

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

Caractérisation de deux nouvelles espèces *Arcobacter*, *A. lanthierii* et *A. septicus*

Par

Kerri Whiteduck Léveillée

Mémoire présentée pour l'obtention du grade de
Maître es Sciences, M.Sc.
Microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Philippe Constant
INRS-IAF

Examineur externe

Caroline Côté
Institut de recherche et de développement en
agroenvironnement (IRDA)

Directeur de recherche

Richard Villemur
INRS-IAF

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier infiniment Dr Martin Lanthier de m'avoir offert une maîtrise et permis de travailler dans son laboratoire à Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC). Malheureusement, Dr Lanthier est décédé pendant la durée de ma maîtrise et donc je dédie ce mémoire en son honneur. Mes plus grandes reconnaissances vont à Dr James Tambong et Dr Ed Topp, qui ont pris en charge mon projet de maîtrise lors du départ de Dr Lanthier, et ainsi qu'au Dr Izhar Khan, qui a éventuellement remplacé celui-ci en tant que superviseur de recherche à AAC. Je veux également remercier Dr Richard Villemur d'avoir accepté d'être mon codirecteur à l'INRS-IAF, d'avoir géré les documents scolaires nécessaires par rapport à l'INRS ainsi que pour son aide lors de mes séminaires.

Mes remerciements vont aussi au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), à la Fondation Armand-Frappier et à AAC pour leur financement personnel lors de ma maîtrise. Encore une fois mes remerciements vont à AAC pour le financement relié à mon projet de maîtrise.

Je suis énormément reconnaissante aux personnes suivantes pour leur collaboration à mon projet de maîtrise : Dr Miloslav Kalab et Denise Chabot pour leur aide avec la microscopie électronique, Dr André Lévesque et Ekaterina Ponomareva pour le séquençage du génome, Dr Zaky Adam pour l'assemblage du génome et Environnement Canada pour l'analyse des acides gras (FAME).

Finalement, j'aimerais remercier les gens faisant partie de mon soutien technique et moral, soit Natacha Laprade, Jenni Whiteduck Léveillée, des étudiantes à la maîtrise; Michel Cloutier, notre technicien de laboratoire; ainsi que de nombreux étudiants COOP, mais surtout Cynthia Anna Kaneza (La Cité collégiale) pour son aide pendant la session hiver 2013 et Jenelle Pragasam (Université de Western Ontario) pour la session été 2013.

RÉSUMÉ

La systématique microbienne permet la classification des bactéries en associant celles-ci à un genre et une espèce. La caractérisation et l'identification de nouvelles espèces bactériennes sont d'une grande importance clinique puisqu'elles permettent d'observer le rôle par rapport aux risques à la santé humaine et animale, mais aussi d'évaluer les traitements possibles si celles-ci causent des infections ou des maladies. Cette tâche peut devenir difficile lorsque l'espèce provient d'un milieu extrême ou encore pour des bactéries fastidieuses dans leurs exigences de croissance. Il n'existe pas une analyse directe afin d'identifier une nouvelle espèce bactérienne et donc une approche polyphasique est nécessaire (Prakash *et al.*, 2007, Vandamme *et al.*, 1992b). Ce type d'approche permet d'obtenir des résultats d'une panoplie d'analyses différentes permettant alors une vue d'ensemble de la taxonomie de la bactérie.

Il existe plusieurs communautés bactériennes capables de survivre dans les eaux de surface ainsi que dans la matière fécale humaine et animale. Certaines bactéries font normalement partie de la flore intestinale de certains animaux et de l'humain, comme *E. coli*. Cependant, lorsqu'une bactérie pathogène s'introduit, alors celle-ci peut causer des infections et des maladies. La contamination fécale des eaux de surface se fait par le ruissellement des matières fécales animales lors de fortes pluies et donc une simple ingestion lors d'une baignade peut causer une infection chez l'humain. La rivière Nation sud (RNS) située en Ontario (Canada) est un bassin versant avec plus de 60% d'activités agricoles et elle est donc un lieu idéal pour faire une étude sur l'effet de la contamination bactérienne provenant de l'agriculture sur les eaux de surface. Le genre bactérien observé dans cette étude est *Arcobacter*. Ce genre est retrouvé dans les eaux de surface et aussi chez les animaux de ferme, sauvages et domestiques. Des échantillonnages d'eaux de surface de la RNS ainsi que de diverses matières fécales dans les environs de la RNS ont permis d'évaluer la prévalence d'*Arcobacter* dans cette région. En ce sens, une collection d'isolats *Arcobacter* fut établie à partir d'échantillons provenant de ce bassin et conservés à AAC.

L'hypothèse principale de ce mémoire est que de nouvelles espèces du genre *Arcobacter* se retrouvent dans la collection d'isolats fécaux d'AAC. L'objectif a été de caractériser ces espèces à l'aide de l'approche polyphasique visant la caractérisation morphologique, phénotypique et génétique. Deux nouvelles espèces *Arcobacter* ont été découvertes dans cette collection. Le séquençage de l'ARNr 16S et des gènes *cpn60*, *rpoB* et *gyrB* ainsi que le séquençage du génome ont été faits chez ces deux espèces. Des tests biochimiques, enzymatiques et de tolérance ont permis d'évaluer les conditions de croissance des bactéries. Pour compléter, le développement de méthodes moléculaires

a permis l'identification de ces nouvelles espèces. Les noms proposés pour ces deux nouvelles espèces sont *Arcobacter lanthierii* et *Arcobacter septicus*.

TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION.....	13
2	REVUE DE LITTÉRATURE.....	15
2.1	TAXONOMIE DES <i>ARCOBACTER</i>	15
2.2	GENOMIQUE DES <i>ARCOBACTERS</i>	17
2.3	IMPORTANCE CLINIQUE	20
2.3.1	<i>Arcobacter</i> chez les humains	20
2.3.2	<i>Arcobacter</i> chez les animaux	21
2.3.3	Facteurs de virulence et pathogénicité	21
2.3.4	Résistance aux antibiotiques	24
2.4	MODES DE TRANSMISSION	25
2.5	METHODES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION.....	27
2.5.1	<i>Isolement</i>	27
2.5.2	<i>Méthodes d'identification phénotypique</i>	28
2.5.3	<i>Méthodes d'identification moléculaires</i>	29
2.5.4	<i>Méthodes d'identification par génotypage</i>	30
3	MATERIELS ET METHODES	33
3.1	SOUCHES BACTERIENNES	33
3.2	ISOLEMENT ET IDENTIFICATION D' <i>ARCOBACTER</i> PROVENANT DE MATIERE FECALE	34
3.2.1	<i>Collection d'échantillons fécaux</i>	34
3.2.2	<i>Isolement d'Arcobacter des échantillons fécaux</i>	34
3.2.3	<i>Extraction d'ADN et préservation des isolats Arcobacter hypothétiques</i>	35
3.2.4	<i>Identification des espèces Arcobacter de la collection fécale d'AAC</i>	36
3.3	CARACTERISATION MICROBIOLOGIQUE.....	38
3.3.1	<i>Condition de croissance et morphologie</i>	38
3.4	RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	38
3.5	CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET ENZYMATIQUE	40
3.5.1	<i>Galleries API</i>	40
3.6	CARACTERISATION GENETIQUE	40
3.6.1	<i>Séquençage de l'ARNr 16S et analyse phylogénétique</i>	40
3.6.2	<i>Séquençage des gènes de ménage</i>	41
3.6.3	<i>Détection des nouvelles espèces avec méthodes connues</i>	41

3.6.4	Séquençage du génome la technologie Illumina	42
3.7	AUTRES ANALYSES	43
3.7.1	Analyses des acides gras méthyles esters (FAMES).....	43
3.8	DEVELOPPEMENT DE METHODES D'IDENTIFICATION	44
3.8.1	Conception des amorces.....	44
3.8.2	Identification des deux nouvelles espèces.....	44
3.8.3	Discrimination des nouvelles espèces parmi les espèces <i>Arcobacter</i> connues.....	45
4	RESULTATS.....	47
4.1	ANALYSES PHYLOGENETIQUES DU GENE DE L'ARNR 16S ET GENES DE MENAGE	47
4.2	CONDITIONS OPTIMALES DE CROISSANCE	52
4.3	CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET BIOCHIMIQUE.....	53
4.4	LES RESULTATS DES METHODES CONNUES D'IDENTIFICATION DES <i>ARCOBACTER</i> SE CONTREDIT	58
4.5	ANALYSES PRELIMINAIRES DU GENOME.....	59
4.6	ACIDES GRAS EN COMMUN AVEC LE GENRE <i>ARCOBACTER</i>	60
4.7	<i>A. SEPTICUS</i> ET <i>A. LANTHIERII</i> SOUS LE MICROSCOPE	62
4.8	NOUVELLES METHODES D'IDENTIFICATION	63
5	DISCUSSION.....	69
5.1	LES NOUVELLES ESPECES APPARTIENNENT AU GENRE <i>ARCOBACTER</i>	69
5.2	CONDITIONS OPTIMALES DE CROISSANCE	70
5.3	CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET ENZYMATIQUE.....	70
5.4	LES ESPECES <i>A. LANTHIERII</i> ET <i>A. SEPTICUS</i> SONT MULTIRESISTANTES.....	71
5.5	GENETIQUE.....	72
5.6	ANALYSES DES ACIDES GRAS	73
5.7	OBSERVATION MICROSCOPIQUE	74
5.8	METHODES D'IDENTIFICATION DES NOUVELLES ESPECES	74
6	CONCLUSION.....	75
7	RÉFÉRENCES.....	77

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 2.1	RÉSULTATS DE TESTS PHÉNOTYPIQUES ET BIOCHIMIQUES DE TOUTES LES ESPÈCES <i>ARCOBACTER</i> *	29
TABLEAU 3.1	SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES DANS CETTE ÉTUDE	33
TABLEAU 3.2	SOURCES DES SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES DANS CETTE ÉTUDE (N=10)	34
TABLEAU 3.3	LISTE DES AMORCES UTILISÉES DANS CETTE ÉTUDE	36
TABLEAU 3.4	LISTE DES AMORCES UTILISÉES DANS CETTE ÉTUDE (SUITE)	37
TABLEAU 3.5	CONCENTRATIONS DES ANTIBIOTIQUES UTILISÉS	39
TABLEAU 4.1	HOMOLOGIE (%) ENTRE LES SÉQUENCES DE L'ARNR 16S D' <i>A. SEPTICUS</i> (N=3) ET <i>A. LANTHIERII</i> (N=6) PAR RAPPORT AUX ESPÈCES RÉFÉRENCES <i>ARCOBACTER</i>	52
TABLEAU 4.2	RÉSULTAT DE CROISSANCE D' <i>A. SEPTICUS</i> (N=4) ET <i>A. LANTHIERII</i> (N=6) À DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES ET CONDITIONS SUR MILIEU ASIA	53
TABLEAU 4.3	RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES À LA VALEUR SEUIL*	54
TABLEAU 4.4	ANALYSES PHÉNOTYPIQUES D' <i>A. SEPTICUS</i> ET <i>A. LANTHIERII</i>	55
TABLEAU 4.5	GALERIE API 20E	56
TABLEAU 4.6	GALERIE API CAMPY	57
TABLEAU 4.7	RÉSULTATS DES MÉTHODES DE PCR CONNUES POUR DÉTECTION DES ESPÈCES <i>ARCOBACTER</i> AVEC LES SOUCHES D' <i>A. SEPTICUS</i> ET <i>A. LANTHIERII</i>	59
TABLEAU 4.8	RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES DU GÉNOME D' <i>A. LANTHIERII</i> AF1430	60
TABLEAU 4.9	PORTION (%) D'ACIDES GRAS MÉTHYLÉS	61
TABLEAU 4.10	FRAGMENTS D'ADN THÉORIQUES ET EXPÉRIMENTAUX POUR LA MÉTHODE RFLP	67

LISTE DES FIGURES

FIGURE 2.1	<i>ARCOBACTER BUTZLERI</i> , IMAGE PRISE PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE (MEB).....	17
FIGURE 2.2	RELATION PHYLOGÉNÉTIQUE DU GÈNE DE L'ARNR 16S (1401 BP) DES ESPÈCES <i>ARCOBACTER</i> PRÉSENTEMENT DÉCRITES.	19
FIGURE 2.3	MÉCANISME DE VIRULENCE OBSERVÉ CHEZ <i>ARCOBACTER</i> DANS DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES (COLLADO <i>ET AL.</i> , 2011A)..	23
FIGURE 4.1	PHYLOGÉNIE DU GÈNE CODANT POUR L'ARNR 16S.	48
FIGURE 4.2	PHYLOGÉNIE DU GÈNE DE MÉNAGE <i>CPN60</i>	49
FIGURE 4.3	PHYLOGÉNIE DU GÈNE DE MÉNAGE <i>GYRB</i>	50
FIGURE 4.4	PHYLOGÉNIE DU GÈNE DE MÉNAGE <i>RPOB</i>	51
FIGURE 4.5	IMAGE D' <i>A. SEPTICUS</i> EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE (MEB) ET EN TRANSMISSION (MET).	62
FIGURE 4.6	IMAGE D' <i>A. LANTHIERII</i> EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE (MEB) ET EN TRANSMISSION (MET).	63
FIGURE 4.7	PCR MULTIPLEX.	64
FIGURE 4.8	PCR SPÉCIFIQUE AU GENRE <i>ARCOBACTER</i>	65
FIGURE 4.9	PROFILE DES FRAGMENTS DES ESPÈCES <i>ARCOBACTER</i> PAR RFLP.	66



LISTE DES ABRÉVIATIONS

#CAT : numéro de catalogue

% GC : taux de guanine et cytosine

AAC : Agriculture et Agroalimentaire Canada

ADN : acide désoxyribonucléique

AFLP : polymorphisme de longueur des fragments amplifiés

AM : *Arcobacter* broth

API : Advance profile index

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

ASIA : *Arcobacter* selective isolation agar

ATCC : American Type Culture Collection

BCCM/LMG : Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms/Laboratory for Microbiology of the Faculty of Sciences of Ghent University

CAT : cefopérazone, amphotéricine B et Tétracycline

CDT : cytolethal-distending toxin

Ctrl - : contrôle négatif

DGGE : Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant

dNTPs : déoxyribonucléotides

DP : direct plating

EC : Environnement Canada

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

ELISA : dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

EMJH : Ellinghausen and McCullough, Johnson and Harris

ERIC-PCR : Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-based PCR

FAME : Fatty acid methyl esters

g : gramme

Gb : Gigabase

IBD : Inflammatory bowel disease

IDT : Integrated DNA Technologies

Ile : Isoleucine

JM : Johnson-Murano

Kb : kilobase

LE GQ : Low electroendosmosis Genetic Quality

m-AAM : modified agarised *Arcobacter* media
Mb : Méga base
mCCDA : modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar
MEB : microscopie électronique à balayage
MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MET : microscopie électronique en transmission
MH : Mueller-Hinton
MLST : Multilocus sequence typing
mPCR : réaction de polymérisation en chaîne multiplex
N.D. : non disponible
pb : paire de bases
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PICRA : Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens
PW : peptone water
RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
RPM : révolution par minute
T : souche type
TAE : Tris Acétate EDTA
Thr : Thréonine
Tm : température d'hybridation
UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
v/v : ratio volume/volume
VP : Voges–Proskauer
VWR : Van Waters and Rogers
WWTP : Waste Water Treatment Plant

1 INTRODUCTION

La caractérisation et l'identification bactérienne sont essentielles de nos jours afin d'obtenir des diagnostics de manière adéquate et définitive. Certaines bactéries sont pathogènes pour l'humain et les animaux, donc peuvent causer des maladies graves ainsi que des infections. Leur identification rapide est devenue primordiale afin de minimiser les risques de propagation et d'épidémie. L'étude des différentes caractéristiques des bactéries permet alors d'anticiper leur capacité de causer des maladies ou des infections et d'en déterminer le traitement. L'identification bactérienne est utilisée dans plusieurs domaines, soit la médecine légale, les investigations criminelles et les études environnementales pour en nommer quelques-uns.

Plusieurs défis sont reliés à la caractérisation et l'identification bactérienne, car les bactéries sont constamment en évolution et s'adaptent souvent à leur environnement. La méthode traditionnelle afin de caractériser une bactérie est l'identification phénotypique qui utilise des méthodes de culture ainsi que des analyses biochimiques et enzymatiques. Cependant, cette méthode peut seulement être utilisée avec des microorganismes cultivables *in vitro*, ce qui n'est pas le cas pour certaines bactéries, comme celles qui habitent dans des conditions extrêmes qui ne peuvent pas être simulées en laboratoire. Il est très difficile de prendre seulement un profil phénotypique afin de classer un microorganisme dans un genre bactérien puisqu'il se peut qu'un certain profil n'existe pas encore ou que deux espèces n'appartenant pas au même genre aient le même profil phénotypique.

Afin d'améliorer la caractérisation et l'identification bactérienne, les méthodes moléculaires sont devenues beaucoup plus populaires. Comparativement à la méthode traditionnelle, utilisant seulement la réaction de la bactérie à certaines analyses dans des conditions spécifiques, les méthodes moléculaires permettent d'utiliser le génome de la bactérie. En utilisant l'ADN, il est possible d'observer beaucoup plus la discrimination bactérienne entre deux espèces.

Les espèces appartenant au genre *Arcobacter* ont initialement été classées dans le genre *Campylobacter* comme étant des «*Campylobacter* aérotolérants». Cependant, en 1991, le groupe de Vandamme a créé un nouveau genre bactérien pour ceux-ci, soit *Arcobacter*. Étant donné qu'*Arcobacter* partage la famille des *Epsilonprotéobactérie* avec *Campylobacter* et *Helicobacter* et que plusieurs espèces de ces deux autres familles sont connues comme étant des pathogènes causant de graves infections gastro-intestinales, il n'est pas surprenant que certaines espèces du genre *Arcobacter* causent aussi ce type d'infections. Les gastro-entérites sont des infections inflammatoires très graves du système digestif causant beaucoup de problèmes dans les hôpitaux. Afin de diminuer

la propagation rapide de ce genre d'infections, l'identification rapide de l'agent responsable est primordiale. En diminuant la propagation, les coûts reliés au traitement de l'infection diminuent aussi puisqu'un traitement rapide peut être immédiatement administré; ce qui limite la transmission de l'infection aux autres patients.

Les espèces *Arcobacter* sont des bactéries sous-estimées, car elles causent des infections graves chez les humains, mais aussi les animaux. Ce genre bactérien est à la hausse avec plus d'une dizaine de nouvelles espèces décrites depuis 2009. L'omniprésence des espèces *Arcobacter* peut être due à la présence de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques étant communément utilisés. Des cas de gastro-entérites chez les humains ainsi que des problèmes de reproduction, des mastites et des cas d'avortements chez les animaux ont été reportés. Les animaux de ferme, domestiques et sauvages sont régulièrement en contact avec les humains, soit dans les abattoirs, les fermes et à la maison. Des espèces *Arcobacter* ont été isolées du porc, de la vache, des poulets et même des carcasses d'animaux. Ceci augmente alors le risque de transmission entre humains et animaux et il est donc nécessaire, sans dire essentiel, de comprendre et identifier autant les *Arcobacter* isolés des humains que des animaux.

Avec un nombre croissant d'espèces caractérisées dans les 10 dernières années ainsi que la présence de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques, l'identification et la caractérisation de nouvelles espèces *Arcobacter* sont très importantes.

L'hypothèse de ce mémoire de recherche est que de nouvelles espèces *Arcobacter* allaient être découvertes dans la collection d'isolats fécaux d'Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC). Le principal objectif était de faire la caractérisation génomique et phénotypique des nouvelles espèces découvertes. Les sous objectifs étaient de faire le séquençage de l'ARNr 16S, de trois gènes de ménage et finalement de séquencer et d'analyser le génome de ces espèces. Des tests phénotypiques utilisant des galeries API, des tests de croissance sur différents milieux et sous différentes conditions, l'analyse de résistance aux antibiotiques, l'analyse des acides gras ainsi que plusieurs autres analyses permettant la caractérisation de nouvelles espèces ont été faites. De plus, des méthodes moléculaires ont été développées et validées pour l'identification subséquente de ces nouvelles espèces.

2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Taxonomie des *Arcobacter*

Le genre *Arcobacter*, de la classe des *Epsilonproteobacteria*, a été introduit en 1991 par le groupe de Vandamme (Vandamme *et al.*, 1991b) afin de discriminer ces bactéries à Gram négatif en forme de bâtonnet légèrement courbé par rapport aux espèces du genre *Campylobacter* (Smibert, 1974). Les espèces *Campylobacter nitrofigilis* (Mcclung *et al.*, 1983) et *Campylobacter cryaerophila* (Neill *et al.*, 1985) ont ainsi été transférées au genre *Arcobacter* avec *A. nitrofigilis* comme espèce type du genre. Les genres *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, *Wolinella* et "*Flexispira*" constituaient initialement la superfamille à ARNr VI. Par contre, plusieurs caractéristiques communes entre le genre *Arcobacter* et *Campylobacter* permettaient de les différencier des autres membres de cette famille et donc la famille *Campylobacteraceae* a aussi été introduite en 1991 afin d'inclure les genres *Arcobacter* et *Campylobacter* dans la même famille (Vandamme *et al.*, 1991a). Les espèces du genre *Arcobacter* sont mobiles à l'aide d'un seul flagelle polaire (Figure 2.1). Leurs conditions de croissance optimale sont en milieu microaérophile (3 à 10% O₂), à l'exception de la plus récente espèce publiée, soit *Arcobacter anaerophilus* pouvant croître en conditions anaérobies obligatoires. Leurs températures de croissance varient entre 15 et 37°C avec la présence d'acides organiques ou aminés comme source de carbone. Il n'y a pas de croissance à 42°C et en présence de 1% glycine. Une croissance est également absente en présence de 0.1% de chlorure de 2,3,5-triphenyltétrazolium. La majorité des espèces possède l'oxydase et la catalase et ont la capacité de faire la réduction du nitrate. Par contre, elles sont incapables de faire l'hydrolyse de l'hippurate, de l'esculine, du sang et de l'amidon, et la liquéfaction de la gélatine. Les *Arcobacter* sont inaptes à la production d'indoles, ainsi qu'à l'oxydation et la fermentation des hydrates de carbone (Vandamme *et al.*, 1991b).

Les espèces *Arcobacter* ont été isolées d'une variété de sources, et il existe présentement 18 espèces décrites dans la littérature. Les premières espèces isolées sont *A. nitrofigilis* (Mcclung *et al.*, 1983) provenant de racines de la plante de marais salés *Spartina alterniflora* et *A. cryaerophilus* (Neill *et al.*, 1985) isolé de diverses sources, soit des fèces, de tractus reproductifs et de fœtus d'avortement de plusieurs animaux de ferme ainsi que du lait de vaches laitières ayant une mastite. Plusieurs ont été isolées de sources environnementales : *A. halophilus*, de lagon hypersaline (Donachie *et al.*, 2005); *A. mytili* (Collado *et al.*, 2009a), *A. molluscorum* (Figueras *et al.*, 2011a), *A. ellisii* (Figueras *et al.*, 2011b), *A. bivalviorum* et *A. venerupis* (Levican *et al.*, 2012), de crustacés; *A. marinus*, d'étoile de

mer et d'eau de mer (Kim *et al.*, 2010); *A. defluvii* (Collado *et al.*, 2011b) et *A. cloacae* (Levican *et al.*, 2013), des eaux usées. Les autres espèces proviennent de sources animales ou humaines : *A. butzleri*, de fèces humaines (Kiehlbauch *et al.*, 1991); *A. skirrowii* (Vandamme *et al.*, 1992b) et *A. theaeus* (Houf *et al.*, 2009), de fèces animales; *A. cibarius* (Houf *et al.*, 2005) ainsi que *A. suis* (Levican *et al.*, 2013), de carcasses animales; *A. trophiarum* (De Smet *et al.*, 2011b), de porcs engraisés et récemment *A. anaerophilus*, d'un sédiment estuarien (Sasi Jyothsna *et al.*, 2013). Plusieurs études sur la prévalence des espèces *Arcobacter* ont démontré aussi leur omniprésence dans plusieurs domaines. Dans le domaine de l'agriculture, les espèces *Arcobacter* sont retrouvées chez les bœufs de boucherie et les vaches laitières (Golla *et al.*, 2002), les poulets (Atabay *et al.*, 1998b, Atanassova *et al.*, 2008, Lipman *et al.*, 2008), les porcs (De Smet *et al.*, 2011a, Suarez *et al.*, 1997), d'avortements d'animaux de ferme (De Oliveira *et al.*, 1997, On *et al.*, 2002, Schroeder-Tucker *et al.*, 1996) et les bisons (Piva *et al.*, 2013). Les espèces *Arcobacter* sont aussi présentes au niveau de la transformation alimentaire du poulet (Harvey *et al.*, 1999, Houf *et al.*, 2002, Son *et al.*, 2007b), de la dinde (Andersen *et al.*, 2007), du bœuf emballé et congelé (Balamurugan *et al.*, 2013), et même dans les épinards (Hausdorf *et al.*, 2013) et la laitue (González *et al.*, 2011). De nombreuses études ont évalué la prévalence d'*Arcobacter* dans des usines de traitement des eaux usées, qui était probablement causée par une contamination fécale humaine. La présence d'*Arcobacter* peut être associée directement à l'usine (Collado *et al.*, 2010, Jacob *et al.*, 1998, Stampi *et al.*, 1999, Stampi *et al.*, 1993), à la tuyauterie (Assanta *et al.*, 2002) ou simplement à l'eau potable (Ertas *et al.*, 2010, Jacob *et al.*, 1993, Jacob *et al.*, 1998), et plus récemment même à des sédiments (Sasi Jyothsna *et al.*, 2013). L'ubiquité de ce genre bactérien est très bien représentée par la variété de régions du monde où il se retrouve, soit au Niger (Adesiji *et al.*, 2011, Amisu *et al.*, 2003), au Danemark (Atabay *et al.*, 2006), en Italie (Fera *et al.*, 2009, Stampi *et al.*, 1993), en Allemagne (Jacob *et al.*, 1993), en Antarctique (Teixeira *et al.*, 2010), en Belgique (Van Driessche *et al.*, 2007), en Espagne (Vilar *et al.*, 2010), en Turquie (Atabay *et al.*, 2003, Aydin *et al.*, 2007), au Japon (Kabeya *et al.*, 2004), en Corée (Lee *et al.*, 2010) ainsi qu'en République tchèque (Pejchalová *et al.*, 2008).

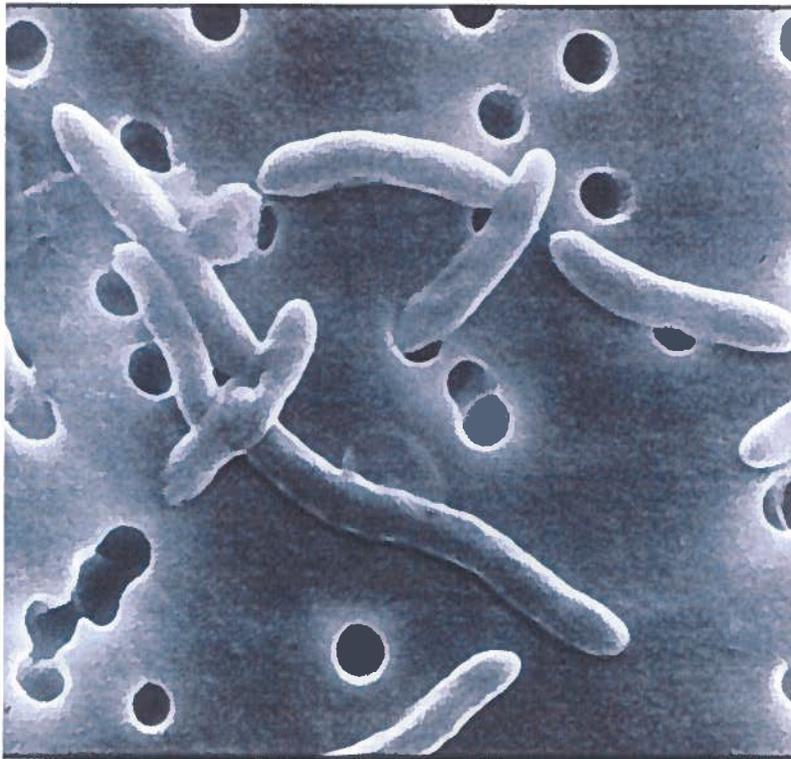


Figure 2.1 *Arcobacter butzleri*, image prise par microscopie électronique à balayage (MEB).

2.2 Génomique des *Arcobacters*

Jusqu'à maintenant, seulement deux génomes du genre *Arcobacter* ont été totalement séquencés, soit la souche humaine d'*A. butzleri* RM4018 (Miller *et al.*, 2007) et l'espèce type du genre *Arcobacter*, *A. nitrofigilis* DSM 7299^T (Pati *et al.*, 2010). Le génome d'*A. butzleri* est de 2.34 Mb et contient 2 259 séquences codantes; 1 011 protéines prédites ont été attribuées à une fonction spécifique, 505 avaient seulement un rôle général et 743 avaient une fonction inconnue. Selon cette étude, plusieurs gènes ont un rôle dans le métabolisme du soufre; le reste étant généralement pour la croissance et la survie de la bactérie (Miller *et al.*, 2007). Le génome d'*A. nitrofigilis*, quant à lui, est de 3,19 Mb et contient 3 224 gènes prédits. La grande majorité de ces gènes, 3 154 d'entre eux, codent pour les protéines dont 72,1% ont une fonction hypothétique. La différence de taille du génome entre *A. butzleri* (2.34 Mb) et *A. nitrofigilis* (3.19 Mb) pourrait être causée par une adaptation d'*A. nitrofigilis* à son environnement au lieu d'un hôte (Collado *et al.*, 2011a). Le génome d'autres souches a aussi été séquencé, comme la souche bovine d'*Arcobacter butzleri*, qui a montré une très grande divergence des locus impliqués dans la perception de stimuli de l'environnement et de la survie comparée à la souche humaine RM4018 (Sloane *et al.*, 2009). Des résultats préliminaires du génome

d'*A. halophilus* LA31B^T confirment qu'il y a des gènes communs avec *A. butzleri* (RM4018); par contre cette espèce a aussi des gènes uniques qui pourraient expliquer la capacité à celle-ci de s'adapter à de grandes concentrations de sels (Wesley *et al.*, 2010).

La figure 2.2 illustre la relation phylogénétique du gène de l'ARNr 16S des espèces actuellement décrites (Levican *et al.*, 2013). Les espèces *Arcobacter* ont entre 91 à plus de 99% d'homologie entre elles dans leurs séquences de l'ARNr 16S; *A. cloacae* et *A. ellisii* ayant 99,6% de similarité (Levican *et al.*, 2013). Ceci rend la discrimination de celles-ci de plus en plus difficile. La méthode de classification bactérienne utilisant le gène de l'ARNr 16S, introduit en 1977 (Fox *et al.*, 1977), semble être de moins en moins un bon outil discriminatoire lors de la comparaison d'espèce du même genre (Fox *et al.*, 1992, Woo *et al.*, 2008). D'autres gènes conservés, appelés gènes de ménage codant pour des protéines exprimées de manière constante dans la cellule, sont maintenant utilisés afin de remplacer l'ARNr 16S comme outil de classification. Ces gènes de ménage sont principalement *hsp60* (*cpn60*) (Goh *et al.*, 1996, Hill *et al.*, 2004), *gyrB* (Dauga, 2002, Kasai *et al.*, 1998) et *rpoB* (Mollet *et al.*, 1997). Ces gènes sont également utilisés comme outil de comparaison aux analyses de phylogénie de l'ARNr 16S avec les espèces *Arcobacter* récemment publiées (Collado *et al.*, 2009a, Collado *et al.*, 2011b, De Smet *et al.*, 2011b, Figueras *et al.*, 2011a).

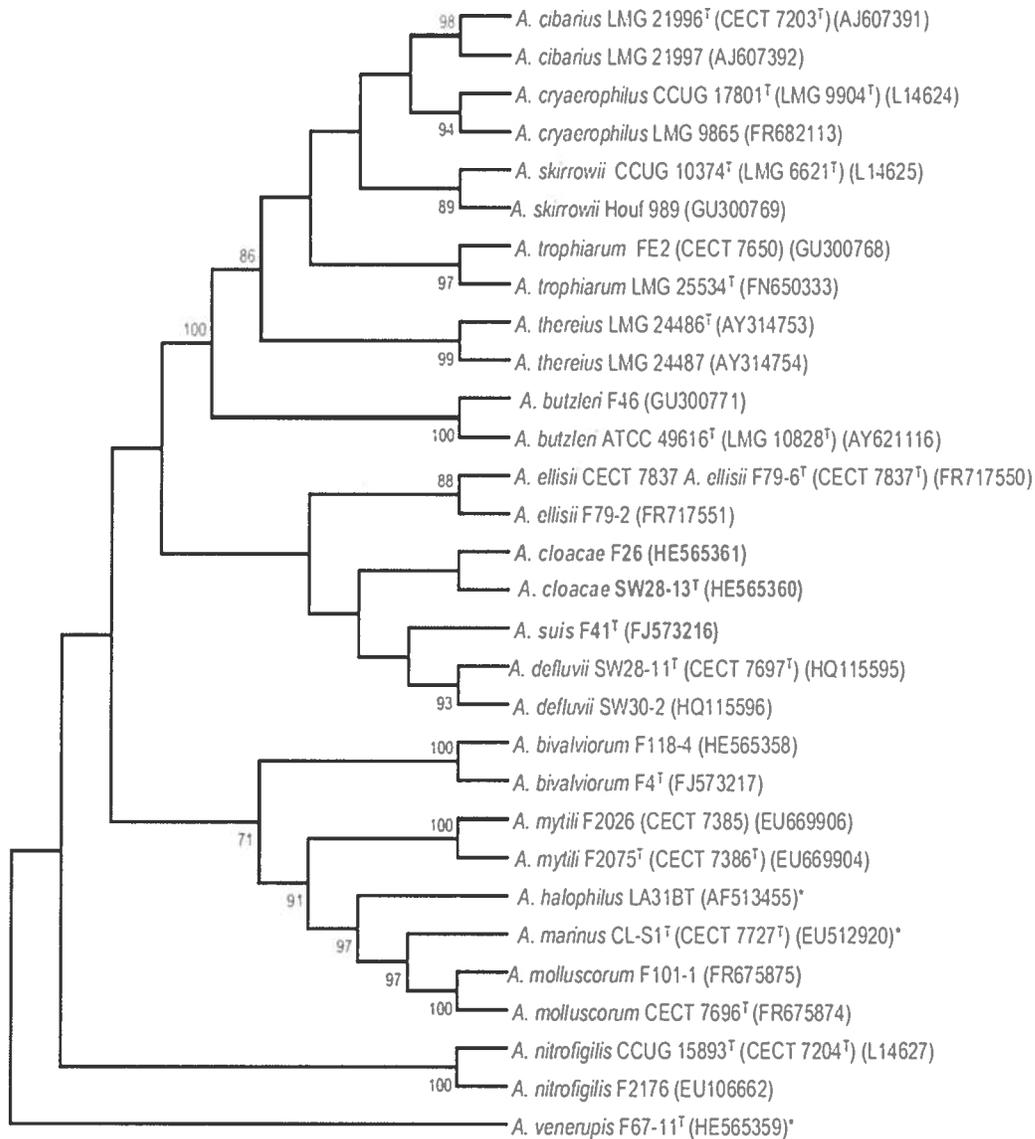


Figure 2.2 Relation phylogénétique du gène de l'ARNr 16S (1401 bp) des espèces *Arcobacter* présentement décrites.

Arbre phylogénétique de Maximum Parcimonie, Bootstrap d'une valeur de $\geq 70\%$ avec 1000 répliquions est présenté aux nœuds. L'espèce *Arcobacter anaerophilus* n'est pas présente dans cet arbre phylogénétique.

2.3 Importance clinique

2.3.1 *Arcobacter* chez les humains

L'espèce *Campylobacter cryaerophila* (*A. cryaerophilus*) a été la première espèce isolée d'un spécimen humain (Tee *et al.*, 1988). Depuis, plusieurs espèces *Arcobacter* ont été retrouvées chez les humains (Vandenberg *et al.*, 2004), surtout *A. butzleri*, étant la 4^e espèce bactérienne, précédée par *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli* et *C. upsaliensis*, la plus souvent isolée parmi 67 599 spécimens fécaux dans cette étude. Les espèces *A. skirrowii*, *A. cryaerophilus* et *A. butzleri* ont été initialement considérées des pathogènes émergents potentiels (Mansfield *et al.*, 2000, Phillips, 2001). La pathogénicité de ces espèces est souvent reliée aux maladies gastroentériques (Jiang *et al.*, 2010, Lee *et al.*, 2012, Prouzet-Mauléon *et al.*, 2006). Selon l'espèce, différents symptômes peuvent être observés. Les complications communes aux infections causées par *A. butzleri* sont principalement des gastroentérites avec une diarrhée liquide et persistante (Lerner *et al.*, 1994, Prouzet-Mauléon *et al.*, 2006) ainsi que des crampes abdominales (Vandamme *et al.*, 1992a). Les espèces *A. butzleri* et *A. cryaerophilus* ont été aussi associées à des cas de bactériémies chez les nouveau-nés (On *et al.*, 1995), les victimes d'un accident de voiture (Woo *et al.*, 2001), les patients avec une appendicite gangreneuse aiguë (Lau *et al.*, 2002) et un patient souffrant d'une cirrhose (Yan *et al.*, 2000). L'espèce *A. cryaerophilus* est également associé à des diarrhées chroniques (Wybo *et al.*, 2004). Les espèces *Arcobacter* sont souvent associées à la diarrhée du voyageur dans plusieurs études (De La Cabada Bauche *et al.*, 2011, Dupont, 2009, Hill *et al.*, 2010, Jiang *et al.*, 2010, Mandisodza *et al.*, 2012). Des espèces *Arcobacter* ont aussi été isolées de selles humaines de gens asymptomatiques (Houf *et al.*, 2007, Samie *et al.*, 2007, Vandenberg *et al.*, 2004).

2.3.2 *Arcobacter* chez les animaux

Les espèces *Arcobacter* sont considérées comme étant des agents zoonotiques (Ho *et al.*, 2006a, Villalobos *et al.*, 2013), ce qui leur permet de transférer d'hôte, soit d'humain à animal ou vice-versa. Les animaux sont alors une source importante de contamination chez les humains par contact avec les animaux de ferme, domestiques et sauvages. Les complications importantes chez les animaux sont des avortements, des mastites ainsi que des diarrhées. Des cas de mastites ont été documentés (Logan *et al.*, 1982) chez un troupeau de vaches laitières où la présence d'un *Campylobacter*-aérotolérant (*Arcobacter*) dans les échantillons de lait a été détectée. Des espèces *Arcobacter*, soit 5 souches d'*A. cryaerophilus* et une souche d'*A. butzleri*, ont été isolées à partir de 32 échantillons de lait provenant d'une ferme de vaches laitières ayant des mastites au Brésil (Pianta *et al.*, 2007). Les *Arcobacter* peuvent aussi causer des problèmes de reproduction (De Oliveira *et al.*, 1997) et des avortements (De Oliveira *et al.*, 1997, Neill *et al.*, 1979, On *et al.*, 2002) chez les animaux de ferme, principalement chez les porcs. L'espèce *A. cryaerophilus* est le plus souvent associée aux avortements chez des animaux (De Oliveira *et al.*, 1997, On *et al.*, 2003). Comme chez les humains, les *Arcobacter* peuvent être isolées d'animaux ayant des diarrhées, mais aussi chez des moutons et bovins ayant des colites hémorragiques (Ho *et al.*, 2006a, Vandamme *et al.*, 1992b). Dans certains cas, visant souvent les poulets (Atabay *et al.*, 1997, Atabay *et al.*, 2006), la présence d'*Arcobacter* ne semble pas être associée à une infection ou une maladie quelconque. Certaines études vont jusqu'à conclure qu'*Arcobacter* est naturellement présent chez le poulet (Ho *et al.*, 2008a, Lipman *et al.*, 2008) et même le porc (Ho *et al.*, 2006b). Le genre *Arcobacter* peut aussi être retrouvé chez des espèces exotiques en santé (Stirling *et al.*, 2008, Wesley *et al.*, 2003) et des primates non humains (Anderson *et al.*, 1993, Higgins *et al.*, 1999). Normalement, les espèces *Arcobacter* sont strictement retrouvées chez les mammifères, et seulement une étude indique la présence d'*A. cryaerophilus* chez une truite arc-en-ciel (Yildiz *et al.*, 2006). Dans cette dernière étude, la bactérie aurait causé la mort du poisson en causant des dommages à ses organes.

2.3.3 Facteurs de virulence et pathogénicité

Seulement quelques études ont été publiées concernant les facteurs de virulence chez les espèces *Arcobacter*. Conséquemment, le rôle de ces facteurs et le mécanisme de pathogénicité ne sont pas très bien élucidés jusqu'à maintenant. Cependant, il existe plusieurs études sur leur capacité d'adhésion, d'invasion et de cytotoxicité chez de nombreuses lignées cellulaires. La toxicité et l'adhérence sont les effets les plus documentés. Une étude en 2008 a démontré le rôle du gène *flaA*

dans la motilité d'*A. butzleri* (Ho *et al.*, 2008b). Normalement, les flagellines *flaA* et *flaB* sont adjacentes et donc accomplissent ensemble le processus de motilité bactérienne chez les *Epsilonproteobactérie*. Par contre, dans le cas d'*Arcobacter*, seulement le gène *flaA* est nécessaire, ce qui les distingue du genre *Campylobacter* et *Helicobacter*. De plus, il y a une faible homologie entre les flagellines parmi les espèces du genre *Arcobacter*, ce qui permet de mieux discriminer les espèces de ce genre (Ho *et al.*, 2008b). Malgré le fait que *flaA* est impliqué dans la motilité d'*A. butzleri*, il n'a pas été démontré que ce gène est impliqué dans la colonisation de l'intestin. Le séquençage du génome complet d'*A. butzleri* a permis de déterminer les gènes potentiellement impliqués dans la virulence de la bactérie. Des homologues des gènes codant pour des protéines de liaison à la fibronectine *cadF* et *cj1349*, de la protéine d'invasion CiaB, ainsi que de virulence MviN, de la phospholipase PldA et de l'hémolysine TlyA ont été retrouvés chez la souche *A. butzleri* RM4018. De plus, deux autres déterminants de virulence ont été découverts, soit *irgA* et *hecAB* (Miller *et al.*, 2007). Ces mêmes gènes ont été utilisés dans une autre étude en 2012 sur les gènes de virulence hypothétiques chez *Arcobacter* (Doudah *et al.*, 2012). De plus récents résultats ont démontré que les gènes mentionnés ci-haut, avec l'ajout de l'enzyme périplasmique IroE impliquée dans l'acquisition du fer, ont été identifiés par PCR chez 52 souches d'*A. butzleri* (Karadas *et al.*, 2013). Le rôle spécifique et l'expression de ces gènes de virulence hypothétiques chez les espèces *Arcobacter* ne sont pas encore connus; cependant, ces résultats soulignent leur potentiel de causer des infections et des maladies humaines et animales. Une cytotoxine présente chez *Campylobacter*, «cytolethal-distending toxin» (CDT), n'est pas présente chez *Arcobacter* (Miller *et al.*, 2007). Ces résultats concordent avec des résultats obtenus dans une autre étude où cette cytotoxine n'a pas été retrouvée chez des souches d'*A. cryaerophilus* et d'*A. butzleri* (Villarruel-López *et al.*, 2003). Bref, les gènes impliqués dans la cytotoxicité des espèces *Arcobacter* sont toujours inconnus. Des études ont initialement découvert qu'*A. butzleri* avait la capacité de causer des effets cytotoxiques à l'aide de tests *in vitro* dans des cellules humaines et animales. Une invasion des cellules n'a jamais été documentée; par contre, une cytotoxicité était apparente parmi les souches utilisées (Musmanno *et al.*, 1997). Certaines études ont su démontrer un aperçu de leur mécanisme d'infection, surtout par rapport aux cellules épithéliales de l'intestin (Bücker *et al.*, 2009, Carbone *et al.*, 2003, Fernández *et al.*, 1995, Ho *et al.*, 2007). Des recherches ont montré que les *Arcobacter* sont présents dans les hôpitaux (Minaeva *et al.*, 2006b). Une étude réalisée en 1995 a tenté d'élucider le mécanisme de pathogénicité d'*A. cryaerophilus*. Les résultats ont démontré que cette espèce a été assimilée aux cellules Hep-2; ce qui a produit une accumulation de fluide et d'électrolytes dans le lumen du rat indiquant la présence de substances toxiques (Fernández *et al.*, 1995). L'induction de l'expression de l'interleukine-8 pro-inflammatoire (IL-8) est un facteur de virulence important chez *Helicobacter pylori* et *Campylobacter*,

mais également chez les bactéries *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* et *A. cibarius* (Ho *et al.*, 2007). Le mécanisme de virulence d'*Arcobacter* est illustré par la figure 2.3 (Collado *et al.*, 2011a). Dans une autre étude, l'espèce *A. cibarius* a démontré la plus grande habileté d'invasion de cellules humaines de type Caco-2 et porcine IPI-2I. Par contre, seulement l'espèce *A. cryaerophilus* a été capable d'intégrer les cellules épithéliales de l'intestin. De plus, les huit souches d'*Arcobacter* ont toutes adhéré aux deux types de cellules et ont induit la production de IL-8; démontrant une réponse immunitaire (Ho *et al.*, 2007). Une étude sur l'espèce *A. butzleri* a aussi illustré son effet sur les cellules épithéliales de l'intestin en démontrant que celle-ci induit des dysfonctions au niveau de la barrière épithéliale en changeant les protéines des jonctions serrées et causant ainsi l'apoptose (Bücker *et al.*, 2009). Malgré son omniprésence, le genre *Arcobacter* semble être sous-estimé par rapport à la santé humaine (Ho *et al.*, 2006a, Hoi *et al.*, 2008, Minaeva *et al.*, 2006b, Prouzet-Mauléon *et al.*, 2006).

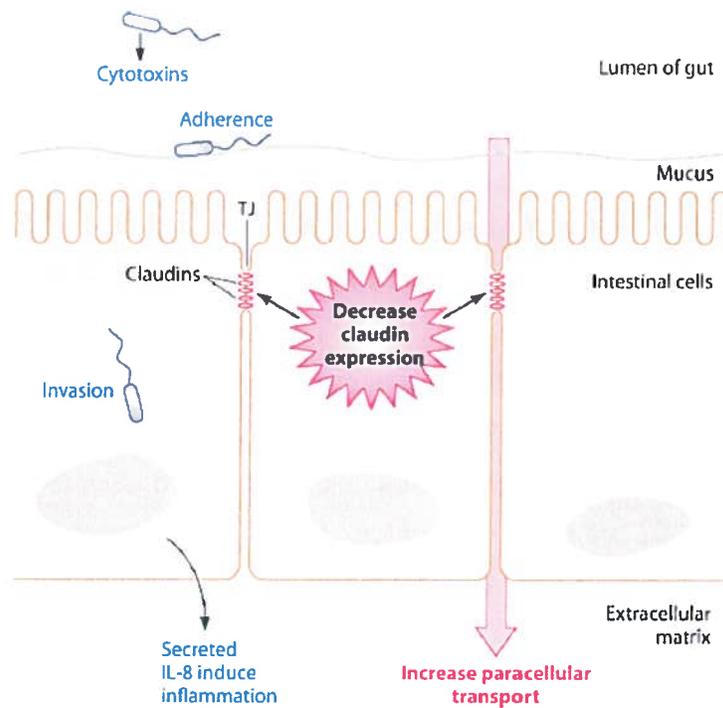


Figure 2.3
al., 2011a).

Mécanisme de virulence observé chez *Arcobacter* dans différentes lignées cellulaires (Collado *et*

2.3.4 Résistance aux antibiotiques

La résistance et la susceptibilité aux antibiotiques chez *Arcobacter* ont été évaluées par différentes méthodes, soit par le Etest, la dilution d'agar, la diffusion de disque sur agar ou encore par la microdilution; il n'existe donc pas de méthode normalisée. Certains milieux sélectifs pour *Arcobacter* comprennent des antibiotiques qui peuvent inhiber la croissance d'espèces spécifiques. Houf a confirmé en 2001 que trois espèces, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* et *A. skirrowii*, sont susceptible à la colistine et à la rifampine. Par contre, aucune inhibition de croissance n'a été remarquée chez ces trois espèces avec les antibiotiques suivants: 5-fluorouracile, novobiocine, triméthoprim, vancomycine et téicoplanine (Houf *et al.*, 2001b). Une étude déterminant la résistance chez 39 souches d'*A. butzleri* à 23 agents antimicrobiens utilisés contre des maladies infectieuses chez les humains et les animaux a démontré que toutes les souches étaient résistantes aux antibiotiques suivants: aztréonam, sodium de céfuroxime, céfalotine, orbenine, oxacilline, pénicilline G et triméthoprim/sulfaméthoxazole (Atabay *et al.*, 2001). Les résultats du séquençage du génome complet d'*A. butzleri* RM4018 sont en accord, en partie, avec les résultats de cette dernière étude. La souche d'*A. butzleri* RM4018 est résistante à 42 des 65 antibiotiques évalués. Une résistance a été observée avec tous les macrolides et les sulfamides testés, ainsi que pour tous les antibiotiques de type β -lactame à l'exception de la céphalosporine ceftazidime. La souche RM4018 est résistante à certaines quinolones, soit l'acide nalidixique, l'acide oxolinique, le chloramphénicol et le 5-fluorouracile. Certains gènes spécifiques ont été associés à la résistance aux antibiotiques, comme le gène *cat* permettant une résistance au chloramphénicol (Miller *et al.*, 2007). Dans d'autres cas, une simple mutation d'un gène peut engendrer une résistance. Par exemple Abdelbaqi et collègues ont trouvé chez deux souches d'*A. butzleri* et une d'*A. cryaerophilus* une mutation Thr→Ile à l'acide aminé 85 du gène *gyrA* permettant alors à ces souches une résistance à la ciprofloxacine (Abdelbaqi *et al.*, 2007b). Fera *et coll.* en 2003 ont démontré que des isolats d'*A. butzleri* et d'*A. cryaerophilus* avaient une grande résistance aux pénicillines, aux macrolides, au chloramphénicol, à la triméthoprim et la vancomycine (Fera *et al.*, 2003). Une étude de comparaison entre des espèces affiliées aux genres *Arcobacter* et *Campylobacter* isolées de carcasses de poulet a conclu que leur résistance aux antibiotiques était très similaire. Les deux genres partagent une résistance élevée à la clindamycine, l'azithromycine et l'acide nalidixique (Son *et al.*, 2007a). De plus récentes expériences ont suggéré l'utilisation de la gentamicine, la streptomycine et la tétracycline (Abay *et al.*, 2012) ainsi que l'enrofloxacine (Shah *et al.*, 2013) comme antibiotiques afin de traiter les infections causées par *Arcobacter* autant chez les humains que chez les animaux.

2.4 Modes de transmission

Comme la majorité des infections bactérienne, il est important d'isoler la personne infectée afin de ne pas propager l'infection de personne-à-personne. La contamination de personne-à-personne est un mode de transmission commun chez le genre *Arcobacter* étant donné qu'il est reconnu comme un agent nosocomial (Minaeva *et al.*, 2006b). Lors d'une épidémie par *A. butzleri* dans une garderie en Italie en 1983, les délais de temps très court entre chaque cas d'infection suggèrent une transmission de personne-à-personne (Vandamme *et al.*, 1992a). Le premier cas d'infection néonatale par *A. butzleri* en 1995, impliquant un nouveau-né avec une bactériémie, est un autre exemple de transmission de personne-à-personne. La mère n'avait pas d'infection avant l'accouchement suggérant alors une transmission *in utéro* (On *et al.*, 1995).

La majorité des espèces *Arcobacter* ont été isolées de sources animales ou aquatiques, ce qui suggère que leurs principales routes de transmission sont l'eau et les animaux. L'eau peut être une source de contamination pour les humains et les animaux. Les espèces *Arcobacter* ont été retrouvées dans plusieurs types de réservoirs d'eau, soit les rivières (Collado *et al.*, 2010, Mukherjee *et al.*, 2013), les lacs (Lee *et al.*, 2012, Maugeri *et al.*, 2000), la mer (Donachie *et al.*, 2005, Fera *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2010, Maugeri *et al.*, 2005) et l'eau souterraine (Fong *et al.*, 2007, Rice *et al.*, 1999). Seulement les espèces *A. marinus* et *A. halophilus* proviennent naturellement des eaux environnementales (Donachie *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2010). La contamination par les effluents de ferme (Chinivasagam *et al.*, 2007) ainsi que par les matières fécales du bétail (Van Driessche *et al.*, 2003) pourrait expliquer la contamination des eaux. La présence d'*Arcobacter* dans l'eau a déjà été reliée à une contamination fécale, suggérant qu'il peut être un indicateur de la pollution fécale dans l'eau (Collado *et al.*, 2008). Il a déjà été prouvé que la baignade peut causer une infection gastro-intestinale par l'ingestion de l'eau ou par contact seulement (Soller *et al.*, 2010). Les *Arcobacter* peuvent aussi infecter leur hôte via la baignade (Lee *et al.*, 2012) ou par l'ingestion d'eau potable (Ertas *et al.*, 2010, Jacob *et al.*, 1993). Les *Arcobacter* ont aussi été souvent reliés aux usines de traitements des eaux usées (McClellan *et al.*, 2010, Stampi *et al.*, 1993). Leur présence dans celles-ci est probablement due au fait qu'*Arcobacter* a la capacité d'adhérer et former des biofilms sur la tuyauterie (Assanta *et al.*, 2002). Cependant, le traitement des eaux usées dans les usines a prouvé être efficace, car les espèces *A. butzleri* et *A. cryaerophilus* n'étaient plus présentes à la fin du traitement (Collado *et al.*, 2010). Les effets du chlore (Moreno *et al.*, 2004) et d'autres produits, soit différents acides, herbes et épices (Cervenka *et al.*, 2004, Cervenka *et al.*, 2006), sur la persistance d'*A. butzleri* dans l'environnement ont été documentés; les résultats ont démontré une inhibition de la croissance. Bref, l'eau est un réservoir et une source de contamination pour les humains et les

animaux par l'entremise de résistance aux changements de température et à la présence de matière organique dans l'eau. *A. butzleri* est l'espèce clinique la plus alarmante et la plus persistante aux changements de température (Van Driessche *et al.*, 2008). Ceci démontre que le genre bactérien *Arcobacter* est un risque pour la santé publique grâce à sa survie dans les eaux environnementales.

Comme discuté dans la section 2.3 de ce mémoire, les *Arcobacter* peuvent être présents dans les aliments à travers les différents procédés de transformation. En 2009, un article a compilé les résultats de 15 études sur la présence d'*Arcobacter* dans différents produits de source animale. Les *Arcobacter* étaient le plus souvent retrouvés dans les palourdes, suivi du poulet, du porc, du mollusque et du canard. Aucune espèce *Arcobacter* n'a été retrouvée dans les huîtres, les crevettes congelées ou les saucisses (Collado *et al.*, 2009b). La majorité des études sur la contamination des aliments provenant de source animale étaient sur les produits du poulet (Gude *et al.*, 2005), du porc (Van Driessche *et al.*, 2007), du bœuf (Hamill *et al.*, 2008) et du lait (Scullion *et al.*, 2006). Des espèces *Arcobacter* sont de plus en plus isolées des fruits de mer. Plusieurs des dernières espèces caractérisées proviennent de fruits de mer, soit *A. mytili*, *A. molluscorum*, *A. ellisii*, *A. bivalviorum*, *A. venerupis* et *A. cloacae*. Les *Arcobacter* ne sont pas seulement présents chez les animaux, mais aussi chez les légumes. Une étude sur la contamination de la laitue fraîche a conclu que 10 des 50 échantillons contenaient des espèces *Arcobacter* (González *et al.*, 2011). Étant donné que les fruits de mer et les légumes sont souvent mangés crus, ceci peut causer un risque élevé de contamination seulement par ingestion de ces aliments. C'est pour ces raisons qu'*Arcobacter* fait maintenant partie du « Microbiological testing in food safety management » (Icmsf, 2002) et devient de plus en plus un risque pour les animaux et les aliments provenant de source animale (Shah *et al.*, 2011).

Les espèces *Arcobacter* peuvent aussi être retrouvées chez les animaux domestiques et sauvages, et causer des infections par contact avec les humains et autres animaux. Elles ont été isolés de chats en santé et malades dans 78,8% des cas dans une étude par Fera *et coll.* (Fera *et al.*, 2009), mais seulement 3,3% des cas reportés par Fernandez (Fernández *et al.*, 2007). Toutefois, dans une autre étude, aucune espèce *Arcobacter* n'a été isolée de chats, mais certaines ont été retrouvés chez quelques chiens (Houf *et al.*, 2008). Il a également été reporté qu'*Arcobacter* était présent chez les oies domestiques qui pourraient être la cause de leur dissémination (Atabay *et al.*, 2008). Quelques études ont mentionné la présence d'*Arcobacter* chez certains animaux sauvages. Les rats laveurs (*Procyon lotor*) ont des espèces *Arcobacter* dans leurs intestins, et seraient une source de contamination étant donné leur cohabitation avec les humains en milieu urbain (Hamir *et al.*, 2004). La présence d'*Arcobacter* chez les animaux exotiques et non domestiques a été observée chez la tortue Galapagos, les rhinocéros blancs et noirs, la gazelle, le nandou, et l'alpaga (Wesley *et*

al., 2003). Les infections par *Arcobacter* peuvent également se transmettre d'animal à animal souvent par l'intermédiaire du système reproducteur, comme dans le cas des truies, où la transmission de la bactérie à leur progéniture s'est faite lors de la mise bas en raison la présence d'*Arcobacter* dans le rectum et le liquide amniotique des mères (Ho *et al.*, 2006b).

2.5 Méthodes d'isolement et d'identification

2.5.1 Isolement

Aucune méthode normalisée n'existe jusqu'à maintenant pour isoler *Arcobacter*. Par contre, les premiers *Arcobacter* ont été isolés à partir d'une variété de sources sur un milieu Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) *Leptospira* (Ellis *et al.*, 1977). La méthode la plus communément utilisée est l'utilisation d'un bouillon d'enrichissement avec l'ajout de trois antibiotiques, soit le céfopérazone, l'amphotéricine B et le téicoplanine (supplément CAT). Une incubation dans ce milieu est suivie d'une filtration passive du bouillon sur un filtre de 0.45 µm afin d'incuber ce filtre sur un milieu solide de sang (Atabay *et al.*, 1997, Atabay *et al.*, 1998a). Le milieu Johnson-Murano (JM) (Johnson *et al.*, 1999a, Johnson *et al.*, 1999b) a aussi été proposé en utilisant également du céfopérazone, mais avec l'ajout de l'antibiotique 5-fluorouracile comme suppléments sélectifs permettant ainsi l'inhibition des bactéries hétérotrophes. Une bonne croissance d'*Arcobacter* a été obtenue avec le milieu JM avec une inhibition accrue des autres bactéries. D'autres études de comparaison de milieux ont aussi prouvé que l'isolement sur milieu JM est le plus efficace pour la croissance des *Arcobacter* provenant de viande en vente sur le marché (Hamill *et al.*, 2008, Ohlendorf *et al.*, 2002). Le milieu mCCDA (modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar) est normalement utilisé afin d'isoler *Campylobacter*, mais dans certain cas il peut être combiné avec un milieu liquide sélectif afin d'isoler efficacement *Arcobacter* (Merga *et al.*, 2011). De plus, certaines études ont démontré que l'utilisation du milieu mCCDA seulement semble augmenter le taux de récupération d'*Arcobacter* (Scullion *et al.*, 2004). À l'aide d'une étude de résistance aux antibiotiques conduite par Houf *et coll.* (Houf *et al.*, 2001a), un nouveau milieu contenant cinq antibiotiques, soit le 5-fluorouracile, la novobiocine, l'amphotéricine B, le céfopérazone et la triméthoprime, dans un bouillon ainsi que dans un milieu solide est devenu très populaire. Seul ce milieu a été validé afin d'isoler des *Arcobacter* de fèces humaines (Houf *et al.*, 2007). Ce milieu a été modifié légèrement avec l'ajout du cycloheximide et en augmentant la concentration de novobiocine afin de permettre la croissance d'*Arcobacter* provenant de matière fécale animale (Van Driessche *et al.*, 2003). Un milieu d'enrichissement liquide et solide sélectif pour *Arcobacter* sous conditions aérobies à 24°C a permis à

l'équipe de Boer d'effectuer la croissance d'*Arcobacter* provenant de viande en vente sur le marché (De Boer *et al.*, 1996). L'isolement de celui-ci se fait dans les conditions microaérophiles à 30°C (Vandamme *et al.*, 1991b). Selon la source, différents milieux peuvent être utilisés et ceci rend le consensus pour l'application d'une méthode standard plus difficile. Les difficultés les plus rapportées sont l'inhibition de certaines espèces lors de l'utilisation de différents antibiotiques et la croissance d'autres espèces bactériennes non désirées.

2.5.2 Méthodes d'identification phénotypique

Concernant la croissance, les *Arcobacter* peuvent être différenciés de *Campylobacter* grâce à leur capacité de croître en présence d'oxygène et à des températures plus basses, soit entre 15°C et 37°C. Ils ne croissent pas à 42°C contrairement à *Campylobacter* (On, 2001). Morphologiquement, ces deux genres bactériens peuvent être très similaires. Ils sont tous deux Gram négatif, en forme de bâtonnet spiral, mobile à l'aide d'un flagelle polaire ou bipolaire (Neill *et al.*, 1979, Vandamme *et al.*, 1991a, Vandamme *et al.*, 1991b). Des tests phénotypiques et biochimiques peuvent être utilisés afin de discriminer les espèces du genre *Arcobacter* (On *et al.*, 1996). Avec un nombre accru d'espèces caractérisées, ces tests deviennent de moins en moins efficaces pour identifier les différentes espèces. Le tableau 2.1 résume les tests phénotypiques et biochimiques utiles ainsi que le résultat attendu pour chaque espèce publiée jusqu'à maintenant (Levican *et al.*, 2013).

Tableau 2.1 Résultats de tests phénotypiques et biochimiques de toutes les espèces *Arcobacter**

Caractéristiques	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Motilité	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Croissance sur/dans conditions																			
37°C aérobie	+	-	V(-)	V(+)	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
37°C microaérobie	+	-	-	V(+)	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
42°C microaérobie	-	-	-	-	V(+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
0.5% (w/v) NaCl	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4% (w/v) NaCl	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
1% (w/v) glycine	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	V(-)	-	-	-	-	-	-	+
0.05% safranine	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	V(+)	+	+	-	-	-	-	N.D.
0.1% sodium deoxycholate	+	+	V(-)	V(+)	+	+	+	-	+	V(-)	-	+	+	+	+	-	-	-	N.D.
1% (w/v) oxgall	+	-	-	+	V(+)	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	N.D.
0.04% TTC	-	-	-	+	+	V(-)	V(-)	-	-	V(-)	-	+	-	-	-	-	-	-	N.D.
0.01% TTC	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	N.D.
Milieu minimal	V(+)	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	N.D.
MacConkey	+	+	-	V(-)	+	-	+	-	+	V(+)	-	V(+)	+	+	V(+)	-	+	+	N.D.
CCDA	+	-	-	+	+	+	V(-)	-	-	V(-)	-	+	+	-	+	-	+	+	N.D.
Résistance à																			
Céfopérazone 64 mg/L	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	V(+)	+	-	-	-	-	-
Activité enzymatique																			
Catalase	+	+	+	+	V(+)	+	V(-)	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Uréase	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	V(-)	-	+	-	-
Réduction du nitrate	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Hydrolyse Indoxyl Acétate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

* Tableau adapté selon résultats obtenus par Levican (Levican et al., 2013) et Jyothsna (Sasi Jyothsna et al., 2013)

Taxon : 1, *Arcobacter cloacae* (n=2) (Levican et al., 2013); 2, *Arcobacter suis* (n=1) (Levican et al., 2013); 3, *A. nitrofigilis* (n=4) (McClung et al., 1983); 4, *A. cryaerophilus* (n=19) (Neill et al., 1985); 5, *A. butzleri* (n=12) (Kiehlbauch et al., 1991); 6, *A. skirrowii* (n=9) (Vandamme et al., 1992b); 7, *A. cibarius* (n=15) (Houf et al., 2005); 8, *A. halophilus* (n=1) (Donachie et al., 2005); 9, *A. mytili* (n=3) (Collado et al., 2009a); 10, *A. thereius* (n=8) (Houf et al., 2009); 11, *A. marinus* (n=1) (Kim et al., 2010); 12, *A. trophiarum* (n=11) (De Smet et al., 2011b); 13, *A. defluvii* (n=8) (Collado et al., 2011b); 14, *A. molluscorum* (n=3) (Figueras et al., 2011a); 15, *A. ellisii* (n=3) (Figueras et al., 2011b); 16, *A. bivalviorum* (n=3) (Levican et al., 2012); 17, *A. venerupis* (n=1) (Levican et al., 2012); 18, *A. anaerophilus* (n=1) (Sasi Jyothsna et al., 2013).

2.5.3 Méthodes d'identification moléculaires

L'identification par la méthode phénotypique n'est souvent pas suffisante pour identifier l'espèce, et a démontré sa grande variabilité dans le tableau 2.1. Des méthodes de génétiques moléculaires peuvent permettre une meilleure identification. Une des premières méthodes publiées pour la discrimination des espèces *Arcobacter* a été la PCR multiplex (mPCR) par Houf et coll. en 2000 permettant une discrimination entre les espèces *A. butzleri*, *A. skirrowii* et *A. cryaerophilus*; les espèces les plus communément retrouvées dans l'environnement, selon leur gène de l'ARNr 16S et 23S (Houf et al., 2000). Cette approche est toujours utilisée, cependant elle amplifie également le

gène de l'ARNr 16S des espèces *Arcobacter* nouvellement décrites depuis la publication de cette méthode (Collado *et al.*, 2009a, Figueras *et al.*, 2011a, Houf *et al.*, 2009). Une autre méthode de mPCR publiée en 2010 a permis de discriminer, selon le gène de l'ARNr 23S et le gène *gyrB*, cinq espèces *Arcobacter* retrouvées chez les mammifères et les humains, soient *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cryaerophilus*, *A. cibarius* ainsi qu'*A. thereius* (Doudiah *et al.*, 2010). Comme la mPCR de Houf, celle-ci produit des amplicons pour certaines espèces récemment publiées (Collado *et al.*, 2011b, Levican *et al.*, 2013). En 1999, la méthode de PCR-RFLP du gène codant pour l'ARNr 16S a permis la discrimination des genres *Arcobacter*, *Helicobacter* et *Campylobacter* en générant des profils de digestions spécifiques à chaque genre (Marshall *et al.*, 1999). Cependant, en 2008, une nouvelle méthode PCR-RFLP impliquant aussi le gène codant pour l'ARN 16S et l'enzyme de restriction *MseI* a permis la discrimination au niveau des espèces connues à ce moment (Figueras *et al.*, 2008). Cette même méthode a été modifiée plus tard afin d'inclure les nouvelles espèces publiées après 2008 (Figueras *et al.*, 2012). L'utilisation de sondes capables de s'hybrider à l'ADN des espèces du genre *Arcobacter* a été validée en 1995 avec une méthode dot blot (Wesley *et al.*, 1995). De plus, une méthode utilisant une PCR combinée à une analyse ELISA a prouvé être capable de quantifier rapidement *Arcobacter* présent dans la viande de poulet (AntolíN *et al.*, 2001). D'autres méthodes moléculaires, toutefois moins utilisées, incluent la PCR en temps réel (Abdelbaqi *et al.*, 2007a, Brightwell *et al.*, 2007), ainsi que la PCR-DGGE (Petersen *et al.*, 2007). Cependant, ces méthodes ne permettent pas l'identification de toutes les espèces décrites. Seulement la méthode PCR-RFLP de Figueras a permis la discrimination de toutes les 17 espèces publiées avant 2012 et ceci à partir des séquences du gène de l'ARNr 16S. À l'aide de l'enzyme de restriction *MseI*, seulement 10 des 17 espèces ont un profil de restrictions différent. La séquence de l'ARNr 16S des espèces restants a été digérée avec *MnII* et/ou *BfaI* afin d'obtenir 17 profils de restrictions différents (Figueras *et al.*, 2012).

2.5.4 Méthodes d'identification par génotypage

Les méthodes de génotypage utilisent les différences, parfois minimes, entre les génomes des espèces afin de les différencier. Une des méthodes de génotypage les plus communément utilisées dans les descriptions récentes de nouvelles espèces *Arcobacter* (Collado *et al.*, 2009a, Collado *et al.*, 2011b, Figueras *et al.*, 2011a, Figueras *et al.*, 2011b, Levican *et al.*, 2012) est la technique ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (Sharples *et al.*, 1990). Cette méthode de PCR utilise des séquences à palindromes imparfaits d'environ 127 pb retrouvées en plusieurs copies dans le génome des bactéries entériques. Elle a été utilisée en 2007 afin de déterminer la différence au niveau de la souche d'une même espèce et les résultats ont montré 13 profils distincts d'ADN parmi

92 isolats d'*A. butzleri* (Aydin *et al.*, 2007). La méthode concurrente à celle de l'ERIC-PCR est celle d'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos *et al.*, 1995), où les polymorphismes dans l'ADN sont détectés afin de faire du sous-typage des espèces. Une comparaison des deux méthodes a été faite avec la nouvelle espèce *A. trophiarum*, et 10 profils AFLP ont été générés tandis que seulement quatre génotypes ont été générés par la méthode ERIC-PCR (De Smet *et al.*, 2011b). La technique de MLST (MultiLocus Sequence Typing) utilise la séquence partielle de plusieurs gènes de ménage (multilocus), et a ainsi permis la discrimination de souches appartenant à cinq espèces du genre *Arcobacter* (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. cibarius* et *A. thereius*) à l'aide de sept gènes et 374 souches. De plus, un site a été depuis établi afin d'y obtenir les séquences des amorces et les conditions de séquençage pour les espèces *Arcobacter* (<http://pubmlst.org/arcobacter/>) (Miller *et al.*, 2009). Plusieurs gènes de ménages sont également utilisés comme méthode de discrimination entre les espèces. Les gènes *cpn60* (*hsp60*) (Hill *et al.*, 2006), *gyrA* (Abdelbaqi *et al.*, 2007b), *gyrB* (Dauga, 2002, Kasai *et al.*, 1998) et *rpoB* (Mollet *et al.*, 1997) sont les plus communément retrouvés dans la littérature pour la caractérisation de nouvelles espèces ou bien dans des méthodes de discrimination d'une espèce parmi les autres étant donné que l'ARNr 16S semble ne plus être aussi efficace (Fox *et al.*, 1992, Woo *et al.*, 2008).

Les espèces *Arcobacter* sont présentes dans une grande variété d'environnements. De plus, leur présence chez les animaux et les humains cause des inquiétudes par rapport au risque à la santé humaine puisque leur pathogénicité est très bien documentée. Dans le domaine de l'agriculture, les gens sont constamment en contact avec les animaux et donc la contamination est un aspect très important. La découverte et la caractérisation ardue de nouvelles espèces *Arcobacter* sont alors nécessaires afin de mieux comprendre le risque potentiel envers les humains et animaux; et même pour les produits de consommation. L'objectif principal du projet était de caractériser de manière morphologique, phénotypique et génétique deux nouvelles espèces découvertes dans des matières fécales provenant d'humains et d'animaux de ferme.

3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Souches bactériennes

Les souches références d'*Arcobacter* ont été commandées d'ATCC (Manassas, USA), de la collection BCCM/LMG (Bruxelles, Belgique) ainsi que du Laboratoire National de Microbiologie (Winnipeg, Manitoba). Le tableau 3.1 résume les souches bactériennes avec leur source et la compagnie d'où elles proviennent.

Tableau 3.1 Souches bactériennes utilisées dans cette étude

Espèce	Souche	Compagnie
<i>A. nitrofigilis</i>	ATCC 33309	ATCC
<i>A. halophilus</i>	ATCC BAA-1022	
<i>A. skirrowii</i>	LMG 6621	BCCM/LMG
<i>A. cibarius</i>	LMG 21996	
<i>A. mytili</i>	LMG 24559	
<i>A. thereius</i>	LMG 24486	
<i>A. defluvii</i>	LMG 25694	
<i>A. molluscorum</i>	LMG 25693	
<i>A. marinus</i>	LMG 25770	
<i>A. trophiarum</i>	LMG 25534	
<i>A. ellisii</i>	LMG 26155	
<i>A. bivalviorum</i>	LMG 26154	
<i>A. venerupis</i>	LMG 26156	
<i>A. cryaerophilus</i>	NCTC 11885	

3.2 Isolement et identification d'*Arcobacter* provenant de matière fécale

3.2.1 Collection d'échantillons fécaux

Le numéro d'identification et l'origine des souches bactériennes retenues de la collection d'isolats fécaux spécifiquement utilisées dans cette étude ont été compilés dans le tableau 3.2. Les informations ont été classifiées selon le type d'animal et la source.

Tableau 3.2 Sources des souches bactériennes utilisées dans cette étude (n=10)

No. de souche	Source
AF1028	Échantillon fécal humain (fosse septique)
AF1033	
AF1078	
AF1058	
AF1429	Réservoir fumier de cochon femelle
AF1430	
AF1431	
AF1440	
AF1441	Réservoir fumier de vache
AF1581	

3.2.2 Isolement d'*Arcobacter* des échantillons fécaux

Lors d'un projet ultérieur effectué entre les années 2008 et 2010 par des étudiants COOP, des échantillons provenant de diverses sources fécales ont été utilisés afin d'y isoler des bactéries du genre *Arcobacter*. Des échantillons de 1 g de matière fécale ont été dilués (10^{-1}) dans 9 ml d'eau peptonée (PW) contenant (par litre) 10 g de bactopectone et 5 g de NaCl (VWR). Des dilutions sérielles allant de 10^{-2} à 10^{-6} ont été effectuées en ajoutant 100 µl de la dilution 10^{-1} à 900 µl d'eau peptonée et ainsi de suite. Ensuite, 100 µl de chacune de ces dilutions ont été étalés directement (DP) sur un milieu ASIA (*Arcobacter* selective isolation media) contenant (par litre) 12 g de bouillon *Arcobacter*, 6 g d'agar no.3 et des suppléments d'antibiotiques décrits par Houf (Houf *et al.*, 2001b) incluant (par litre) 100 mg de 5-fluorouracile, 10 mg d'amphotéricine B, 16 mg de céfopérazone, 32 mg de novobiocine, 64 mg de triméthoprime et 100 mg de cycloheximide (Sigma). Cette étape a

été suivie par la purification des colonies provenant du milieu ASIA sur un milieu m-AAM (modified agarised *Arcobacter media*) comprenant (par litre) du bouillon *Arcobacter*, 6 g d'agar no.3, 5 mg de phénol rouge, 250 g de glucose et un supplément sélectif (CAT) contenant (par litre) 8 mg de céfopérazone, 10 mg d'amphotéricine B ainsi que 4 mg de téicoplanine. Deux colonies de chaque morphologie différente ayant une couleur beige à blanche et translucide ont été prises du milieu de purification décrit précédemment. Toute incubation, soit du milieu ASIA et m-AAM, ont été effectuée à 30°C en conditions microaérophiles dans une jarre anaérobie et la croissance sur gélose a été vérifiée après 3 à 6 jours d'incubation.

3.2.3 Extraction d'ADN et préservation des isolats *Arcobacter* hypothétiques

L'ADN d'une seule colonie bactérienne a été extrait dans 100 µl d'eau sans nucléase à 100°C pendant 10 minutes pour ensuite être entreposé à -20°C pour des analyses de génotypage ultérieures. Afin de préserver les isolats *Arcobacter* hypothétiques, une seule colonie a été inoculée dans un bouillon AM (*Arcobacter media*), comportant (par litre) 12 g de bouillon *Arcobacter* et le supplément CAT mentionné ci-dessus. Ce milieu a été incubé à 30°C dans une boîte avec un sachet permettant un environnement microaérophile et une agitation de 200 RPM pendant 16 à 24 h. Les isolats ont ensuite été préservés dans un ratio 1 :1 de bouillon AM et de glycérol 30 % (v/v) à -80°C.

3.2.4 Identification des espèces *Arcobacter* de la collection fécale d'AAC

Tableau 3.3 Liste des amorces utilisées dans cette étude

Nom de la PCR	Gène et espèce cible	Amorces	Séquence de l'amorce (5' à 3')	Température d'hybridation (°C)	Longueur de l'amplicon (pb)
mPCR spécifique à l'espèce Doudah et coll. 2010	ARNr 23S (<i>A. butzleri</i>)	ButR	TCC TGA TAC AAG ATA ATT GTA CG	58	2061
		ArcoF	GCY AGA GGA AGA GAA ATC AA		
	ARNr 23S (<i>A. skirrowii</i>)	SkiR	TCA GGA TAC CAT TAA AGT TAT TGA TG		198
		ArcoF	GCY AGA GGA AGA GAA ATC AA		
	gyrA (<i>A. cryaerophilus</i>)	GyrasR	CCA ACA ATA TTT CCA GTY TTT GGT		395
		GyrasF	AGA ACA TCA CTA AAT GAG TTC TCT		
	ARNr 23S (<i>A. cibarius</i>)	CibR	CGA ACA GGA TTC TCA CCT GT	55	1125
		ArcoF	GCY AGA GGA AGA GAA ATC AA		
	ARNr 23S (<i>A. thereius</i>)	TherR	GCA ACC TCT TTG GCT TAC GAA		1590
PCR universelle (Bruce et al., 1992)	ARNr 16S (Bactéries)	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 Houf et coll. 2000	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		
PCR spécifique au genre (conçues dans cette étude)	gyrB (<i>Arcobacter</i> spp.)	ArcGB-F	ACW GGH GAT GAY GTW AGA G	52	395
		ArcGB-R2	GCT TGR WAW ACT CTA TCT CTW CC		

Tableau 3.4 Liste des amorces utilisées dans cette étude (suite)

Nom de la PCR	Gène et espèce cible	Amorces	Séquence de l'amorce (5' à 3')	Température d'hybridation (°C)	Longueur de l'amplicon (pb)
mPCR spécifique à nouvelles espèces (conçues dans cette étude)	<i>gyrB</i> (<i>A. lanthierii</i>)	<i>lanG3-F</i>	CAG CTT TAT GTG AAG TTG TAG C	60	461
		<i>lanG4-R</i>	TGC CTT TTT AGC AGC TTC TC		
	<i>rpoB</i> (<i>A. septicus</i>)	<i>sepR5-F</i>	GCT CCA GGA AGT ACA AAA GTA G		151
		<i>sepR6-R</i>	AGG CTA GCA GCT ACT CCC		
PCR spécifique au genre (conçues dans cette étude)	<i>gyrB</i> (<i>Arcobacter</i> spp.)	<i>gyrB-Arc-7F</i>	GTT TAY CAY TTT GAA GGT GG	45	722
		<i>gyrB-Arc-14R</i>	CTA GAT TTT TCA ACA TTT AAA AT		
PCR spécifique au genre (conçues dans cette étude)	<i>cpn60</i> (<i>Arcobacter</i> spp.)	<i>H729</i>	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC GAI III GCI GGI GAY GGI ACI ACI AC	46	555
		<i>H730</i>	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA YKI YKI TCI CCR AAI CCI GGI GCY TT		
PCR spécifique au genre (conçues dans cette étude)	<i>rpoB</i> (<i>Arcobacter</i> spp.)	<i>CamrpoB-L</i>	CCA ATT TAT GGA TCA AAC	46	524
		<i>RpoB-R</i>	GTT GCA TGT TNG NAC CCA T		
PCR spécifique au genre (conçues dans cette étude)	ARNr 16S (<i>Arcobacter</i> spp.)	<i>Arco-I</i>	AGA GAT TAG CCT GTA TTG TAT C	56	1223
		<i>Arco-II</i>	TAG CAT CCC CGC TTC GAA TGA		

L'ADN congelé à -20°C a été utilisé afin d'identifier les isolats correspondant potentiellement à des espèces *Arcobacter*. Dans le laboratoire de microbiologie environnementale du Dr Lanthier à AAC, la méthode de PCR établie par Houf *et coll.* (2000) a été utilisée pour identifier et discriminer les trois espèces *Arcobacter* les plus communes, soit *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* et *A. skirrowii*, à partir de leurs gènes de l'ARNr 16S et 23S. Une PCR universelle, permettant l'amplification du gène de l'ARNr 16S de toutes les bactéries, a aussi été effectuée en parallèle afin d'évaluer la qualité et la quantité de l'ADN. Les réactions de PCR ont été préparées dans un volume final de 25 µl comprenant de l'eau sans nucléase, 5 µl de tampon 5X (80 mM Tris-HCl, 0.1 % Triton X-100, 20 mM (NH₄)SO₄, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs), 0.6 U de *Taq* polymérase (Fermentas), 0.4 µM des amorces BUTZ, SKIR, CRY1 et CRY2 et 0.8 µM de l'amorce ARCO pour la mPCR et les amorces pA-F et pH-R pour la PCR universelle (Tableau 3.3), ainsi que 10 µl de l'extrait d'ADN. Le programme mPCR impliquait 32 cycles avec les étapes suivantes : dénaturation (94 °C, 45 s), hybridation des amorces (61°C, 45 s) et

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 était de 30 cycles avec les étapes suivantes : dénaturation (94°C, 40 s), hybridation des amorces (55°C, 1 min) et élongation (72°C, 2 min), et un cycle d'extension final (72°C, 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 (40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA 0.5 M (pH 8.0)) avec un voltage de 120 V. Avec la mPCR de Houf, des fragments de 401 pb, 257 pb et 641 pb ont été obtenus respectivement pour *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* et *A. skirrowii*. Pour la PCR universelle, un fragment de 1.5 kb a été observé lorsqu'il y avait présence d'ADN amplifiable.

3.3 Caractérisation microbiologique

3.3.1 Condition de croissance et morphologie

Étant donné que les espèces *Arcobacter* provenant de sources fécales ont initialement été isolées sur milieu ASIA, ce milieu a été utilisé comme milieu de base pour la caractérisation phénotypique. La morphologie bactérienne a été observée sur milieu de croissance m-AAM et ASIA. Une coloration de Gram a été effectuée à l'aide d'une trousse commerciale en suivant les instructions recommandées par le manufacturier (Fisher Scientific). Une étude de croissance à différentes températures et en présence ou absence d'oxygène a été effectuée afin de déterminer les conditions optimales de croissance des nouvelles espèces. Les températures 25°C, 30°C, 37°C et 42°C en conditions microaérophiles ainsi que 30°C en conditions aérobies et anaérobies ont été choisies. La forme et les dimensions des bactéries ont été visualisées par microscopie électronique à balayage et en transmission avec l'aide du Dr Kaleb et la technicienne Denise Chabot de l'unité de microscopie électronique à AAC. Les dimensions des bactéries ont été effectuées avec le programme ImageJ à partir des images de microscopie électronique.

3.4 Résistance aux antibiotiques

L'analyse de la résistance aux antibiotiques a été faite à partir d'une technique de dilution sur agar décrite par Fera (Fera *et al.*, 2004). Une colonie isolée de chaque isolat *Arcobacter* a été incubée en conditions microaérophiles à 30°C avec une agitation de 250 RPM pour 16 h dans du bouillon AM dans une plaque de 96 puits afin d'obtenir une préculture des isolats à testés. Cette plaque a ensuite été répliquée en inoculant 10 µl de chaque puits de la culture dans le bouillon AM avec 90 µl de bouillon Mueller-Hinton (MH) dans une nouvelle plaque de 96 puits. Cette plaque a été incubée

pendant trois jours en conditions optimales de croissance. Après cette incubation, un volume de 10 µl de chaque puits a été ajouté à 200 µl d'une solution de 0,02 % Tween-20. Après avoir mélangé la suspension bactérienne dans la solution de Tween-20, cette plaque de 96 puits a été répliquée sur un milieu solide de Mueller-Hinton II (MHII) contenant une concentration des 8 antibiotiques testés à l'aide d'un "96-floating-pin-replicator" capable de transférer 5 µl. Un total de 8 antibiotiques a été testé avec trois concentrations différentes, soit à la valeur seuil de sensibilité, intermédiaire et de résistance, résumée dans le tableau 3.5. Ces concentrations ont été obtenues dans le rapport PICRA de 2004 (Canada, 2004). Les plaques MHII ont été incubées en conditions optimales de croissance et la croissance a été examinée après trois jours. La présence de croissance a été considérée un résultat positif.

Tableau 3.5 Concentrations des antibiotiques utilisés

Antibiotique	Concentration (mg/L)		
	Sensibilité	Intermédiaire	Résistance
Azithromycine	4	8	16
Chloramphénicol	16	32	64
Ciprofloxacine	2	4	8
Clindamycine	4	8	16
Érythromycine	16	32	64
Gentamicine	4	8	16
Acide Nalidixique	32	64	128
Tétracycline	8	16	32

Légende :

Sensibilité = moitié de la valeur seuil;

Intermédiaire = valeur seuil;

Résistance = 2 fois valeur seuil.

3.5 Caractérisation biochimique et enzymatique

Toutes les analyses ont été faites en triplicata et pour les analyses nécessitant une croissance initiale, l'inoculum a été pris de la croissance sur un milieu m-AAM au lieu du milieu ASIA afin de minimiser les coûts. De plus, toutes les espèces *Arcobacter* disponibles dans le laboratoire du Dr Lanthier ont été testées en parallèle afin de faire une comparaison. Un milieu solide MacConkey (Oxoid) a été utilisé afin d'observer la fermentation du lactose et un milieu de sang Columbia (Oxoid) a été utilisé pour vérifier l'hémolyse alpha du sang. Un test d'oxydase a été fait à partir de bandes de détection de l'oxydase du cytochrome en suivant les étapes recommandées par le manufacturier (Sigma CAT# 40560). L'analyse de l'hydrolyse de l'acétate indoxyl afin de déterminer la présence d'une activité acétate estérase a été testée à l'aide de bandes indoxyl en suivant le protocole recommandé par le manufacturier (Sigma CAT# 04739).

3.5.1 Galeries API

Les galeries API utilisées étaient API 20E et API Campy de Biomérieux. Les galeries ont été inoculées et les résultats ont été observés selon le protocole du manufacturier (Biomérieux). L'inoculum a été préparé à partir de quelques colonies dispersées dans de l'eau stérile afin que le milieu de croissance n'ait pas une influence sur le résultat. Les galeries ont été incubées à 30°C en conditions microaérophiles pendant 24 h jusqu'à 48 h. Les contrôles recommandés par Biomérieux ont été utilisés.

3.6 Caractérisation génétique

3.6.1 Séquençage de l'ARNr 16S et analyse phylogénétique

Parmi les isolats de la collection fécale d'AAC, 125 isolats ont été sélectionnés aléatoirement et le séquençage du gène de l'ARNr 16S a été effectué sur ceux-ci. Le séquençage a été fait par le service de séquençage dans le laboratoire du Dr André Lévesque à AAC. Les échantillons envoyés au service de séquençage ont été préparés dans le laboratoire du Dr Lanthier. Dans un volume final de 15 µl, une réaction de PCR contenait de l'eau sans nucléase, 1X tampon Titanium Taq (0,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTPs), 0,08 mM des amorces universelles pA-F et pH-R (Tableau 3.3), 0,50X par 10 µl de Taq polymérase Titanium et 0,1 ng/réaction d'ADN. Le programme de PCR pour cette réaction est le même que celui mentionné plus haut avec les amorces universelles pA-F et pH-R

(Tableau 3.3). Afin de vérifier la pureté de l'ADN amplifié, le produit d'amplification a été observé par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % dans du tampon 1X TAE avec un voltage de 120 V. Avec ce protocole, la purification du produit d'amplification n'a pas été nécessaire et donc la préparation des séquences a été faite immédiatement après l'amplification du fragment désiré. Par la suite, pour chaque réaction de séquençage, 8,5 µl d'un master mix (eau sans-nucléase, 20 % tréhalose, tampon 5X de séquençage, mélange Big Dye terminator) fourni par le laboratoire du Dr Lévesque, 0,5 µl de l'amorce sens ou antisens diluées à 3,2 µM et 1 µl d'ADN purifié ont été mélangés. Dans le cas du séquençage de l'ARNr 16S, deux autres amorces internes, 907-R et 530-F, ont été ajoutées afin de maximiser les chances d'obtenir une séquence de 1,5 kb complète. Ces réactions ont ensuite été amplifiées dans le MasterCycler d'Eppendorf avec le programme suivant : 29 cycles de dénaturation (94 °C, 10 s), hybridation des amorces (50 °C, 5 s) et élongation (60 °C, 4 min). Par la suite, le service de séquençage a obtenu ces séquences par électrophorèse capillaire (ABI Prism 3130XL). Une fois les quatre séquences individuelles obtenues avec les quatre amorces différentes, celles-ci ont été alignées ensemble à l'aide du programme SeqMan de DNASTar Lasergene (version 10). Les séquences ont été éditées manuellement dans SeqMan pour ensuite être alignées avec des séquences d'espèces *Arcobacter* connues ainsi que d'autres séquences inconnues avec le programme MegAlign ou MEGA 5.0. Un arbre phylogénétique a ensuite été généré à l'aide du programme MEGA 5.0, où la position phylogénétique a été obtenue par rapport aux espèces connues. À partir des résultats de séquençage et des analyses phylogénétiques, 10 souches démontrant potentiellement une appartenance à de nouvelles espèces *Arcobacter* ont été évaluées davantage.

3.6.2 Séquençage des gènes de ménage

En suivant le même protocole de séquençage mentionné plus haut, les gènes *gyrB*, *cpn60* et *rpoB* ont été séquencés. Les amorces utilisées étaient les suivantes : *gyrB*-7F/*gyrB*-14R (Collado *et al.*, 2011b), H729/H730 (Hill *et al.*, 2006), et CamrpoB-L/*rpoB*-R (Neill *et al.*, 1979) respectivement pour le gène *gyrB*, *cpn60* et *rpoB* (Tableau 3.4). Ceux-ci ont généré des fragments de 722 pb, 524 pb et 555 pb respectivement. Des analyses phylogénétiques ont aussi été réalisées sur ces séquences en suivant la même procédure que pour le gène de l'ARNr 16S.

3.6.3 Détection des nouvelles espèces avec méthodes connues

Afin de confirmer davantage la découverte de nouvelles espèces, l'ADN de celles-ci a été testé avec des méthodes moléculaires communes de détection des espèces *Arcobacter*. Premièrement, la

vérification du genre *Arcobacter* a été faite à l'aide des amorces Arco-I et Arco-II (Tableau 3.4). Les réactions de cette PCR ont été préparées dans un volume final de 25 µl comprenant de l'eau sans nucléase, 5 µl de tampon 5X, 0,6 U de *Taq* polymérase, 0,4 µM des amorces Arco-I et Arco-II ainsi que 10 µl d'ADN. Le programme PCR contenait 30 cycles avec les étapes suivantes : dénaturation (94 °C, 1 min), hybridation des amorces (56°C, 1 min) et élongation (72°C, 1 min), et un cycle d'extension finale (72°C, 7 min) à l'aide d'un MasterCycler d'Eppendorf. Une autre de ces méthodes qui ont été utilisées est celle de Houf *et coll.* (2000), détaillée dans la section 3.2.4. de ce mémoire. Ensuite la méthode décrite par Doudah *et coll.* (2010) permettant de discriminer *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. cibarius* et *A. thereius* a été testée. Les réactions de cette mPCR ont été préparées dans un volume final de 25 µl comprenant de l'eau sans nucléase, 5 µl de tampon 5X , 0.6 U de *Taq* polymérase, 0,4 µM des amorces ButR, SkiR, CibR, TherR, ArcoF, GyraR et GyraF (Tableau 3.3) ainsi que 10 µl d'ADN. Le programme mPCR contenait 30 cycles avec les étapes suivantes : dénaturation (94°C, 45 s), hybridation des amorces (58°C, 45 s) et élongation (72°C, 2 min), et un cycle d'extension finale (72°C, 5 min) à l'aide d'un MasterCycler d'Eppendorf. 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 avec un voltage de 120 V.

3.6.4 Séquençage du génome la technologie Illumina

Étant donné leur forte croissance sur milieu solide, l'ADN des nouvelles espèces ont été extraits d'une croissance sur milieu m-AAM en conditions optimales. L'ADN pour le séquençage du génome complet a été extrait à l'aide de la trousse commerciale «UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation» (CAT # 12334-50) de Mo-bio Laboratories. La technologie utilisée a été Illumina HiSeq avec la chimie TrueSeq V3 capable de produire 25-40 Gb de données par lignes. Les réactions de séquençage ont été effectuées sur un FlowCell contenant 8 lignes. Une fois les données de séquençage obtenues, des membres du département de bioinformatique d'AAC ont assemblé le génome avec l'aide de leur étudiant postdoctoral Dr Adam Zaky. L'assemblage du génome complet est toujours en cours et certains détails sont toujours confidentiels, cependant une annonce du génome a été publiée en avril 2014 dans le journal «Genome Announcements» de la Société Américaine de la Microbiologie.

3.7 Autres analyses

3.7.1 Analyses des acides gras méthyles esters (FAMES)

L'analyse des acides gras a été effectuée par l'équipe du Dr Michael Arts d'Environnement Canada (EC) selon la méthode décrite dans l'article de Chao *et coll.* Les culots bactériens ont été préparés en centrifugeant une suspension bactérienne dans du bouillon AM incubée pendant 24 h. Le surnageant a ensuite été enlevé et les culots ont été envoyés sur de la glace sèche à EC (Burlington, Ontario). Les culots ont été lyophilisés pendant 24 h à -62 °C avant l'extraction des acides gras. L'extraction a été amorcée avec une saponification dans 1 ml d'hydroxyde de sodium (3,75 mol/L) dans un ratio de 1:1 méthanol/eau à 80°C pour 30 minutes. Cette étape a été suivie par la transestérification (méthylation) avec 2 ml d'acide hydrochlorique 10 % dans du méthanol à 80 °C pendant 10 minutes. La séparation des phases a été effectuée à l'aide de 1,5 ml de 1:1 hexane/méthyle éther *tert*-butyle et un lavage avec 3 ml d'hydroxyde de sodium 0,3 mol/L. L'extraction a ensuite été terminée avec l'ajout d'une extraction avec 1 ml d'hexane.

Les acides gras méthyles esters (FAMES) ont été analysés dans un chromatographe à phase gazeuse avec un détecteur d'ionisation de flamme (GC-FID) Varian CP-3800. Une colonne de 5 % silicone méthyle phényle fusionnée à une colonne capillaire de silice a été utilisée afin de séparer les acides gras méthyles esters. Les programmations du four ont été les suivantes : 50°C pour 0,5 min, puis une augmentation à 170°C à un taux de 35°C/min, ensuite à 225°C à 4°C/min, et finalement à 310°C à 60°C/min et pour 1,15 min. Les paramètres pour le chromatographe à phase gazeuse ont été 0,5 µl de volume d'injection, 1,0 ratio fractionné, et 1,0 ml/min de flux constant d'hélium. Les standards bactériens d'acide éther méthylique (Sigma CAT# 47080-U) avec l'ajout du standard 21:0 (Sigma CAT# H3265) ont été utilisés pour l'identification et quantification. Des pics additionnels ont été identifiés grâce aux standards FAME de Matreya LLC : 3-hydroxydécanoate (CAT# 1728), 3-hydroxyhexadécanoate (CAT# 1262), méthyle hexadécanoate (CAT# 1614), acide *cis*-11-octadécenoïque (CAT# 1266), acide *trans*-11-octadécenoïque (CAT# 1262), et acide *cis*-9,10-méthylèneoctadécanoïque (CAT# 1822). Une courbe d'étalonnage linéaire à quatre points a été construite avec un mélange des standards d'acides gras méthyles esters bactériens et 21:0 afin de quantifier les pics de chaque échantillon. Toutes les données du chromatographe à phase gazeuse ont été évaluées avec le programme Galaxie™ de Varian (version 1.9.3). Les données ont été reportées en %mol d'acide gras total. Toutes les souches d'*A. septicus* et *A. lanthierii* ainsi qu'un contrôle positif du genre *Arcobacter*, soit *A. cibarius* ont été envoyées à E C. Les contrôles négatifs *E. coli* et *P. aeruginosa* ont été utilisés lors de l'analyse à EC.

3.8 Développement de méthodes d'identification

3.8.1 Conception des amorces

Des amorces spécifiques aux deux nouvelles espèces *Arcobacter* ont été générées à l'aide des alignements des séquences des gènes l'ARNr 16S et des gènes de ménage. Avec le programme MegAlign, des régions variables et conservées ont été recherchées. Par la suite, les amorces potentielles ont été proposées à l'aide du programme OligoAnalyzer de DNA IDT Technologies. Ces analyses consistaient à vérifier la présence de formation de dimère et d'épingle dans la séquence elle-même ou entre les amorces sens et antisens. La température d'hybridation (T_m) ainsi que le pourcentage G+C ont été aussi vérifiés. La recherche d'amorces ayant plus de 20 nucléotides, un contenu en GC de plus de 40% ainsi qu'un T_m de plus de 50°C a été favorisée. Lorsque des amorces adéquates ont été trouvées, elles ont été commandées directement sur le site de la compagnie IDT DNA Technologies pour ensuite être vérifiées avec les souches référence d'espèces *Arcobacter*.

3.8.2 Identification des deux nouvelles espèces

Six paires d'amorces à partir des séquences des gènes de ménage ont été conçues afin d'identifier les deux nouvelles espèces *Arcobacter*. Après validation avec les souches de références *Arcobacter* et 42 autres genres et espèces bactériennes, seulement trois paires d'amorces n'ont pas donné une amplification croisée avec d'autres espèces. Un PCR multiplex a été mis au point à l'aide de deux paires d'amorces permettant une bonne résolution et distinction des fragments sur gel d'agarose 1,5 %. Les amorces lanG3-F et lanG4-R (Tableau 3.4) ont permis l'amplification d'un fragment de 461 pb du gène *gyrB* de l'espèce *A. lanthierii* tandis que les amorces sepR5-F et sepR6-R (Tableau 3.4) amplifiaient un fragment de 151 pb du gène *rpoB* d'*A. septicus*. Les réactions de cette mPCR ont été préparées dans un volume final de 25 µl comprenant de l'eau sans nucléase, 5 µl de tampon 5X, 0,6 U de *Taq* polymérase, 0,1 µM des amorces lanG3-F, lanG4-R, sepR5-F et sepR6-R ainsi que 10 µl d'ADN. Le programme de PCR optimisé contenait 30 cycles avec les étapes suivantes : dénaturation (94°C, 30 s), hybridation des amorces (60°C, 30 s) et élongation (72°C, 30 s), et un cycle d'extension finale (72°C, 5 min) à l'aide d'un MasterCycler d'Eppendorf. 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 avec un voltage de 120 V.

3.8.3 Discrimination des nouvelles espèces parmi les espèces *Arcobacter* connues

Des amorces spécifiques au genre *Arcobacter* ont été conçues à partir des séquences du gène de l'ARNr 16S et du gène *gyrB* car leurs séquences contenaient le plus de régions conservées. Une paire d'amorce a été créée et validée avec les nouvelles espèces, 15 espèces références *Arcobacter* disponibles dans le laboratoire du Dr Lanthier et 42 autres genres et espèces bactériennes. Les amorces ArcGB-F et ArcGB-R2 (Tableau 3.3) ont permis d'amplifier un fragment de 395 pb du gène *gyrB* de toutes les espèces *Arcobacter*. Les réactions de cette PCR ont été préparées dans un volume final de 25 µl comprenant de l'eau sans nucléase, 2,5 µl de tampon Titanium 10X, 0.25 µl de *Taq*Titanium 50X, 0,1 mM de dNTPs, 0,08 µM des amorces ArcGB-F et ArcGB-R2 ainsi que 10 µl d'ADN. Le programme de PCR optimisé contenait 35 cycles avec les étapes suivantes : dénaturation (94°C, 30 s), hybridation des amorces (52°C, 20 s) et élongation (72°C, 30 s), et un cycle d'extension finale (72°C, 7 min) à l'aide d'un MasterCycler d'Eppendorf. L'endonucléase *AluI* a ensuite été ajoutée à 10 µl du produit de PCR en suivant les instructions du fabricant (Fisher Scientifique) et ce mélange a ensuite été digéré pendant 24 h. Le résultat a été visualisé à l'aide d'une électrophorèse sur gel de 4% d'agarose TopVision LE GQ (CAT# R0491) dans du tampon TAE 1X pendant 3,5 h à 100 V.

4 RÉSULTATS

4.1 Analyses phylogénétiques du gène de l'ARNr 16S et gènes de ménage

Lors de l'analyse phylogénétique des séquences du gène de l'ARNr 16S de certains des isolats *Arcobacter* hypothétiques de la collection d'isolats provenant de matières fécales à Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC), deux nouvelles espèces ont été découvertes par l'entremise d'un arbre phylogénétique (Fig. 4.1). Cet arbre a démontré deux positions phylogénétiques différentes pour ces nouvelles espèces par rapport aux espèces *Arcobacter* validées. J'ai par la suite effectué le séquençage de trois gènes de ménage, *cpn60*, *gyrB* et *rpoB*, ainsi que l'analyse phylogénétique de ceux-ci, représentée par les figures 4.2, 4.3 et 4.4 respectivement. La même tendance observée avec le gène codant pour l'ARNr 16S par rapport aux positions phylogénétiques peut être également observée avec ces trois gènes. De plus, selon les arbres phylogénétiques des figures 4.1, 4.2, 4.3 et 4.4, les espèces *Arcobacter* les plus phylogénétiquement proches aux nouvelles espèces sont *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cryaerophilus* et *A. cibarius*. Les homologues des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des nouvelles espèces par rapport aux quatre espèces nommées précédemment se situent entre 97,0 et 98,0% (Tableau 4.1).

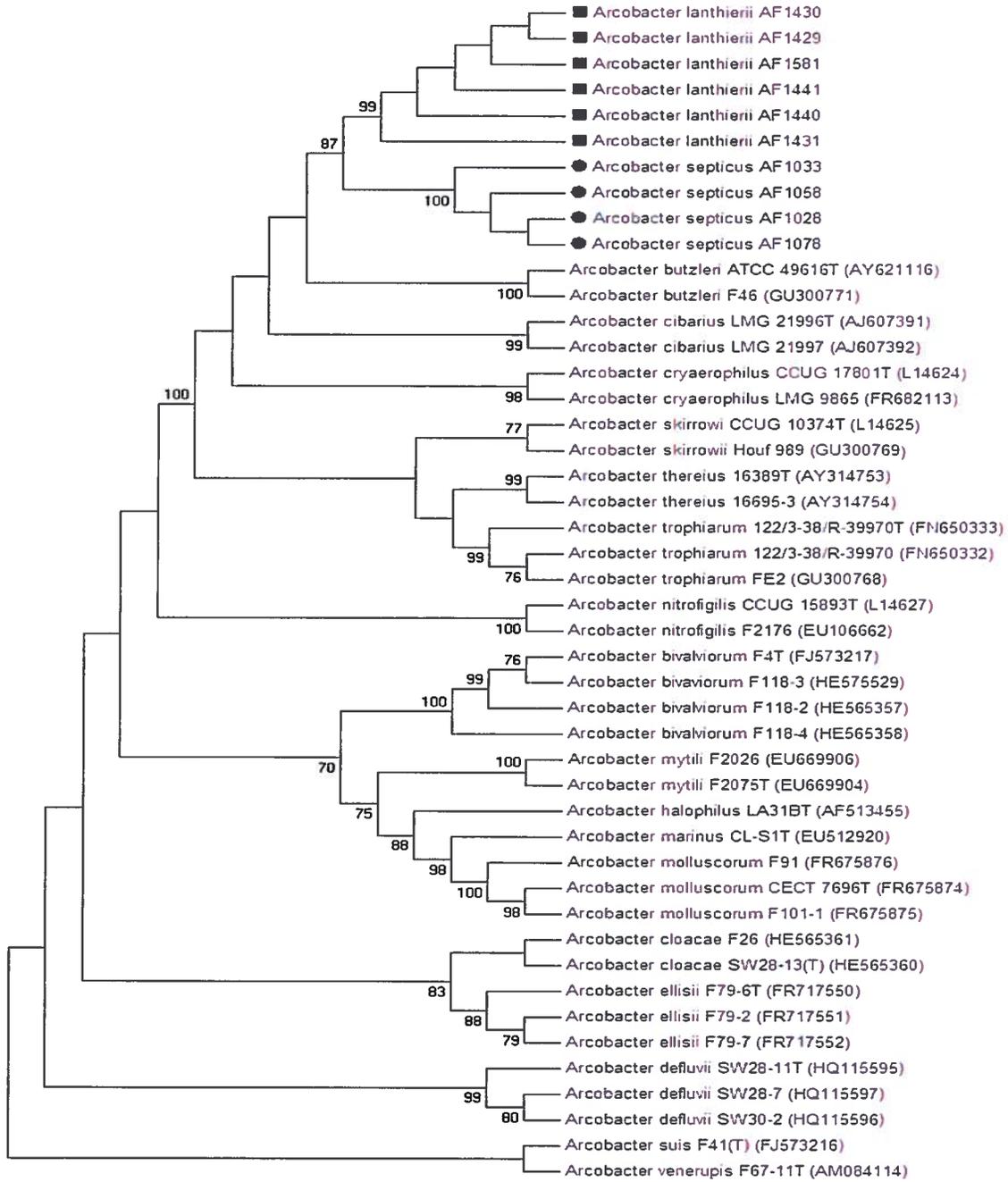


Figure 4.1 Phylogénie du gène codant pour l'ARNr 16S.

Arbre phylogénétique de Parsimonie Maximum des séquences des gènes de l'ARNr 16S (1410 pb) montrant la position phylogénétique d'*Arcobacter lanthierii* (■) et *Arcobacter septicus* (●) parmi le genre *Arcobacter*. Les valeurs de Bootstrap ($\geq 70\%$) basées sur 1000 répliques sont illustrées aux nœuds de l'arbre.

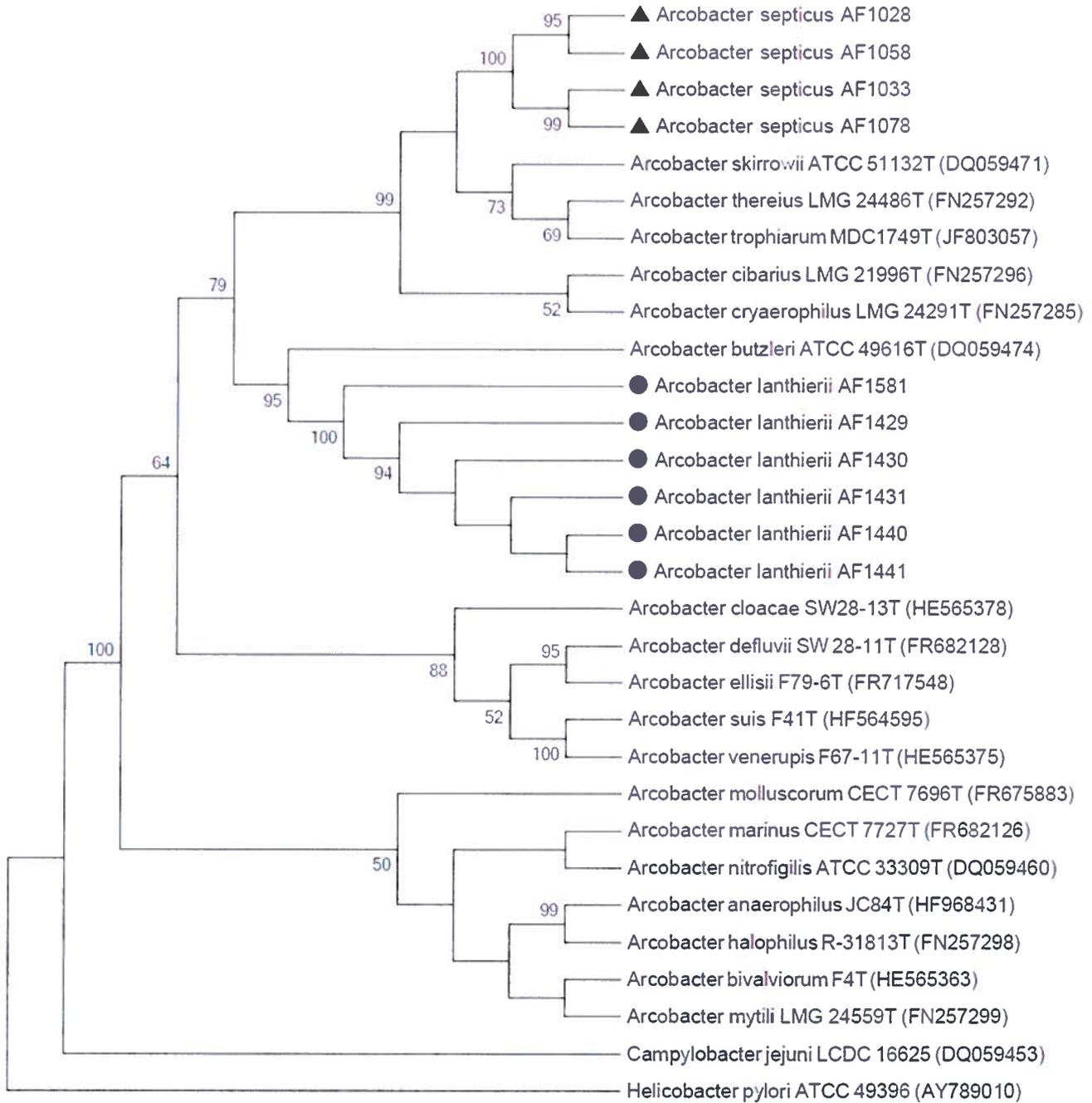


Figure 4.2 Phylogénie du gène de ménage *cpn60*.

Arbre phylogénétique de Parsimonie Maximum des séquences du gène *cpn60* (555 pb) montrant la position phylogénétique d'*Arcobacter lanthierii* (●) et *Arcobacter septicus* (▲) parmi le genre *Arcobacter*. Les valeurs de Bootstrap ($\geq 50\%$) basées sur 1000 répliques sont illustrées aux nœuds de l'arbre.

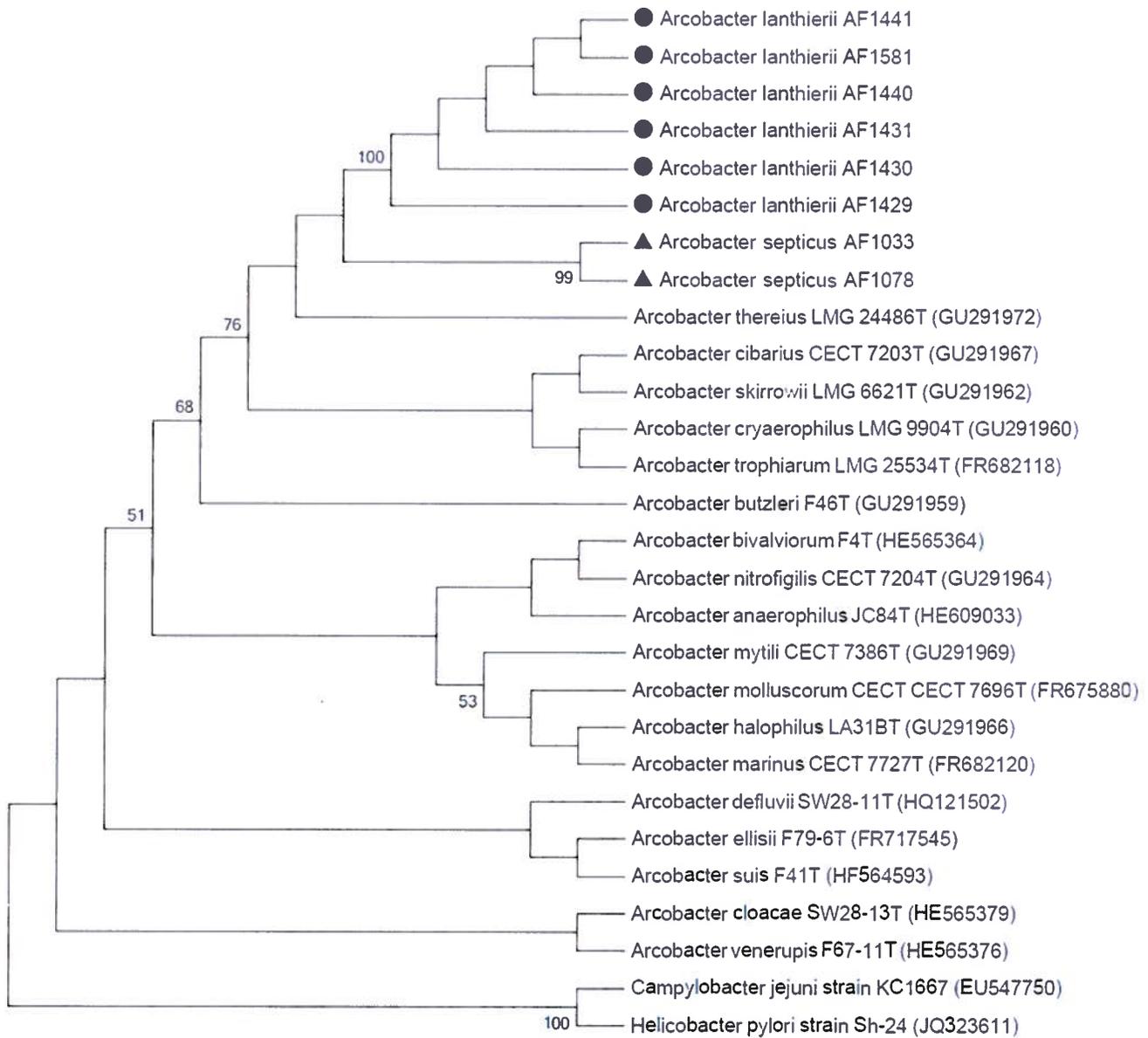


Figure 4.3 Phylogénie du gène de ménage *gyrB*.

Arbre phylogénétique de Parsimonie Maximum des séquences du gène *gyrB* (722 pb) montrant la position phylogénétique d'*Arcobacter lanthierii* (■) et *Arcobacter septicus* (▲) parmi le genre *Arcobacter*. Les valeurs de Bootstrap ($\geq 50\%$) basées sur 1000 répliques sont illustrées aux nœuds de l'arbre. Les souches AF1028 et AF1058 d'*A. septicus* ne sont pas représentées dans cet arbre.

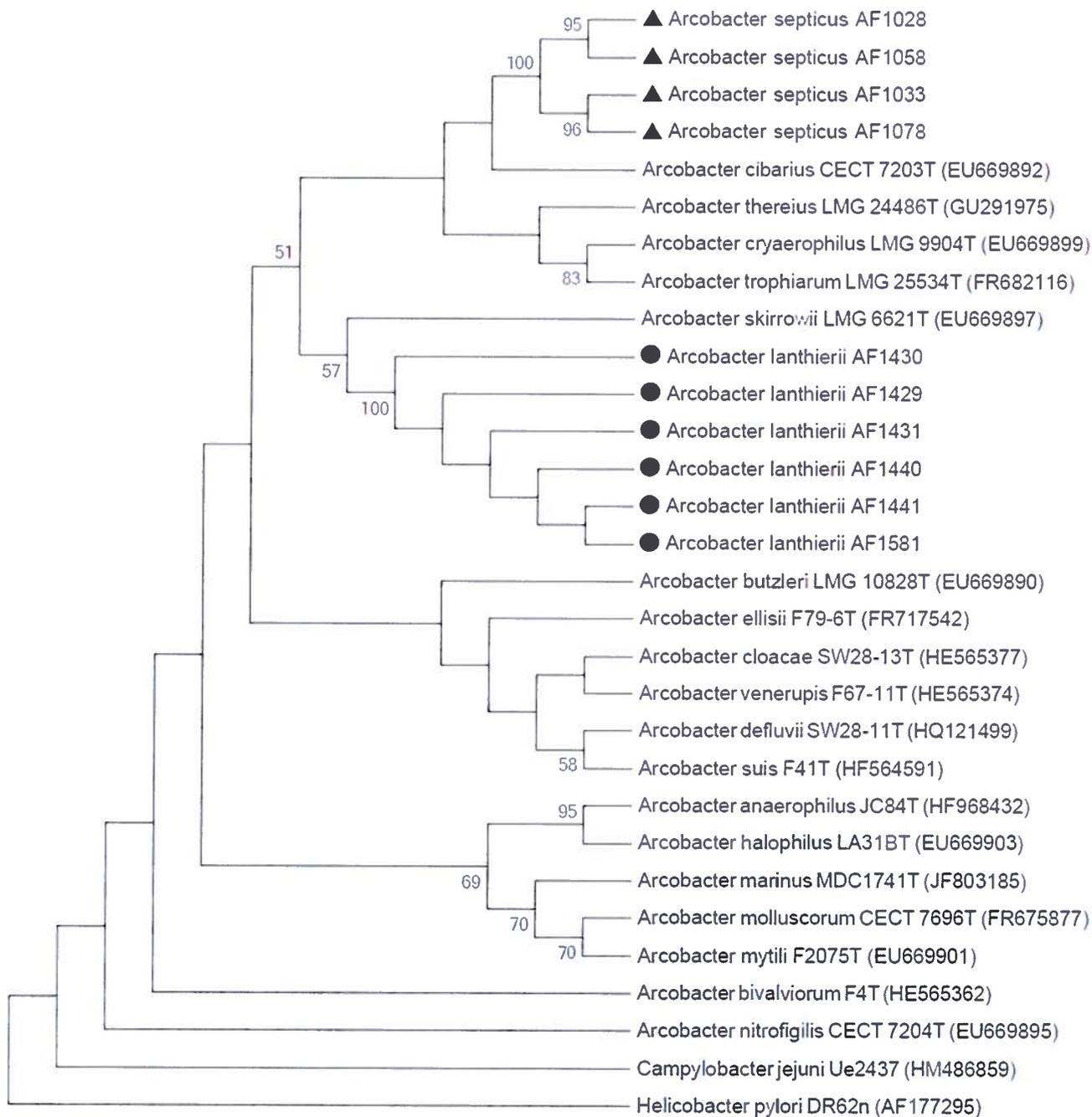


Figure 4.4 Phylogénie du gène de ménage *rpoB*.

Arbre phylogénétique de Parsimonie Maximum des séquences du gène *rpoB* (474 pb) montrant la position phylogénétique d'*Arcobacter lanthierii* (■) et *Arcobacter septicus* (▲) parmi le genre *Arcobacter*. Les valeurs de Bootstrap (≥50%) basées sur 1000 répliques sont illustrées aux nœuds de l'arbre.

Tableau 4.1 Homologie (%) entre les séquences de l'ARNr 16S d'*A. septicus* (n=3) et *A. lanthierii* (n=6) par rapport aux espèces références *Arcobacter*

	<i>A. septicus</i>	<i>A. lanthierii</i>
<i>A. cibarius</i> ATCC 21996 (T)	97.9	98.0
<i>A. butzleri</i> ATCC 49616 (T)	97.7	97.8
<i>A. cryaerophilus</i> CCUG 17801 (T)	97.7	97.5
<i>A. skirrowii</i> CCUG 10374 (T)	97.5	97.7

n : représente le nombre d'isolats associé aux deux espèces

4.2 Conditions optimales de croissance

Étant donné que les nouvelles espèces ont été initialement isolées sur un milieu ASIA, celui-ci a été utilisé afin de vérifier différentes conditions de croissance (Tableau 4.2). Les conditions optimales de croissance des deux nouvelles espèces *Arcobacter* sont à une température de 30°C en conditions microaérophiles. Les nouvelles espèces sont aérotoles, car une croissance a été observée en conditions microaérophiles et aérobies. Toutefois, aucune croissance n'a été observée en conditions anaérobies (Tableau 4.2). La morphologie des colonies des deux nouvelles espèces est très différente. *Arcobacter septicus* forme des petites colonies circulaires et élevées, jaunâtre ayant un aspect granuleux, tandis qu'*Arcobacter lanthierii* forme des colonies allongées et élevées, de couleur beige ou blanche avec une consistance muqueuse.

Tableau 4.2 Résultat de croissance d'*A. septicus* (n=4) et *A. lanthierii* (n=6) à différentes températures et conditions sur milieu ASIA

Conditions et température	<i>A. septicus</i>	<i>A. lanthierii</i>
25°C microaérophile	++	++
30°C microaérophile	+++	+++
37°C microaérophile	+	++
42°C microaérophile	-	-
30°C aérobic	+	++
30°C anaérobic	-	-
37°C aérobic	++	++

Légende : Beaucoup de croissance (+++)

Croissance moyenne (++)

Peu de croissance (+)

Absence de croissance (-)

n : représente le nombre de souches associées aux deux espèces.

4.3 Caractérisation phénotypique et biochimique

Les résultats de la résistance aux antibiotiques ont été déterminés par rapport à la résistance intermédiaire. Les profils de résistance obtenue par les souches d'*A. septicus* sont tous différents à l'exception des souches AF1058 et AF1078, qui n'ont aucune résistance aux antibiotiques testés. Une résistance à l'azithromycine et au chloramphénicol a été le plus souvent observée. Cependant, une résistance à la clindamycine a été observée pour les souches d'*A. lanthierii* à l'exception de la souche AF1581 qui est aussi résistante au chloramphénicol. Les souches AF1028, AF1033 ainsi que AF1581 sont des souches considérées multirésistantes étant donné qu'elles sont résistantes à plus de deux antibiotiques.

Tableau 4.3 Résistance aux antibiotiques à la valeur seuil*

Évaluation de la résistance aux antibiotiques des souches d'*A. septicus* (n=4) et *A. lanthierii* (n=6)

Espèce	Souche	Azithromycine 8 µg/ml	Chloramphénicol 32 µg/ml	Ciprofloxacine 4 µg/ml	Clindamycine 8 µg/ml	Érythromycine 32 µg/ml	Gentamicine 8 µg/ml	Acide nalidixique 64 µg/ml	Tétracycline 16 µg/ml
<i>Arcobacter septicus</i>	AF1028	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Arcobacter septicus</i>	AF1033	+	-	+	+	-	-	+	-
<i>Arcobacter septicus</i>	AF1058	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arcobacter septicus</i>	AF1078	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arcobacter lanthierii</i>	AF1429	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Arcobacter lanthierii</i>	AF1430	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Arcobacter lanthierii</i>	AF1431	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Arcobacter lanthierii</i>	AF1440	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Arcobacter lanthierii</i>	AF1441	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Arcobacter lanthierii</i>	AF1581	-	+	-	+	-	-	-	-

* Référence au tableau 3.5

n : représente le nombre de souches associé aux deux espèces.

Selon les tableaux 4.4, 4.5 et 4.6, les nouvelles espèces *Arcobacter septicus* et *Arcobacter lanthierii* possèdent des caractéristiques enzymatiques distinctes du genre *Arcobacter*, soit la présence de l'oxydase, la catalase et la gélatinase. De plus, elles ont démontré une incapacité de croître en présence de NaCl, de faire l'hydrolyse du sang et de la production d'indole ainsi que l'oxydation et la fermentation d'hydrates de carbone. Le tableau 4.4 indique que les deux espèces peuvent croître sur un milieu m-CCDA et MacConkey. De plus, les colonies roses sur milieu MacConkey ont indiqué qu'elles sont aussi capables de faire la fermentation du lactose, qui est aussi une caractéristique souvent retrouvée chez les espèces *Arcobacter* (Tableau 2.2). Le tableau 2.2 indique également que la majorité des *Arcobacter* ont l'habileté de faire l'hydrolyse de l'indoxyl acétate et ces habiletés ont été également retrouvées chez *A. septicus* et *A. lanthierii*.

Tableau 4.4 Analyses phénotypiques d'*A. septicus* et *A. lanthierii*

Analyses	<i>A. septicus</i>	<i>A. lanthierii</i>
Croissance sur milieu CCDA	+	+
Croissance sur MacConkey	+	+
Croissance 4% NaCl	-	-
Croissance 1% glycine	-	+
Alpha-hémolyse	-	-
Catalase	+	+
Oxydase	+	+
Hydrolyse indoxyl acétate	+	+
Résistance à la céfopérazone (64 mg/L)	+	+

Tableau 4.5 Galerie API 20E

Analyses phénotypiques avec galerie API 20E d'*A. septicus* (n=4) et *A. lanthierii* (n=6) en comparaison avec espèces *Arcobacter* connues.

Espèces <i>Arcobacter</i>	URÉase	Réduction du NITrate	ESTérase	HIPpurate	Gamma Glutamyl Transférase	réduction du TTC	Pyrrolidonyl Arylamidase	L-Arginine Arylamidase	L-Aspartate Arylamidase	Phosphatase Alcaline	H ₂ S production	assimilation (GLUcose)	assimilation (sodium Succinate)	Inhibition de croissance (acide NALidixique)	Inhibition de croissance (sodium CeEaZolin)	assimilation (sodium ACÉtate)	assimilation (PROPionate)	assimilation (MALate)	assimilation (trisodium ClTrate)	prédiction de sensibilité thérapeutique (ÉrythrOmycine)
<i>A. nitrofigilis</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. butzleri</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>A. skirrowii</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. cibarius</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>A. halophilus</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. mytili</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. thereus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>A. marinus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. trophiarum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. defluvi</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>A. molluscum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. ellisii</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. bivalviorum</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. venerupis</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arcobacter septicus</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arcobacter lanthierii</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CT(+) <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 49943	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
CT(-) Eau	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 4.6 Galerie API Campy

Analyses phénotypiques avec galerie API Campy d'*A. septicus* (n=4) et *A. lanthierii* (n=6) en comparaison avec espèces *Arcobacter* connues.

Espèces <i>Arcobacter</i>	β-galactosidase	Arginine Dihydrolase	Lysine Décarboxylase	Ornithine Décarboxylase	Utilisation du Citrate	production de H ₂ S	URÉase	Tryptone DéAminase	Production d'INDole	production acétoïne (Voges Proskauer)	Gélatinase (GEL)	fermentation/oxydation (Glycose)	fermentation/oxydation (MANitol)	fermentation/oxydation (INOsitol)	fermentation/oxydation (SORbitol)	fermentation/oxydation (RHAmnose)	fermentation/oxydation (SACcharose)	fermentation/oxydation (MEI libiose)	fermentation/oxydation (AMYgdaline)	fermentation/oxydation (ARAbinose)	production NO ₂	réduction à gaz N ₂
<i>A. nitrofigilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. butzleri</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>A. skirrowii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. cibarius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. halophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. mytili</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. thereius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. marinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. trophiarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. defluvii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. molluscum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. ellisii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. bivalviorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. venerupis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arcobacter septicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arcobacter lanthierii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CT(+) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
CT(-) Water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.4 Les résultats des méthodes connues d'identification des *Arcobacter* se contredisent

Les résultats de l'identification de ces nouvelles espèces avec des méthodes communément utilisées afin de détecter les espèces *Arcobacter* sont résumés dans le tableau 4.7. Cette approche a permis de vérifier l'appartenance potentiel de ces nouvelles espèces à des espèces connues ainsi que de vérifier s'il y aurait des variances dans les résultats obtenus. Ce type d'approche est fréquemment utilisé dans les récentes publications de nouvelles espèces du genre *Arcobacter* (De Smet *et al.*, 2011b, Figueras *et al.*, 2011a). Toutes les souches d'*A. septicus* et *A. lanthierii* ont été identifiées comme étant du genre *Arcobacter*. Cependant, avec l'utilisation de mPCR les plus souvent utilisées pour l'identification et la discrimination des espèces *Arcobacter*, les résultats ont démontré l'identification d'une seule espèce, soit *A. butzleri* selon la mPCR publiée par Houf pour toutes les souches des deux espèces. Un mélange d'espèces différentes, *A. cibarius* et *A. skirrowii* ou simplement un inconnu ont résulté de la PCR multiplex publiée par Doudah. Malgré le fait que la méthode PCR de Doudah identifie aussi *A. butzleri*, tout comme la méthode de Houf, les deux méthodes ont montré des résultats très différents. Avec des contrôles ayant parfaitement fonctionné avec toutes les méthodes PCR testées, ces résultats ambigus indiquent potentiellement la présence de nouvelles espèces. Cette ambiguïté sera discutée plus loin dans ce mémoire.

Tableau 4.7 Résultats des méthodes de PCR connues pour détection des espèces *Arcobacter* avec les souches d'*A. septicus* et *A. lanthierii*.

Espèce	Genre <i>Arcobacter</i>	mPCR (Houf et al. 2000)	mPCR (Doudah et coll. 2010)
<i>A. septicus</i> AF1028	<i>Arcobacter</i> sp.	<i>A. butzleri</i>	Inconnu
<i>A. septicus</i> AF1033	<i>Arcobacter</i> sp.	<i>A. butzleri</i>	Inconnu
<i>A. septicus</i> AF1058	<i>Arcobacter</i> sp.	<i>A. butzleri</i>	Inconnu
<i>A. septicus</i> AF1078	<i>Arcobacter</i> sp.	<i>A. butzleri</i>	Inconnu
<i>A. lanthierii</i> AF1429	<i>Arcobacter</i> sp.	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cibarius</i> ; <i>A. skirrowii</i>
<i>A. lanthierii</i> AF1430	<i>Arcobacter</i> sp.	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cibarius</i> ; <i>A. skirrowii</i>
<i>A. lanthierii</i> AF1431	<i>Arcobacter</i> sp.	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cibarius</i> ; <i>A. skirrowii</i>
<i>A. lanthierii</i> AF1440	<i>Arcobacter</i> sp.	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cibarius</i> ; <i>A. skirrowii</i>
<i>A. lanthierii</i> AF1441	<i>Arcobacter</i> sp.	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cibarius</i> ; <i>A. skirrowii</i>
<i>A. lanthierii</i> AF1581	<i>Arcobacter</i> sp.	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cibarius</i> ; <i>A. skirrowii</i>
Contrôles	<i>A. butzleri</i>	<i>Arcobacter</i> sp.	<i>A. butzleri</i>
	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Arcobacter</i> sp.	<i>A. cryaerophilus</i>
	<i>A. skirrowii</i>	<i>Arcobacter</i> sp.	<i>A. skirrowii</i>
	Eau sans nucléase	N.A.	N.A.

4.5 Analyses préliminaires du génome

Le séquençage du génome des nouvelles espèces est toujours en cours. Toutefois, certaines informations ont été obtenues jusqu'à présent. Le génome d'une souche d'*A. lanthierii* a été partiellement analysé. Ce génome est approximativement 2.26 Mb de taille et contient un ratio de 26% GC. Le nombre de gènes et protéines exprimées n'est pas disponible pour le moment. Les résultats préliminaires du génome sont résumés dans le tableau 4.8.

Tableau 4.8 Résultats préliminaires du génome d'*A. lanthierii* AF1430.

Espèce	Taille (Mb)	GC%	Gène	Protéine
<i>A. butzleri</i> RM4018	2,34	27	2 333	2 259
<i>A. nitrofigilis</i> DSM 7299	3,19	28,4	3 220	3 126
<i>A. lanthierii</i> AF1430	2,26	26	N.D.	N.D.

4.6 Acides gras en commun avec le genre *Arcobacter*

Suivant l'analyse des acides gras méthyl ester (tableau 4.9), il a été possible de déduire qu'*A. septicus* et *A. lanthierii* n'ont pas d'acides gras cycliques ainsi que de longues chaînes avec un nombre impair d'insaturations. Ils contiennent aussi un grand pourcentage d'acides gras hydroxylés et d'acides gras ramifiés. De plus, ils contiennent une grande portion d'acides gras saturés et mono-insaturés, ce dernier ayant un ratio d'acides gras *cis* plus élevé que *trans*.

Tableau 4.9 Portion (%) d'acides gras méthylés

Acide gras	<i>A. septicus</i> AF1028	<i>A. lanthierii</i> AF1429	<i>A. cibarius</i> (Ctrl +)	<i>E. coli</i> (Ctrl -)	<i>P. aeruginosa</i> (Ctrl -)
C11:0	0	0	0	0	0
2-OH C10:0	0	0	0	0	0
3-OH C10:0	0	0	0	0	2,25
C12:0	5,08	5,03	4,52	3,74	1,95
C13:0	0	0	0	0,11	0
2-OH C12:0	0	0	0	0	6,19
3-OH C12:0	0,73	0,73	0	0	3,01
C14:0	1,24	1,30	3,12	6,50	0,55
i-C15:0	0	0	0	0	0,05
a-C15:0	0	0	0	0	0,03
C15:0	0,15	0,15	0	0,47	0,49
2-OH C14:0	0,22	0,17	0	0,41	0
3-OH C14:0	7,04	6,24	4,00	9,57	0
i-C16:0	0	0	0	0	0,13
C16:1n7c	30,12	22,48	30,82	2,81	9,04
C16:1n7t	6,75	11,65	5,88	0	0
C16:0	27,41	31,20	25,73	35,50	27,60
i-C17:0	0	0	0	0	0,11
a-C17:0	0	0	0	0,09	0,04
cyc-C17:0 (9,10)	0	0	0	24,36	4,08
C17:0	0	0,09	0	0,31	0,39
2-OH C16:0	0	0	0	0	0
3-OH C16:0	0	0	0	0	0
i-C18:0	0	0	0	0	0
C18:2n6	0	1,23	0	0	0
C18:1n9c	0	0	0	0	0,30
C18:1n7c	17,56	16,61	20,09	0,74	33,26
C18:1n9t	0	0	0	0	0
C18:1n7t	0,68	1,32	0	4,29	0
C18:0	0,44	0,50	0	1,76	1,56
i-C19:0	0	0	0	0	0
a-C19:0	0	0	0	0	0
cyc-C19:0 (9,10)	0	0	0	0	0
cyc-C19:0 (11,12)	0	0	0	7,52	8,96
C19:0	0	0	0	0	0
C20:0	0	0	0	0	0
C21:0	0	0	0	1,07	0
C23:0	0,37	0,37	2,52	0	0
Inconnu	2,23	0,93	3,32	0,76	0

4.7 *A. septicus* et *A. lanthierii* sous le microscope

L'observation des nouvelles espèces *A. septicus* et *A. lanthierii* sous microscopie électronique à balayage et en transmission ont permis de déduire que ces espèces ont une forme de bâtonnet légèrement courbé. Ils ont la capacité d'être mobiles par l'entremise d'un seul flagelle polaire. La longueur des bactéries a été déterminée comme étant entre 1,2 et 2 μm , tandis que la largeur est entre 0,2 et 0,4 μm .

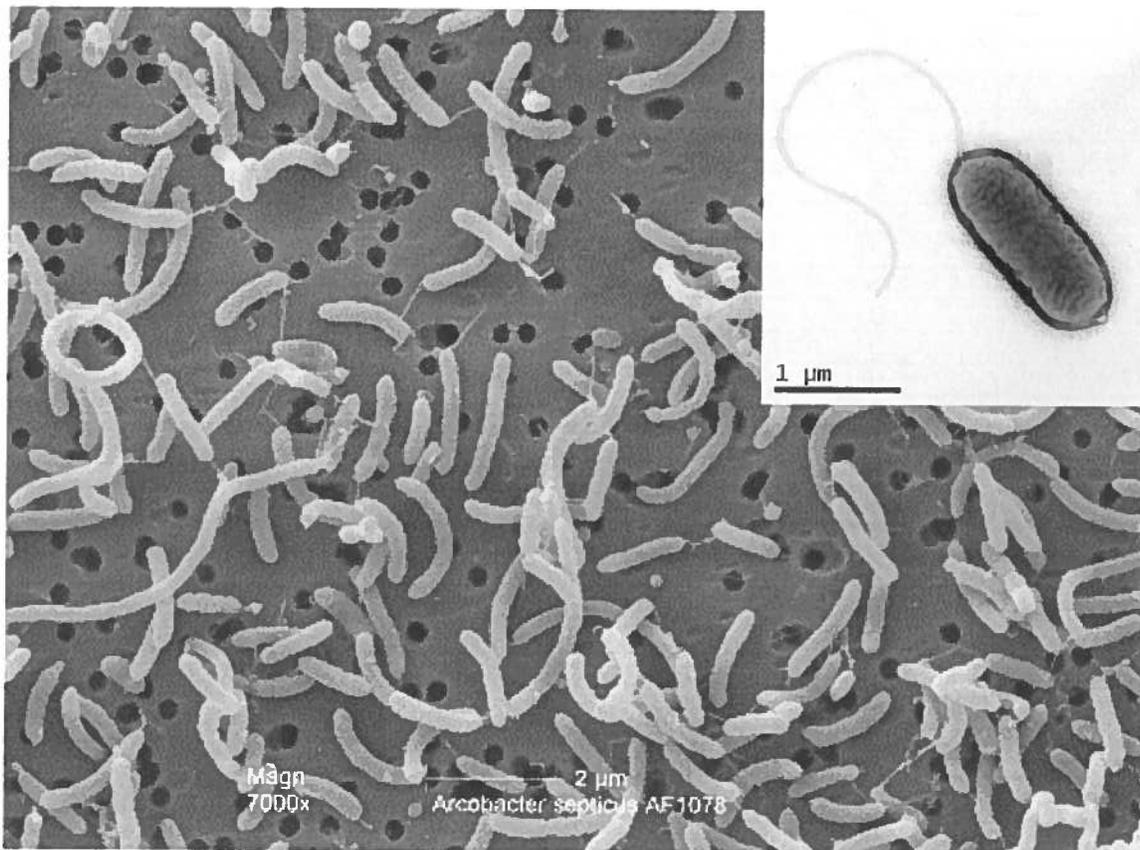


Figure 4.5 Image d'*A. septicus* en microscopie électronique à balayage (MEB) et en transmission (MET).

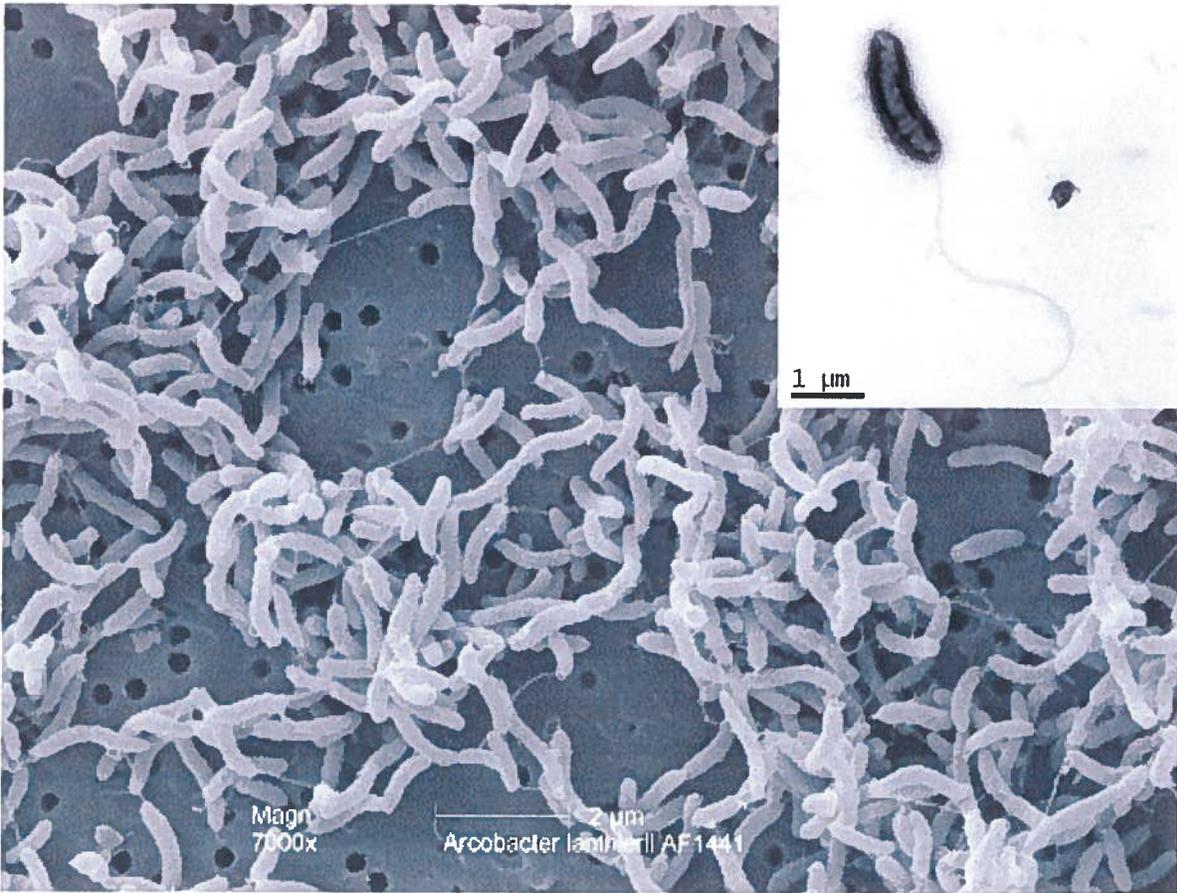


Figure 4.6 Image d'*A. lanthierii* en microscopie électronique à balayage (MEB) et en transmission (MET).

4.8 Nouvelles méthodes d'identification

Un protocole de PCR multiplex a été créé avec succès à l'aide du gène *rpoB* de l'espèce *A. septicus* ainsi que du gène *gyrB* de l'espèce *A. lanthierii*. Ce protocole permet d'identifier simultanément les deux espèces en une même PCR. La figure 4.7 illustre l'identification des deux espèces lorsqu'elles sont mélangées et lorsqu'elles sont identifiées séparément. De plus, une validation avec d'autres espèces *Arcobacter* a démontré qu'il n'y a pas eu d'amplification non spécifique.

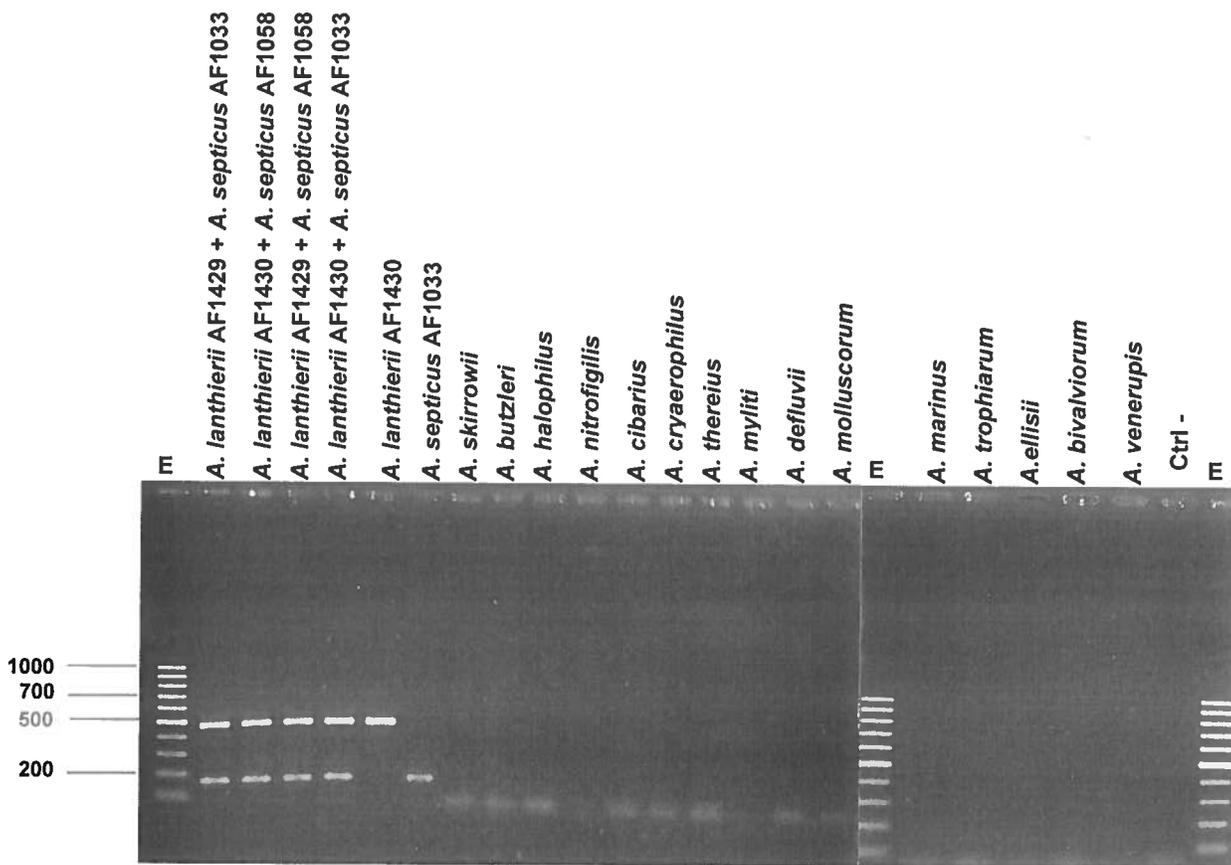


Figure 4.7 PCR multiplex.

Méthode PCR créée pour l'identification simultanée d'*A. septicus* et *A. lanthierii*. Le gène *rpoB* (151 pb) et le gène *gyrB* (461 pb) ont été amplifiés respectivement pour *A. septicus* et *A. lanthierii* et migré par électrophorèse sur gel d'agarose. Des références des espèces *Arcobacter* ont aussi été évaluées avec cette PCR comme contrôles négatifs.

Un protocole de PCR ciblant toutes les espèces *Arcobacter*, incluant les nouvelles espèces, a aussi été créé avec succès. À l'aide des séquences du gène *gyrB* de toutes les espèces *Arcobacter* publiées lors de la rédaction de ce mémoire, une paire d'amorces a été créée et validée. Dans le gel de la figure 4.8, un amplicon de 395 bp a été observé pour toutes les espèces *Arcobacter*. Aucune amplification n'a été observée avec d'autres genres bactériens testés, comme *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* et *Escherichia* (ces résultats ne sont pas illustrés sur le gel).

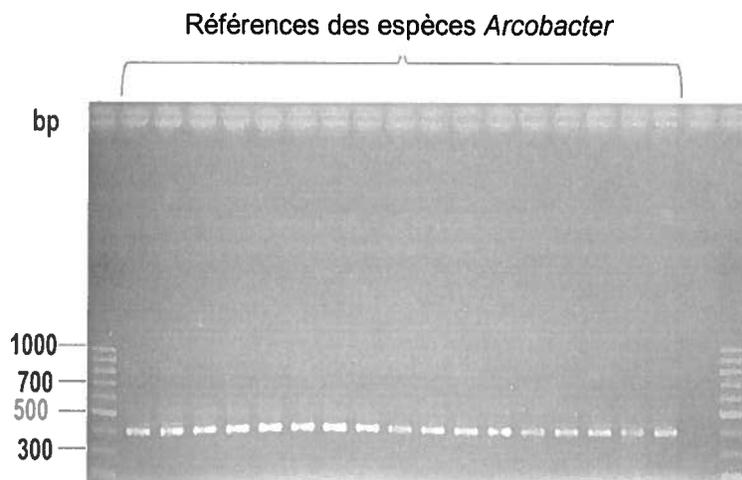


Figure 4.8 PCR spécifique au genre *Arcobacter*.

Méthode PCR créée afin d'identifier toutes les espèces *Arcobacter* connues. Les références des espèces *Arcobacter* sont représentées dans la première partie de ce gel en suivant l'ordre des puits: (1) *A. bivalviorum*, (2) *A. nitrofigilis*, (3) *A. molluscorum*, (4) *A. ellisii*, (5) *A. trophiarum*, (6) *A. marinus*, (7) *A. mytili*, (8) *A. venerupis*, (9) *A. defluvii*, (10) *A. cibarius*, (11) *A. halophilus*, (12) *A. thereius*, (13) *A. skirrowii*, (14) *A. cryaerophilus*, (15) *A. butzleri*, (16) *A. septicus* et (17) *A. lanthierii*. Cette PCR amplifie le gène *gyrB* (395 pb). Les produits d'amplification ont été observés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1,5%.

À l'aide du protocole de PCR spécifique au genre *Arcobacter*, une méthode RFLP a été conçue afin de discriminer toutes les espèces. La figure 4.9 illustre les 17 différents profils de restriction avec l'enzyme de restriction *AluI*. Les différents profils pour chaque espèce évaluée sont résumés dans le tableau 4.10 avec les fragments théoriques obtenus avec un logiciel ainsi que les fragments expérimentaux.

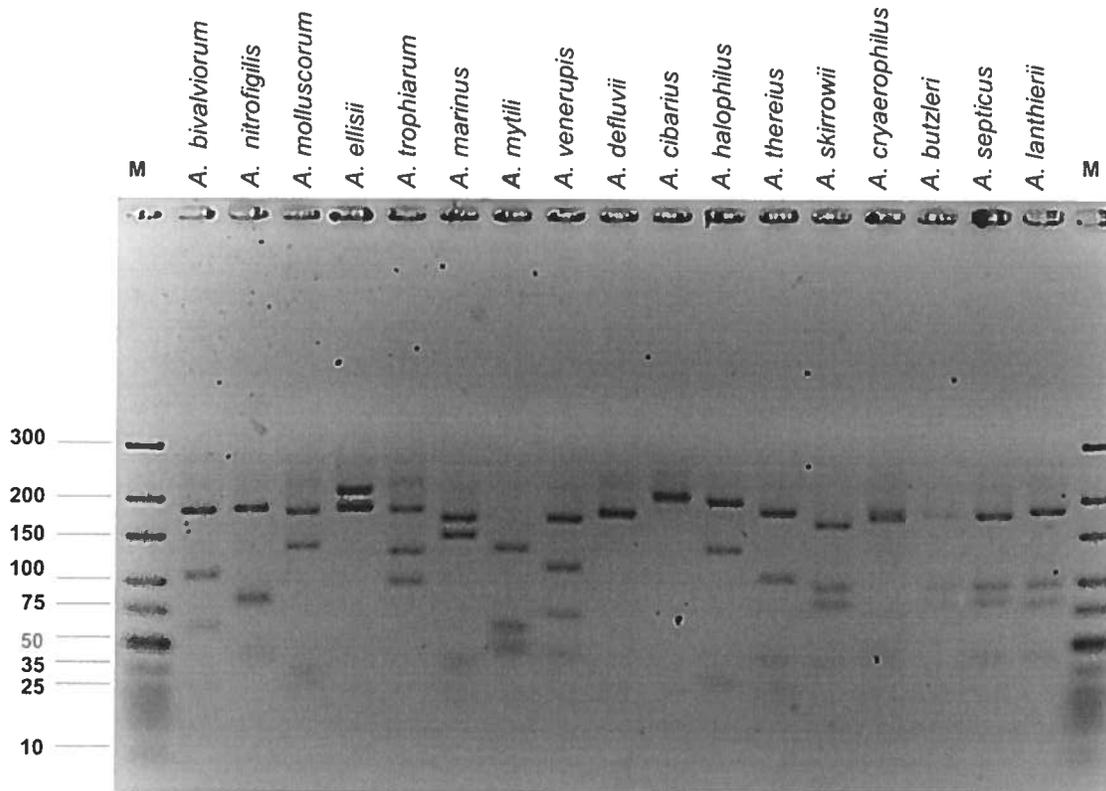


Figure 4.9 Profile des fragments des espèces *Arcobacter* par RFLP.

Méthode RFLP créée afin de discriminer toutes les espèces *Arcobacter*. L'échelle de poids moléculaire d'ADN GeneRuler Ultra Low Range a été utilisée (M). Les résultats de la digestion avec *A1u1* ont été observés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 4% TopVision LE GQ (CAT# R0491).

Tableau 4.10 Fragments d'ADN théoriques et expérimentaux pour la méthode RFLP.

Les fragments expérimentaux obtenus par électrophorèse (Fig 4.9) et les fragments théoriques par le logiciel DNAMAN pour chaque espèce *Arcobacter* sont illustrés. Les chiffres en gras sont les fragments obtenus théoriquement et expérimentalement.

Well #	Species	Strain	Fragment sizes (bp)	
			Theoretical	Factual
1	<i>Arcobacter bivalviorum</i>	LMG 26124	178, 103, 60, 27, 15, 12	178, 103, 60
2	<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	ATCC 33309	178, 84, 79, 30, 15, 12, 9	178, 84, 79
3	<i>Arcobacter molluscorum</i>	LMG 25693	189, 132, 31, 27, 15, 12, 6	189, 132, 31, 27
4	<i>Arcobacter ellisii</i>	LMG 26155	202, 178, 15	202, 178
5	<i>Arcobacter trophiarum</i>	LMG 25534	178, 125, 95	178, 125, 95
6	<i>Arcobacter marinus</i>	LMG 25770	163, 141, 39, 31, 21	163, 141, 39
7	<i>Arcobacter mytili</i>	LMG 24559	127, 60, 51, 45, 43, 9	127, 60, 51
8	<i>Arcobacter venrupis</i>	LMG 26156	163, 109, 69, 42, 12	163, 109, 69, 42
9	<i>Arcobacter defluvii</i>	LMG 25694	175, 172, 27, 15, 6	175, 172, 27
10	<i>Arcobacter cibarius</i>	LMG 21996	202, 193	202, 193
11	<i>Arcobacter halophilus</i>	ATCC BAA-1022	193, 132, 31, 30, 9	193, 132, 31, 30
12	<i>Arcobacter theaeus</i>	LMG 24486	178, 104, 43, 30, 25, 15	178, 104, 43, 30
13	<i>Arcobacter skirrowii</i>	LMG 6621	163, 95, 83, 42, 12	163, 95, 83, 42
14	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	NCTC 11885	178, 172, 45	178, 172, 45
15	<i>Arcobacter butzleri</i>	ATCC 49616	175, 95, 83, 27, 15	175, 95, 83
16	<i>Arcobacter septicus</i> (not yet published)	AF1028	175, 95, 83, 42	175, 95, 83, 42
17	<i>Arcobacter lanthierii</i> (not yet published)	AF1429	178, 96, 79, 42	178, 96, 79, 42

5 DISCUSSION

L'objectif global de ce mémoire était de caractériser deux nouvelles espèces bactériennes appartenant potentiellement au genre *Arcobacter*. Ces nouvelles espèces ont été isolées de matières fécales humaines et d'animaux de ferme. Les espèces *Arcobacter septicus* et *Arcobacter lanthierii* ont été caractérisées comme faisant partie du genre *Arcobacter*.

5.1 Les nouvelles espèces appartiennent au genre *Arcobacter*

Ces deux nouvelles espèces se regroupent avec les espèces *Arcobacter* provenant de sources fécales plutôt que de sources environnementales (Fig. 4.1). Étant donné leur source, soit des fèces de vaches laitières et de truie ainsi que de fosses septiques humaines, il n'est pas surprenant qu'elles se classent dans ce groupe. Selon la littérature, une valeur arbitraire d'au plus de 97% entre les séquences des gènes de l'ARNr 16S permet de discriminer potentiellement des espèces du même genre. Le tableau 4.1 illustre les pourcentages d'homologie entre les séquences du gène de l'ARNr 16S et la moyenne, par rapport aux espèces les plus génétiquement similaires aux deux nouvelles espèces, est à plus de 97%. Cependant, ce chiffre peut être sous-estimé étant donné que les espèces du genre *Arcobacter* ont entre 91 et 99% d'homologie entre elles comme mentionnée dans la section 2.2 de ce mémoire. D'après les arbres phylogénétiques (Fig. 4.1 à 4.4), les dix souches découvertes semblent appartenir à de nouvelles espèces étant donné qu'elles ont toutes deux des positions phylogénétiques différentes par rapport aux séquences de l'ARNr 16S et des gènes de ménage des espèces *Arcobacter* connues. Toutefois, la comparaison des génomes de ces deux espèces avec les autres espèces d'*Arcobacter* permettra de mieux valider la notion de nouvelles espèces. Pour le bien de ce mémoire, les arbres phylogénétiques ont été représentés individuellement pour chaque gène étudié cependant, pour une publication future un arbre concaténé regroupant tous les gènes séquencés sera construit afin de démontrer d'avantage le profil génétique de chaque souche.

5.2 Conditions optimales de croissance

Le genre *Arcobacter* se distingue du genre *Campylobacter* en ayant l'incapacité de croître à une température de 42°C. Les nouvelles espèces ont la capacité de bien croître aux températures de 25, 30 et 37°C, cependant aucune croissance n'a été observée à 42°C. Les *Arcobacter* peuvent croître aisément à des températures entre 25 et 37°C. Une autre distinction entre les genres *Arcobacter* et *Campylobacter* est que les espèces *Campylobacter* ne sont pas aérotolérantes tandis qu'*Arcobacter* peut croître en présence d'oxygène. D'après le tableau 4.3, les deux nouvelles espèces ont la capacité de croître sur le milieu m-CCDA (*Campylobacter* blood-free selective media), utilisé pour la croissance des espèces *Campylobacter*, cependant en très faible biomasse comparée au genre *Campylobacter*. Les deux nouvelles espèces appartiennent bel et bien au genre *Arcobacter* et non au genre *Campylobacter*, un genre de la même famille qu'*Arcobacter* basé sur ces études de croissance.

5.3 Caractérisation biochimique et enzymatique

Afin de bien démontrer les résultats pertinents, les résultats de la caractérisation phénotypique ont été mis sous forme de tableau (tableau 4.5 et 4.6). Toutefois, une analyse d'agglomération de type UPGMA aurait aidé à visualiser, sous forme de dendrogrammes, la classification distincte des souches selon leurs profils phénotypiques parmi les espèces *Arcobacter* connues. De ces tableaux, il est possible de déduire que les espèces *A. lanthierii* et *A. septicus* ont toutes deux plusieurs des caractéristiques standards observées chez les espèces du genre *Arcobacter*, soit la forme de bâtonnet courbé, motile à l'aide d'un flagelle polaire ainsi que la capacité de faire la catalase, la réduction du nitrate et l'oxydase. Il est difficile aujourd'hui de discriminer les espèces du même genre bactérien à l'aide de tests phénotypiques comme les galeries API (Huysmans *et al.*, 1995) étant donné l'augmentation du nombre d'espèces bactériennes décrites. Cependant, la croissance sur un milieu contenant de la glycine pourrait être un test pouvant discriminer entre les deux nouvelles espèces, car *A. lanthierii* a été positif pour la croissance sur ce produit tandis qu'*A. septicus* a été négatif. De plus, plusieurs conclusions peuvent être faites à partir des résultats des galeries API, non seulement par rapport aux autres espèces *Arcobacter*, mais aussi entre *A. septicus* et *A. lanthierii*. Parmi tous les tests présents sur les galeries API, aucun ne permet la discrimination de ses deux nouvelles espèces aux espèces *Arcobacter* connues. Cependant le test de la production d'acétoïne, indiquée par la réaction positive avec le réactif de Vogues-Proskauer (VP), pourrait être un test identifiant une souche bactérienne comme étant potentiellement *A. septicus* ou *A. lanthierii*, étant

donné que ce test a été positif pour seulement une autre espèce *Arcobacter*, soit *A. trophiarum*. Les tests pouvant discriminer *A. septicus* de *A. lanthieri* sont la réduction du nitrate, qui a été positif pour *A. lanthieri* et négatif pour *A. septicus*. De plus, *A. lanthieri* a été capable de faire l'assimilation de l'acétate de sodium et non *A. septicus*.

5.4 Les espèces *A. lanthieri* et *A. septicus* sont multirésistantes

L'analyse de la résistance aux antibiotiques est très importante dans le cas des espèces *Arcobacter* puisqu'elles sont souvent retrouvées chez des animaux (Driessche *et al.*, 2003) et des humains (Vandenberg *et al.*, 2004) ayant une gastroentérite. De même, elles sont aussi retrouvées dans les hôpitaux (Minaeva *et al.*, 2006a). Les profils de résistance des souches d'*Arcobacter septicus* sont beaucoup plus variables que ceux observés avec les souches d'*Arcobacter lanthieri*. Cependant, une résistance à la clindamycine a été observée chez la majorité des souches appartenant aux deux espèces. La clindamycine est un antibiotique communément utilisé contre les infections causées par des bactéries anaérobies. De plus, il est utilisé chez les chiens et les chats; par contre, son utilisation n'est pas recommandée pour les animaux de ferme puisqu'il cause des diarrhées pouvant causer la mort. Plusieurs études ont démontré une résistance accrue à la clindamycine chez les espèces *Arcobacter*. L'évaluation de la résistance à la clindamycine chez 126 isolats d'*A. butzleri* a démontré que 90% des isolats étaient résistants (Son *et al.*, 2007a). Dans une autre étude effectuée dans le laboratoire du Dr Lanthier, l'évaluation de la résistance à la clindamycine chez 311 isolats d'*A. butzleri* provenant de diverses sources fécales a démontré une résistance dans 86% des isolats (Whiteduck Léveillé *et al.*, 2013). Il est important de noter le profil de résistance très varié des isolats *A. septicus*, car ils sont tous des isolats provenant de fosses septiques et donc d'échantillons fécaux humains. Une résistance à la clindamycine, un antibiotique de choix pour les infections anaérobies, chez les souches AF1028 et AF1033 ainsi que leur résistance à trois et quatre, respectivement, des huit antibiotiques évalués est très alarmante. Cette multirésistance peut être due à l'emploi impropre ou encore abusif des antibiotiques chez les humains. Les bactéries vont normalement acquérir une résistance afin de s'adapter davantage à leur environnement et donc ceci suggère que l'acquisition d'une multirésistance chez les souches AF1028 et AF1033 d'*A. septicus* pourrait être un signe de pathogénicité chez cette bactérie. Étant donné que ces souches proviennent de fosses septiques humaines, ceci suggère qu'elles pourraient causer des maladies gastroentériques. Cependant, des analyses de pathogénicité n'ont pas été effectuées sur ces deux nouvelles espèces. Aucune résistance n'a été observée pour les souches AF1058 et AF1078; néanmoins, ceci n'exclut pas une résistance à tout autre antibiotique. Bien qu'elle ne soit pas

omniprésente chez l'ensemble des espèces *Arcobacter*, une résistance à la céfopérazone (tableau 4.4), qui est souvent analysée lors de la caractérisation des espèces *Arcobacter*, a été observée chez les deux espèces. C'est pour cela que certains des milieux sélectifs pour *Arcobacter* contiennent de la céfopérazone et ces milieux sont également considérés adéquats pour la croissance de ces deux nouvelles espèces (c.-à-d. milieux ASIA et m-AAM).

5.5 Génétique

Une PCR spécifique au genre *Arcobacter* a bel et bien validé l'appartenance de ces nouvelles espèces à ce genre bactérien (Fig. 4.8). Afin de vérifier si ces espèces appartenaient possiblement à une espèce déjà publiée, deux méthodes de PCR multiplex ont été effectuées. L'ADN extrait des nouvelles espèces a été premièrement identifié par la PCR multiplex de Houf *et coll.* qui permet la discrimination d'*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* et *A. skirrowii* et le résultat a conclu que tous les isolats étaient *Arcobacter butzleri*. La méthode de PCR multiplex de Doudah *et coll.* a ensuite été réalisée et, malgré le fait que cette méthode PCR identifie aussi *A. butzleri*, aucun isolat n'a été identifié comme étant *A. butzleri* avec cette mPCR. Les résultats de cette dernière méthode n'ont démontré aucune amplification pour les isolats d'*A. septicus* et a démontré un mélange des espèces *A. cibarius* et *A. skirrowii* pour les isolats d'*A. lanthierii*. En utilisant les deux mPCR qui sont communément utilisées, tous les contrôles positifs ont été bien amplifiés et identifiés; cependant, les résultats pour les isolats appartenant aux nouvelles espèces sont peu convaincants, ce qui a aussi été reporté dans d'autres études (Collado *et al.*, 2009a, Levican *et al.*, 2012). Cette identification plutôt douteuse est un indice de la découverte potentielle de nouvelles espèces *Arcobacter*.

Actuellement, seulement deux génomes complets de souche référence du genre *Arcobacter* ont été séquencés, soit *A. butzleri* RM4018 (Miller *et al.*, 2007) et *A. nitrofigilis* CI (Pati *et al.*, 2010); cependant plusieurs sont en voie de l'être. Le génome complet d'*A. septicus* et *A. lanthierii* sont toujours en cours de séquençage. Toutefois, des analyses préliminaires à l'aide du logiciel FastQC suggèrent que le génome est de bonne qualité; ne nécessitant alors aucune correction ou excision. Par rapport au contenu (%) en G+C, les résultats préliminaires sur le génome d'*A. lanthierii* sont en accord avec la majorité des espèces *Arcobacter* déjà publiées ou séquencées (Sasi Jyothsna *et al.*, 2013), soit avec un contenu se situant entre 25 et 30% (tableau 4.8). Selon les données obtenues par les séquences des génomes connus, on peut s'attendre à ce qu'*A. septicus* et *A. lanthierii* possèdent plus de 2000 gènes.

5.6 Analyses des acides gras

Le profil des acides gras présents chez une espèce ou une autre peut permettre la différenciation entre les espèces appartenant à un même genre bactérien. Les acides gras 14:0, 16:0 ; 16:1, 18:0 ainsi que 18:1 sont les plus présents chez les espèces *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. nitrofigilis* et *A. skirrowii*. Ces mêmes acides gras ont été retrouvés chez les nouvelles espèces, *A. septicus* et *A. lanthierii* (Tableau 4.9). De plus, les acides gras 16:0 sont les plus abondants chez les *Arcobacter* et de même pour *A. septicus* et *A. lanthierii*. L'espèce *Arcobacter* la plus récemment publiée démontre aussi un profil d'acide gras très similaire à ceux d'*A. septicus* et *A. lanthierii*, soit une présence majoritaire des acides gras C16:1 ω 7c, C18:1 ω 7c, C16:0 et C12:0 et en minorité les acides gras C14:0, C12:03OH et C18:0 (Sasi Jyothsna *et al.*, 2013). Il y a une grande ressemblance entre le profil d'acide gras des deux nouvelles espèces en comparaison avec une espèce génétiquement similaire, soit *A. cibarius* (Tableau 4.9). Toutefois, les nouvelles espèces ont un plus grand nombre d'acides gras hydroxylés (OH) ainsi qu'un plus grand ratio d'acides gras ayant de longues chaînes. Cependant, lorsque l'on compare avec d'autres bactéries à Gram négatif étant aussi des pathogènes humains, soit *Escherichia coli* ou encore *Pseudomonas aeruginosa*, il y a plusieurs différences. Les espèces *A. septicus* et *A. lanthierii* ont toutes deux un manque d'acides gras cycliques qui sont normalement présents chez les bactéries à Gram négatif. La plus grande source d'acides gras hydroxylés chez les bactéries est la partie du lipide A du lipopolysaccharide qui sert à l'ancrage des polysaccharides à la surface de la membrane bactérienne. Ceci peut être une indication de la présence d'antigène de surface ou encore de pathogénicité. Les nouvelles espèces contiennent aussi de longues chaînes saturées à nombre impair qui sont généralement rares chez les bactéries à Gram négatif. L'espèce *A. septicus* a un ratio d'acides gras *cis/trans* plus grand qu'*A. lanthierii*, indiquant que celui-ci aurait une membrane plus fluide et flexible permettant alors un ancrage cellulaire et ainsi contribuer à la pathogénicité. Encore une fois, l'utilisation d'une analyse d'agglomération de type UPGMA avec les résultats du tableau 4.9 aurait permis de visualiser davantage les profils phénotypiques divergents des souche et donc ce type d'analyse devrait être considérée pour une publication future.

5.7 Observation microscopique

Sous un microscope, les deux nouvelles espèces découvertes ont une apparence très similaire et comparable aux espèces *Arcobacter* publiées. Vandamme *et coll.* on décrit le nouveau genre *Arcobacter* en 1991 comme ayant une forme de bâtonnet courbé, mobile à l'aide d'un seul flagelle polaire et mesurant 0,2-0,9 μm de largeur ainsi que 1-3 μm de longueur (Vandamme *et al.*, 1991b). Toutes ces caractéristiques ont été également observées chez *A. septicus* et *A. lanthierii* lors d'une observation sous microscope électronique. Certaines particularités peuvent permettre de différencier les nouvelles espèces l'une de l'autre, soit une forme plus allongée et courbée pour *A. lanthierii* en général.

5.8 Méthodes d'identification des nouvelles espèces

L'utilisation de séquences de gènes de ménage a prouvé être plus efficace pour le développement d'une méthode PCR multiplex pour la détection simultanée des nouvelles espèces. Le tableau 4.7 démontre le type de résultats ambigus obtenus lors de l'utilisation de méthodes conventionnelles utilisant l'ARNr 16S. De plus, avec un nombre croissant d'espèces *Arcobacter* étant caractérisées dans les dix dernières années, des méthodes qui discriminent toutes les espèces sont de mise. La méthode PCR-RFLP présentée dans ce mémoire est non seulement capable de détecter toutes les espèces *Arcobacter* en utilisant également la séquence d'un gène de ménage, mais aussi de les discriminer entre elles.

6 CONCLUSION

L'étude de 10 souches *Arcobacter* hypothétiques a permis de conclure que deux nouvelles espèces ont été découvertes. Le nom *A. lanthierii* a été proposé afin de rendre hommage au Dr Lanthier, qui était originairement mon directeur de recherche, et *A. septicus* est le mot latin pour septique. Les résultats de plusieurs méthodes de caractérisations phénotypiques, soit la capacité de faire la catalase, l'oxydase, la réduction du nitrate et une croissance optimale en conditions microaérophiles à 30°C, démontrent un profil de caractéristiques commun aux *Arcobacter*. Les résultats de l'analyse des acides gras ainsi que des observations sous microscopie électronique ont aussi démontré une appartenance au genre *Arcobacter*. De plus, des analyses phylogénétiques du gène de l'ARNr 16S ainsi que de 3 gènes de ménage ont permis de discriminer ses nouvelles espèces parmi les espèces appartenant déjà au genre *Arcobacter*. Cependant, la séquence du génome complet, toujours en processus, pourra confirmer leur individualité dans le genre *Arcobacter*.

7 RÉFÉRENCES

- Abay S, Kayman T, Hizlisoy H & Aydin F (2012) *In vitro* antibacterial susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolated from different sources. *J Vet Med Sci* 74(5):613-616.
- Abdelbaqi K, Buissonnière A, Prouzet-Mauleon V, Gresser J, Wesley I, Mégraud F & Ménard A (2007a) Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to detect *Arcobacter* species. *J Clin Microbiol* 45(9):3015-3021.
- Abdelbaqi K, Ménard A, Prouzet-Mauleon V, Bringaud F, Lehours P & Mégraud F (2007b) Nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49(3):337-345.
- Adesiji YO, Coker AO & Oloke JK (2011) Detection of *Arcobacter* in feces of healthy chickens in Osogbo, Nigeria. *J Food Prot* 74(1):119-121.
- Amisu KO, Coker AO, On SL & Isokpehi RD (2003) *Arcobacter butzleri* strains from poultry abattoir effluent in Nigeria [corrected]. *East Afr Med J* 80(4):218-222.
- Andersen MM, Wesley IV, Nestor E & Trampel DW (2007) Prevalence of *Arcobacter* species in market-weight commercial turkeys. *Antonie Van Leeuwenhoek* 92(3):309-317.
- Anderson KF, Kiehlbauch JA, Anderson DC, McClure HM & Wachsmuth IK (1993) *Arcobacter* (*Campylobacter*) *butzleri*-associated diarrheal illness in a nonhuman primate population. *Infect Immun* 61(5):2220-2223.
- Antolín A, González I, García T, Hernández PE & Martín R (2001) *Arcobacter* spp. enumeration in poultry meat using a combined PCR-ELISA assay. *Meat Sci* 59(2):169-174.
- Assanta MA, Roy D, Lemay MJ & Montpetit D (2002) Attachment of *Arcobacter butzleri*, a new waterborne pathogen, to water distribution pipe surfaces. *J Food Prot* 65(8):1240-1247.
- Atabay H & Aydin F (2001) Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents. *Lett Appl Microbiol* 33(6):430-433.
- Atabay H & Corry J (1997) The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. *J Appl Microbiol* 83(5):619-626.
- Atabay H & Corry JE (1998a) Evaluation of a new *Arcobacter* enrichment medium and comparison with two media developed for enrichment of *Campylobacter* spp. *Int J Food Microbiol* 41(1):53-58.
- Atabay H, Corry JE & On SL (1998b) Diversity and prevalence of *Arcobacter* spp. in broiler chickens. *J Appl Microbiol* 84(6):1007-1016.
- Atabay H, Unver A, Sahin M, Otlu S, Elmali M & Yaman H (2008) Isolation of various *Arcobacter* species from domestic geese (*Anser anser*). *Vet Microbiol* 128(3-4):400-405.
- Atabay H, Wainø M & Madsen M (2006) Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry. *Int J Food Microbiol* 109(1-2):139-145.

- 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. *Int J Food Microbiol* 81(1):21-28.
- Atanassova V, Kessen V, Reich F & Klein G (2008) Incidence of *Arcobacter* spp. in poultry: quantitative and qualitative analysis and PCR differentiation. *J Food Prot* 71(12):2533-2536.
- Aydin F, Gümüşsoy KS, Atabay HI, İça T & Abay S (2007) Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *J Appl Microbiol* 103(1):27-35.
- Balamurugan S, Ahmed R & Chambers JR (2013) Survival of *Arcobacter butzleri* on vacuum packaged chill stored beef. *J Food Res Int* 52(2):503-507.
- Brightwell G, Mowat E, Clemens R, Boerema J, Pulford DJ & On SL (2007) Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*. *J Microbiol Meth* 68(2):318-325.
- 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. *Appl Environ Microbiol* 58(10):3413-3416.
- Bücker R, Troeger H, Kleer J, Fromm M & Schulzke JD (2009) *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells. *J Infect Dis* 200(5):756-764.
- Canada Go (2004) Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) 2004. (Public Health Agency of Canada, Guelph, ON).
- Carbone M, Maugeri TL, Giannone M, Gugliandolo C, Midiri A & Fera MT (2003) Adherence of environmental *Arcobacter butzleri* and *Vibrio* spp. isolates to epithelial cells in vitro. *Food Microbiol* 20(5):611-616.
- Cervenka L, Malíková Z, Zachová I & Vytrasová J (2004) The effect of acetic acid, citric acid, and trisodium citrate in combination with different levels of water activity on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture. *Folia Microbiol (Praha)* 49(1):8-12.
- Cervenka L, Peskova I, Foltynova E, Pejchalova M, Brozkova I & Vytrasova J (2006) Inhibitory effects of some spice and herb extracts against *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus*, and *A. skirrowii*. *Curr Microbiol* 53(5):435-439.
- Chao J, Wolfaardt GM & Arts MT (2010) Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid profiles in biofilms and batch planktonic cultures. *Can J Microbiol* 56(12):1028-1039.
- Chinivasagam HN, Corney BG, Wright LL, Diallo IS & Blackall PJ (2007) Detection of *Arcobacter* spp. in piggery effluent and effluent-irrigated soils in southeast Queensland. *J Appl Microbiol* 103(2):418-426.
- Collado L, Cleenwerck I, Van Trappen S, De Vos P & Figueras MJ (2009a) *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *Int J Syst Evol Microbiol* 59(Pt 6):1391-1396.
- Collado L & Figueras MJ (2011a) Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin Microbiol Rev* 24(1):174-192.

- Collado L, Guarro J & Figueras MJ (2009b) Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *J Food Prot* 72(5):1102-1106.
- Collado L, Inza I, Guarro J & Figueras MJ (2008) Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environ Microbiol* 10(6):1635-1640.
- 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 Res* 44(12):3696-3702.
- Collado L, Levican A, Perez J & Figueras MJ (2011b) *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 61(Pt 9):2155-2161.
- Dauga C (2002) Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. *Int J Syst Evol Microbiol* 52(2):531-547.
- de Boer E, Tilburg JJ, Woodward DL, Lior H & Johnson WM (1996) A selective medium for the isolation of *Arcobacter* from meats. *Lett Appl Microbiol* 23(1):64-66.
- de la Cabada Bauche J & DuPont HL (2011) New developments in traveler's diarrhea. *J Gastroen Hepatol* 7(2):88.
- de Oliveira SJ, Baetz AL, Wesley IV & Harmon KM (1997) Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. *Vet Microbiol* 57(4):347-354.
- De Smet S, De Zutter L, Debruyne L, Vangroenweghe F, Vandamme P & Houf K (2011a) *Arcobacter* population dynamics in pigs on farrow-to-finish farms. *Appl Environ Microbiol* 77(5):1732-1738.
- De Smet S, Vandamme P, De Zutter L, On SL, Doudah L & Houf K (2011b) *Arcobacter trophiarum* sp. nov., isolated from fattening pigs. *Int J Syst Evol Microbiol* 61(Pt 2):356-361.
- Donachie SP, Bowman JP, On SL & Alam M (2005) *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(Pt 3):1271-1277.
- 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. *J Clin Microbiol* 50(3):735-741.
- Doudah L, De Zutter L, Vandamme P & Houf K (2010) Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by a novel multiplex-PCR assay. *J Microbiol Methods* 80(3):281-286.
- Driessche E, Houf K, Hoof J, Zutter L & Vandamme P (2003) Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. *FEMS Microbiol Lett* 229(2):243-248.
- DuPont H (2009) Systematic review: the epidemiology and clinical features of travellers' diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 30(3):187-196.
- Ellis W, Neill S, O'Brien J, Ferguson H & Hanna J (1977) Isolation of *Spirillum/Vibrio*-like organisms from bovine fetuses. *Vet Rec* 100(21):451-452.
- 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. *J Food Prot* 73(11):2099-2102.

- Fera MT, La Camera E, Carbone M, Malara D & Pennisi MG (2009) Pet cats as carriers of *Arcobacter* spp. in Southern Italy. *J Appl Microbiol* 106(5):1661-1666.
- Fera MT, Maugeri TL, Giannone M, Gugliandolo C, La Camera E, Blandino G & Carbone M (2003) In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents* 21(5):488-491.
- Fera MT, Maugeri TL, Gugliandolo C, Beninati C, Giannone M, La Camera E & Carbone M (2004) Detection of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Mediterranean Sea. *Appl Environ Microbiol* 70(3):1271-1276.
- Fernández H, Eller G, Paillacar J, Gajardo T & Riquelme A (1995) Toxigenic and invasive capacities: possible pathogenic mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90(5):633-634.
- Fernández H, Vera F & Villanueva MP (2007) *Arcobacter* and *Campylobacter* species in birds and mammals from Southern Chile. *Arch Med Vet* 39(2):163-165.
- Figueras MJ, Collado L & Guarro J (2008) A new 16S rDNA-RFLP method for the discrimination of the accepted species of *Arcobacter*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 62(1):11-15.
- Figueras MJ, Collado L, Levican A, Perez J, Solsona MJ & Yustes C (2011a) *Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish. *Syst Appl Microbiol* 34(2):105-109.
- Figueras MJ, Levican A & Collado L (2012) Updated 16S rRNA-RFLP method for the identification of all currently characterised *Arcobacter* spp. *BMC Microbiol* 12(1):292.
- Figueras MJ, Levican A, Collado L, Inza MI & Yustes C (2011b) *Arcobacter ellisii* sp. nov., isolated from mussels. *Syst Appl Microbiol* 34(6):414-418.
- Fong T-T, Mansfield LS, Wilson DL, Schwab DJ, Molloy SL & Rose JB (2007) Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in lake Erie, South Bass Island, Ohio. *Environ Health Perspect* 115(6):856-864.
- Fox GE, Magrum LJ, Balch WE, Wolfe RS & Woese CR (1977) Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc Natl Acad Sci* 74(10):4537-4541.
- Fox GE, Wisotzkey JD & Jurtschuk P (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Evol Microbiol* 42(1):166-170.
- Goh SH, Potter S, Wood JO, Hemmingsen SM, Reynolds RP & Chow AW (1996) *HSP60* gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 34(4):818-823.
- Golla SC, Murano EA, Johnson LG, Tipton NC, Cureington EA & Savell JW (2002) Determination of the occurrence of *Arcobacter butzleri* in beef and dairy cattle from Texas by various isolation methods. *J Food Prot* 65(12):1849-1853.
- González A & Ferrús MA (2011) Study of *Arcobacter* spp. contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods. *Int J Food Microbiol* 145(1):311-314.
- Gude A, Hillman TJ, Helps CR, Allen VM & Corry JE (2005) Ecology of *Arcobacter* species in chicken rearing and processing. *Lett Appl Microbiol* 41(1):82-87.
- Hamill S, Neill SD & Madden RH (2008) A comparison of media for the isolation of *Arcobacter* spp. from retail packs of beef. *J Food Prot* 71(4):850-854.

- Hamir AN, Sonn RJ, Franklin S & Wesley IV (2004) *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter* species associated with intussusception in a raccoon (*Procyon lotor*). *Vet Rec* 155(11):338-340.
- Harvey RB, Anderson RC, Young CR, Hume ME, Genovese KJ, Ziprin RL, Farrington LA, Stanker LH & Nisbet DJ (1999) Prevalence of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Arcobacter* species at slaughter in market age pigs. *Adv Exp Med Biol* 473:237-239.
- Hausdorf L, Neumann M, Bergmann I, Sobiella K, Mundt K, Fröhling A, Schlüter O & Klocke M (2013) Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter* spp. in a spinach-processing plant and evaluation of two *Arcobacter*-specific quantitative PCR assays. *Syst Appl Microbiol* 36(4):235-243.
- Higgins R, Messier S, Daignault D & Lorange M (1999) *Arcobacter butzleri* isolated from a diarrhoeic non-human primate. *Lab Anim* 33(1):87-90.
- Hill DR & Beeching NJ (2010) Travelers' diarrhea. *Curr opin infect dis* 23(5):481-487.
- Hill JE, Paccagnella A, Law K, Melito PL, Woodward DL, Price L, Leung AH, Ng LK, Hemmingsen SM & Goh SH (2006) Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified *cpn60* sequences and comparison to cpnDB, a chaperonin reference sequence database. *J Med Microbiol* 55(Pt 4):393-399.
- Hill JE, Penny SL, Crowell KG, Goh SH & Hemmingsen SM (2004) cpnDB: a chaperonin sequence database. *Genome res* 14(8):1669-1675.
- Ho HT, Lipman LJ & Gaastra W (2006a) *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Vet Microbiol* 115(1-3):1-13.
- Ho HT, Lipman LJ & Gaastra W (2008a) The introduction of *Arcobacter* spp. in poultry slaughterhouses. *Int J Food Microbiol* 125(3):223-229.
- Ho HT, Lipman LJ, Hendriks HG, Tooten PC, Ultee T & Gaastra W (2007) Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50(1):51-58.
- Ho HT, Lipman LJ, Wösten MM, van Asten AJ & Gaastra W (2008b) *Arcobacter* spp. possess two very short flagellins of which FlaA is essential for motility. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53(1):85-95.
- Ho TK, Lipman LJ, van der Graaf-van Bloois L, van Bergen M & Gaastra W (2006b) Potential routes of acquisition of *Arcobacter* species by piglets. *Vet Microbiol* 114(1-2):123-133.
- Hoi HT, Lipman LJ & Gaastra IW (2008) *Arcobacter*, a possible new pathogenic bacterium for humans. *Tijdschr Diergeneeskd* 133(17):712-714.
- Houf K, De Smet S, Baré J & Daminet S (2008) Dogs as carriers of the emerging pathogen *Arcobacter*. *Vet Microbiol* 130(1-2):208-213.
- Houf K, De Zutter L, Van Hoof J & Vandamme P (2002) Occurrence and distribution of *Arcobacter* species in poultry processing. *J Food Prot* 65(8):1233-1239.
- Houf K, Devriese LA, De Zutter L, Van Hoof J & Vandamme P (2001a) Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products. *Int J Food Microbiol* 71(2-3):189-196.

- Houf K, Devriese LA, De Zutter L, Van Hoof J & Vandamme P (2001b) Susceptibility of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* to antimicrobial agents used in selective media. *J Clin Microbiol* 39(4):1654-1656.
- Houf K, On SL, Coenye T, Debruyne L, De Smet S & Vandamme P (2009) *Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks. *Int J Syst Evol Microbiol* 59(Pt 10):2599-2604.
- Houf K, On SL, Coenye T, Mast J, Van Hoof J & Vandamme P (2005) *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(Pt 2):713-717.
- Houf K & Stephan R (2007) Isolation and characterization of the emerging foodborn pathogen *Arcobacter* from human stool. *J Microbiol Methods* 68(2):408-413.
- Houf K, Tutenel A, De Zutter L, Van 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*. *FEMS Microbiol Lett* 193(1):89-94.
- Huysmans MB, Turnidge JD & Williams JH (1995) Evaluation of API Campy in comparison with conventional methods for identification of thermophilic campylobacters. *J Clin Microbiol* 33(12):3345-3346.
- ICMSF (2002) *Microbiological Testing in Food Safety Management*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. <http://books.google.ca/books?id=cYopYygLfToC>
- Jacob J, Lior H & Feuerpfel I (1993) Isolation of *Arcobacter butzleri* from a drinking water reservoir in eastern Germany. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 193(6):557-562.
- Jacob J, Woodward D, Feuerpfel I & Johnson WM (1998) Isolation of *Arcobacter butzleri* in raw water and drinking water treatment plants in Germany. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 201(2):189-198.
- Jiang Z-D, DuPont HL, Brown EL, Nandy RK, Ramamurthy T, Sinha A, Ghosh S, Guin S, Gurleen K, Rodrigues S, Chen JJ, McKenzie R & Steffen R (2010) Microbial Etiology of Travelers' Diarrhea in Mexico, Guatemala, and India: Importance of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* Species. *J Clin Microbiol* 48(4):1417-1419.
- Johnson LG & Murano EA (1999a) Comparison of three protocols for the isolation of *Arcobacter* from poultry. *J Food Protect* 62(6):610-614.
- Johnson LG & Murano EA (1999b) Development of a new medium for the isolation of *Arcobacter* spp. *J Food Prot* 62(5):456-462.
- 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. *Int J Food Microbiol* 90(3):303-308.
- Karadas G, Sharbati S, Hänel I, Messelhäuser U, Glocker E, Alter T & Gözl G (2013) Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. *J Appl Microbiol* 115(2):583-590.
- Kasai H, Watanabe K, Gasteiger E, Bairoch A, Isono K, Yamamoto S & Harayama S (1998) Construction of the *gyrB* database for the identification and classification of bacteria. *Genome Inform Ser*:13-21.

- 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. *J Clin Microbiol* 29(2):376-385.
- Kim HM, Hwang CY & Cho BC (2010) *Arcobacter marinus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60(Pt 3):531-536.
- Lau SK, Woo PC, Teng JL, Leung KW & Yuen KY (2002) Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis. *Mol Pathol* 55(3):182-185.
- Lee C, Agidi S, Marion JW & Lee J (2012) *Arcobacter* in Lake Erie beach waters: an emerging gastrointestinal pathogen linked with human-associated fecal contamination. *Appl Environ Microbiol* 78(16):5511-5519.
- Lee MH, Cheon DS, Choi S, Lee BH, Jung JY & Choi C (2010) Prevalence of *Arcobacter* species isolated from retail meats in Korea. *J Food Prot* 73(7):1313-1316.
- Lerner J, Brumberger V & Preac-Mursic V (1994) Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13(8):660-662.
- Levican A, Collado L, Aguilar C, Yustes C, Diéguez AL, Romalde JL & Figueras MJ (2012) *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Syst Appl Microbiol* 35(3):133-138.
- Levican A, Collado L & Figueras MJ (2013) *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Syst Appl Microbiol* 36(1):22-27.
- Lipman L, Ho H & Gaastra W (2008) The presence of *Arcobacter* species in breeding hens and eggs from these hens. *Poult Sci* 87(11):2404-2407.
- Logan E, Neill S & Mackie D (1982) Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant *Campylobacter*. *Vet Rec* 110(10):229-230.
- Mandisodza O, Burrows E & Nulsen M (2012) *Arcobacter* species in diarrhoeal faeces from humans in New Zealand. *N. Z. Med. J.* 125(1353):40-46.
- Mansfield LP & Forsythe SJ (2000) *Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii* and *A. cryaerophilus* - potential emerging human pathogens. *Rev Med Microbiol* 11(3):161-170.
- Marshall SM, Melito PL, Woodward DL, Johnson WM, Rodgers FG & Mulvey MR (1999) Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 37(12):4158-4160.
- Maugeri TL, Gugliandolo C, Carbone M, Caccamo D & Fera MT (2000) Isolation of *Arcobacter* spp. from a brackish environment. *New Microbiol* 23(2):143-149.
- Maugeri TL, Irrera GP, Lentini V, Carbone M, Fera MT & Gugliandolo C (2005) Detection and enumeration of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Straits of Messina (Italy). *New Microbiol* 28(2):177-182.
- McClung CR, PATRIQUIN DG & DAVIS RE (1983) *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Bacterium Associated with Roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *Int J Syst Bacteriol* 33(3):605-612.

- McLellan S, Huse S, Mueller-Spitz S, Andreishcheva E & Sogin M (2010) Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environ Microbiol* 12(2):378-392.
- Merga JY, Leatherbarrow AJ, Winstanley C, Bennett M, Hart CA, Miller WG & Williams NJ (2011) Comparison of *Arcobacter* isolation methods, and diversity of *Arcobacter* spp. in Cheshire, United Kingdom. *Appl Environ Microbiol* 77(5):1646-1650.
- Miller WG, Parker CT, Rubenfield M, Mendz GL, Wösten MM, Ussery DW, Stolz JF, Binnewies TT, Hallin PF, Wang G, Malek JA, Rogosin A, Stanker LH & Mandrell RE (2007) The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *PLoS One* 2(12):e1358.
- Miller WG, Wesley IV, On SL, Houf K, Mégraud F, Wang G, Yee E, Srijan A & Mason CJ (2009) First multi-locus sequence typing scheme for *Arcobacter* spp. *BMC Microbiol* 9:196.
- Minaeva N, Minaev V, Sokolov A, Avilova N & Mitrokhin S (2006a) Bacteria of the genus *Arcobacter*, a new etiological factor of nosocomial infections. *Antibiot Khimioter* 51(2):18.
- Minaeva NZ, Minaev VI, Sokolov AA, Avilova ND & Mitrokhin SD (2006b) [Bacteria of the genus *Arcobacter*, a new etiological factor of nosocomial infections]. *Antibiot Khimioter* 51(2):18-22.
- Mollet C, Drancourt M & Raoult D (1997) *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol* 26(5):1005-1011.
- Moreno Y, Alonso JL, Botella S, Ferrús MA & Hernández J (2004) Survival and injury of *Arcobacter* after artificial inoculation into drinking water. *Res Microbiol* 155(9):726-730.
- Mukherjee S, Kumar D, Nanda AK & Chakraborty R (2013) 16S rRNA gene sequence analyses of the metagenome derived from waters of river Mahananda at Siliguri: An approach to understand bacterial diversity. *Indian J Biotechnol* 12(1):80-87.
- Musmanno RA, Russi M, Lior H & Figura N (1997) In vitro virulence factors of *Arcobacter butzleri* strains isolated from superficial water samples. *New Microbiol* 20(1):63-68.
- Neill S, CAMPBELL JN, O'BRIEN JJ, WEATHERUP STC & ELLIS WA (1985) Taxonomic Position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 35(3):342-356.
- Neill S, Ellis W & O'Brien J (1979) Designation of aerotolerant *Campylobacter*-like organisms from porcine and bovine abortions to the genus *Campylobacter*. *Res Vet Sci* 27(2):180.
- Ohlendorf DS & Murano EA (2002) Sensitivity of three methods used in the isolation of *Arcobacter* spp. in raw ground pork. *J Food Prot* 65(11):1784-1788.
- On S (2001) Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 90(S6):1S-15S.
- On S, Harrington CS & Atabay HI (2003) Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces. *J Appl Microbiol* 95(5):1096-1105.
- On S, Holmes B & Sackin M (1996) A probability matrix for the identification of campylobacters, helicobacters and allied taxa. *J Appl Microbiol* 81(4):425-432.

- On S, 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. *Vet Microbiol* 85(2):159-167.
- On S, Stacey A & Smyth J (1995) Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia. *J Infect* 31(3):225-227.
- Pati A, Gronow S, Lapidus A, Copeland A, Glavina Del Rio T, Nolan M, Lucas S, Tice H, Cheng JF, Han C, Chertkov O, Bruce D, Tapia R, Goodwin L, Pitluck S, Liolios K, Ivanova N, Mavromatis K, Chen A, Palaniappan K, Land M, Hauser L, Chang YJ, Jeffries CD, Detter JC, Rohde M, Göker M, Bristow J, Eisen JA, Markowitz V, Hugenholtz P, Klenk HP & Kyrpides NC (2010) Complete genome sequence of *Arcobacter nitrofigilis* type strain (CI). *Stand Genomic Sci* 2(3):300-308.
- Pejchalová M, Dostáliková E, Slámová M, Brozková I & Vytrasová J (2008) Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. in the Czech Republic. *J Food Prot* 71(4):719-727.
- Petersen RF, Harrington CS, Kortegaard HE & On SL (2007) A PCR-DGGE method for detection and identification of *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter* and related Epsilonbacteria and its application to saliva samples from humans and domestic pets. *J Appl Microbiol* 103(6):2601-2615.
- Phillips C (2001) Arcobacters as emerging human foodborne pathogens. *Food Control* 12(1):1-6.
- Pianta C, Passos DT, Hepp D & Oliveira SJD (2007) Isolation of *Arcobacter* spp from the milk of dairy cows in Brazil. *Cienc Rural* 37(1):171-174.
- Piva S, Serraino A, Florio D, Giacometti F, Pasquali F, Manfreda G & Zanoni RG (2013) Isolation of *Arcobacter* species in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Foodborne Pathog Dis* 10(5):475-477.
- Prakash O, Verma M, Sharma P, Kumar M, Kumari K, Singh A, Kumari H, Jit S, Gupta SK, Khanna M & Lal R (2007) Polyphasic approach of bacterial classification — An overview of recent advances. *Indian J Microbiol* 47(2):98-108.
- Prouzet-Mauléon V, Labadi L, Bouges N, Ménard A & Mégraud F (2006) *Arcobacter butzleri*: underestimated enteropathogen. *Emerg Infect Dis* 12(2):307-309.
- Rice EW, Rodgers MR, Wesley IV, Johnson CH & Tanner SA (1999) Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Lett Appl Microbiol* 28(1):31-35.
- Samie A, Obi CL, Barrett LJ, Powell SM & Guerrant RL (2007) Prevalence of *Campylobacter* species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from the Venda region, Limpopo, South Africa: studies using molecular diagnostic methods. *J Infect* 54(6):558-566.
- Sasi Jyothsna TS, Rahul K, Ramaprasad EVV, Sasikala C & Ramana CV (2013) *Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* 63(Pt 12):4619-4625.
- Schroeder-Tucker L, Wesley IV, Kiehlbauch JA, Larson DJ, Thomas LA & Erickson GA (1996) Phenotypic and ribosomal RNA characterization of *Arcobacter* species isolated from porcine aborted fetuses. *J Vet Diagn Invest* 8(2):186-195.
- Scullion R, Harrington CS & Madden RH (2004) A comparison of three methods for the isolation of *Arcobacter* spp. from retail raw poultry in Northern Ireland. *J Food Prot* 67(4):799-804.

- Scullion R, Harrington CS & Madden RH (2006) Prevalence of *Arcobacter* spp. in raw milk and retail raw meats in Northern Ireland. *J Food Prot* 69(8):1986-1990.
- Shah A, Saleha A, Zunita Z, Murugaiyah M, Aliyu A & Jafri N (2013) Prevalence, distribution and antibiotic resistance of emergent *Arcobacter* spp. from clinically healthy cattle and goats. *Transbound Emerg Dis* 60(1):9-16.
- Shah AH, Saleha A, Zunita Z & Murugaiyah M (2011) *Arcobacter*—An emerging threat to animals and animal origin food products? *Trends Food Sci Tech* 22(5):225-236.
- Sharples GJ & Lloyd RG (1990) A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res* 18(22):6503-6508.
- Sloane Y, Winstanley C, Hall N, Ashelford K, Leatherbarrow H, Bennett M & Williams NJ (2009) The genome sequence of an *Arcobacter butzleri* isolate from cattle indicates considerable divergence from human isolates. *15 th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms (CHRO)*. (Niigata, Japan).
- Smibert R (1974) *Campylobacter* Sebald and Véron 1963, 907. *BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology*:207-212.
- Soller JA, Bartrand T, Ashbolt NJ, Ravenscroft J & Wade TJ (2010) Estimating the primary etiologic agents in recreational freshwaters impacted by human sources of faecal contamination. *Water Res* 44(16):4736-4747.
- Son I, Englen MD, Berrang ME, Fedorka-Cray PJ & Harrison MA (2007a) Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses. *Int J Antimicrob Agents* 29(4):451-455.
- Son I, Englen MD, Berrang ME, Fedorka-Cray PJ & Harrison MA (2007b) Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. *Int J Food Microbiol* 113(1):16-22.
- Stampi S, De Luca G, Varoli O & Zanetti F (1999) Occurrence, removal and seasonal variation of thermophilic campylobacters and *Arcobacter* in sewage sludge. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 202(1):19-27.
- Stampi S, Varoli O, Zanetti F & De Luca G (1993) *Arcobacter cryaerophilus* and thermophilic campylobacters in a sewage treatment plant in Italy: two secondary treatments compared. *Epidemiol Infect* 110(3):633-639.
- Stirling J, Griffith M, Blair I, Cormican M, Dooley J, Goldsmith C, Glover S, Loughrey A, Lowery C & Matsuda M (2008) Prevalence of gastrointestinal bacterial pathogens in a population of zoo animals. *Zoonoses Public Health* 55(3):166-172.
- Suarez DL, Wesley IV & Larson DJ (1997) Detection of *Arcobacter* species in gastric samples from swine. *Vet Microbiol* 57(4):325-336.
- Tee W, Baird R, Dyall-Smith M & Dwyer B (1988) *Campylobacter cryaerophila* isolated from a human. *J Clin Microbiol* 26(12):2469-2473.
- Teixeira LCRS, Peixoto RS, Cury JC, Sul WJ, Pellizari VH, Tiedje J & Rosado AS (2010) Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. *ISME J* 4(8):989-1001.
- Van Driessche E & Houf K (2007) Characterization of the *Arcobacter* contamination on Belgian pork carcasses and raw retail pork. *Int J Food Microbiol* 118(1):20-26.

- Van Driessche E & Houf K (2008) Survival capacity in water of *Arcobacter* species under different temperature conditions. *J Appl Microbiol* 105(2):443-451.
- van Driessche E, Houf K, van Hoof J, De Zutter L & Vandamme P (2003) Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. *FEMS Microbiol Lett* 229(2):243-248.
- Vandamme P & De Ley J (1991a) Proposal for a new family, Campylobacteraceae. *Int J Syst bacteriol* 41(3):451-455.
- Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R & De Ley J (1991b) Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 41(1):88-103.
- Vandamme P, Pugina P, Benzi G, Van Etterijck R, Vlaes L, Kersters K, Butzler JP, Lior H & Lauwers S (1992a) Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *J Clin Microbiol* 30(9):2335-2337.
- Vandamme P, Vancanneyt M, Pot B, Mels L, Hoste B, Dewettinck D, Vlaes L, van den Borre C, Higgins R & Homme 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. *Int J Syst Bacteriol* 42(3):344-356.
- Vandenberg O, Dediste A, Houf K, Ibekwem S, Souayah H, Cadranel S, Douat N, Zissis G, Butzler JP & Vandamme P (2004) *Arcobacter* species in humans. *Emerg Infect Dis* 10(10):1863-1867.
- Vilar MJ, Peña FJ, Pérez I, Diéguez FJ, Sanjuán ML, Rodríguez-Otero JL & Yus E (2010) Presence of *Listeria*, *Arcobacter*, and *Campylobacter* spp. in dairy farms in Spain. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 123(1-2):58-62.
- Villalobos EG, Jaramillo HF, Ulate CC & Echandi MLA (2013) Isolation and identification of zoonotic species of genus *Arcobacter* from chicken viscera obtained from retail distributors of the metropolitan area of San Jose, Costa Rica. *J Food Protect* 76(5):879-882.
- Villarruel-López A, Márquez-González M, Garay-Martínez LE, Zepeda H, Castillo A, Mota de la Garza L, Murano EA & Torres-Vitela R (2003) Isolation of *Arcobacter* spp. from retail meats and cytotoxic effects of isolates against vero cells. *J Food Prot* 66(8):1374-1378.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van De Lee T, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J & Kuiper M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23(21):4407-4414.
- Wesley I, Miller G & Scheld W (2010) *Arcobacter*: an opportunistic human food-borne pathogen. *Emerg Infect Dis* 9:185-211.
- Wesley IV, Schroeder-Tucker L, Baetz AL, Dewhirst FE & Paster BJ (1995) *Arcobacter*-specific and *Arcobacter butzleri*-specific 16S rRNA-based DNA probes. *J Clin Microbiol* 33(7):1691-1698.
- Wesley IV, Schroeder-Tucker L & FRANKLIN S (2003) Recovery of *Arcobacter* spp. from exotic animal species. *Campylobacter Helicobacter and Related Organisms International Workshop*. p 54.
- Whiteduck Léveillée K, Laprade N, Whiteduck Léveillée J, Topp E, Lapen DR, Tambong J, Talbot G, Wilke G & Khan IUH (2013) Antimicrobial resistance profiling of *Arcobacter butzleri* isolates

from faecal sources and an agricultural watershed in 2013 *Canadian Society of Microbiologist Conference* Ottawa, Ontario).

- Woo PC, Chong KT, Leung K, Que T & Yuen K (2001) Identification of *Arcobacter cryaerophilus* isolated from a traffic accident victim with bacteremia by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 40(3):125-127.
- Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H & Yuen KY (2008) Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 14(10):908-934.
- Wybo I, Breynaert J, Lauwers S, Lindenburg F & Houf K (2004) Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a Patient with Chronic Diarrhea. *J Clin Microbiol* 42(4):1851-1852.
- Yan JJ, Ko WC, Huang AH, Chen HM, Jin YT & Wu JJ (2000) *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis. *J Formos Med Assoc* 99(2):166-169.
- Yildiz H & Aydin S (2006) Pathological effects of *Arcobacter cryaerophilus* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). *Acta Vet Hung* 54(2):191-199.