes de virulence confèrent à la bactérie des fonctions qui lui permettent de survivre dans des environnements moins favorables, par exemple la capacité d'être motile ou de former un biofilm. Quelques études récentes confirment la présence de gènes de virulence hypothétiques chez les espèces *Arcobacter* provenant de différentes sources. Avec la publication du génome complet d'*Arcobacter butzleri* ATCC49616 (Miller *et al.*, 2007), certains gènes de virulence potentiels ont été découverts à l'aide de l'analyse de sa séquence (Tableau 2.1). La plupart sont suggéré d'être impliqués dans l'adhésion et l'invasion de la cellule hôte chez d'autres espèces. Selon l'étude de Miller en 2007, certains gènes de virulence hypothétiques chez *Arcobacter* ont des homologues chez *Campylobacter*. Les gènes de virulence hypothétiques découverts chez *A. butzleri* sont les gènes *cadF*, *ciaB*, *cj1349*, *iroE*, *mviN*, *pldA*, *irgA*, *hecA*, *hecB* et *tlyA*. En 2012, Doudah et collègues (Doudah *et al.*, 2012) ont généré des paires d'amorces afin d'identifier neuf de ces gènes et détecter leur présence par PCR chez plusieurs souches références *Arcobacter* ainsi que des isolats provenant d'animaux et d'humains. Les gènes *cadF* (Konkel *et al.*, 2005) et *cj1349* (Monteville *et al.*, 2003) sont des gènes codant pour des protéines de liaison de fibronectines qui facilitent l'adhérence entre cellules chez *Campylobacter jejuni*. Le gène *ciaB* (*Campylobacter* invasive antigen B) (Konkel *et al.*, 1999), qui possèdent un rôle dans l'invasion par l'internalisation de la bactérie dans la cellule hôte, possède aussi une similarité avec le gène correspondant chez *Arcobacter*. Ce gène est d'ailleurs le plus présent dans l'étude de Doudah, soit une présence de 92% chez tous les isolats étudiés. Le gène *pldA* code pour une phospholipase A de la membrane externe (Schmiel *et al.*, 1999). Cette protéine hydrolyse les

liaisons ester acyle chez beaucoup de bactéries Gram négatif (Istivan *et al.*, 2006) et possède un rôle dans la lyse des érythrocytes chez *Campylobacter coli* (Grant *et al.*, 1997). Ce gène possède 60 et 58% de similarité avec *Campylobacter curvus* et *Campylobacter fetus*, respectivement avec *Arcobacter*. L'hémolysine codée par le gène *tlyA*, initialement découvert chez *Serpula (Treponema) hyodysenteriae*, est également responsable de la lyse des globules rouges (Muir *et al.*, 1992). Le gène *irgA* code pour un récepteur d'entérobactine de la membrane externe régulé par le fer chez *Vibrio cholera* (Goldberg *et al.*, 1990) et joue un rôle important dans la pathogénicité chez *Escherichia coli* (Bauer *et al.*, 2002). Le gène *mviN* présent chez *A. butzleri* possède également un homologue chez *E. coli* (Inoue *et al.*, 2008). Ce gène code pour un facteur sigma qui régule l'expression de l'opéron *flg* responsable de la synthèse du flagelle chez *Salmonella Typhimurium* (Ohnishi *et al.*, 1990). Les gènes *hecA* et *hecB* sont couramment retrouvés chez les pathogènes d'animaux et de plantes. La protéine HecA fait partie de la famille des hémagglutinines filamenteuses et possède une fonction d'agrégation et d'attachement, mais est aussi impliquée dans la mort cellulaire des cellules épithéliales chez *Erwinia chrysanthemi*, un pathogène de plante (Rojas *et al.*, 2002). Le gène *hecB* code pour une protéine d'activation de l'hémolysine chez *E. chrysanthemi* (Kim *et al.*, 1998). Finalement le gène *iroE* code pour une protéine estérase de sidérophores, une enzyme périplasmique (Zhu *et al.*, 2005) retrouvée chez les souches de *E. coli* uropathogénique (Bauer *et al.*, 2002) qui a comme rôle de fixer le fer dans la cellule et ainsi permettre l'infection de persister.

Doudah *et al.* (2012) (Doudah *et al.*, 2012) ont démontré que le gène le plus prévalent chez les *Arcobacter* environnementales est *ciaB*. Les gènes *irgA* et *hecA* sont les moins fréquemment détectés chez les souches provenant des trois espèces, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* et *A. skirrowii*. Les mêmes auteurs n'ont déterminé aucune corrélation entre l'origine des souches *Arcobacter* et le profil de gènes de virulence hypothétiques que celles-ci

possèdent, ce qui rend l'identification des souches responsables des infections humaines plus difficiles à cerner. De plus, la fonction qu'ont ces gènes chez *Arcobacter* n'est pas encore élucidée. Selon des études par Levican (Levican *et al.*, 2013) et Karadas (Karadas *et al.*, 2013), les souches ayant plusieurs gènes de virulence hypothétiques possèdent un potentiel d'invasion et d'adhésion plus élevé que les souches dépourvues de ceux-ci. L'étude de Levican a déterminé que 10 des 16 espèces *Arcobacter* ont la capacité d'infecter certaines lignées cellulaires humaines.

Tableau 2.1 Gènes de virulence hypothétiques chez *Arcobacter* spp.

Gène	Amorces	Longueur de l'amplicon (pb)	Source
------	---------	-----------------------------	--------

<i>ciaB</i>	<i>ciaB</i> -F <i>ciaB</i> -R	284	Doudah <i>et al.</i> 2012
<i>cj1349</i>	<i>cj1349</i> -F <i>cj1349</i> -R	659	Doudah <i>et al.</i> 2012
<i>pldA</i>	<i>pldA</i> -F <i>pldA</i> -R	293	Doudah <i>et al.</i> 2012
<i>irgA</i>	<i>irgA</i> -F <i>irgA</i> -R	437	Doudah <i>et al.</i> 2012
<i>hecA</i>	<i>hecA</i> -F <i>hecA</i> -R	537	Doudah <i>et al.</i> 2012
<i>tlyA</i>	<i>tlyA</i> -F <i>tlyA</i> -R	230	Doudah <i>et al.</i> 2012
<i>mviN</i>	<i>mviN</i> -F <i>mviN</i> -R	294	Doudah <i>et al.</i> 2012
<i>hecB</i>	<i>hecB</i> -F <i>hecB</i> -R	528	Doudah <i>et al.</i> 2012
<i>iroE</i>	AB0730F AB0730R	415	Karadas <i>et al.</i> 2013

Ce tableau inclut tous les gènes de virulence hypothétiques retrouvés chez les espèces *Arcobacter* dans la littérature. Ces gènes ne sont pas nécessairement les gènes utilisés lors de cette étude.

2.5 Facteurs qui influencent la persistance des microorganismes dans l'environnement

Plusieurs facteurs environnementaux influencent la survie d'une espèce dans son environnement, entre autres des facteurs biotiques et abiotiques. Plusieurs études ont démontré que ces facteurs influencent énormément la survie des pathogènes humains dans le sol. Les facteurs biotiques sont les éléments de la microflore indigène de l'organisme, donc les microorganismes qui sont déjà dans son environnement. Les facteurs abiotiques représentent l'ensemble des facteurs physicochimiques d'un environnement, soit les facteurs non vivants qui ont un effet sur le vivant. Des éléments génétiques peuvent aussi être un facteur, comme la résistance aux antibiotiques, la diversité métabolique, la capacité d'être dans un état viable non cultivable et la capacité de former des biofilms.

2.5.1 Facteurs biotiques

Comme mentionné préalablement, les facteurs biotiques sont les éléments vivants qui ont un effet sur le microorganisme dans son environnement, donc l'interaction du vivant sur le vivant. Il existe deux types d'interactions, soit intraspécifique qui implique une interaction entre deux organismes de la même espèce ou interspécifique qui implique une interaction entre deux organismes différents. Ce dernier inclut la prédation, la compétition pour les ressources alimentaires, la symbiose, le mutualisme ou encore le parasitisme. Ces facteurs ont été peu étudiés chez les *Arcobacter*, cependant chez *Escherichia coli* plusieurs de ces aspects ont été étudiés. *E. coli* est une bactérie à Gram négatif qui fait partie de l'embranchement des Protéobactéries et, tout comme le genre *Arcobacter*, peut causer des gastroentérites chez l'être humain. Une étude par Recorbet (Recorbet *et al.*, 1992) dans des microcosmes de sols ont démontré que la persistance d'une souche *E. coli* dans le sol est inversement reliée à la population croissante d'une amibe indigène. En effet, de façon simultanée, le nombre d'amibes augmentait et le nombre d'*E. coli* diminuait, un phénomène qui n'a pas eu lieu dans un sol avec une microflore ne contenant aucune amibe. De plus, ils ont découvert que l'inoculation d'*E. coli* dans un sol n'ayant pas de protozoaires, a eu un effet négatif sur la population finale d'*E. coli* ce qui a indiqué que la compétition inter-espèces avait aussi eu lieu. Les bactéries sont également susceptibles à la prédation des bactériophages, un phénomène étudié chez *C. jejuni*, *E. coli* et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (García *et al.*, 2010, Recorbet *et al.*, 1992, Scott *et al.*, 2007). Par contre, une souche de *Campylobacter jejuni* retrouvée chez les poulets possède une

résistance à certains bactériophages par le biais d'un réarrangement génétique (Scott *et al.*, 2007). Une étude par Rice et collègues (Rice *et al.*, 1999), sur la survie d'*Arcobacter butzleri* dans l'eau souterraine, a déterminé que sa survie était probablement due à une population faible de protozoaire (prédateur) et à une diminution de la population microbienne réduisant la compétition pour les nutriments disponibles dans l'eau (McLaughlin *et al.*, 2010).

2.5.2 Facteurs abiotiques

Les facteurs abiotiques regroupent tous les éléments chimiques ou physiques de l'environnement qui définissent un écosystème. Un des facteurs les plus importants sur la persistance d'un microorganisme est la température à laquelle il se retrouve. C'est d'ailleurs un des aspects les plus étudiés chez les *Arcobacter*. De nombreuses études ont démontré qu'*A. butzleri* est capable de survivre à des températures beaucoup plus basses que sa température minimale de croissance de 15°C. D'ailleurs, celle-ci a été capable de survivre à 10°C et même 5°C sur un milieu imitant la composition d'une carcasse de poulet (Kjeldgaard *et al.*, 2009). Avec un inoculum de 1×10^9 UFC/ ml incubé à 5°C, *A. butzleri* a survécu au-delà de 77 jours, soit 35 jours de plus que *C. jejuni* qui est la cause première de cas de gastroentérite mondiale chez l'humain. En 2008, Van Driessche (Van Driessche *et al.*, 2008) a entrepris une expérience semblable avec les espèces *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* et *A. skirrowii* dans de l'eau potable, une eau qui est fréquemment utilisée dans les abattoirs de poulets et de porcs. La persistance dans cette eau potable a été évaluée pour chaque espèce à 4, 7, 20, 52, 56 et 60°C. Ces températures ont été choisies pour simuler les températures d'entreposage (4 et 7°C), la température ambiante (20°C) ainsi que les températures brûlantes (52°C) et rigoureuses (56 et 60°C) qui sont également utilisées dans ces installations. Selon les résultats, toutes les espèces étudiées ont survécu plus de 42 jours à 4°C, soit 98 jours pour *A. butzleri*, 56 jours pour *A. cryaerophilus* et 42 jours pour *A. skirrowii*. À la température de la pièce, *A. butzleri* a persisté beaucoup plus longtemps que les deux autres espèces, qui ont persisté 91 jours pour *A. cryaerophilus* et 21 jours pour *A. skirrowii*. Cependant, à des températures plus élevées que la température de croissance optimale des *Arcobacter* une baisse de son potentiel de survie a été observée. Le temps de survie est passé de jours à des minutes, soit 30, 16 et 5 minutes à des températures de 52, 56 et 60°C, respectivement pour *A. butzleri*. Des temps plus courts ont été observés chez *A. cryaerophilus* et *A. skirrowii*. Sous des conditions de réfrigération, plusieurs souches de *C. jejuni* ont persisté également entre 64 et 120 jours (Cools *et al.*, 2003, Obiri-Danso *et al.*, 2001). Dans de l'eau de puits entreposée à 5°C, *A. butzleri* a survécu 16 jours (Rice *et al.*, 1999). De plus, lorsque des

cultures en phase exponentielle d'*A. butzleri* ont été exposées à des températures de réfrigération (4°C) et de congélation (-20°C), il y a une réduction lente sur une étendue de 21 jours à 4°C tandis qu'à -20°C, il y a eu une réduction rapide après 24 heures et a resté constante pendant 21 jours. Toutes ces études ont démontré que la température a un impact sur la survie des *Arcobacter* dans différents environnements et que des températures plus basses semblent augmenter la survie. Certaines études proposaient que ce phénomène peut-être dû à un ralentissement du métabolisme de la bactérie à des températures froides (Jones *et al.*, 2008).

Le pH de l'environnement est important pour la croissance et la survie des bactéries, car les bactéries sont influencées par la concentration d'ions H⁺ libres. Chez les bactéries, un pH entre 6,0 et 8,0 est habituellement optimal. Selon une étude par D'Sa (D'sa *et al.*, 2005), les espèces *A. butzleri* et *A. cryaerophilus* possèdent la capacité de survivre dans des pH allant de 5,5 à 8,0, comparativement à une étendue entre 6,5 et 7,5 pour *Campylobacter* (T.A. Roberts, 1996). Ce qui implique que les *Arcobacter*, sous les mêmes conditions environnementales, seraient peut-être capables de survivre en présence d'espèces *Campylobacter*. Le pH a un effet moindre sur la concentration en cellules viable chez *Arcobacter butzleri* que *Arcobacter cryaerophilus* ce qui explique peut-être le fait qu'on récupère moins souvent cette espèce dans l'environnement et dans la nourriture comme évoquée dans la littérature (D'sa *et al.*, 2005). De plus, le pH induit, chez certains microorganismes, la production de protéines de stress comme démontré chez *E. coli* (Hickey *et al.*, 1990) et *Campylobacter jejuni* (Wu *et al.*, 1994) sous des conditions alcalines qui pourraient être impliqués dans la pathogénicité de ceux-ci.

Dans la même étude de D'Sa en 2005, la tolérance des *Arcobacter* à différentes concentrations de sel (NaCl) a été évaluée afin de déterminer son effet sur la persistance dans l'environnement. Leur croissance n'a pas été influencée entre des concentrations de 3,0 et 3,5% de NaCl, de plus certaines souches ont toléré une concentration de 5%. Chez *Campylobacter*, on a observé plutôt une concentration optimale de 0,5% de NaCl jusqu'à un maximum de 1,5% (T.A. Roberts, 1996), ce qui suggère que les *Arcobacter* possèdent une capacité plus élevée que les *Campylobacter* de persister dans des écosystèmes d'hypersalinité. D'ailleurs, on retrouve des espèces comme *Arcobacter halophilus* qui tolère des concentrations en NaCl entre 0,5-20% (Donachie *et al.*, 2005). Cette espèce est d'ailleurs un halophile obligatoire, donc incapable d'être cultivée sur un milieu qui n'est pas salin.

D'autres éléments peu étudiés qui influencent la persistance dans l'environnement sont la lumière du soleil, l'oxygène, les désinfectants et l'humidité. On sait que dans l'eau de mer les

coliformes fécaux peuvent persister plusieurs jours en l'absence des rayons du soleil; cependant lorsque la lumière du soleil est présente, ils ne survivent que quelques heures. La lumière solaire est plutôt un élément mortel envers les microorganismes qu'un facteur de stress (Fujioka *et al.*, 1981). D'ailleurs, les *Campylobacter* sont reconnus comme étant faiblement tolérants aux températures et niveaux de radiation UV élevés (Obiri-Danso *et al.*, 2001).

2.5.3 Facteurs génétiques

Plusieurs bactéries utilisent comme moyen de protection contre un environnement défavorable la formation de biofilm (Flemming, 1993). La capacité de formation de biofilm permet une protection par la sécrétion d'une matrice extracellulaire qui protège la communauté bactérienne des éléments néfastes comme dans les abattoirs (Ho *et al.*, 2008) et les installations de transformation alimentaire. Des études ont même démontré que les *Arcobacter* persistent sur les outils utilisés dans ces environnements (Gude *et al.*, 2005, Houf *et al.*, 2002). Les bactéries qui utilisent ce système de défense passent d'un état planctonique à un état sessile. L'étude la plus détaillée de ce phénomène chez *Arcobacter butzleri* est de Kjeldgaard (Kjeldgaard *et al.*, 2009). L'étude a démontré que *A. butzleri* persistait dans les installations de transformation à l'aide de la formation de biofilm qui leur permettait de survivre, et dans certains cas de proliférer à des températures entre 10 et 37°C et pour différentes conditions atmosphériques. De plus, cette étude a montré que *A. butzleri* a survécu plus longtemps que *C. jejuni*, un pathogène considéré plus dangereux pour la santé publique, durant l'entreposage à 5°C. Il est aussi connu que *A. butzleri* s'attache avec facilité sur des surfaces comme l'acier inoxydable, le cuivre et le polyéthylène (Assanta *et al.*, 2002), des matériaux qu'on retrouve souvent dans les installations qui transforment les aliments et les abattoirs. Le transfert de matériels génétiques peut être favorisé lorsque des microorganismes s'assemblent en biofilm (Molin *et al.*, 2003).

Une bactérie peut aussi se transformer d'un état cultivable à un état viable non cultivable (VBNC) qui est aussi un système de survie. En d'autres mots, elle demeure viable, par contre elle ne se réplique pas ce qui explique le fait qu'elle ne produit pas de colonies sur un milieu de culture (Oliver, 2005). Cet état est souvent induit par un stress quelconque, comme un changement au niveau de la température d'incubation en dehors de l'étendu favorable à sa croissance, de la concentration en oxygène, d'une concentration osmotique élevée, soit dans l'eau salée, ou encore dans l'absence de nutriments (Oliver, 2000). Ce système de survie était suggéré chez *Campylobacter* (Cappelier *et al.*, 1998, Chaveerach *et al.*, 2003, Jones *et al.*, 1991, Obiri-Danso *et al.*, 2001, Rollins *et al.*, 1986) et *A. butzleri* (Fera *et al.*, 2008). Chez *C. jejuni*, on

a constaté que dans l'eau d'un étang, les bactéries se modifient dans un état VBNC entre 18 et 28 jours à 4°C (Jones *et al.*, 1991). Cette étude a aussi démontré qu'une fois dans cet état, une infection pouvait quand même apparaître si cette eau était ingérée par des animaux; ils ne perdent donc pas leur caractère infectieux. Plusieurs autres études sur les *Arcobacter* laissent supposer que ceux-ci subissent l'état VBNC lorsque retrouvés dans certaines conditions, comme l'absence de nutriments (Fera *et al.*, 2008). L'étude de Fera en 2008 a démontré qu'*Arcobacter butzleri* ATCC49616, une souche provenant de source humaine, se transforme dans un état VBNC en condition de famine dans des microcosmes d'eau de mer à température ambiante et à 4°C, soit après 14 et 20 jours respectivement. Par contre, selon cette même étude, *A. butzleri* est resté dans cet état plus de 270 jours après inoculation. Selon des études récentes, certaines bactéries pathogènes ont conservé leur virulence même dans un état VBNC, tel que les *Vibrio* (Baffone *et al.*, 2003), des pathogènes humains (Schmidt *et al.*, 1979). Par contre, cela reste à être déterminé chez les *Arcobacter*.

L'acquisition d'une résistance à un antibiotique est un autre système utilisé par les microorganismes de persister dans l'environnement si cet environnement contient l'antibiotique en question (Sheldon Jr, 2005). Ce phénomène est de plus en plus observé dans les cas de campylobactériose causée majoritairement par *Campylobacter jejuni* selon une étude en 2002 en Angleterre et Pays de Galles (Frost *et al.*, 2002). Les *Campylobacter* sont reconnus comme étant résistants à certaines quinolones (Karmali *et al.*, 1981), aminoglycosides (Lambert *et al.*, 1985) et bêta-lactames (Karmali *et al.*, 1981) ainsi que la tétracycline (Sagara *et al.*, 1987). Il est évident qu'un microorganisme ayant plusieurs résistances possède une meilleure chance de survie puisque celui-ci n'est pas affecté par les antibiotiques utilisés pour combattre l'infection. Chez des isolats d'*A. butzleri*, on a observé une multirésistance contenant plusieurs types d'antibiotiques (Atabay *et al.*, 2001, Houf *et al.*, 2004, Kabeya *et al.*, 2004) ce qui rend le traitement le plus efficace difficile à choisir. Les espèces *Arcobacter* possèdent une résistance à l'érythromycine et la cyprofloxacin (Houf *et al.*, 2004) qui sont des antibiotiques souvent conseillés lors d'une infection entérique chez l'humain.

Comparativement, aux gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes de virulence offrent un avantage direct dans le sens qu'ils confèrent aux microorganismes un caractère pathogénique et ainsi son habileté à causer une infection. Les gènes de virulence, comme mentionnés auparavant, confèrent certains avantages à la bactérie en ce qui a trait à son efficacité à causer

et maintenir une infection. Ces éléments sont généralement des protéines qui aident à l'adhérence de la bactérie à la cellule hôte, à la colonisation d'une partie précise du corps humain et à l'invasion par l'internalisation des pathogènes à l'intérieure de la cellule hôte. D'autres vont plutôt inhiber le système immunitaire de l'hôte afin de l'affaiblir et de faciliter l'entrée dans l'hôte. Des toxines peuvent être aussi exprimées afin d'endommager la membrane cellulaire et s'introduire plus aisément. Un microorganisme possédant un système de gènes de virulence très développé est beaucoup plus difficile à éliminer de l'environnement où il se retrouve et donc, a la possibilité de persister dans l'environnement. Chez les *Arcobacter*, on a observé beaucoup de gènes de virulence homologues aux espèces *Campylobacter* et la majorité d'entre eux possèdent un rôle dans l'adhérence, la colonisation ou l'invasion de ceux-ci dans la cellule hôte (Miller *et al.*, 2007). L'étude des gènes de virulence chez les espèces *Arcobacter* est un domaine encore peu étudié.

3 Matériels et méthodes

3.1 Souches bactériennes

Trois souches *Arcobacter*, *Arcobacter butzleri* ATCC49616, *Arcobacter cryaerophilus* NCTC11885 et *Arcobacter skirrowii* LMG 6621, ont été sélectionnées au centre de ressource biologique «American Type culture Collection» (ATCC), Manassas, Virginie, la «National Collection of Type Cultures» (NCTC), Public Health England, Salisbury, Royaume-Uni et «Laboratory for Microbiology BCCM/LMG Collection», Ghent University, Ghent, Belgique respectivement. Les souches ont été cultivées sur le milieu solide m-AAM (modified agarised *Arcobacter* medium) [24 g/l bouillon *Arcobacter* CM0965, 12 g/l Agar technical (Agar NO.3) LP0013, 1 ampoule de supplément CAT (Céfooperazone, Amphotéricine B et Teicoplanine) SR0174 et 4 % glucose] à partir d'une culture congelée dans 30 % glycérol. Les cultures ont été étalées et incubées à 30 °C pour 48 heures sous conditions microaérophiles (5 % CO₂, 10 % O₂ et 85 % N₂) dans des jarres anaérobiques. Ces conditions sont les conditions de croissance optimales pour les *Arcobacter*. Ces trois souches ont été utilisées comme contrôles positifs pour toutes les réactions en chaîne par polymérase (PCR) dans cette étude sauf mention contraire.

Tableau 3.1 Liste des amorces utilisées ainsi que les gènes ciblés dans cette étude pour les PCR multiplex et simplex.

Nom de la PCR	Gène cible	Amorce	Séquence de l'amorce (5' à 3')	Température d'hybridation (°C)	Longueur de l'amplicon (pb)
mPCR(A)	<i>ciaB</i>	ciaB-F	TGGGCAGATGTGGATA GAGCTTGGA	56	284
		ciaB-R	TAGTGCTGGTCGTCCC ACATAAAG		
	<i>cj1349</i>	cj1349-F	CCAGAAATCACTGGCT TTTGAG		659
		cj1349-R	GGGCATAAGTTAGATG AGGTTCC		
mPCR(B)	<i>tlyA</i>	tlyA-F	CAAAGTCGAAACAAAG CGACTG	56	230
		tlyA-R	TCCACCAGTGCTACTTC CTATA		
	<i>mviN</i>	mviN-F	TGCACTTGTTGCAAAAC GGTG		294
		mviN-R	TGCTGATGGAGCTTTTA CGCAAGC		
	<i>hecB</i>	hecB-F	CTAAACTCTACAAATCG TGC		528
		hecB-R	CTTTTGAGTGTTGACCT C		
mPCR(C)	<i>pldA</i>	pldA-F	TTGACGAGACAATAAGT GCAGC	56	293
		pldA-R	CGTCTTTATCTTTGCTT TCAGGGA		
	<i>irgA</i>	irgA-F	TGCAGAGGATACTTGG AGCGTAACT		437
		irgA-R	GTATAACCCCATTTGATG AGGAGCA		
	<i>hecA</i>	hecA-F	GTGGAAGTACAACGAT AGCAGGCTC		537
		hecA-R	GTCTGTTTTAGTTGCTC TGCACTC		
PCR universelle	ARNr 16S (Bactérie)	pA-F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	55	1500
		pH-R	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA		
mPCR spécifique à l'espèce	ARNr 16S (<i>A. butzleri</i>)	butz-F	CCT GGA CTT GAC ATA GTA AGA ATG A	61	401
		arco-R	CGT ATT CAC CGT AGC ATA GC		

ARNr 16S (<i>A. skirrowii</i>)	skir-F	GGC GAT TTA CTG GAA CAC A	641
	arco-R	CGT ATT CAC CGT AGC ATA GC	
ARNr 23S (<i>A. cryaerophilus</i>)	cry1-F	TGC TGG AGC GGA TAG AAG TA	257
	cry2-R	AAC AAC CTA CGT CCT TCG AC	

Les amorces des mPCR(A), mPCR(B) et mPCR(C) proviennent de Doudah *et al.* 2012. Les amorces de la PCR universelle proviennent de Bruce *et al.* 1992 et de Houf *et al.* 2000 pour la mPCR qui permet d'identifier les trois espèces *Arcobacter*.

3.2 Isolement, purification et extraction d'ADN des isolats *Arcobacter* de matières fécales

Les échantillons de matières fécales ont tous été prélevés dans la région d'Ottawa, Ontario et Sherbrooke, Québec (Tableau 3.2). Chaque échantillon fécal liquide ou solide a été prélevé sur la ferme de façon stérile avec une spatule en acier inoxydable et une quantité suffisante à l'analyse, soit au moins 100 ml ou 100 g, était transférée dans une bouteille en polytéraphthalate d'éthylène (PET) stérile de 1,0 litre. Les échantillons ont été transportés au laboratoire sur glace et gardés sous réfrigération jusqu'à leur analyse. Chaque échantillon a été analysé pas plus de 24 heures après son arrivée au laboratoire de façon stérile dans une hotte à flux laminaire de niveau de bioprotection de classe II. Pour chaque échantillon, 1,0 g de matière fécale a été diluée dans 9 ml d'eau peptonée [15 g/l peptone CM0009] et diluée de façon sérielle jusqu'à 10^{-6} . Un volume de 0,1 ml de chaque dilution a été ensuite étendu de façon stérile avec un épandeur en métal sur un milieu sélectif pour les *Arcobacter*, ASIA (*Arcobacter* selective isolation agar) [24 g/l de bouillon *Arcobacter* CM0965, 12 g/l Agar technical (Agar No.3) LP0013 de Oxoid et les suppléments suivants, cycloheximide (100 mg/l), amphotéricine B (10 mg/l), triméthoprime (64 mg/l), 5-fluorouracil (100 mg/l), céfopérazone 16 mg/l) et novobiocine (32 mg/l) de Sigma-Aldrich, St-Louis, MO (Houf *et al.*, 2001)]. Les dilutions ont été étalées sur gélose ASIA en duplicata. Les géloses ont été laissées à découvert un court moment afin de laisser la solution pénétrer dans l'agar avant l'incubation. Les géloses ont été incubées à l'envers à 30 °C sous conditions microaérophiles dans des jarres anaérobies (condition optimale de croissance). La croissance bactérienne a été observée et le nombre de colonies a été dénombré chaque trois jours jusqu'à un maximum de six jours. Tous les trois jours, quelques colonies de grosseurs et morphologies différentes ont été purifiées sur un milieu m-AAM. Les géloses m-AAM (purification) ont été par la suite incubées de 3 à 6 jours sous les mêmes conditions optimales de croissance.

Une fois que les colonies sur milieu m-AAM ont été visibles, une colonie a été mélangée à 100 µl d'eau stérile et le tout a été bouilli à 100 °C pendant 10 minutes à l'aide d'un thermobloc. L'ADN libéré a été utilisé pour l'identification de l'espèce *Arcobacter* par réaction en chaîne de polymérisation (PCR). Les échantillons d'ADN ont été congelés à -20 °C jusqu'à utilisation.

Pour chaque échantillon fécal, un poids sec a été déterminé en chauffant à 105 °C dans une étuve un échantillon de 2-5 g pendant 24 h afin de déterminer le nombre de UFC/g de poids sec. Un échantillon d'environ 40 g ou 40 ml a été également congelé dans une concentration finale de 30 % glycérol afin de congeler un échantillon à -80 °C pour des analyses futures. Finalement, un échantillon de 0,25 g a été congelé à -80 °C pour une extraction d'ADN totale également pour des analyses futures.

3.3 Caractérisation par PCR des isolats *Arcobacter* provenant de matières fécales

Chaque isolat a été caractérisé au niveau de l'espèce et par des amorces universelles amplifiant une région de l'ARNr 16S ou 23S (Tableau 3.1). Les amorces universelles ont permis de déterminer si les échantillons d'ADN contenaient des inhibiteurs de la polymérase PCR en amplifiant une région de 1,5 kb de l'ARNr 16S à l'aide des amorces pA-F et pH-R (Bruce *et al.*, 1992) (Tableau 3.1). Pour l'identification au niveau de l'espèce, une PCR multiplex (mPCR) a été utilisée qui permet de différencier entre trois espèces du genre *Arcobacter* en amplifiant l'ARNr 16S ou 23S. Cette mPCR a été développée par (Houf *et al.*, 2000) et permet d'identifier trois espèces, soit *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* et *A. skirrowii* dans une même réaction PCR. La méthode de mPCR est conçue sur la base d'une distinction des longueurs spécifiques des amplicons par une électrophorèse sur gel d'agarose. Les réactions PCR ont été préparées dans un volume final de 25 µl composés de 5 µl de tampon 5X, 0,6 U de taq polymérase (Fermentas), 0,4 µM des amorces pA-F, pH-R butz-F, skir-F, cry1-F et cry2-R ou arco-R (Tableau 3.1) ainsi que 10 µl d'ADN (environ 1 ng). Le programme de la mPCR incluait 32 cycles contenant une dénaturation (94 °C, 45 s), une hybridation des amorces (61 °C, 45 s) et une élongation (72 °C, 30 s) et un cycle d'extension finale (72 °C, 7 min) à l'aide d'un MasterCycler d'Eppendorf. Le programme de la PCR universelle incluait 30 cycles contenant une dénaturation (94 °C, 40 s), une hybridation des amorces (55 °C, 1 min) et une élongation (72 °C, 2 min); et un cycle d'extension finale (72°, 10 min). Un volume de 10 µl du produit d'amplification a été migré par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % dans du tampon 1X TAE (Tris-Acétate-EDTA) sous tension de 120 V pour 60 minutes. Une échelle de poids moléculaire de 100 pb (GeneRuler 100bp DNA ladder #SM0241, Fermentas) a été utilisée pour la mPCR et de 1 kb pour la PCR universelle (GeneRuler 1 kb DNA ladder #SM0311, Fermentas). Les gels ont été visualisés sous lumière UV à l'aide du bromure d'éthidium et un transilluminateur UV Alphamager (ProteinSimple).

Tableau 3.2 Type et origine des échantillons de matières fécales échantillonnés durant la période estivale 2010

Type et source de l'échantillon	n	Origine
Porc		
Fèces	1	RNS
Réservoir secondaire	3	RNS
Réservoir primaire	2	RNS
	36	Lennoxville
Vache laitière		
Fèces	1	RNS
Réservoir primaire	2	RNS
	33	Lennoxville
Poulet		
Fèces	3	RNS
Poulet et Porc		
Fèces	2	RNS
Humain		
Fosse septique	13	RNS
Poney		
Fèces	2	RNS
Chèvre		
Fèces	3	RNS
Canard		
Fèces	1	RNS
Chien		
Fèces	4	Ottawa Humane Society
Chat		
Fèces	4	Ottawa Humane Society
Chevreuil		
Fèces	1	RNS
Coyote		
Fèces	1	RNS
Castor		
Fèces	2	RNS
TOTAL	114	

RNS: Bassin de la rivière de la Nation Sud

Lennoxville : Ferme expérimentale située à Lennoxville, Québec

Le nombre d'échantillons (n) est listé ainsi que l'origine géographique de l'échantillon.

3.4 Optimisation et identification des gènes de virulences hypothétiques chez *Arcobacter* provenant de matières fécales

Plusieurs expériences ont été effectuées afin de déterminer les meilleurs paramètres permettant une détection efficace et rapide de gènes de virulence hypothétiques chez *Arcobacter* par PCR. Les amorces proviennent d'une étude par Doudah (Doudah *et al.*, 2012). Les amorces ont été conçues à partir de la séquence du génome de la souche *Arcobacter butzleri* ATCC49616. La spécificité des amorces aux souches *Arcobacter* a été vérifiée par le séquençage d'au moins un amplicon par gène par espèces *Arcobacter*. Les amorces ont été validées sur 30 souches références *Arcobacter* et 319 souches environnementales *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* et *A. skirrowii*.

3.4.1 Programme de PCR

L'article de Doudah et collaborateurs (2012) présente deux programmes de PCR afin de détecter les gènes de virulence chez les *Arcobacter*. Les deux programmes PCR ont été essayés avec nos ADN afin de déterminer si les produits PCR étaient adéquats et distincts l'un de l'autre par électrophorèse sur gel d'agarose. De plus, chaque programme a été testé avec tous les gènes pour déterminer si un programme PCR peut être éliminé afin de diminuer la charge de travail. Le mélange PCR est identique à la section 3.3. Les deux programmes PCR et les gènes détectés sont les suivants: 32 cycles de dénaturation (94 °C, 45 s), hybridation des amorces à 56 °C pour 45 s pour les paires d'amorces des gènes *ciaB*, *cj1349*, *hecA*, *mviN* et *irgA*; et 55 °C pour 45 s pour les paires d'amorces des gènes *hecB*, *cadF*, *pldA* et *tlyA*, et une extension (72 °C, 45 s) et finalement une élongation finale (72 °C, 3 min). Les réactions PCR ont été effectuées à l'aide du MasterCycler d'Eppendorf et une échelle de poids moléculaire de 100 pb a été utilisée. Les produits PCR ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % avec du bromure d'éthidium et un transilluminateur UV Alphamager.

3.4.2 PCR multiplex et combinaison de gènes de virulences

Différentes combinaisons de gènes de virulences ont été analysées afin de créer des protocoles de mPCR. Pour ce faire, les longueurs des fragments les plus adéquats ont été choisies selon leur séparation par électrophorèse sur gel d'agarose. La réaction PCR a été effectuée dans un volume final de 25 µl contenant 0.2 µM de chaque amorce présentée dans le

tableau 3.1, 5 µl de tampon 5X et 0,6 U de taq polymérase (Fermentas). Les paramètres de la PCR étaient 32 cycles de dénaturation (94 °C, 45 s); hybridation des amorces (56 °C, 45 s); une extension (72 °C, 45 s), suivie d'une élongation finale (72 °C, 3 min). Les produits de PCR ont été visualisés de la même façon que présentée dans la section précédente.

3.4.3 Optimisation des réactions PCR

Des suppléments ajoutés à la réaction PCR ont été testés avec l'ajout de diméthylsulfoxyde (DMSO) avec une proportion de 5 % et l'ajout d'albumine sérique bovine (BSA) à une concentration finale de 0,5 µg/µl. Ensuite, différentes concentrations d'amorces, soit des concentrations finales de 0,4 µM et 0,2 µM, ont été analysées. Chaque paramètre a été testé avec l'ADN des espèces *A. butzleri* et *A. cibarius* comme contrôle positif, ainsi que l'ADN des espèces *Campylobacter jejuni* ATCC33291 et *Helicobacter pylori* NCTC11637 comme contrôle négatif. Chacun des paramètres a été testé avec tous les gènes de virulences hypothétiques. La réaction PCR a été effectuée dans un volume final de 25 µl contenant 0,2 ou 0,4 µM de chaque amorce, 5 µl de tampon 5X, 0,6 U de taq polymérase (Fermentas) et 0.5 ug/µl de BSA ou 5 % DMSO. Les paramètres de la PCR étaient 32 cycles de dénaturation (94 °C, 45 s); hybridation des amorces (56 °C, 45 s); une extension (72 °C, 45 s), suivie d'une élongation finale (72 °C, 3 min).

3.4.4 Spécificité des amorces aux espèces *Arcobacter*

Un total de 15 espèces *Arcobacter* (Tableau 3.3) ainsi que 38 espèces provenant d'autres genres bactériens (Tableau 3.4) ont été analysées avec les programmes PCR choisis et les protocoles de mPCR optimisés afin de déterminer si les amorces étaient spécifiques au genre *Arcobacter*. Si le résultat PCR avait démontré des produits non spécifiques pour certaines espèces, les amorces correspondantes auraient été testées séparément sur cette espèce afin de déterminer si le produit d'amplification non spécifique provenait de la combinaison des amorces.

Tableau 3.3 Liste des espèces *Arcobacter* pour la validation de la spécificité des amorces pour l'identification des gènes de virulence chez les espèces *Arcobacter*.

Nom de l'espèce	Collection de la culture et No
<i>Arcobacter butzleri</i>	ATCC49616
<i>Arcobacter bivalviorum</i>	LMG26124
<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	ATCC33309
<i>Arcobacter molluscorum</i>	LMG25693
<i>Arcobacter ellisii</i>	LMG26155
<i>Arcobacter trophiarum</i>	LMG25534
<i>Arcobacter marinus</i>	LMG25770
<i>Arcobacter mytilii</i>	LMG24559
<i>Arcobacter venerupis</i>	LMG26156
<i>Arcobacter defluvii</i>	LMG25694
<i>Arcobacter cibarius</i>	LMG21996
<i>Arcobacter halophilus</i>	ATCC BAA-1022
<i>Arcobacter thereius</i>	LMG24486
<i>Arcobacter skirrowii</i>	LMG6621
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	NCTC 11885

Ce tableau énumère les espèces *Arcobacter* dont l'ADN génomique a été analysée avec toutes les paires d'amorces pour la détection de huit gènes de virulence hypothétiques chez *Arcobacter*, soit *ciaB*, *cj1349*, *tlyA*, *hecA*, *hecB*, *pIdA*, *mviN* et *irgA*. Quelques espèces *Arcobacter* publiées dans la littérature depuis 2012 ne figurent pas dans cette liste, car l'ADN génomique n'était pas disponible dans le laboratoire.

Tableau 3.4 Liste des espèces pour la validation de la spécificité des amorces pour l'identification des gènes de virulence chez les *Arcobacter*.

Nom de l'espèce	Collection de la culture et No.
-----------------	---------------------------------

<i>Aeromonas bv. veronii</i>	ATCC35625
<i>Aeromonas encheleia</i>	ATCC51929
<i>Aeromonas veronii</i>	ATCC9071
<i>Aeromonas trota</i>	ATCC49658
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	ATCC51208
<i>Aeromonas jandaei</i>	ATCC49568
<i>Aeromonas salmonicida</i>	CDC0434-84
<i>Aeromonas bestiarum</i>	ATCC51108
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	ATCC11163
<i>Aeromonas popoffii</i>	LMG17541
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC13444
<i>Aeromonas sobria</i>	CDC9538-76
<i>Aeromonas schubertii</i>	ATCC43700
<i>Aeromonas caviae</i>	ATCC15468
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC23211
<i>Aeromonas media</i>	CDC0435-84
<i>Pseudomonas shigelloides</i>	Isolat environnemental*
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Isolat environnemental*
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Isolat environnemental*
<i>Escherichia coli</i>	ATCC35218 (2)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	ATCC29932
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	ATCC12325
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	ATCC13314
<i>Arcobacter skirrowii</i>	ATCC51132
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	ATCC49349
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	ATCC29423
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	ATCC35217
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC43136
<i>Campylobacter helveticus</i>	ATCC51210
<i>Campylobacter coli</i>	ATCCBAA-371
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC33291
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC33292
<i>Campylobacter lari</i>	ATCC43675

*Isolat qui a été isolé d'un échantillon environnemental

Le tableau de la page précédente énumère les espèces provenant d'autres genres bactériens qu'*Arcobacter* dont l'ADN génomique a été analysé avec toutes les paires d'amorces pour la détection de huit gènes de virulence hypothétiques chez *Arcobacter*, soit *ciaB*, *cj1349*, *tlyA*, *hecA*, *hecB*, *pldA*, *mviN* et *irgA*.

3.4.5 Identification des gènes de virulences chez des isolats *Arcobacter* provenant de matières fécales

La présence des huit gènes de virulence a été analysée chez des *Arcobacter* préalablement isolés durant un projet de recherche de l'été 2010 comme étudiante stagiaire. Les trois protocoles de mPCR ont été effectués dans un volume final de 25 µl dans des plaques de 96 puits. Chaque puits contenait l'ADN d'un isolat fécal. La réaction PCR contenait 0.2 µM de chaque amorce, 5 µl de tampon 5X, 0,6 U de taq polymérase (Fermentas) et 0.5 ug/µl de BSA. Les paramètres de la PCR étaient 32 cycles de dénaturation (94 °C, 45 s); hybridation des amorces (56 °C, 45 s); une extension (72 °C, 45 s) et suivie d'une élongation finale (72 °C, 3 min). La présence des gènes de virulence a été identifiée en migrant les produits PCR par électrophorèse sur gel agarose 1,5 % à 120 V pour 60 minutes avec une échelle de poids moléculaire de 100 pb (GeneRuler 100bp DNA ladder #SM0241, Fermentas). Les produits PCR ont été visualisés sous lumière UV d'un Alphamager.

3.5 Optimisation d'une méthode du nombre le plus probable (NPP) pour l'isolement et le dénombrement d'*Arcobacter butzleri* dans le sol

Différentes expériences ont été effectuées afin de déterminer les meilleurs paramètres permettant un isolement et un dénombrement des *Arcobacter* dans le sol basé sur la méthode NPP de Chinivasagam (Chinivasagam *et al.*, 2007). Cette méthode est basée sur une estimation statistique par l'enregistrement de la croissance positive ou négative de dilutions d'un même échantillon. Donc, aucun comptage direct n'est effectué pour cette méthode.

3.5.1 Milieux utilisés pour les dilutions sérielles

Deux milieux, le PBW (Phosphate buffered water) [42,5 mg l⁻¹ KH₂PO₄ et 420 mg l⁻¹ MgCl₂.6H₂O et ajusté à pH 7,0] et l'eau peptoné à 0,1 % ont été analysés pour la récupération d'*Arcobacter butzleri* sur géloses ASIA. Une culture d'*A. butzleri* congelé a été étalée sur milieu m-AAM et incubée sous conditions optimales de croissance pour 48 heures. Une colonie a été transférée dans du bouillon AM [30 g l⁻¹ bouillon *Arcobacter* ajusté à pH 7,2 ± 0,2 à 25 °C et le supplément sélectif CAT (Cétopérazone, Amphotéricine B et Teicoplanine)] et incubée pendant 16 heures (D.O_{600 nm} de 0,4) à 30 °C sous conditions microaérophiles et ensuite diluée de façon sérielle dans les deux milieux respectifs. Un volume de 100 µl de dilutions sérielles (10⁻¹ à 10⁻¹⁰)

a été étalé sur gélose ASIA et incubé sous les conditions de croissance optimales. La concentration en *Arcobacter* (UFC/ml) a ensuite été évaluée après 3 jours de croissance.

3.5.2 Détermination de la concentration d'*Arcobacter* dans le sol par la méthode du nombre le plus probable (NPP)

Des microcosmes de sol ont été utilisés afin d'avoir un contrôle sur les conditions expérimentales. Des microcosmes sont des écosystèmes simplifiés et artificiels souvent utilisés pour simuler les effets de microorganismes sur les écosystèmes comme l'eau et le sol. Les microcosmes de sol étaient composés d'une bouteille en Pyrex stérilisée de 1,0 L (1397-1L, Corning) avec une ouverture très large (69 mm) afin de permettre un échantillonnage plus efficace. Une quantité de 250 g de sol agricole tamisé à 0.5 mm de la ferme expérimentale d'Ottawa entreposé à 4 °C dans la noirceur a été ajoutée. Le pH du sol a été initialement déterminé à 6,8 en mélangeant un ratio kg/l (sol/eau) 1:1 en triplicata. Le contenu en eau du sol a été évalué à 15 %. Les microcosmes de sol ont été préparés 24 heures avant les expériences de persistance afin de tempérer et laisser le sol se tasser. Chaque microcosme contenait un tube de polypropylène stérile contenant 5,0 ml d'eau stérile et filtrée afin de conserver l'humidité à l'intérieur du microcosme la plus constante possible. Les microcosmes de sol ont été ouverts de façon stérile tous les 2 à 3 jours afin de permettre un échange gazeux durant les expériences de persistance.

Le dénombrement des *Arcobacter* dans les microcosmes de sol durant les expériences de persistance a été évalué par une méthode du nombre le plus probable (Figure 3.1). Dix grammes de sol ont été échantillonnés et mélangés à 90,0 ml de milieu PBW. Cette dilution a été mélangée manuellement pendant 1 minute suivie par 30 s de sonication et ensuite mélangée à nouveau pendant 1 min. Des dilutions sérielles dans 9,0 ml de PBW jusqu'à 10^{-8} ont ensuite été effectuées en transférant 1,0 ml avec un embout de 1,0 ml coupé afin de transférer les particules de sols. Le transfert des particules de sols était important, car les *Arcobacter* avaient peut-être adhéré à celles-ci. Entre chaque dilution, le contenu a été vortexé une minute à vitesse maximale, et 1,0 ml ont été transférés dans 9,0 ml de bouillon JM (Johnson-Murano) [peptone spéciale (Oxoid L72) (10 g l⁻¹), extrait de levure (5 g l⁻¹), extrait de bœuf (5 g l⁻¹), NaCl (4 g l⁻¹), phosphate de potassium (monobasique) (1,5 g l⁻¹), phosphate de sodium (dibasique) (3,5 g l⁻¹), pyruvate de sodium (0,5 g l⁻¹), thioglycolate de sodium (0,5 g l⁻¹), charbon (0,5 g l⁻¹), sels biliaires No 3 (Oxoid L56) (2 g l⁻¹), agar bactériologique (Oxoid L11) (2 g l⁻¹) et les suppléments suivants, 5-fluorouracil (200 mg l⁻¹) et céfopérazone (32 mg l⁻¹)] en triplicata. Les 24 tubes d'enrichissement ont été légèrement

vortexés pour homogénéiser le contenu et un tube contrôle de bouillon JM (contrôle négatif) a été incubé pour une durée de 48 heures dans une jarre anaérobie à 30 °C sans agitation sous conditions microaérophiles. Différents temps d'incubation des tubes d'enrichissement ont été préalablement vérifiés pour déterminer la croissance maximale des *Arcobacter*, soit 24, 48 et 72 heures d'incubation. Un échantillon de 1-2 g a été pesé et chauffé à 105 °C dans une étuve pour 24 heures afin de déterminer le pourcentage d'humidité dans le sol.

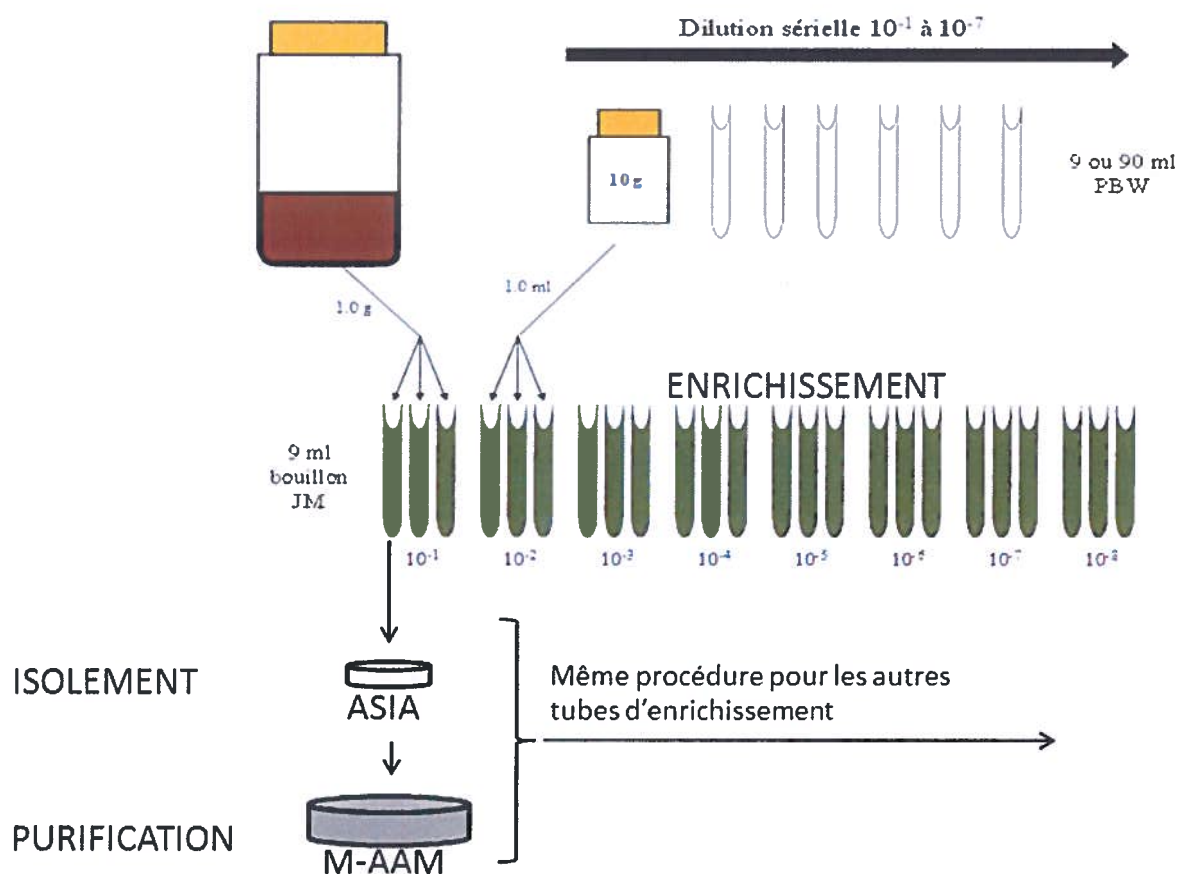


Figure 3.1 Schématisation de la méthode NPP pour l'isolement et le dénombrement des *Arcobacter* à partir d'un microcosme de sol.

Ce schéma démontre la méthode du nombre le plus probable développée (NPP) pour l'isolement et le dénombrement des *Arcobacter* dans un sol qui a été utilisée pour toutes les expériences de persistance des *Arcobacter* dans le sol. ASIA: *Arcobacter* selective isolation agar, m-AAM: modified agarised *Arcobacter* media, JM: Johnson-Murano, PBW: phosphate buffered water.

Après l'incubation de 48 heures, 10 µl de chaque tube d'enrichissement ont été étalés sur un milieu ASIA afin de sélectionner les *Arcobacter* spp. Les géloses ont été incubées 3 jours sous conditions optimales de croissance. Deux colonies avec une morphologie semblable par géloses ont été ensuite étalées sur un milieu m-AAM. Les géloses ont été incubées sous conditions optimales de croissance. L'extraction de l'ADN a été effectuée de la même façon que mentionnée dans la section 3.1. L'ADN a été analysé avec les protocoles de PCR mentionnées dans la section 3.2 afin de déterminer l'espèce *Arcobacter* isolée. La concentration des *Arcobacter* dans les expériences de persistance a été évaluée à l'aide du programme « MPN calculator » built 23 de Mike Curiale (Fig. 3.2).

File Edit Options Help

1. Select MPN type

jenni

2. Enter MPN data

gramss per test	Tests	Positive tests
1	3	
0.1	3	
0.01	3	
0.001	3	
0.0001	3	
0.00001	3	
0.000001	3	

Keypad

BS	RTB	TAB
7	8	9
4	5	6
1	2	3
.	0	

3. Calculate MPN

MPN/grams

95% CI LL:

95% CI UL:

Calculate MPN

Figure 3.2 Interface du programme « MPN calculator » built 23 de Mike Curiale.

Le programme « MPN calculator » a été utilisé pour évaluer la concentration en NPP/g des *Arcobacter* dans les microcosmes de sols. La quantité en gramme de sols dans chaque dilution doit être insérée ainsi que le nombre de réplicats par dilutions et le nombre de réplicats positifs pour la présence d'*Arcobacter* validé par l'identification de l'espèce par PCR. Une valeur de ≤ 0.3 NPP/g est apposée lorsque tous les tubes sont négatifs.

3.6 Étude de persistance des *Arcobacter* dans un sol agricole

Des études de persistance dans le sol des *Arcobacter* ont été effectuées afin de déterminer sa survie dans cette matrice très complexe et ainsi évaluer son potentiel de propagation dans l'environnement.

3.6.1 Persistance des *Arcobacter* indigène du fumier dans un sol agricole

Deux fumiers d'origine animale provenant de sources différentes, soit d'un élevage porcin ou de vaches laitières, ont été choisis selon leurs concentrations en *Arcobacter*. Tous les échantillons ont été reçus moins de 24 heures après l'échantillonnage et gardés sur glace pendant le transport au laboratoire. En tout, 8 échantillons de fumier bovin et 5 échantillons de

fumier porcin ont été analysés par la méthode mentionnée dans la 3.2 afin d'évaluer leur concentration en *Arcobacter*. Le contenu en eau a été déterminé par le séchage de 2-5 g de matières fécales humides à une température de 105 °C pour 24 heures dans une étuve.

Les fumiers ont été mélangés avec 250 g de sol agricole (CEF_2009) en triplicata avec un ratio de 10 % l/kg de sol. Des microcosmes de sols contenant également 250 g de sol agricole ne contenant pas de fumier ont été utilisés comme contrôle négatif. Ces contrôles ont plutôt reçu une quantité égale de milieu PBW.

Au temps zéro, la concentration d'*Arcobacter* a été analysée avec la méthode NPP pour chacun des microcosmes de sols ainsi que l'analyse du poids sec. Par la suite, l'isolement *Arcobacter butzleri* a été évalué de façon hebdomadaire utilisant la méthode NPP optimisée (figure 3.1) de la section 3.5.2. Le poids sec a été analysé lors de chaque échantillonnage par le séchage de 2-5 g de sol humide à une température de 105 °C pour 24 heures dans une étuve. La présence des *Arcobacter* a été déterminée par les PCR mentionnées dans la section 3.2. Le nombre de tubes d'enrichissement positifs pour la croissance des *Arcobacter* sur ASIA et identifié par PCR comme étant des *Arcobacter* a ensuite servi à déterminer la concentration en *Arcobacter* (NPP/g de sol) avec le programme «MPN calculator» (Figure 3.2).

3.6.2 Persistance d'*Arcobacter butzleri* dans un sol agricole à différentes température

La souche *Arcobacter butzleri* ATCC49616 a été inoculée dans 20 ml de bouillon AM pour 16 heures avec une agitation de 200 rpm jusqu'à l'obtention d'une D.O._{600nm} d'environ 0,4. La concentration en *A. butzleri* a été évaluée sur gélose ASIA afin de calculer le nombre d'UFC/ml initiale. Pour ce faire, des volumes de 100 µl de dilutions sérielles de 10⁻¹ à 10⁻⁸ ont été inoculés dans 900 µl de milieu PBW et incubés sous les conditions optimales de croissance pour les *Arcobacter*. La culture bactérienne a été centrifugée à 8000 rpm pendant 5 minutes et dispersée dans 20 ml de milieu PBW, centrifugée à nouveau afin d'éliminer les résidus du milieu de culture, et finalement dispersée dans 20 ml de PBW. Cette culture a été utilisée afin d'inoculer six microcosmes de sol contenant 250 g de sol agricole CEF_2009 pour obtenir une concentration finale de 1 x 10⁶ CFU/g. Trois microcosmes ont été entreposés à température ambiante (20 °C) et les trois autres à 4 °C. Des microcosmes de sols ne contenant pas de culture *Arcobacter butzleri*, mais plutôt un volume égal de milieu PBW, ont aussi été préparés pour représenter les contrôles négatifs.

Au temps zéro, la concentration d'*Arcobacter* a été analysée avec la méthode NPP pour chacun des microcosmes de sols ainsi que l'analyse du poids sec. Par la suite, la concentration d'*Arcobacter butzleri* a été évaluée de façon hebdomadaire utilisant la méthode NPP optimisée (Fig. 3.1) de la section 3.5.2. La présence d'*A. butzleri* a été déterminée par les méthodes PCR mentionnées dans la section 3.2. Le nombre de tubes d'enrichissement positifs pour la croissance d'*Arcobacter butzleri* identifié par PCR a ensuite servi à déterminer la concentration en *Arcobacter butzleri* (NPP/g) de sol avec le programme «MPN calculator»

4 Résultats

4.1 Optimisation et détection des gènes de virulences chez *Arcobacter*

Une série de combinaisons d'amorces amplifiant les gènes de virulence hypothétiques chez *Arcobacter* ont été analysées avec l'espèce *A. butzleri* afin de déterminer quelles combinaisons pouvaient produire des résultats clairs et précis par électrophorèse sur gel d'agarose (Tableau 4.1 et Fig. 4.1). Trois mPCR ont été générées ayant chacune deux ou trois gènes (en gras au Tableau 4.1). Un gène a été délaissé, *cadF*, puisqu'aucune combinaison n'a abouti à un amplicon suffisamment visible sur gel d'agarose. Aucun amplicon sur gel d'agarose n'a été observé pour les autres espèces représentant des contrôles négatifs (Tableau 3.4). Les mPCR ont été confirmées comme étant efficaces pour la détection des gènes de virulence hypothétiques chez les *Arcobacter* puisque les gènes détectés chez les souches références *Arcobacter* (Tableau 3.3) par les mPCR sont les mêmes observés dans l'étude de Doudah (2012).

Tableau 4.1 Combinaison de gènes de virulence testés durant l'optimisation des mPCR pour la détection de gènes de virulences chez *Arcobacter*.

Combinaison de gènes	Résultats sur gel d'agarose (+ ou —)	Explication du résultat
<i>cadF</i> <i>cj1349</i>	-	Amplicons trop faibles
<i>tlyA</i> <i>mviN</i>	+	Amplicons clairs et visibles
<i>pldA</i> <i>hecB</i>	-	Amplicon <i>pldA</i> clair, mais amplicon <i>hecA</i> très faible
<i>pldA</i> <i>hecA</i>	+	Amplicons sont clairs et visibles
<i>pldA</i> <i>irgA</i>	+	Amplicons sont clairs et visibles
<i>tlyA</i> <i>mviN</i> <i>hecB</i>	+	Amplicons clairs et visibles
<i>cadF</i> <i>hecA</i>	-	Amplicons faibles
<i>ciaB</i> <i>hecB</i>	-	Amplicons faibles
<i>pldA</i> <i>irgA</i> <i>cj1349</i>	-	Amplicon <i>cj1349</i> très faible comparé aux deux autres qui sont très clairs
<i>pldA</i> <i>irgA</i> <i>hecA</i>	+	Amplicons sont clairs et visibles
<i>ciaB</i> <i>cj1349</i>	+	Amplicons clairs et visibles

Les résultats en **gras** sont les PCR multiplex qui ont été utilisées pour le restant de l'étude. Cette étape a été effectuée avec l'espèce *Arcobacter butzleri* ATCC49616 seulement, car celle-ci contient tous les gènes de virulence hypothétiques.

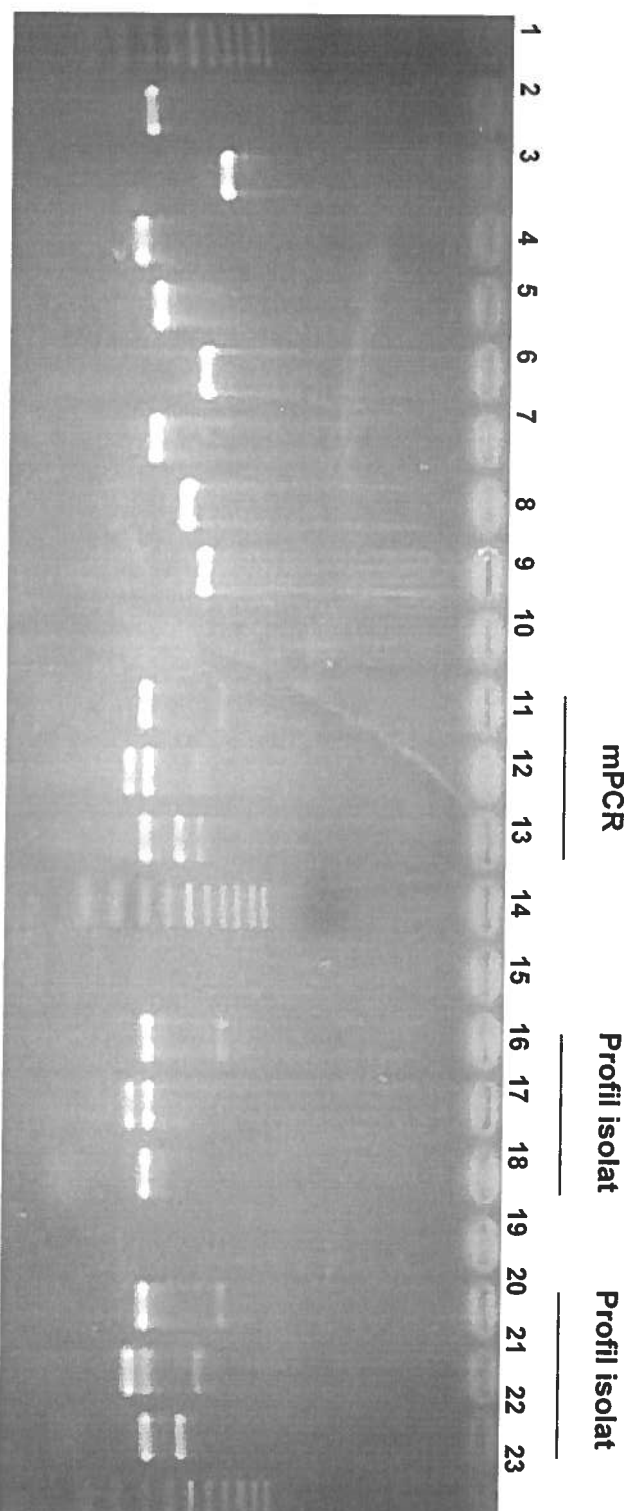


Figure 4.1 Amplicons des gènes de virulence chez *Arcobacter butzleri*.

Les amplicons ont migré par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 %. Dans les puits 2-9, *ciab*, *ci1349*, *tlvA*, *mvn*, *hecB*, *pldA*, *irgA* et *hecA*. Les PCR multiplex optimisées sont représentées dans les puits 11-13 *ciab* et *ci134*; *tlvA*, *mvn* et *hecB*; *pldA*, *irgA* et *hecA*. Les puits 16-18 et 20-22 représentent des profils de gènes de virulence chez des isolats provenant de boues de réservoir septique. Les puits 1, 14 et 23 contiennent une échelle de poids moléculaire de 100 pb (GeneRuler 100 pb, SM0241) et les puits 10, 15 et 19 n'ont pas de contenu.

4.2 Présence de gène de virulence chez *Arcobacter*

Des échantillons de matières fécales ont tous été prélevés dans la région d'Ottawa, Ontario et de Sherbrooke, Québec (Tableau 3.2). La majorité provient de fumier, mais aussi sous forme d'excréments frais d'animaux de ferme. Les animaux de ferme ont été ciblés, car le fumier d'origine animale et les excréments de ceux-ci contiennent beaucoup d'*Arcobacter* spp., donc un potentiel danger pour la santé humaine via son utilisation dans l'agriculture.

Ces échantillons fécaux ont été étalés sur des géloses spécifiques pour l'isolement d'un maximum d'isolats *Arcobacter*. Un total de 147 isolats *Arcobacter* préalablement identifiés par une PCR spécifique au genre, développée lors d'un autre projet de maîtrise dans le laboratoire du Dr Lanthier, a été retenu pour cette étude. Ils ont également été identifiés au niveau de l'espèce par amplification PCR et dans certains cas par séquençage du gène de l'ARN 16S durant des projets de recherches antérieurs. Parmi ceux-ci, 100 isolats appartiennent à *A. butzleri*, 42 à *A. cryaerophilus*, 3 à *A. skirrowii*, 1 à *A. defluvii* et 1 à *A. cibarius*. Par la suite, ces isolats ont été analysés par mPCR pour la présence de huit gènes de virulences hypothétiques afin de déterminer la pathogénicité potentielle de ceux-ci et possiblement déterminer les isolats les plus pathogènes. Les résultats sont résumés dans les Figures 4.2, 4.3 et 4.4. Tous les amplicons générés par les mPCR ont produit la taille des fragments attendue. Aucun isolat analysé ne présentait tous les gènes de virulence à l'étude. Cependant, les huit gènes ont été observés de façon individuelle chez les isolats *A. butzleri*. Chez les isolats *A. cryaerophilus*, les gènes *irgA* et *hecA* étaient absents, et les gènes *cj1349*, *tlyA*, *hecB*, *pldA*, *irgA* et *hecA* étaient absents chez tous les isolats *A. skirrowii*. Les gènes *ciaB* et *mviN* ont été observé individuellement chez toutes les espèces bactériennes (Fig. 4.3) à l'étude, mais pas chez toutes les sources (Fig. 4.4), soit la chèvre pour le gène *mviN*. Une proportion de 8 % (11/147) des isolats ne possédait aucun gène de virulence hypothétique étudié dans cette étude, soit 7 isolats *A. butzleri* et 4 isolats *A. cryaerophilus*. Tous les gènes ont été observés individuellement chez les sources d'origine humaine et de vaches laitières (Fig. 4.4). Le gène *ciaB* a été le plus souvent détecté avec une présence dans 91 % (133/147) des isolats totaux (Fig. 4.2). Ce gène était également le plus fréquent lorsqu'on regarde sa présence en fonction de l'espèce (Fig. 4.3) ou de l'origine (Fig. 4.4) de l'isolat.

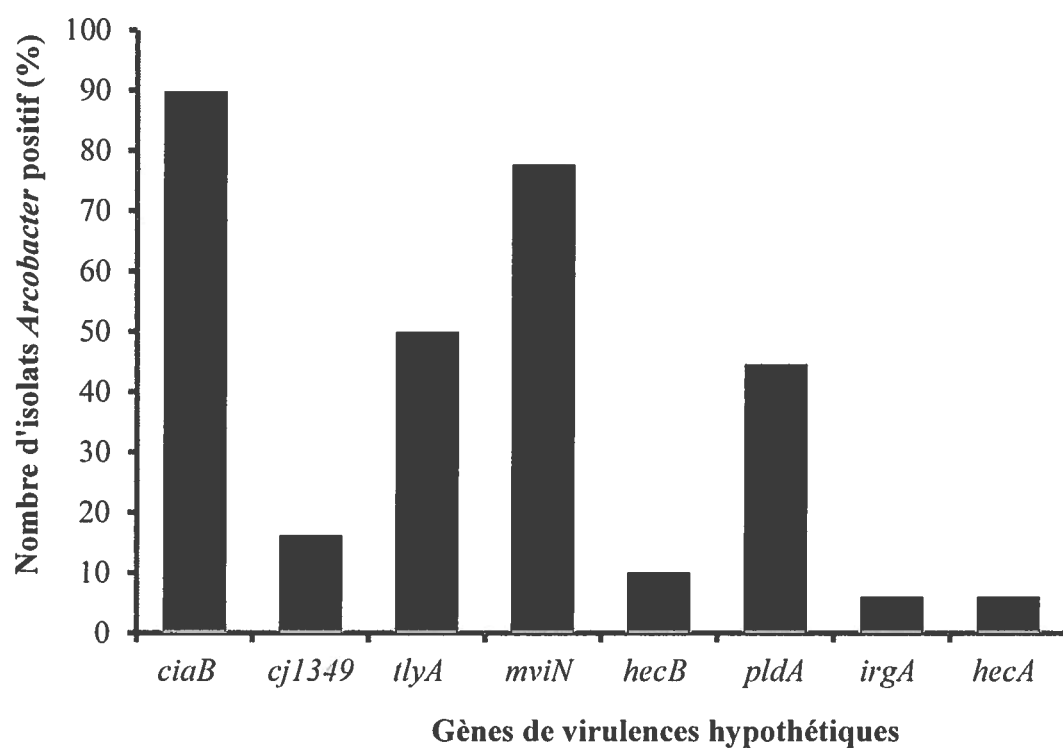


Figure 4.2 Distribution des huit gènes de virulence hypothétiques chez les *Arcobacter* isolés.

Le nombre d'isolats positifs pour chaque gène est représenté en pourcentage (%) du nombre total d'isolats *Arcobacter* (n=147).

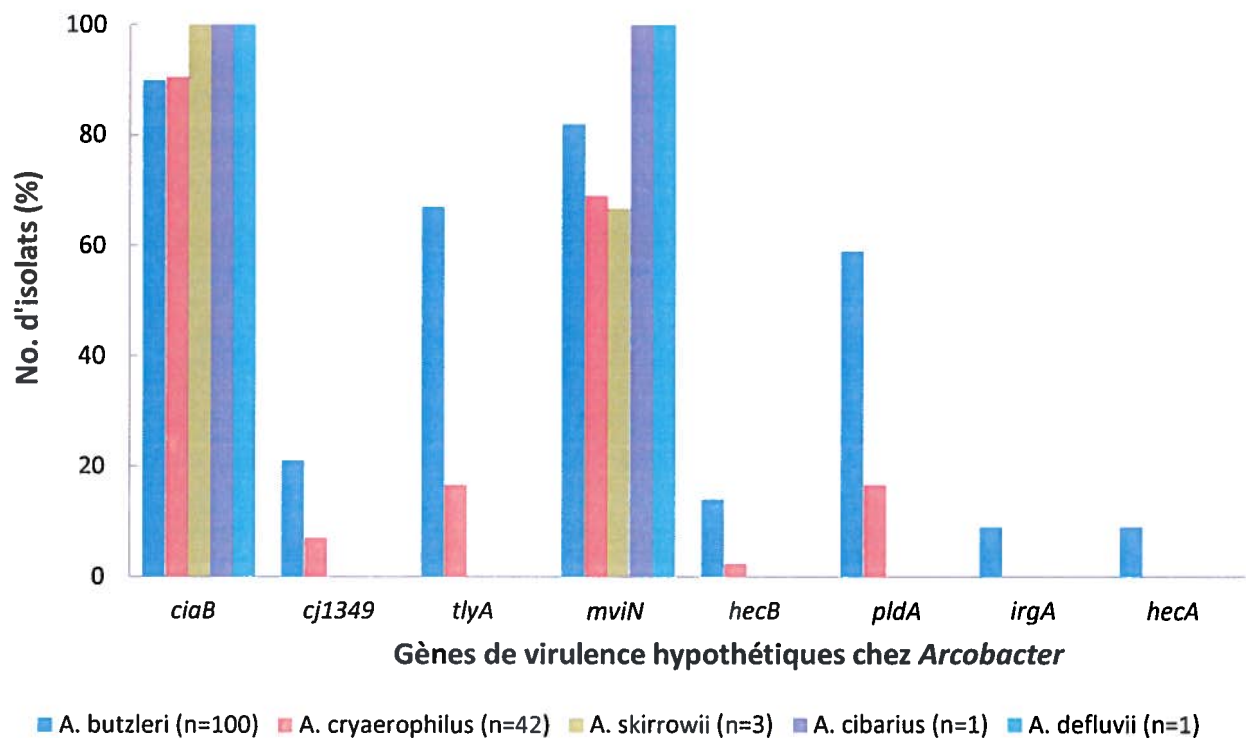


Figure 4.3 Présence de gènes de virulence hypothétiques chez des isolats d'espèces *Arcobacter* variées isolés de sources fécales.

Le nombre d'isolats positifs pour chaque gène est représenté en pourcentage (%) du nombre d'isolats analysés pour chaque espèce *Arcobacter* isolée de source fécale. Chaque espèce ainsi que le nombre (n) d'isolats pour chacune est décrit dans la légende située sous la figure.

Dans notre étude, *mviN* a été le deuxième gène le plus souvent observé avec une présence dans 78.2 % (115/147) des isolats *Arcobacter*. Il est, comme *ciaB*, un des deux gènes qui a été observé chez toutes les espèces étudiées (Fig. 4.3). D'ailleurs 80 % (80/100) des *A. butzleri* et 52 % (22/42) des *A. cryaerophilus* contenaient ces deux gènes ensemble. De plus, il est le deuxième plus important au niveau de l'espèce et de la source fécale également (Fig. 4.4 et 4.5). Les gènes *tlyA* et *pldA* ont été retrouvés en proportion de 50 (74/147) et 45 % (66/147) des isolats totaux, respectivement. La majorité provenait de l'espèce *A. butzleri* pour ces deux gènes. Dans 90 % des isolats *Arcobacter* provenant de matières fécales, les gènes *irgA* et *hecA* étaient absents. D'ailleurs, seulement 6 % (9/147) des isolats présentaient l'un ou l'autre. Ce sont les deux gènes qui ont été les moins observés dans cette étude (Fig.4.2).

Le gène *cj1349* n'a été retrouvé que dans 16 % (24/147) des isolats *Arcobacter*. Ils ont été retrouvés chez l'espèce *A. butzleri* (21/24) et *A. cryaerophilus* (3/24). Ce gène n'a pas été observé chez les autres espèces à l'étude qui possédaient des effectifs plus faibles. Finalement, le gène *hecB* a été présent dans 10 % (15/147) des isolats à l'étude, soit le troisième gène le moins présent. Près de la totalité des isolats positifs pour ce gène provenait de l'espèce *A. butzleri* (14/15) et une souche *A. cryaerophilus* isolée du porc (1/15). Ce gène, tout comme le gène *cj1349*, n'a pas été observé chez les autres espèces à l'étude.

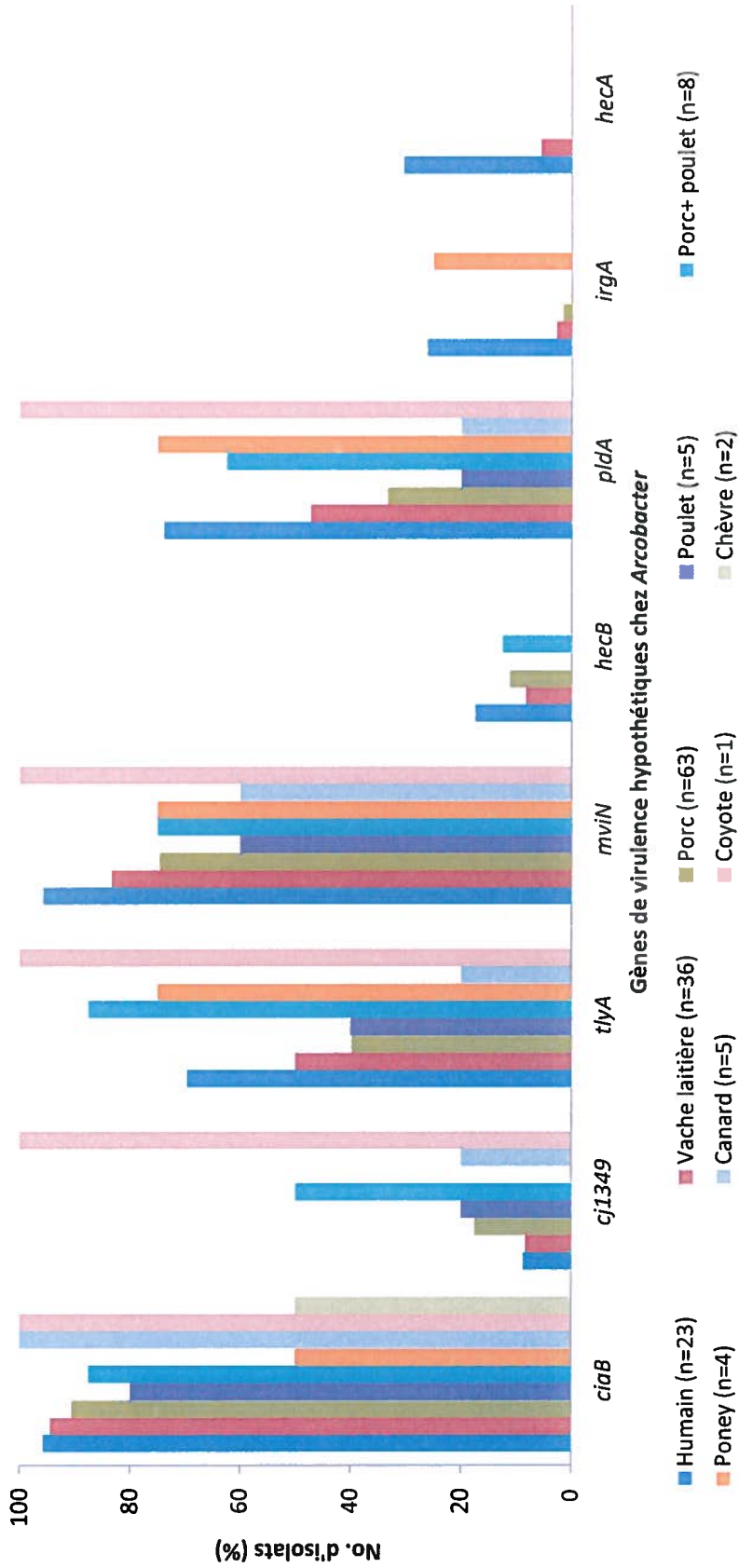


Figure 4.4 Présence des gènes de virulence hypothétiques chez des isolats *Arcobacter* provenant de sources fécales variées.

Le nombre d'isolats positifs pour chaque gène est représenté en pourcentage (%) du nombre d'isolats analysés pour chaque origine de la source fécale. Chaque source ainsi que le nombre (n) d'isolats pour chacune est décrit dans la légende situé dessous la figure.

4.3 Évaluation de la persistance dans un sol agricole des espèces *Arcobacter*

4.3.1 Étude 1 : Persistance dans un sol agricole des *Arcobacter* spp. en fonction de la source de fumier

La concentration d'*Arcobacter* (UFC/g ou UFC/ml) dans 12 fumiers a été préalablement déterminée (Tableau 4.2) par la méthode détaillée à la section 3.2. Les concentrations d'*Arcobacter* dans les fumiers qui en contenaient étaient de l'ordre de 10^2 à 10^4 UFC/g de poids humide. Les fumiers F0349 et F0350 ont été choisis pour les expériences de persistance dans le sol, car pour chaque source, porc et vache laitière, la concentration en *Arcobacter* (UFC/g de poids sec) était la plus élevée et la consistance était la même, soit un lisier (Tableau 4.2). La concentration en *Arcobacter* dans le sol a été évaluée sur une durée de 14 semaines par la méthode NPP présentée dans la section 3.5.2.

Les *Arcobacter* provenant de fumier de vache laitière ont persisté plus de 91 jours dans un sol agricole à la température ambiante. La concentration en *Arcobacter* a diminué graduellement sous le seuil de détection, soit ≤ 0.3 MPN/g. Les *Arcobacter* provenant du fumier de porc ont persisté beaucoup moins longtemps, soit 49 jours dans un sol agricole à la température ambiante (Fig. 4.7). Un plateau a été observé entre les jours 14 à 28, soit une période de 14 jours où la concentration en *Arcobacter* est restée stable. Une diminution de près de 60 fois jusqu'à extinction entre les jours 49 et 63 a été observée au niveau de la concentration en *Arcobacter*. *A. butzleri* a persisté au-delà de 49 jours; par contre au jour 42, *A. cryaerophilus* n'était plus présent dans le sol contenant des *Arcobacter* du fumier de porc, car il n'était plus présent par PCR. Par contre, les deux espèces ont été observées jusqu'à 91 jours dans le sol contenant les *Arcobacter* provenant de fumier de vache laitière. Aucun *Arcobacter* n'a été décelé dans les microcosmes contrôles négatifs durant l'étendue de l'étude. L'humidité du sol est restée constante entre 23 et 29 % durant toute l'étude pour les deux fumiers à l'étude.

De plus, les gènes de virulence hypothétiques ont été analysés sur les isolats du jour 0 après inoculation des fumiers afin de déterminer s'il y a un potentiel de virulence au début de l'expérience. Six des huit gènes ont été observés chez les deux fumiers. Les gènes *irgA* et *hecA* n'étaient pas présent.

4.3.2 Étude 2 : Persistance dans un sol agricole d'*Arcobacter butzleri* en fonction de la température

Une culture d'*Arcobacter butzleri* ATCC49616 a été inoculée dans des microcosmes de sol. La concentration en *Arcobacter* dans le sol a été évaluée sur une durée de 15 semaines par la méthode NPP présentée dans la section 3.5.2. Ceux-ci ont été mis à la température à 20 °C et à 4 °C pour déterminer la persistance de la souche dans le sol. Ces températures ont été choisies afin d'illustrer des températures de la saison estivale et les saisons plus froides. Les résultats montrent un déclin de la concentration en *A. butzleri* sur une période de 105 jours jusqu'à extinction. *A. butzleri* a persisté à température ambiante plus de 42 jours et plus de 105 jours à une température de 4 °C. Aucune espèce *Arcobacter* n'a été décelée dans les microcosmes contrôles négatifs durant l'étendue de l'étude. Aucune espèce autre qu'*A. butzleri* n'a été récupéré des microcosmes inoculés. L'humidité du sol est restée constante entre 27 et 31 % durant toute l'étude pour les deux températures à l'étude.

Tableau 4.2 Évaluation de la concentration en *Arcobacter* de fumier porcin et de vache laitière

No échantillon fécal	Endroit	Source de l'échantillon	Type d'échantillon	UFC/ml ou UFC/g de poids sec	Contenu en eau (%)
F0346	Sherbrooke	Vaches laitières	Fumier solide	3,41x10 ⁴	91
F0247	Sherbrooke	Vaches laitières	Fumier solide	2.82x10 ⁴	92
F0348	Sherbrooke	Porcs	Fumier solide	Sous limite de détection	95
F0349	Sherbrooke	Vaches laitières	Fumier liquide	2.67x10 ⁶	98
F0350	Sherbrooke	Porcs	Fumier liquide	8.73x10 ⁶	99
F0351	London	Porcs	Fumier solide	9,27x10 ³	94
F0352	London	Porcs	Fumier solide	4,45x10 ⁴	92
F0353	London	Porcs	Fumier liquide	2,86x10 ⁴	99
F0354	London	Vaches laitières	Fumier solide	Sous limite de détection	86
F0356	London	Vaches laitières	Litière	5,27x10 ⁴	99
F0357	London	Vaches laitières	Litière	7,39x10 ⁶	85
F0358	London	Porcs	Fumier solide	2,48x10 ³	86

Ce tableau représente le numéro fécal assigné à l'échantillon, l'endroit échantillonné, la source fécale ainsi que le type d'échantillon reçu. La concentration en *Arcobacter* est représentée en UFC/ml ou UFC/g dépendant de la consistance de l'échantillon et prend en considération le poids sec de l'échantillon. Cette évaluation a été effectuée afin de déterminer les échantillons nécessaires pour l'expérience de persistance dans le sol des *Arcobacter* retrouvés dans le fumier. La limite de détection de cette méthode est de $\leq 100-10^8$ UFC/g de poids humide.

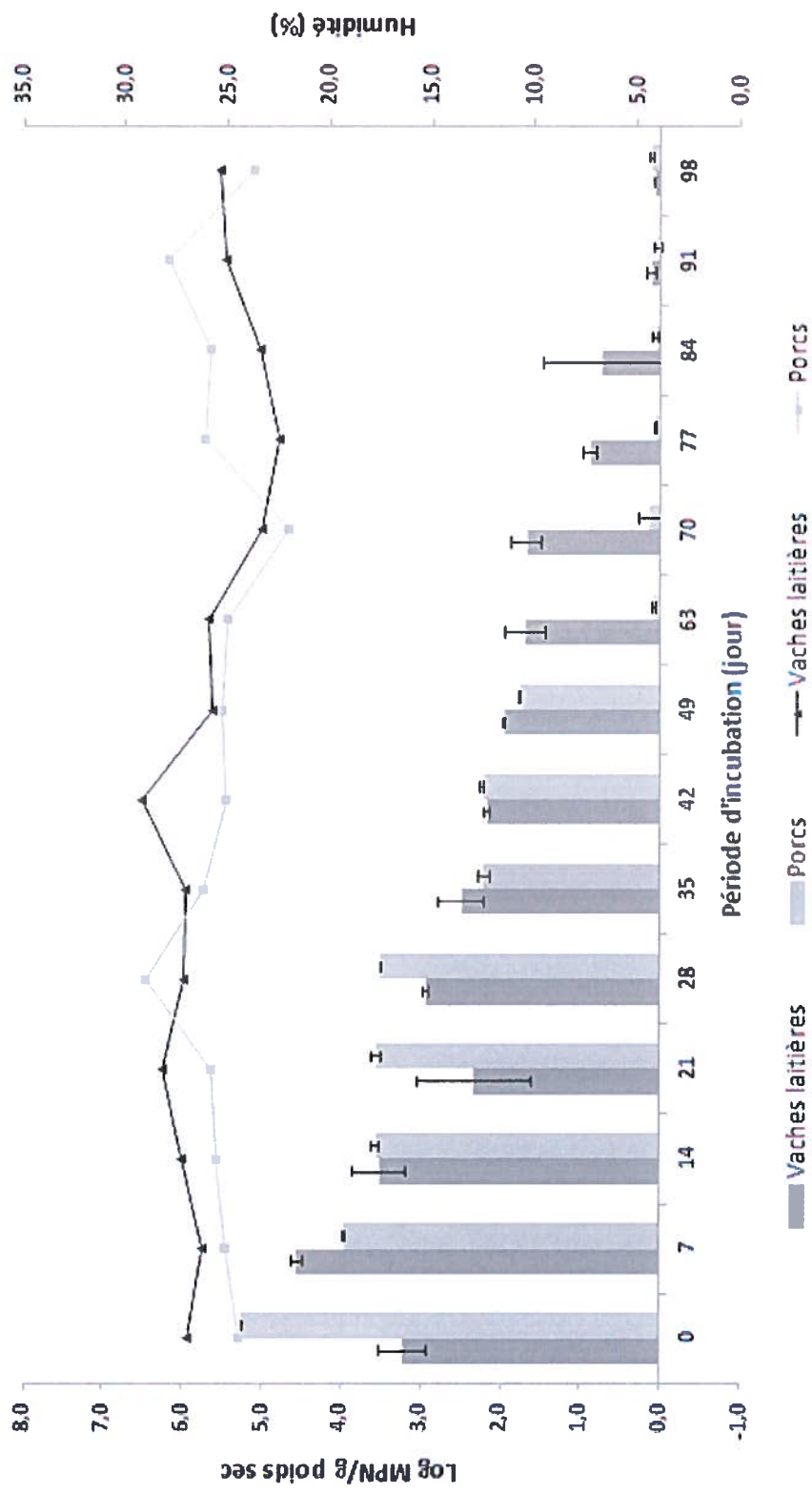


Figure 4.5 Persistance dans un sol agricole des *Arcobacter* provenant de fumier d'origine animale.

Les résultats sont présentés en moyenne de triplicata pour la concentration en *Arcobacter* (colonnes) ainsi que le pourcentage d'humidité (points). La concentration en *Arcobacter* est présentée en log et a été déterminée par la méthode NPP optimisée. Les deux fumiers à l'étude étaient porcins et de vache laitière.

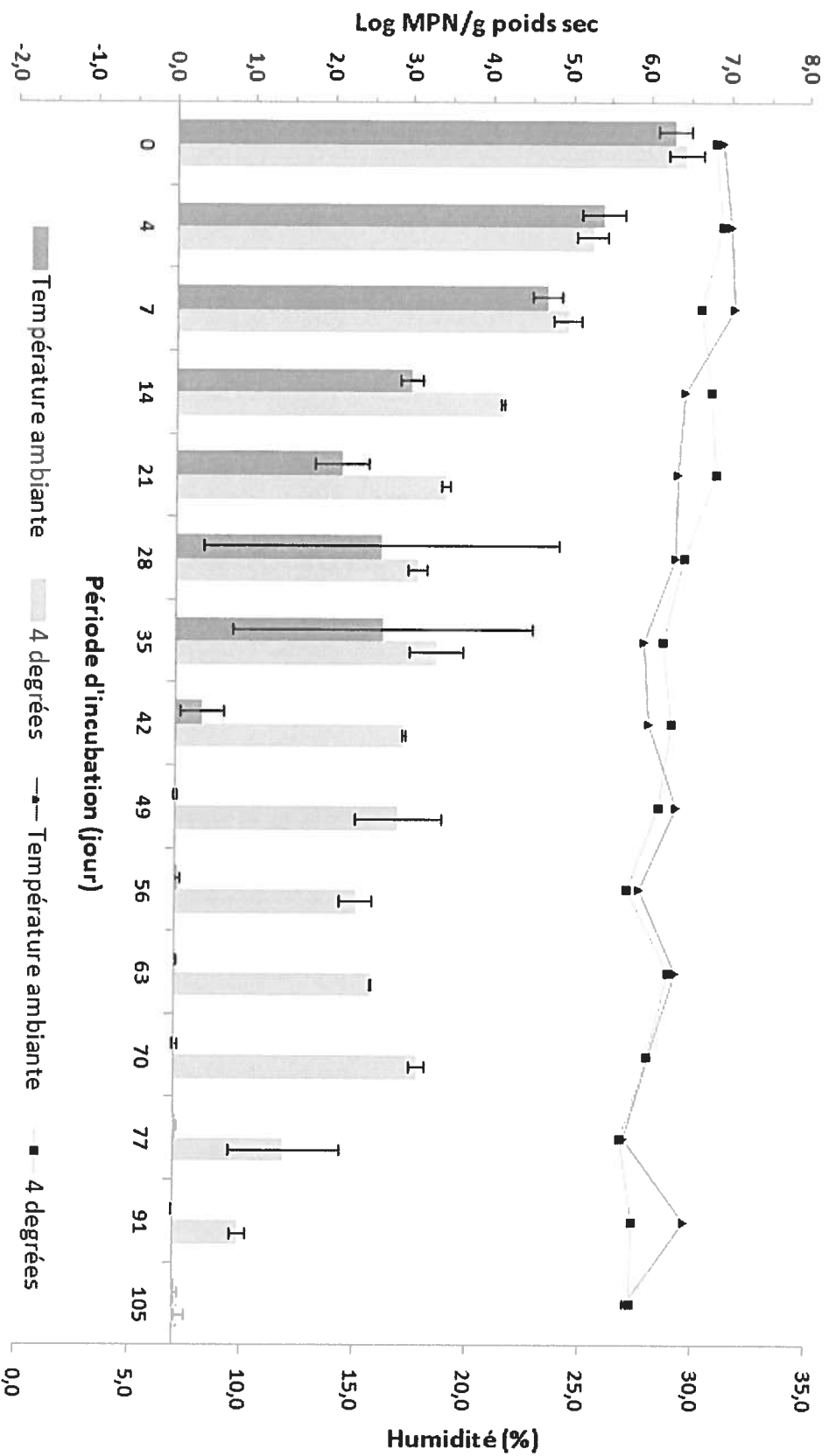


Figure 4.6 Persistance dans un sol agricole de l'espèce *Arcobacter butzleri* à différentes températures

Les résultats sont présentés en moyenne de triplicate pour la concentration en *Arcobacter butzleri* (colonnes) ainsi que le pourcentage d'humidité (points). La concentration en *Arcobacter butzleri* est présentée en logarithme et a été déterminée par la méthode NPP optimisée. Les deux températures à l'étude étaient la température ambiante et 4 °C.

5 Discussion

Le but de cette étude était de décrire la distribution de gènes associés potentiellement à la virulence des *Arcobacter* provenant de matières fécales d'animaux de ferme et de boues de fosses septiques humaines. Pour ce faire, des mPCR ont été développées et validées afin de détecter huit gènes de virulence hypothétiques. Des analyses de persistance dans un sol agricole de la souche référence *A. butzleri*, une souche avec un potentiel de virulence par la présence de neuf gènes de virulence hypothétique, ainsi que des *Arcobacter* indigènes présents dans un fumier de porc et un fumier de vache laitière ont été effectuées afin de mieux comprendre leur survie dans l'environnement. Il y a eu très peu d'études sur le sujet de la persistance des *Arcobacter* dans le sol, malgré leur présence dans le fumier (Wesley *et al.*, 2000a) que l'on épand sur les terres agricoles en très grandes quantités. Les *Arcobacter* sont aussi présents dans les eaux souterraines qui sont en contact direct avec le sol (Rice *et al.*, 1999). C'est pourquoi le sujet est important et doit être plus approfondi.

5.1 Les *Arcobacter* provenant de matières fécales ont un potentiel de virulence

Le mécanisme de pathogénicité des *Arcobacter* est encore méconnu aujourd'hui. Ce pathogène n'est donc pas encore considéré comme un danger pour la santé humaine. Cependant, plusieurs études indiquent que ceux-ci sont sous-estimés en ce qui a trait à leur impact sur la santé publique. Quelques études ont démontré la présence de plusieurs facteurs de virulence hypothétiques chez des *Arcobacter* provenant de différentes sources (Doudiah *et al.*, 2012, Karadas *et al.*, 2013, Levican *et al.*, 2013, Tabatabaei *et al.*, 2014) et même leur potentiel d'invasion et d'adhésion sur des cellules humaines (Karadas *et al.*, 2013, Levican *et al.*, 2013). Cependant, la détection par PCR de plusieurs gènes chez de nombreux isolats *Arcobacter* peut-être laborieuse et dispendieuse. L'utilisation de PCR multiplex devient alors un outil favorable puisque plusieurs gènes peuvent être détectés dans une même réaction PCR, ce qui épargne du temps et est moins dispendieux. Trois mPCR ont été développées, contenant chacune deux ou trois paires d'amorces, qui détectent en tout huit gènes de virulence hypothétiques chez *Arcobacter* (Tableau 3.1).

Au total 147 isolats *Arcobacter* provenant de matières fécales variées d'animaux de ferme et de boues de fosses septiques humaines ont été isolés de cette étude et analysés pour la

présence de huit gènes de virulence hypothétiques chez *Arcobacter*. Le gène *ciaB* (C*ampylobacter* invasion antigen B) est associé à l'internalisation de la bactérie dans la cellule hôte (Konkel et al., 1999) chez *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter*, un genre très apparenté au genre *Arcobacter* et l'espèce responsable de la majorité des cas de gastroentérites bactériennes mondiales (Blaser et al., 1983, Sarkar et al., 2014). Dans notre étude, ce gène a été le plus prévalent avec une présence dans 91 % (133/147) des isolats suivie par le gène *mviN* avec une présence dans 78 % (115/147) des isolats. Dans une étude sur des isolats provenant du contenu intestinal et de la vésicule biliaire de bovins, le gène *ciaB* a été détecté dans 30 % des isolats *Campylobacter* (n=210) et était le deuxième moins important dans une série de dix gènes de virulence et production de cytotoxines (Acik et al., 2013). Ces résultats sont contraires à ce que nous avons observé chez les isolats *Arcobacter* à Agriculture et Agroalimentaire Canada. Par contre, certains des isolats de l'étude de Acik (2013) provenaient de la vésicule biliaire, ce qui pourrait laisser entendre que l'origine de l'échantillon aurait potentiellement un impact sur les gènes de virulences présents. Cependant, le gène *ciaB* est très fréquent dans des isolats *C. jejuni* provenant d'échantillons cliniques d'enfants du Brésil (Quetz et al., 2012). Dans les études de Doudah (Doudah et al., 2012), Tabatabaei (Tabatabaei et al., 2014) et Karadas (Karadas et al., 2013), les gènes *ciaB* et *mviN* ont également été majoritaires dans une série d'espèces *Arcobacter*. L'étude de Levican (Levican et al., 2013) a démontré aussi que le gène *ciaB* était dominant dans une série d'espèces *Arcobacter*; le gène *mviN* n'a pas été étudié.

Les gènes *tlyA*, *pldA* et *cj1349* ont été observé dans 50 % (74/147), 45 % (66/147) et 16 % (24/147) des isolats *Arcobacter* dans notre étude. La plus grosse proportion a été retrouvée chez les isolats d'*A. butzleri* suivis d'*A. cryaerophilus*. Ces trois gènes n'étaient pas présents chez l'espèce *A. skirrowii* qui est moins représentée en nombre d'isolats. Dans les études de Karadas, Doudah et Tabatabaei, ces trois gènes ont été observés dans 100 % des isolats *Arcobacter butzleri* étudiés, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Chez les isolats *A. butzleri*, les gènes *tlyA*, *pldA* et *cj1349* ont été présents dans 67 % (67/100), 59 % (59/100) et 21 % (21/100) des isolats, respectivement. Ces résultats ne sont pas en accord avec les résultats des autres études. Chez *Campylobacter* le gène *pldA* a été observé dans 39 % des isolats provenant de vaches (Acik et al., 2013). Le gène *pldA* a potentiellement un rôle dans l'invasion des cellules hôte et contribuerait grandement à la pathogénicité de ce microorganisme. La différence entre ces études est la matrice étudiée. Dans notre cas, les isolats provenaient majoritairement d'échantillons fécaux d'animaux de ferme et d'échantillon humain de réservoir septique. Tandis que Karadas (2013) et Tabatabaei (2014) ont analysé majoritairement des échantillons qui ont été en contact avec des équipements d'usine de transformation, comme des viandes animales et des carcasses.

Doudah (Doudah *et al.*, 2012) a plutôt analysé des échantillons fécaux d'origine humaine ayant une forte présence en gène de virulence hypothétiques. Ce résultat n'est pas surprenant dans l'étude de Doudah (2012) puisque la séquence d'*Arcobacter butzleri* ATCC49616 a été utilisée afin de développer des amorces pour la détection des gènes de virulence hypothétiques et cette souche provient d'un échantillon clinique d'origine humaine. De plus, les gènes *tlyA* et *pldA* ont été reconnus comme ayant un rôle dans la lyse des érythrocytes chez *Campylobacter coli* (Grant *et al.*, 1997) ce qui pourrait expliquer leur présence accrue dans les échantillons de viandes qui possèdent beaucoup d'érythrocytes, tandis que les échantillons de matière fécale n'en possèdent pas la plupart du temps. Dans notre étude, plusieurs échantillons provenaient de réservoirs de fumier étant parfois en constante agitation, ce qui n'encourage pas l'adhérence d'*Arcobacter* aux particules de fumier. D'ailleurs, aucun gène relié à l'adhérence ou la liaison aux cellules hôtes n'ont été prévalent dans notre étude, soit les gènes *cj1349*, *irgA* et *hecA*.

Les gènes *hecB*, *hecA* et *irgA* ont été observés par PCR dans 10 % (15/147), 6 % (9/147) et 6 % (9/147) des isolats *Arcobacter*, respectivement. Ces trois gènes ont été les moins prédominants dans la présente étude, ainsi que dans les études de Karadas et Doudah. Ces gènes ont principalement été détectés chez l'espèce *A. butzleri* d'origine humaine (Fig. 4.3 et Fig. 4.4). Cependant, aucun isolat ne possède les trois gènes simultanément. Cette exclusivité à l'espèce *A. butzleri* a aussi été observée dans l'étude de Doudah chez les mêmes gènes. Ces trois gènes ont été retrouvés seulement dans quatre ou moins des neuf origines de la source fécale (Fig. 4.4). L'étude de Doudah a démontré la présence des gènes *ciaB*, *cj1349*, *pldA*, *mviN* et *tlyA* chez tous les isolats *A. butzleri* ce qui n'a pas été observé dans notre étude. Ceci peut être dû à un nombre d'isolats plus faible impliqué dans notre étude.

En conclusion, les gènes *ciaB* et *mviN* semblent être très prévalents chez les espèces *Arcobacter*, étant les deux gènes les plus souvent présents dans toutes les études de la littérature, incluant notre étude. Ces deux caractéristiques sont reconnues chez *Arcobacter* comme étant des facteurs qui influencent leur potentiel d'initier une infection comme a démontré Karadas (2013), où les souches possédant ces gènes envahissaient deux lignées cellulaires humaines. L'espèce *A. butzleri* semble être la souche ayant la présence de plus de gènes de virulence entre les trois espèces les plus souvent associées aux infections humaines, autant dans notre étude que dans la littérature. Cependant, il faut prendre en compte le nombre d'isolats faible *A. Skirrowii*. Par contre, la spécificité des amorces à *A. butzleri* peut être en cause, car celles-ci ont été développées à partir du génome de la souche *A. butzleri* ATCC49616. Certains isolats *A. butzleri* d'origine humaine (2/147) possèdent sept des huit gènes de virulence hypothétiques ce qui n'a

pas été observé chez les autres espèces ni chez les autres origines de source fécale. Malgré le nombre plus faible d'isolats d'origine humaine (n=23) comparativement au nombre d'isolats provenant de vaches laitières (n=36) ou de porcs (n=63), le ratio d'isolats positifs (%) pour chacun des gènes de virulence a été toujours plus élevé chez les isolats d'origine humaine à l'exception du gène *cj1349* (Fig. 4.4). Ceci n'est pas surprenant puisque la souche référence *A. butzleri* ATCC49616^T, qui possède les huit gènes de virulence, provient d'un échantillon fécal d'origine humaine (Miller *et al.*, 2007). Il semble y avoir une divergence entre nos résultats pour les gènes *tlyA*, *pldA* et *cj1349* et ceux documentés dans la littérature. Cependant, cela peut être dû à des différences géographiques ou des différences au niveau de l'animal et de l'espèce. L'étude a établi que certaines souches *Arcobacter* ne possèdent aucuns gènes de virulence, puisqu'aucun gène de virulence n'a été observé chez 11 souches. Notre étude a démontré leur présence chez des *Arcobacter* provenant d'une multitude de sources fécales de la région d'Ottawa, ON et de Sherbrooke, QC.

5.2 Les *Arcobacter* indigènes du fumier persistent dans le sol

Il est connu que les *Arcobacter* sont présents dans les fèces d'animaux de ferme, comme les vaches laitières, le bœuf de boucherie et les porcs (Wesley *et al.*, 2000a, Wesley *et al.*, 2000b). Ces matières fécales animales sont fréquemment entreposées dans des réservoirs pour l'éventuelle production de fumier d'origine animale. Ce fumier est ensuite épandu sur les terres agricoles afin de fertiliser les sols pour la croissance de produits conçus pour la consommation. Il est important de réduire la quantité de pathogènes présents dans les fumiers d'origines animales avant l'application sur les terres agricoles afin de minimiser les chances d'infection reliée à la consommation de produits agricoles. Cependant, des procédures ne sont pas toujours prises pour ce faire et le fumier contenant parfois plusieurs pathogènes humains comme *Campylobacter jejuni* (Bui *et al.*, 2011), *Escherichia coli* O157 :H7 (Berry *et al.*, 2013), *Arcobacter butzleri* (Wesley *et al.*, 2000a) et les espèces *Listeria* (Strawn *et al.*, 2013) sont quand même épandus sur les terres agricoles.

Deux sources de fumiers, porcin et bovin, contenant naturellement des *Arcobacter* ont été utilisées pour inoculer des microcosmes de sols afin d'évaluer leur persistance dans le sol. Les résultats démontrent une persistance des *Arcobacter* d'au moins 49 jours dans le sol inoculé avec du fumier de porc et 91 jours dans le sol inoculé avec du fumier de vache laitière (Fig. 4.5). Malgré le fait que la concentration initiale en *Arcobacter* viable (Tableau 4.2) avant l'inoculation dans le sol était similaire dans chaque fumier, la concentration en *Arcobacter* récupérée au jour 0 dans

le sol était plus élevée dans le sol amendé en fumier d'origine porcine que la concentration initiale. Ce phénomène a été observé dans une étude avec deux souches *E. coli* (Topp *et al.*, 2003) inoculées dans un sol amendé en fumier de porc également. Il est connu chez *E. coli* que sous des conditions de famine prolongée elle acquiert des mutations lui permettant de mieux survivre dans un environnement non favorable (Finkel *et al.*, 1999). Ainsi, il est possible que les *Arcobacter* ayant été dans un fumier entreposé sur une longue durée de temps soient capables de persister dans le sol.

On connaît que les pathogènes retrouvés dans certains fumiers sont capables d'y persister longtemps. L'étude de Berry (2013) a observé une persistance de 42 jours d'*Escherichia coli* O157:H7 naturellement retrouvé dans le fumier de bovins ayant reçu très peu de traitement (Berry *et al.*, 2013). Une étude sur la survie de *Campylobacter coli* dans le fumier porcin indique une persistance de seulement 6 jours à température ambiante (22°C) (Bui *et al.*, 2011). D'autres températures ont été évaluées dans cette étude, par contre les microcosmes de sol dans notre étude ont tous été évalués à température ambiante afin d'éliminer le facteur température. En comparaison avec nos résultats, il semble que les *Arcobacter* naturellement présents dans le fumier ont une persistance semblable à *E. coli*, un autre pathogène humain dans le fumier qui persiste dans le sol (Bolton *et al.*, 2011, Byappanahalli *et al.*, 1998, Franz *et al.*, 2008, Ibekwe *et al.*, 2011b, Scott *et al.*, 2006, Semenov *et al.*, 2008, Vidovic *et al.*, 2007) et contamine les produits de consommation (Bezanson *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2012). En comparaison avec *Campylobacter*, un pathogène ayant une très grande importance au niveau de son impact sur la santé publique, la persistance des *Arcobacter* est beaucoup plus élevée. Cependant, la température de croissance optimale chez les *Campylobacter* est de 37 °C à 42° (Thomas *et al.*, 1998) comparativement à 30 °C chez les *Arcobacter*, donc les *Arcobacter* ont peut-être une meilleure persistance aux températures plus froides. De plus, les *Arcobacter* ont la capacité de croître à 15 °C (Vandamme *et al.*, 1991b).

Les espèces *Campylobacter*, ainsi que la souche *E. coli* O157 et les espèces *Salmonella*, naturellement retrouvées dans le fumier, persistent moins d'un mois dans du fumier solide selon l'étude de Nicholson (2005). Cependant, elles ont toutes survécu au moins un mois suivant l'application du fumier sur deux types de sols agricoles (Nicholson *et al.*, 2005).

5.3 *Arcobacter butzleri* survit longtemps dans le sol à température froide

L'espèce la plus souvent isolée d'échantillons cliniques et environnementaux est *A. butzleri* (Collado *et al.*, 2011a). De plus, elle semble être l'espèce ayant un plus grand potentiel de virulence selon des études récentes (Doudah *et al.*, 2012, Karadas *et al.*, 2013, Tabatabaei *et al.*, 2014) et est l'espèce qui a survécu le plus longtemps dans notre étude précédente. Pour ces raisons, nous avons analysé sa persistance dans le sol de façon individuelle. La souche *A. butzleri* ATCC49616^T a été utilisée puisqu'elle est la plus étudiée et possède neuf gènes de virulence hypothétiques. Nous avons également choisi deux températures dans lesquelles un sol de surface pourrait être; soit la température ambiante de 20± 1°C ou 4 °C, des températures qui pourraient correspondre à la saison estivale et une saison plus froide comme au printemps. De plus, 4°C est la température d'entreposage de plusieurs éléments comme le fumier en hiver, les carcasses d'animaux et les viandes animales, tandis que la température ambiante est la température de manipulation des échantillons, soit la température du travail en laboratoire. Sur une étendue de 105 jours, *A. butzleri* a persisté jusqu'à 42 jours à température ambiante et 105 jours à 4°C dans un sol agricole (Fig. 4.6). Il est connu que les *Arcobacter* peuvent croître entre 15 et 39°C (Collado *et al.*, 2011a, Hilton *et al.*, 2001), donc il n'est pas surprenant qu'elles soient capables de persister à température ambiante. Cependant, les *Arcobacter* ne croissent pas à 4°C, mais l'étude de Hilton (2001) (Hilton *et al.*, 2001) a prouvé qu'elles pouvaient survivre sous des conditions d'entreposage dans un bouillon à cette température pour au moins 21 jours avec une diminution graduelle. À cette température, nous avons observé une viabilité constante entre 21 et 49 jours. Cela a été observé dans l'étude de Hilton entre les jours 1 et 21, mais à une température de -21°C. Dans une autre étude, *A. butzleri* a survécu 77 jours également dans un bouillon à 5 °C (Kjeldgaard *et al.*, 2009). Il est certain que les bouillons de culture ne sont pas comparables à du sol, mais les conditions d'incubations étaient les mêmes que dans notre étude.

L'espèce *Campylobacter coli*, de la même famille que *Arcobacter*, est capable de persister plus de 24 jours dans un fumier de porc entreposé à 4°C comparativement à seulement six jours à 22°C avec une concentration initiale de 1 x 10⁹ UFC/ml (Bui *et al.*, 2011). L'espèce *Arcobacter butzleri* semblerait persister plus longtemps que *C. coli*, malgré une concentration initiale plus faible, soit 1 x 10⁶ UFC/ml. Par contre, les deux genres auraient une meilleure survie à une température plus froide.

Il y a quelques études sur la persistance des *Arcobacter* dans l'eau. L'eau est souvent en contact avec le sol comme lors de l'irrigation des végétaux. Une étude a démontré que *A. butzleri* a persisté plus de 90 jours à 4, 7 et 20°C et pouvait survivre à des températures beaucoup plus chaudes, soit 52, 56 et 60°C dans l'eau potable (Van Driessche *et al.*, 2008). L'étude de Van Driessche (2008) a aussi permis de déterminer qu'*A. butzleri* a survécu plus longtemps que les deux autres espèces associées aux infections humaines, soit *A. cryaerophilus* et *A. skirrowii*. Nos résultats de persistance d'*A. butzleri* dans le sol sont surprenants. D'ailleurs, cette bactérie a survécu beaucoup plus longtemps qu'anticipé. Cette persistance dans le sol de plus d'une quarantaine de jours pourrait être la raison pourquoi *A. butzleri* est l'espèce la plus fréquemment isolée de l'environnement. Une étude par Korkkonen a d'ailleurs analysé l'effet de la température sur deux microorganismes, soit *Campylobacter jejuni* et *Escherichia coli* dans de l'eau de lac à 25 et 4°C. La température n'a pas semblé affecter la survie d'*E. coli* dans l'eau; par contre *C. jejuni* a survécu plus longtemps à 4°C, soit 14 jours comparativement à 7 jours à 25°C dans de l'eau de lac non traitée. Ces chiffres sont beaucoup plus bas que ce que nous avons observé avec *A. butzleri* dans le sol. D'ailleurs, les études de survie dans l'environnement chez les espèces *Campylobacter* semblent toujours démontrer une faible survie comparativement à *Arcobacter* ce qui montre encore une fois que les *Arcobacter* sont souvent sous-estimés comparativement à *Campylobacter*.

Des facteurs biotiques comme la prédation par d'autres bactéries ou des protozoaires à un impact sur la survie des microorganismes dans le sol. L'étude de Korhonen (1991) sur la survie de *C. jejuni* et *E. coli* dans des microcosmes d'eau de lac non traitée et de l'eau de lac filtrée (Korhonen *et al.*, 1991) a démontré que la prédation peut être une cause du déclin d'une espèce bactérienne. L'étude a montré que l'eau filtrée possédant moins de prédateurs et d'autres bactéries a un effet positif sur la survie de *C. jejuni* et *E. coli* comparativement à une eau non traitée. La prédation par les protozoaires a d'ailleurs un impact négatif sur la survie d'autres microorganismes comme *Salmonella enterica* serovar Typhimurium dans un sol amendé en fumier (García *et al.*, 2010). Par contre, la même étude a démontré un impact positif sur la survie de ce microorganisme dans le sol à une température froide (5°C). Dans notre cas, il est possible qu'à 4°C il y ait beaucoup moins de prédation et ainsi moins de compétition pour les nutriments, donc *A. butzleri* survit plus longtemps à cette température.

Des facteurs abiotiques peuvent avoir eu un effet sur la survie d'*Arcobacter butzleri* ATCC 49616^T. L'espèce *A. butzleri* est reconnue comme étant capable d'être dans un état viable, mais non cultivable (Fera *et al.*, 2008). Selon Fera, *A. butzleri* tombe dans cet état après 20 jours

et 14 jours à 4°C et température ambiante, respectivement, dans des microcosmes d'eau de mer. Les cellules non cultivables sont d'ailleurs restées viables pendant 270 jours après incubation dans les microcosmes. Donc, il a une possibilité qu'*A. butzleri* utilise ce même phénomène dans le sol, car comme l'étude de Fera (2008), le nombre de cellules cultivables a baissé plus rapidement à température ambiante qu'à 4°C (Fig. 4.6).

Nous avons observé quelques fluctuations de semaine en semaine, où la concentration en *Arcobacter butzleri* a soudainement augmenté légèrement. Une explication peut être la formation de biofilm sur les parois du microcosme. D'une semaine à une autre, le mélange des microcosmes de sols est immobile et cela peut donner naissance à la formation de biofilms qui est un autre moyen de survie dans l'environnement pour certains microorganismes. Il est déjà connu qu'*Arcobacter butzleri* forme des biofilms sur des surfaces en plastique, en verre et en acier inoxydable (Cervenka *et al.*, 2008) et dans les abattoirs (Ferreira *et al.*, 2013b, Ho *et al.*, 2008). Les biofilms sont également reconnus comme étant la cause d'infections bactériennes persistantes (Costerton *et al.*, 1999).

6 Conclusion

Cette étude a permis de valider une nouvelle méthode rapide et précise qui permet la détection de huit gènes de virulence hypothétiques chez les espèces *Arcobacter* à l'aide de PCR multiplex. Cette méthode a permis de valider la présence de gènes de virulence hypothétiques chez des isolats provenant majoritairement de fumier, de boues de fosses septiques humaines et autres types de matières fécales animales utilisant trois réactions PCR au lieu de huit. Cette nouvelle approche permet de minimiser considérablement les coûts ainsi que le temps d'analyse. Les résultats suggèrent que les *Arcobacter* provenant de matières fécales animales variées qui sont fréquemment utilisées comme fertilisant pour les terres agricoles ont un potentiel de virulence. Les souches *Arcobacter* de source humaine provenant de réservoirs septiques ont d'ailleurs la présence de plusieurs gènes de virulence soit sept des huit gènes de virulence ont été identifiées chez certaines de ces souches. En réponse à l'épandage du fumier, ces pathogènes se retrouvent dans le sol et persistent dans l'environnement soit grâce à ces gènes de virulence ou autres facteurs génétiques ou environnementaux. Cependant, d'autres études doivent être effectuées afin de comprendre si ces gènes sont exprimés et comprendre leur rôle dans le mécanisme de pathogénicité des *Arcobacter*.

Ce projet a également permis de développer un protocole d'isolement permettant le dénombrement des *Arcobacter* dans le sol basé sur une méthode NPP préalablement décrite par Chinivasagam (Chinivasagam *et al.*, 2007). L'analyse dans le sol des *Arcobacter* est très peu étudiée puisque des méthodes d'isolement sont pratiquement inexistantes. La méthode développée est composée de cinq étapes: l'échantillonnage, l'enrichissement, l'isolement des *Arcobacter*, la purification des colonies et l'identification au niveau de l'espèce par amplification PCR. Ce protocole nous a permis d'analyser la persistance dans le sol des espèces *Arcobacter* dans un sol agricole en laboratoire. Des microcosmes de sol ont été utilisés comme écosystème expérimental afin d'avoir un contrôle sur les conditions des études. Cette approche expérimentale est unique chez les espèces *Arcobacter*. Par contre, c'est une approche qui a été utilisée pour l'analyse d'autres microorganismes pathogènes dans le sol (Ibekwe *et al.*, 2007, Ibekwe *et al.*, 2011a, Yamahara *et al.*, 2012) où des méthodes semblables ont été utilisées.

Il est évident que les résultats de persistance dans le sol confirment que des techniques d'élimination des pathogènes naturellement retrouvés dans le fumier sont nécessaires avant l'épandage sur les sols agricoles. Autrement, les *Arcobacter* ont une étendue de plus d'un mois pour contaminer d'autres environnements soit par l'entremise du pâturage ou du ruissellement

des pathogènes causé par de fortes pluies vers les bassins d'eau. Les résultats ont illustré que les *Arcobacter* naturellement retrouvés dans le fumier de différentes sources ont une persistance dans le sol d'une durée (en jour) différente. L'espèce la plus souvent associée aux infections humaines ainsi que la souche ayant un plus grand potentiel de virulence avec la présence de huit gènes de virulence étudiés, soit la souche *A. butzleri* ATCC49616, persiste au moins 42 jours à température ambiante et à 4°C. Nos données ont démontré que la température a un effet sur la persistance d'*A. butzleri* dans le sol et que les *Arcobacter* naturellement retrouvés dans le fumier provenant de sources différentes ont une persistance distincte. De plus amples études devront être effectuées afin de déterminer si c'est le cas chez les autres espèces et pour d'autres températures également.

7 Références

- Acik M, Karahan M, Karagulle HO & Cetinkaya B (2013) Investigation of cytolethal distending toxin production and virulence genes in *Campylobacter* isolates from cattle. *Revue de Médecine Vétérinaire* 164(5):272-277.
- Assanta MA, Roy D, Lemay M-J & Montpetit D (2002) Attachment of *Arcobacter butzleri*, a new waterborne pathogen, to water distribution pipe surfaces. *Journal of Food Protection* 65(8):1240-1247.
- Atabay H & Aydin F (2001) Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents. *Letters in applied microbiology* 33(6):430-433.
- Atabay H & Corry J (1997) The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. *Journal of applied microbiology* 83(5):619-626.
- Atabay HI, Aydin F, Houf K, Sahin M & Vandamme P (2003) The prevalence of *Arcobacter* spp. on chicken carcasses sold in retail markets in Turkey, and identification of the isolates using SDS-PAGE. *International journal of food microbiology* 81(1):21-28.
- Atabay HI, Unver A, Sahin M, Otlı S, Elmali M & Yaman H (2008) Isolation of various *Arcobacter* species from domestic geese. *Veterinary microbiology* 128(3):400-405.
- Atabay HI, Wainã, M & Madsen M (2006) Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry. *International journal of food microbiology* 109(1):139-145.
- Baffone W, Citterio B, Vittoria E, Casaroli A, Campana R, Falzano L & Donelli G (2003) Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *International journal of food microbiology* 89(1):31-39.
- Bauer RJ, Zhang L, Foxman B, Siitonen A, Jantunen ME, Saxen H & Marrs CF (2002) Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection—usp, iha, and iroNE. *Journal of Infectious Diseases* 185(10):1521-1524.
- Berry ED, Millner PD, Wells JE, Kalchayanand N & Guerini MN (2013) Fate of naturally occurring *Escherichia coli* O157:H7 and other zoonotic pathogens during minimally managed bovine feedlot manure composting processes. *Journal of food protection* 76(8):1308-1321.
- Bezanson G, Delaquis P, Bach S, McKellar R, Topp E, Gill A, Blais B & Gilmour M (2012) Comparative Examination of *Escherichia coli* O157: H7 Survival on Romaine Lettuce and in Soil at Two Independent Experimental Sites. *Journal of Food Protection* 75(3):480-487.
- Blaser MJ, TAYLOR DN & FELDMAN RA (1983) Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. *Epidemiologic reviews* 5(1):157-176.
- Bolton DJ, Monaghan A, Byrne B, Fanning S, Sweeney T & McDowell DA (2011) Incidence and survival of non-O157 verocytotoxigenic *Escherichia coli* in soil. *Journal of applied microbiology* 111(2):484-490.
- Brandl MT, Haxo AF, Bates AH & Mandrell RE (2004) Comparison of survival of *Campylobacter jejuni* in the phyllosphere with that in the rhizosphere of spinach and radish plants. *Applied and environmental microbiology* 70(2):1182-1189.
- Bruce K, Hiorns W, Hobman J, Osborn A, Strike P & Ritchie D (1992) Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Applied and environmental microbiology* 58(10):3413-3416.
- Bui XT, Wolff A, Madsen M & Bang DD (2011) Fate and survival of *Campylobacter coli* in swine manure at various temperatures. *Frontiers in Microbiology* 2.
- Burnens A, Schaad U & Nicolet J (1992) Isolation of *Arcobacter butzleri* from a girl with gastroenteritis on Yersinia selective agar. *Medical Microbiology Letters* 1:251-256.
- Byappanahalli M & Fujioka R (1998) Evidence that tropical soil environment can support the growth of *Escherichia coli*. *Water science and technology* 38(12):171-174.
- Cappelletti J & Federighi M (1998) Demonstration of viable but non cultivable state for *Campylobacter jejuni* [direct viable count, food security]. *Revue de Medecine Veterinaire* 149.
- Cervenka L, Kristlova J, Peskova I, Vytrasova J, Pejchalova M & Brozkova I (2008) Persistence of *Arcobacter butzleri* CCUG 30484 on plastic, stainless steel and glass surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology* 39(3):517-520.

- Chaveerach P, Ter Huurne A, Lipman L & Van Knapen F (2003) Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. *Applied and environmental microbiology* 69(1):711-714.
- Chinivasagam H, Corney B, Wright L, Diallo I & Blackall P (2007) Detection of *Arcobacter* spp. in piggery effluent and effluent-irrigated soils in southeast Queensland. *Journal of applied microbiology* 103(2):418-426.
- Collado L, Cleenwerck I, Van Trappen S, De Vos P & Figueras MJ (2009) *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 59(6):1391-1396.
- Collado L & Figueras MJ (2011a) Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical microbiology reviews* 24(1):174-192.
- Collado L, Kasimir G, Perez U, Bosch A, Pinto R, Saucedo G, Huguet JM & Figueras MJ (2010) Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the Llobregat River catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant. *Water research* 44(12):3696-3702.
- Collado L, Levican A, Perez J & Figueras MJ (2011b) *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage samples. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61(9):2155-2161.
- Cools I, Uyttendaele M, Caro C, D'Haese E, Nelis H & Debevere J (2003) Survival of *Campylobacter jejuni* strains of different origin in drinking water. *Journal of applied microbiology* 94(5):886-892.
- Costerton J, Stewart PS & Greenberg E (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418):1318-1322.
- D'sa EM & Harrison MA (2005) Effect of pH, NaCl content, and temperature on growth and survival of *Arcobacter* spp. *Journal of Food Protection* 68(1):18-25.
- De Smet S, Vandamme P, De Zutter L, On SLW, Doudah L & Houf K (2011) *Arcobacter trophiarum* sp. nov., isolated from fattening pigs. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61(2):356-361.
- Donachie SP, Bowman JP, On SLW & Alam M (2005) *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55(3):1271-1277.
- Doran JW & Linn DM (1979) Bacteriological quality of runoff water from pastureland. *Applied and Environmental Microbiology* 37(5):985-991.
- Doudah L, de Zutter L, Baré J, De Vos P, Vandamme P, Vandenberg O, Van den Abeele AM & Houf K (2012) Occurrence of putative virulence genes in *Arcobacter* species isolated from humans and animals. *Journal of Clinical Microbiology* 50(3):735-741.
- Driessche E, Houf K, Hoof J, Zutter L & Vandamme P (2003) Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. *FEMS microbiology letters* 229(2):243-248.
- Driessche EV, Houf K, Vangroenweghe F, Zutter LD & Hoof JV (2005) Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter* species in the faeces of healthy cattle in Belgium. *Veterinary microbiology* 105(2):149-154.
- Duffy LL & Fegan N (2012) Prevalence and Concentration of *Arcobacter* spp. on Australian Beef Carcasses. *Journal of Food Protection* 75(8):1479-1482.
- Ertas N, Dogruer Y, Gonulalan Z, Guner A & Ulger I (2010) Prevalence of *Arcobacter* species in drinking water, spring water, and raw milk as determined by multiplex PCR. *Journal of food protection* 73(11):2099-2102.
- Fera M, La Camera E, Carbone M, Malara D & Pennisi M (2009) Pet cats as carriers of *Arcobacter* spp. in Southern Italy. *Journal of applied microbiology* 106(5):1661-1666.
- Fera M, Maugeri T, Gugliandolo C, Beninati C, Giannone M, La Camera E & Carbone M (2004) Detection of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Mediterranean Sea. *Applied and environmental microbiology* 70(3):1271-1276.
- Fera M, Maugeri T, Gugliandolo C, La Camera E, Lentini V, Favaloro A, Bonanno D & Carbone M (2008) Induction and resuscitation of viable nonculturable *Arcobacter butzleri* cells. *Applied and environmental microbiology* 74(10):3266-3268.
- Fernández H, Krause S & Paz Villanueva M (2004) *Arcobacter butzleri* an emerging enteropathogen: communication of two cases with chronic diarrhea. *Brazilian Journal of Microbiology* 35(3):216-218.

- Ferreira S, Fraqueza MJ, Queiroz JA, Domingues FC & Oleastro M (2013a) Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology* 162(1):82-88.
- Ferreira S, Fraqueza MJ, Queiroz JoA, Domingues FC & Oleastro Mn (2013b) Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *International journal of food microbiology* 162(1):82-88.
- Figueras MJ, Collado L, Levican A, Perez J, Solsona MJ & Yustes C (2010) *Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish. *Systematic and applied microbiology*.
- Figueras MJ, Levican A, Collado L, Inza MI & Yustes C (2011) *Arcobacter ellisii* sp. nov., isolated from mussels. *Systematic and applied microbiology* 34(6):414-418.
- Finkel SE & Kolter R (1999) Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(7):4023-4027.
- Flemming H-C (1993) Biofilms and environmental protection. *Water Science & Technology* 27(7-8):1-10.
- Franz E, Semenov AV, Termorshuizen AJ, De Vos OJ, Bokhorst JG & Van Bruggen AHC (2008) Manure-amended soil characteristics affecting the survival of *E. coli* O157: H7 in 36 Dutch soils. *Environmental Microbiology* 10(2):313-327.
- Frost J, Gillespie I & O'BRIEN S (2002) Public health implications of *campylobacter* outbreaks in England and Wales, 1995-9: epidemiological and microbiological investigations. *Epidemiology and infection* 128(02):111-118.
- Fujioka RS, Hashimoto HH, Siwak EB & Young RH (1981) Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Applied and environmental microbiology* 41(3):690-696.
- García R, Baelum J, Fredslund L, Santorum P & Jacobsen CS (2010) Influence of temperature and predation on survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and expression of *invA* in soil and manure-amended soil. *Applied and environmental microbiology* 76(15):5025-5031.
- Goldberg MB, DiRITA VJ & Calderwood SB (1990) Identification of an iron-regulated virulence determinant in *Vibrio cholerae*, using *TnphoA* mutagenesis. *Infection and immunity* 58(1):55-60.
- Grant KA, Belandia IU, Dekker N, Richardson PT & Park SF (1997) Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. *Infection and immunity* 65(4):1172-1180.
- Gude A, Hillman T, Helps C, Allen V & Corry J (2005) Ecology of *Arcobacter* species in chicken rearing and processing. *Letters in applied microbiology* 41(1):82-87.
- Hausdorf L, Fröhling A, Nettmann E, Schlüter O & Klocke M (2008) Detection of *Arcobacter* during processing of vegetables. *Agricultural and biosystems engineering for a sustainable world. International Conference on Agricultural Engineering, Hersonissos, Crete, Greece, 23-25 June, 2008*. European Society of Agricultural Engineers (AgEng), p P-098.
- Hickey EW & Hirshfield IN (1990) Low-pH-induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Applied and environmental microbiology* 56(4):1038-1045.
- Higgins R, Messier S, Daignault D & Lorange M (1999) *Arcobacter butzleri* isolated from a diarrhoeic non-human primate. *Laboratory animals* 33(1):87-90.
- Hilton C, Mackey B, Hargreaves A & Forsythe S (2001) The recovery of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 from various temperature treatments. *Journal of applied microbiology* 91(5):929-932.
- Ho HT, Lipman LJ & Gaastra W (2008) The introduction of *Arcobacter* spp. in poultry slaughterhouses. *International journal of food microbiology* 125(3):223-229.
- Ho HTK, Lipman LJA & Gaastra W (2006) *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Veterinary microbiology* 115(1):1-13.
- Houf K, De Smet S, Baré J & Daminet S (2008) Dogs as carriers of the emerging pathogen *Arcobacter*. *Veterinary microbiology* 130(1):208-213.
- Houf K, De Zutter L, Van Hoof J & Vandamme P (2002) Assessment of the genetic diversity among arcobacters isolated from poultry products by using two PCR-based typing methods. *Applied and environmental microbiology* 68(5):2172-2178.

- Houf K, Devriese LA, De Zutter L, Van Hoof J & Vandamme P (2001) Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products. *International journal of food microbiology* 71(2):189-196.
- Houf K, Devriese LA, Haesebrouck F, Vandenberg O, Butzler J-P, Hoof JV & Vandamme P (2004) Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers. *Microbial drug resistance* 10(3):243-247.
- Houf K, On SL, Coenye T, Mast J, Van Hoof J & Vandamme P (2005) *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55(2):713-717.
- Houf K, On SLW, Coenye T, Debruyne L, De Smet S & Vandamme P (2009) *Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 59(10):2599-2604.
- Houf K, Tutenel A, Zutter L, Hoof J & Vandamme P (2000) Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 193(1):89-94.
- Hsueh P-R, Teng L-J, Yang P-C, Wang S-K, Chang S-C, Ho S-W, Hsieh W-C & Luh K-T (1997) Bacteremia caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B. *Journal of clinical microbiology* 35(2):489-491.
- Hume ME, Harvey RB, Stanker LH, Droleskey RE, Poole TL & Zhang H-B (2001) Genotypic variation among *Arcobacter* isolates from a farrow-to-finish swine facility. *Journal of Food Protection* 64(5):645-651.
- Ibekwe AM, Grieve CM & Yang C-H (2007) Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in soil and on lettuce after soil fumigation. *Canadian journal of microbiology* 53(5):623-635.
- Ibekwe AM & Ma J (2011a) Effects of fumigants on microbial diversity and persistence of *E. coli* O15: H7 in contrasting soil microcosms. *Science of the Total Environment* 409(19):3740-3748.
- Ibekwe AM, Papiernik SK, Grieve CM & Yang C-H (2011b) Quantification of persistence of *Escherichia coli* O157: H7 in contrasting soils. *International journal of microbiology* 2011.
- Inglis GD & Kalischuk LD (2004) Direct quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae* in feces of cattle by real-time quantitative PCR. *Applied and environmental microbiology* 70(4):2296-2306.
- Inoue A, Murata Y, Takahashi H, Tsuji N, Fujisaki S & Kato J-i (2008) Involvement of an essential gene, *mviN*, in murein synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 190(21):7298-7301.
- Istivan TS & Coloe PJ (2006) Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology* 152(5):1263-1274.
- Jacob J, Lior H & Feuerpfel I (1993) Isolation of *Arcobacter butzleri* from a drinking water reservoir in eastern Germany. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin= International journal of hygiene and environmental medicine* 193(6):557.
- Jacob J, Woodward D, Feuerpfel I & Johnson W (1998) Isolation of *Arcobacter butzleri* in raw water and drinking water treatment plants in Germany. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin= International journal of hygiene and environmental medicine* 201(2):189-198.
- Jones D, Sutcliffe E & Curry A (1991) Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *Journal of General Microbiology* 137(10):2477-2482.
- Jones TH, Johns MW & Gill CO (2008) Changes in the proteome of *Escherichia coli* during growth at 15 degrees C after incubation at 2, 6 or 8 degrees C for 4 days. *International Journal of Food Microbiology* 124(3):299-302.
- Kabeya H, Maruyama S, Morita Y, Ohsuga T, Ozawa S, Kobayashi Y, Abe M, Katsube Y & Mikami T (2004) Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. *International journal of food microbiology* 90(3):303-308.
- Karadas G, Sharbati S, Hänel I, Messelhäufner U, Glocker E, Alter T & Götz G (2013) Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. *Journal of applied microbiology*.
- Karmali M, De Grandis S & Fleming P (1981) Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* with special reference to resistance patterns of Canadian isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 19(4):593-597.
- Kiehlbauch J, Brenner D, Nicholson M, Baker C, Patton C, Steigerwalt A & Wachsmuth I (1991) *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *Journal of clinical microbiology* 29(2):376-385.

- Kim HM, Hwang CY & Cho BC (2010) *Arcobacter marinus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60(Pt 3):531-536.
- Kim JF, Ham JH, Bauer DW, Collmer A & Beer SV (1998) The hrpC and hrpN operons of *Erwinia chrysanthemi* EC16 are flanked by plcA and homologs of hemolysin/adhesin genes and accompanying activator/transporter genes. *Molecular plant-microbe interactions* 11(6):563-567.
- Kjeldgaard J, J rgensen K & Ingmer H (2009) Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*. *International journal of food microbiology* 131(2):256-259.
- Konkel ME, Christensen JE, Keech AM, Monteville MR, Klena JD & Garvis SG (2005) Identification of a fibronectin-binding domain within the *Campylobacter jejuni* CadF protein. *Molecular microbiology* 57(4):1022-1035.
- Konkel ME, Kim BJ, Rivera-Amill V & Garvis SG (1999) Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Molecular microbiology* 32(4):691-701.
- Korhonen LK & Martikainen P (1991) Survival of *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* in untreated and filtered lake water. *Journal of Applied Microbiology* 71(4):379-382.
- Lambert T, Gerbaud G, Trieu-Cuot P & Courvalin P (1985) Structural relationship between the genes encoding 3'-aminoglycoside phosphotransferases in *Campylobacter* and in gram-positive cocci. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*. Elsevier, p 135-150.
- Lau S, Woo P, Teng J, Leung K & Yuen K (2002) Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis. *Molecular Pathology* 55(3):182-185.
- Lerner J, Brumberger V & Preac-Mursic V (1994) Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 13(8):660-662.
- Levican A, Alkeskas A, G nter C, Forsythe SJ & Figueras MJ (2013) The adherence and invasion of human intestinal cells by *Arcobacter* species and their virulence genotype. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Levican A, Collado L, Aguilar C, Yustes C, Di guez AL, Romalde JL & Figueras MJ (2012a) *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Systematic and applied microbiology* 35(3):133-138.
- Levican A, Collado L & Figueras MJ (2012b) *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Systematic and applied microbiology*.
- Lipman L, Ho H & Gaastra W (2008) The presence of *Arcobacter* species in breeding hens and eggs from these hens. *Poultry science* 87(11):2404-2407.
- Logan E, Neill S & Mackie D (1982) Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant *Campylobacter*. *Veterinary Record* 110(10):229-230.
- Manke T & J.S. D (1996) *What is This? Food Pathogen: Arcobacter butzleri*. *Scanning Electron Microscopy Image of Bacteria in Filter Pores*. Iowa State University (ISU), <http://www.micro.iastate.edu/ugrad/bacteria-in-pore.html> (Consult  le 30 Ao t)
- Mansfield LP & Forsythe SJ (2000) *Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii* and *A. cryaerophilus*-potential emerging human pathogens. *Reviews in Medical Microbiology* 11(3):161-170.
- McClung C, Patriquin D & Davis R (1983) *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *International journal of systematic bacteriology* 33(3):605-612.
- McLaughlin MR, Brooks JP, Adeli A & Read JJ (2010) Comparison of selected nutrients and bacteria from common contiguous soils inside and outside swine lagoon effluent spray fields after long-term use. *Journal of environmental quality* 39(5):1829-1840.
- Miller WG, Parker CT, Rubenfield M, Mendz GL, W sten MM, Ussery DW, Stolz JF, Binnewies TT, Hallin PF & Wang G (2007) The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *PLoS one* 2(12):e1358.
- Molin S & Tolker-Nielsen T (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current opinion in biotechnology* 14(3):255-261.
- Monteville MR, Yoon JE & Konkel ME (2003) Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology* 149(1):153-165.

- Moreno Y, Alonso JL, Botella S, Ferrus MA & Hernandez J (2004) Survival and injury of *Arcobacter* after artificial inoculation into drinking water. *Research in Microbiology* 155(9):726-730.
- Muir S, Koopman M, Libby S, Joens L, Heffron F & Kusters J (1992) Cloning and expression of a *Serpula* (*Treponema*) *hyodysenteriae* hemolysin gene. *Infection and immunity* 60(2):529-535.
- Neill S, Campbell J, O'BRIEN J, Weatherup S & Ellis W (1985) Taxonomic Position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology* 35(3):342-356.
- Nicholson FA, Groves SJ & Chambers BJ (2005) Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology* 96(2):135-143.
- Nieva-Echevarria B, Martinez-Malaxetxebarria I, Girbau C, Alonso R & Fernandez-Astorga A (2013) Prevalence and genetic diversity of *Arcobacter* in food products in the north of Spain. *Journal of food protection* 76(8):1447-1450.
- Obiri-Danso K, Paul N & Jones K (2001) The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of *Campylobacter jejuni*, *Camp. coli*, *Camp. lari* and urease-positive thermophilic campylobacters (UPTC) in surface waters. *Journal of Applied Microbiology* 90(2):256-267.
- Ohnishi K, Kutsukake K, Suzuki H & Iino T (1990) Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Molecular and General Genetics MGG* 221(2):139-147.
- Oliver J (2000) The viable but nonculturable state and cellular resuscitation. *Microbial biosystems: new frontiers. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada*:723-730.
- Oliver JD (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology* 43(1):93-100.
- On S, Stacey A & Smyth J (1995) Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia. *Journal of Infection* 31(3):225-227.
- On SL, Jensen TK, Bille-Hansen V, Jorsal SE & Vandamme P (2002) Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark. *Veterinary microbiology* 85(2):159-167.
- Pell AN (1997) Manure and microbes: public and animal health problem? *Journal of dairy science* 80(10):2673-2681.
- Pentimalli D, Pegels N, García T, Martín R & González I (2009) Specific PCR detection of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii*, and *Arcobacter cibarius* in chicken meat. *Journal of Food Protection* 72(7):1491-1495.
- Quetz JdS, Lima IF, Havt A, Prata MM, Cavalcante PA, Medeiros PH, Cid DA, Moraes ML, Rey LC & Soares AM (2012) *Campylobacter jejuni* infection and virulence-associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. *Journal of medical microbiology* 61(Pt 4):507-513.
- Recorbet G, Steinberg C & Faurie G (1992) Survival in soil of genetically engineered *Escherichia coli* as related to inoculum density, predation and competition. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 101(4):251-260.
- Rice E, Rodgers M, Wesley I, Johnson C & Tanner S (1999) Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Letters in applied microbiology* 28(1):31-35.
- Rojas CM, Ham JH, Deng W-L, Doyle JJ & Collmer A (2002) HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(20):13142-13147.
- Rollins D & Colwell R (1986) Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology* 52(3):531-538.
- Sagara H, Mochizuki A, Okamura N & Nakaya R (1987) Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* with special reference to plasmid profiles of Japanese clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 31(5):713-719.
- Sarkar SR, Hossain MA, Paul SK, Ray NC, Sultana S, Rahman MM & Islam A (2014) Campylobacteriosis - an overview. *Mymensingh Medical Journal* 23(1):173-180.
- Schmidt U, Chmel H & Cobbs C (1979) *Vibrio alginolyticus* infections in humans. *Journal of clinical microbiology* 10(5):666-668.
- Schmiel DH & Miller VL (1999) Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes and infection* 1(13):1103-1112.

- Scott A, Conn K, Lazarovits G & Topp E (2006) Dynamics of *Escherichia coli* in agricultural soils receiving swine manure slurry or liquid municipal biosolids. *Canadian journal of soil science* 86(5):841-849.
- Scott AE, Timms AR, Connerton PL, Carrillo CL, Radzum KA & Connerton IF (2007) Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PLoS pathogens* 3(8):e119.
- Semenov AV, Franz E, Van Overbeek L, Termorshuizen AJ & Van Bruggen AH (2008) Estimating the stability of *Escherichia coli* O157: H7 survival in manure-amended soils with different management histories. *Environmental Microbiology* 10(6):1450-1459.
- Shah AH, Saleha AA, Murugaiyah M, Zunita Z & Memon AA (2012) Prevalence and Distribution of *Arcobacter* spp. in Raw Milk and Retail Raw Beef. *Journal of Food Protection* 75(8):1474-1478.
- Sheldon Jr A (2005) Antibiotic resistance: a survival strategy. *Clinical laboratory science: journal of the American Society for Medical Technology* 18(3):170.
- Stampi S, De Luca G, Varoli O & Zanetti F (1999) Occurrence, removal and seasonal variation of thermophilic campylobacters and *Arcobacter* in sewage sludge. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 202(1):19-27.
- Strawn LK, Gröhn YT, Warchocki S, Worobo RW, Bihn EA & Wiedmann M (2013) Risk Factors Associated with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* Contamination of Produce Fields. *Applied and environmental microbiology* 79(24):7618-7627.
- T.A. Roberts ACB-PaRBT (1996) *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*. Blackie Academic Press and Professional, London
- Tabatabaei M, Shirzad Aski H, shayegh H & Khoshbakht R (2014) Occurrence of six virulence-associated genes in *Arcobacter* species isolated from various sources in Shiraz, Southern Iran. *Microbial Pathogenesis* 66(0):1-4.
- Tee W, Baird R, Dyall-Smith M & Dwyer B (1988) *Campylobacter cryaerophila* isolated from a human. *Journal of clinical microbiology* 26(12):2469-2473.
- Thomas C, Gibson H, Hill DJ & Mabey M (1998) *Campylobacter* epidemiology: an aquatic perspective. *Journal of Applied Microbiology* 85 Suppl 1:168s-177s.
- Topp E, Welsh M, Tien YC, Dang A, Lazarovits G, Conn K & Zhu H (2003) Strain-dependent variability in growth and survival of *Escherichia coli* in agricultural soil. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* 44(3):303-308.
- Van Driessche E & Houf K (2008) Survival capacity in water of *Arcobacter* species under different temperature conditions. *Journal of applied microbiology* 105(2):443-451.
- Van Driessche E, Houf K, Vangroenweghe F, Nollet N, De Zutter L, Vandamme P & Van Hoof J (2004) Occurrence and strain diversity of *Arcobacter* species isolated from healthy Belgian pigs. *Research in microbiology* 155(8):662-666.
- Vandamme P & De Ley J (1991b) Proposal for a new family, Campylobacteraceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41(3):451-455.
- Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R & De Ley J (1991a) Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41(1):88-103.
- Vandamme P, Pugina P, Benzi G, Van Etterijck R, Vlaes L, Kersters K, Butzler J, Lior H & Lauwers S (1992a) Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *Journal of Clinical Microbiology* 30(9):2335-2337.
- Vandamme P, Vancanneyt M, Pot B, Mels L, Hoste B, Dewettinck D, Vlaes L, Van Den Borre C, Higgins R & Hommez J (1992b) Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *International journal of systematic bacteriology* 42(3):344-356.
- Vandenberg O, Dediste A, Houf K, Ibekwem S, Souayah H, Cadranel S, Douat N, Zissis G, Butzler J-P & Vandamme P (2004) *Arcobacter* species in humans. *Emerging infectious diseases* 10(10):1863.
- Vidovic S, Block HC & Korber DR (2007) Effect of soil composition, temperature, indigenous microflora, and environmental conditions on the survival of *Escherichia coli* O157: H7. *Canadian journal of microbiology* 53(7):822-829.
- Wesley IV, Harmon KM, Green A, Bush E & Wells S (2000a) Distribution of *Campylobacter* and *Arcobacter* in Livestock.

- Wesley IV, Wells SJ, Harmon KM, Green A, Schroeder-Tucker L, Glover M & Siddique I (2000b) Fecal Shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in Dairy Cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5):1994-2000.
- Woo PC, Chong KT, Leung K-w, Que T-I & Yuen K-y (2001) Identification of *Arcobacter cryaerophilus* isolated from a traffic accident victim with bacteremia by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 40(3):125-127.
- Wu Y, Lee L, Rollins D & Ching W (1994) Heat shock-and alkaline pH-induced proteins of *Campylobacter jejuni*: characterization and immunological properties. *Infection and immunity* 62(10):4256-4260.
- Wybo I, Breynaert J, Lauwers S, Lindenburg F & Houf K (2004) Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhea. *Journal of clinical microbiology* 42(4):1851-1852.
- Yamahara KM, Sassoubre LM, Goodwin KD & Boehm AB (2012) Occurrence and persistence of bacterial pathogens and indicator organisms in beach sand along the California coast. *Applied and environmental microbiology* 78(6):1733-1745.
- Yan J-J, Ko W-C, Huang A-H, Chen H-M, Jin Y-T & Wu J-J (2000) *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis. *Journal of the Formosan Medical Association= Taiwan yi zhi* 99(2):166.
- Yang Y, Luo Y, Millner P, Turner E & Feng H (2012) Assessment of *Escherichia coli* O157: H7 transference from soil to iceberg lettuce via a contaminated field coring harvesting knife. *International journal of food microbiology* 153(3):345-350.
- Zhu M, Valdebenito M, Winkelmann G & Hantke K (2005) Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiology* 151(7):2363-2372.

