



HAL
open science

Analyse du génome de *Campylobacter* : une alternative aux antibiogrammes classiques ?

Adrien Fabre

► **To cite this version:**

Adrien Fabre. Analyse du génome de *Campylobacter* : une alternative aux antibiogrammes classiques ?. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01346785

HAL Id: dumas-01346785

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01346785v1>

Submitted on 19 Jul 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux
U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2016

N°80

MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement à Bordeaux le 16 juin 2016 par

Adrien FABRE
Né le 02 avril 1988 à Saint-Étienne (42)

Tient lieu de

THÈSE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE

Analyse du génome de *Campylobacter* : une alternative aux
antibiogrammes classiques ?

Jury :

Président : Mme DUBOIS Véronique, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Membres : M. LEHOURS Philippe, Maître de conférences des Universités, Praticien
Hospitalier (Directeur de thèse)
M. MÉGRAUD Francis, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Mme RAYMOND Josette, Maître de conférences des Universités, Praticien
Hospitalier
Mme OLEASTRO Mónica, Chercheur

Remerciements

Je tiens à remercier Madame le Professeur Véronique Dubois de me faire l'honneur de présider ce jury et pour m'avoir apporté son aide dans la bonne conduite de certaines étapes essentielles de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Docteur Philippe Lehours d'avoir accepté de diriger ce mémoire et pour son encadrement rigoureux tout au long de ce travail. Je vous exprime toute ma reconnaissance et mon amitié. Ce fut un réel plaisir de collaborer avec vous et je vous souhaite une bonne continuation en tant que futur Professeur des Universités.

Je remercie également Monsieur le Professeur Francis Mégraud d'avoir accepté de juger ce travail. Je garde un excellent souvenir de mon passage dans votre service et vous exprime ma gratitude pour avoir mis à disposition tous les moyens nécessaires du CNRCH permettant de mener à bien ce travail.

Je voudrais exprimer mes sincères remerciements à Madame le Docteur Mónica Oleastro pour m'avoir fourni les génomes bactériens de ce travail qui en constituent l'essence même et sans lesquels il n'aurait jamais vu le jour. Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance pour votre aide, pour les échanges de qualité que nous avons pu avoir par voie électronique ainsi que pour l'honneur que vous me faites de venir du Portugal pour juger ce travail.

Je remercie Madame le Docteur Josette Raymond d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour le temps que vous aurez accordé à la lecture critique de ce travail.

Je remercie ma famille, et plus particulièrement mes parents, qui m'ont toujours soutenu, qui se sont beaucoup investis et ont tout mis à disposition pour contribuer à ma réussite académique. À ma mère : je repense à ces dimanches d'été de mon enfance, en revenant de la campagne en fin de journée, où on t'attendait au labo pendant que tu finissais ta bactério. Probablement que le « virus » de la biologie s'est transmis ici. À mon père et à ma sœur, Aurélia : à tous les bons moments qu'on a partagé à la campagne, à la mer et plus généralement en vacances. Merci, je vous embrasse. À Joëlle, ma marraine : je te remercie de

ta présence aujourd'hui, de ton hospitalité avec Pierre quand je viens à Paris. Je t'exprime toute mon affection et ma gratitude.

À Jeanlo, pour cette amitié unique qui dure depuis les bancs de la maternelle, pour tous les moments délirants et inoubliables qu'on a vécus ensemble, des fêtes de l'école, en passant par les soirées et vacances dans le midi arrosées de planteur.

À Xav, pour avoir eu la patience de supporter mes délires, de l'amphi de la fac aux soirées Pharma, et de les supporter encore aujourd'hui. Pour tous les week-ends et semaines passés dans la poudreuse de l'Alpe d'Huez, au golf de Châteauneuf et autres voyages à l'étranger...

À Anto (et son petit 38), bientôt plus affûté que moi, et Mélanie, des amis en or.

À mon Xav Bat, roi de l'hélico et de la danse du limousin, et à Soso, des filous irremplaçables pour leur amitié et pour tous les moments agréables passés ensemble.

À Hugo, pour ton swing à la Tiger, ton coup droit à la Roger et parce que ça fait vraiment plaisir que tu sois revenu en France après ton périple à l'autre bout du monde. Il paraît loin le temps des WEI pharma, des vacances en Espagne, des golfs à Chassieu... On va bientôt rattraper le temps perdu.

À ce cher Pr Macquère, avec qui j'ai découvert le plaisir breton du catamaran, les déménagements improbables et le bruit de la z4. Futur généticien, maire de Carnac et prix Nobel ! Un vrai plaisir de t'avoir rencontré.

À Cécile, pour les délires qu'on a vécu avec Jean-François (« Ça va ma poule ? »), ta bonne humeur et parce qu'on se marre vraiment bien ensemble.

À Claire-Marie, pour ton petit grain de folie et tes petites aventures stéphanoises improbables qui me feront toujours rire. À quand la prochaine balade à dos de chameau à Agadir ?

À Marine O, pour les supers repas et tous les bons moments qu'on a partagé ensemble à Lyon, à Sainte Max, à Tignes et ailleurs.

À Maxence (Piñata), un bon steph' comme on les aime, toujours le mot pour rire (avec l'accent stéphanois c'est toujours meilleur !) et toujours prêt à trinquer pour fêter tout et n'importe quoi. Allez la Talau !

À Brice l'indestructible, parce que tu es complètement fou sur les pistes, parce que je n'aurais jamais eu l'idée de chausser mes skis à l'envers et que maintenant je sais pourquoi, merci !

À Clément (dondon) et Romsbos (kos, cios...), qui m'ont toujours pris pour un fou mais s'y sont habitués depuis.

À ce brave Juju et ses petites sucettes, OL addict la main sur le cœur. Mes amitiés aux caladoises.

À Sam, pour la tête de cinglé que tu sais faire mieux que personne et pour l'ADN bien sûr.

À Max, Vanille, Thomas et Tom, un bon groupe de potes qui savent comment s'amuser. Aux soirées, vacances, week-ends et autres EVG qui nous attendent.

À Marine J, pour les deux supers semestres qu'on a passé ensemble, pour ton caractère bien trempé, toujours pleine d'énergie et de bonnes intentions. Enfin de retour de vadrouille, on va pouvoir profiter de l'été ensemble !

Remerciements spéciaux à mes supers co-internes de parasito qui ont un peu subi mes absences et mon humeur pendant mes manips de thèse. À ma petite Camille, pour ta gentillesse, pour avoir supporté mes blagues vaseuses, pour ta patience quand je passais mon temps à me plaindre et pour tes délicieux gâteaux. À Réda, toujours dispo pour prendre un café ou pour un petit 9 trous en fin de journée, toujours sympa et toujours la classe. À Cindy, la plus gentille, merci pour ton franc parler et ton vino verde, ne changes rien !

À Barni et Alex, parce que vous êtes tellement sympas qu'on ne peut que vous aimer, parce que votre coloc rue Ste Catherine était magique et qu'on pouvait y être « tous à p**l ».

À Anne et Simon, mes niveaux 2 pendant deux semestres quand j'étais encore un petit interne un peu stressé, que de bons souvenirs avec vous.

À ma super équipe de co-internes en biochimie à Limoges. À Florent, un bon camarade toujours prêt à partager un barbecue autour d'un (ou deux) petit verre de vin. Merci pour toutes les franches rigolades qu'on a eues et pour m'avoir fait apprécier ta ville à sa juste valeur. À Inès, pour les soirées délirantes qu'on a faites, les restrictions d'hétérogénéité qu'on a posées et les pauses piscine scandaleuses qu'on a prises. Et enfin, à Carole, merci pour ta sympathie et ton petit accent toulousain.

À mes co-internes de choc en immuno, sans qui, ce stage n'aurait pas eu du tout la même saveur : à Cécile (2^{ème} fois dans les remerciements, la chance !), Alex (idem), Benoît, Thibaut et princesse Sarah.

À Julien et nos parties de squash à Limoges et à Bordeaux, je crois que je n'ai jamais gagné un match mais j'ai quand même pris du plaisir, ça va sûrement me manquer.

À Manu et Cyrielle, tellement sympas et pleins d'humour, un vrai plaisir de vous connaître et d'avoir survécu à l'hémato HL avec vous.

À Marie et Tanguy, les supers chefs du CH de Marmande qui assurent vraiment pour faire de ce labo un endroit où il fait bon travailler. Un grand merci à vous pour votre sympathie, disponibilité et professionnalisme. Un grand merci aussi pour m'avoir permis de me libérer pour quelques manips de thèse qui m'ont permis d'avancer sereinement dans mon travail.

À Élodie, Lucie, Alice, Astrid et toutes les filles du CNRCH et de la fac pour votre sympathie et pour toute l'aide précieuse que vous m'avez gentiment apporté quand j'étais un peu perdu dans mes manips et qui m'a permis d'avancer.

Un grand merci à tous les biologistes qui m'ont transmis leur savoir durant mon internat et permis d'apprécier mon futur métier.

À tous les techniciens de qualité que j'ai pu croiser durant mon internat dans les différents laboratoires où je suis passé et qui ont fait de mes stages un moment plus agréable.

Table des matières

Liste des tableaux	10
Liste des Figures	12
Abréviations.....	15
Introduction.....	17
Étude bibliographique.....	18
1. Bactéries du genre <i>Campylobacter</i>	18
1.1 Historique	18
1.2 Taxonomie.....	18
1.3 Morphologie et conditions de culture.....	19
1.4 Génome des <i>Campylobacter</i>	20
1.5 Épidémiologie	23
1.5.1 Réservoir.....	23
1.5.2 Transmission.....	24
1.5.3 Incidence.....	25
1.6 Pathogénicité	27
1.6.1 Colonisation.....	28
1.6.2 Production de toxines	29
1.6.3 Lipo-oligosaccharide et capsule	29
1.6.4 Autres facteurs de virulence et de survie.....	31
1.6.5 Physiopathologie chez l'Homme.....	32
1.7 Aspects cliniques des infections à <i>Campylobacter</i>	34
1.7.1 Entérite à <i>Campylobacter</i>	34
1.7.2 Complications infectieuses systémiques	35
1.7.3 Complications post-infectieuses	36
1.8 Diagnostic.....	36
1.8.1 Examen microscopique.....	37
1.8.2 Culture	37
1.8.2.1 Identification phénotypique.....	38
1.8.2.2 Identification par biologie moléculaire	39
1.8.2.3 Identification par spectrométrie de masse	40
1.8.3 Méthodes immuno-enzymatique et immunochromatographique.....	41
1.8.4 Méthode de biologie moléculaire	41

1.8.5	Sérologie.....	42
1.8.6	Typage.....	42
1.9	Prévention.....	43
1.10	Traitement.....	44
2.	Étude de la sensibilité aux antibiotiques.....	44
2.1	Méthodes.....	44
2.2	Sensibilité naturelle.....	46
2.3	Principaux mécanismes de résistance acquis.....	46
2.3.1	Résistances aux quinolones.....	46
2.3.2	Résistances aux tétracyclines.....	47
2.3.3	Résistances aux β -lactamines.....	48
2.3.4	Résistances aux macrolides et apparentés.....	49
2.3.5	Résistances aux aminoglycosides.....	50
2.3.5.1	Mécanisme d'action des aminoglycosides.....	50
2.3.5.2	Mécanismes de résistance aux aminoglycosides.....	51
2.3.5.3	Modification enzymatique des aminoglycosides.....	51
2.3.5.3.1	Aminoglycoside acétyltransférases.....	53
2.3.5.3.2	Aminoglycoside phosphotransférases.....	54
2.3.5.3.3	Aminoglycoside nucléotidyltranférases.....	56
2.4	Évolution des résistances chez l'Homme.....	57
2.4.1	En France.....	57
2.4.2	Dans le reste du monde.....	60
2.4.2.1	En Europe.....	60
2.4.2.2	Aux États-Unis.....	62
2.4.2.2	En Asie.....	63
2.5	<i>Campylobacter</i> et résistance dans les filières animales.....	64
2.5.1	En France.....	64
2.5.2	Aux États-Unis.....	66
2.5.3	En Asie.....	67
2.6	Résistances multiples aux antibiotiques (Multi-Drug Resistance ou MDR).....	68
2.6.1	Chez l'Homme.....	69
2.6.2	Dans les filières animales.....	70
	Matériels et méthodes.....	71
1.	Les souches de <i>Campylobacter</i>	71
2.	Conditions de culture.....	71
3.	Étude de la sensibilité aux antibiotiques.....	71

3.1	Méthode par diffusion en milieu gélosé	71
3.2	Détermination des concentrations minimales inhibitrices par E-test®	72
4.	Séquençage génome entier	72
5.	Identification des gènes de résistances et alignement	72
6.	Analyses phylogénétiques	73
7.	Détection des <i>Campylobacter</i> par biologie moléculaire	74
7.1	Extraction rapide de l'ADN bactérien	74
7.2	Détection de gènes spécifiques par PCR	74
7.3	Identification de <i>Campylobacter</i> par PCR en temps réel	74
8.	Conjugaisons bactériennes	75
8.1	Principe de la conjugaison et sélection des souches	75
8.2	Milieux de culture utilisés et contrôle	76
8.3	Conjugaison sur filtre	77
9.	Typage par Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	77
Résultats		78
1.	Génomomes et profils de résistance	78
2.	Identification des gènes de résistance aux aminoglycosides et alignements	79
2.1	Aminoglycosides acétyltransférases	79
2.2	Aminoglycosides phosphotransférases	84
2.3	Aminoglycosides nucléotidyltransférases	89
2.4	Gènes de résistance, îlots génomiques, clusters, plasmides et leurs environnements génétiqes	96
2.5	Résultats de la transmission horizontale par conjugaison de gènes de résistance aux antibiotiques portés par un plasmide	108
3.	Autres mécanismes de résistance aux antibiotiques identifiés	109
3.1	Gène <i>tet(O)</i> et résistance aux tétracyclines	109
3.2	Gène <i>gyrA</i> et résistance aux quinolones	110
3.3	Résistance enzymatique aux β -lactamines	110
3.4	Gènes de résistance aux macrolides et aux lincosamides	111
4.	Corrélation génotype/phénotype de résistance	112
Discussion		115
1.	Identifications des gènes de résistance aux antibiotiques et corrélation avec le phénotype	115
2.	Échanges génétiques et dissémination des résistances	119

Perspectives	120
Bibliographie	121

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des antibiotiques à tester pour <i>Campylobacter</i> spp. d'après le CASFM 2016 (67)	45
Tableau 2 : Nouvelle nomenclature des APH(2")s (107).....	55
Tableau 3 : Synthèse des principales enzymes modificatrices d'aminoglycosides d'intérêt chez <i>Campylobacter</i> et leurs substrats principaux	57
Tableau 4 : Résistance aux antibiotiques de <i>Campylobacter</i> isolés chez l'homme selon l'espèce, France, 2015, Données CNRCH (27).	59
Tableau 5 : Résistances aux antibiotiques de <i>C. jejuni</i> isolés chez l'Homme par pays en 2013 (117)	61
Tableau 6 : Résistances aux antibiotiques de <i>C. coli</i> isolés chez l'Homme par pays en 2013 (117)	62
Tableau 7 : Amorces utilisées et séquences nucléotidiques associées pour la mise en évidence des gènes <i>virB4</i> , <i>incQ</i> et <i>tet(O)</i>	74
Tableau 8 : Réactifs et volumes des différents réactifs constituant le mix pour la PCR en temps réel du gène <i>gyrA</i>	75
Tableau 9 : Amorces RAPD utilisées et séquences nucléotidiques associées	77
Tableau 10 : Génomes bactériens analysés dans ce travail	78
Tableau 11 : Profils de résistance des souches étudiées.....	79
Tableau 12 : Acétyltransférases présentes au sein des génomes analysés	80
Tableau 13 : Aminoglycosides phosphotransférases présentes au sein des génomes analysés	85
Tableau 14 : Aminoglycosides nucléotidyltransférases présentes au sein des génomes analysés	91
Tableau 15 : Annotations des gènes de résistance aux aminoglycosides du <i>C. coli</i> 2006/550 et leur environnement génétique	97
Tableau 16 : Annotations des gènes de résistance du plasmide pCJ1293 (séquence partielle) du <i>C. jejuni</i> 2006/1293 et leur environnement génétique	98
Tableau 17 : Annotations des gènes de résistance aux aminoglycosides du <i>C. coli</i> 2014/1809 et leur environnement génétique	99
Tableau 18 : Annotations des gènes de résistance aux aminoglycosides du <i>C. coli</i> 226199 et leur environnement génétique	100
Tableau 19 : Annotations des gènes de résistance aux aminoglycosides du <i>C. coli</i> 2006/490H et leur environnement génétique	101

Tableau 20 : Annotations des gènes de résistance du <i>C. coli</i> 2010/378 et leur environnement génétique	102
Tableau 21 : Annotations des gènes de résistance du <i>C. jejuni</i> 2014/105H et leur environnement génétique	102
Tableau 22 : Annotations des gènes de résistance du <i>C. coli</i> 2012/873 et leur environnement génétique	103
Tableau 23 : Annotations des gènes de résistance aux aminoglycosides du <i>C. coli</i> 2007/817 et leur environnement génétique	103
Tableau 24 : Annotations des gènes de résistance du <i>C. jejuni</i> 2009/2424 et leur environnement génétique	104
Tableau 25 : Annotations des gènes de résistance du plasmide pCJ2640 (séquence partielle) du <i>C. jejuni</i> 2012/2640 et leur environnement génétique	105
Tableau 26 : Annotations des gènes de résistance aux aminoglycosides du <i>C. coli</i> 2010/223 et leur environnement génétique	105
Tableau 27 : Screening des gènes <i>virB4</i> et <i>incQ</i> portés par le T4SS au sein de <i>Campylobacter</i> sensibles ou résistants aux tétracyclines.....	108
Tableau 28 : Corrélation entre phénotype et génotype de résistance au sein des souches de <i>Campylobacter</i> séquencées dans ce travail	114

Liste des Figures

Figure 1 : Morphologie spiralée des <i>Campylobacter</i>	19
Figure 2 : Représentation circulaire du génome de <i>C. jejuni</i> (14).	22
Figure 3 : Nombre de souches de <i>Campylobacter</i> (et bactéries apparentées) rapportées par le CNR et son réseau de laboratoire, France, 2005-2015 (27).	25
Figure 4 : Nombre annuel de cas de <i>Campylobacter</i> et bactéries apparentées pour 100 000 habitants par âge et sexe, France, 2015 (27).	26
Figure 5 : Répartition des cas de <i>Campylobacter</i> et bactéries apparentées par mois, France, 2015 (27).	27
Figure 6 : Physiopathologie du syndrome de Guillain-Barré (41).	30
Figure 7 : Mécanismes d'invasion des cellules non phagocytaires par <i>Campylobacter</i> (49)...	32
Figure 8 : Mécanismes de pathogénicité utilisés par <i>Campylobacter</i> pour traverser le tractus gastro-intestinal (39).	34
Figure 9 : <i>Campylobacter</i> observés à la coloration de Gram.	37
Figure 10 : Colonies de <i>Campylobacter</i> sur gélose Karmali.	38
Figure 11 : Courbes de fusion obtenues par PCR en temps réel avec système FRET en tandem avec les amorces du gène <i>gyrA</i> de <i>C. coli</i> et <i>C. jejuni</i> (25).	40
Figure 12 : Exemples de modifications enzymatiques pouvant être induites sur certains aminoglycosides (97).	52
Figure 13 : Exemple de l'acétylation de la kanamycine A par une AAC(6') (98).	54
Figure 14 : Evolution des résistances aux aminopénicillines, tétracyclines, macrolides et quinolones pour <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> entre 1986 et 2014 en France (Réseau de laboratoires correspondants du CNRCH).	59
Figure 15 : Evolution des résistances aux antibiotiques chez <i>C. coli</i> et <i>C. jejuni</i> isolés chez l'Homme aux États-Unis entre 1997 et 2013.	63
Figure 16 : Organisation de la surveillance de <i>Campylobacter</i> dans les filières animales en France. LNR, Anses.	65
Figure 17 : Evolution des résistances aux antibiotiques de <i>C. jejuni</i> isolé chez les bovins en France sur la période 2002-2006 et en 2012. LNR de Lyon, Anses.	66
Figure 18 : Évolution de la résistance à la ciprofloxacine chez <i>C. jejuni</i> aux États-Unis chez l'Homme, le poulet au détail et le poulet HACCP (123).	67
Figure 19 : Distribution des <i>C. jejuni</i> (a) et des <i>C. coli</i> (b) isolés chez l'Homme, sensibles et résistants de une à quatre classes d'antibiotiques, 2013 (117).	69

Figure 20 : Relations phylogénétiques entre les différentes AAC(3)s de nos souches (séquences protéiques).	81
Figure 21 : (a) Alignements de six GNATs de nos souches possédant une AAC (gène <i>aac</i>) homologue à celle de Nirdnoy <i>et al.</i> (111). (b) Souches ayant une AAC identique à celle de Nirdnoy <i>et al.</i>	82
Figure 22 : Alignement de l'aminocyclitol acétyltransférase du <i>C. coli</i> 226199 avec la protéine ApmA.	83
Figure 23 : Relations phylogénétiques entre les différentes APH(2'')s (séquences protéiques).	86
Figure 24 : Alignement des APH(3')s de nos souches avec l'APH(3')-IIIa.	87
Figure 25 : Alignements de la séquence protéique Hph de Nirdnoy <i>et al.</i> (111) avec celles des souches <i>C. coli</i> 2006/490H et <i>C. coli</i> 2006/550.	88
Figure 26 : Relations phylogénétiques entre les différentes ANT(6)s (séquences protéiques).	90
Figure 27 : Relations phylogénétiques entre les différentes ANT(9)s (séquences protéiques).	92
Figure 28 : Alignement de la protéine codée par <i>spw</i> avec celle de la souche <i>C. coli</i> 2014/1809.	93
Figure 29 : Alignement des enzymes Lnu(C) et Lnu(D) avec les lincosamide nucléotidyltransférases de nos souches.	95
Figure 30 : Alignement de la nouvelle Lnu(G) identique dans les deux souches <i>C. coli</i> 2010/378 et <i>C. jejuni</i> 2014/105H.	95
Figure 31 : Illustration des îlots génomiques de multirésistance présents au sein de nos souches.	106
Figure 32 : Représentation schématique des îlots de résistance des plasmides pCJ2640 et pCJ1293 (séquences partielles).	106
Figure 33 : Exemple de résultats des produits de PCR <i>virB4</i> (812 pb), <i>incQ</i> (208 pb) et <i>tet(O)</i> (559 pb) sur la souche <i>C. coli</i> 2014/2129 après migration sur gel d'agarose (1,5%). ...	107
Figure 34 : PCR sur les gènes <i>virB4</i> (812 pb), <i>incQ</i> (208 pb) et <i>tet(O)</i> (559 pb) après conjugaison.	109
Figure 35 : Profils RAPD 1254 (à gauche) et 1290 (à droite).	109
Figure 36 : Alignement de la gyrase A de nos souches avec la souche de référence <i>C. jejuni</i> NCTC11168.	110
Figure 37 : Séquence nucléotidique du gène <i>bla_{OXA-61}</i> et de son promoteur.	111

Figure 38 : Relations phylogénétiques entre les différentes lincosamide O-
nucléotidyltransférases (séquences protéiques). 112

Abréviations

AAC : Aminoglycoside Acétyltransférase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ANT : Aminoglycoside Nucléotidyltransférase

APH : Aminoglycoside Phosphotransférase

ARN : Acide Ribonucléique

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CDC : Centers for Disease Prevention and Control

CDT : Cytolethal Distending Toxin

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNRCH : Centre National de Référence des *Helicobacter* et *Campylobacter*

DGAL : Direction Générale de l'Alimentation

DGCCRF : Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes

ECDC : European Center for Disease Prevention and Control

ECOFFs : Epidemiological Cut-Off values

EFSA : European Food Safety Authority

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA : Food and Drug Administration

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

GNAT : GCN5-related N-Acetyltransferase

HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point

InVS : Institut National de Veille Sanitaire

LNR : Laboratoire National de Référence

LOS : Lipo-oligosaccharide

LPS : Lipo-polyssaccharide

MALDI-TOF MS : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry

MDR : Multidrug Resistance

MLST : Multilocus Sequence Typing

NARMS : National Antimicrobial Resistance Monitoring System

NGS : Next Generation Sequencing

ORF : Open Reading Frame

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis

PLP : Protéines de Liaison aux Pénicillines

QRDR : Quinolone Resistance-Determining Region

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

RAST : Rapid Annotation using Subsystem Technology

SARM : *S. aureus* Résistants à la Méthicilline

SASM : *S. aureus* Sensibles à la Méthicilline

SGB : Syndrome de Guillain-Barré

SMF : Syndrome de Miller-Fisher

T3SS/T4SS : Système de Sécrétion de type 3 ou 4

T_m : Température de fusion

UFC : Unité Formant Colonie

USDA : United State Department of Agriculture

WGS : Whole-Genome Sequencing

Introduction

Les bactéries du genre *Campylobacter* sont des bactéries impliquées en pathologie humaine, le plus souvent dans des infections intestinales de type entérite. Elles sont considérées comme une zoonose dans les élevages et représentent la principale cause bactérienne de gastro-entérites humaines dans le monde devant les salmonelles. Selon l'OMS, l'incidence annuelle dans les pays développés serait de 4,4 à 9,3 pour 1000 habitants tandis que l'incidence dans les pays en voie de développement serait beaucoup plus difficile à évaluer (1). Par ailleurs, des complications post-infectieuses comme le syndrome de Guillain-Barré peuvent survenir et conduire à des séquelles plus ou moins sévères voire au décès (2). *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* sont les deux espèces les plus fréquemment impliquées dans les infections chez l'Homme et ont pour origine, dans la majorité des cas, les animaux d'élevage (volailles et porcs essentiellement) consommés en alimentation humaine. L'élevage intensif en batterie ainsi que l'utilisation massive d'antibiotiques chez ces animaux ont favorisé l'émergence et la diffusion de bactéries résistantes à des antibiotiques auxquels elles étaient habituellement sensibles (3). Le traitement antibiotique des infections entériques chez l'Homme, bien que non systématique, est souvent conduit à l'aide de macrolides ou fluoroquinolones mais les infections systémiques sévères peuvent nécessiter l'utilisation d'aminoglycosides comme la gentamicine (4). Ces derniers sont largement utilisés dans les élevages animaux de certains pays comme en Chine (5).

Des études récentes rapportent une augmentation de l'incidence de souches de *Campylobacter* présentant une résistance à la gentamicine qui était, jusque-là, sensiblement épargnées (6). Par ailleurs, de telles souches présentent fréquemment de multiples résistances associées. Cette limitation des alternatives thérapeutiques constitue alors un risque en santé publique et une perte de chance pour les patients infectés.

L'objectif premier de ce travail de thèse a consisté à faire un état des lieux des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques impliqués chez les bactéries du genre *Campylobacter* par une étude bibliographique approfondie. Une analyse génomique de plusieurs souches a été réalisée pour prédire le phénotype de résistance à partir de gènes de résistance identifiés. Par ailleurs, des expériences de conjugaison bactérienne ont été conduites de manière à étudier les possibilités de transfert de ces résistances entre espèces.

Étude bibliographique

1. Bactéries du genre *Campylobacter*

1.1 Historique

Campylobacter spp. a été décrit pour la première fois par le bactériologiste allemand Theodor Escherich en 1886 sans toutefois pouvoir isoler les bactéries du genre nouvellement découvert dans des selles diarrhéiques d'enfants (7). Plus tard, en 1913, McFayden et Stockman identifieront un micro-organisme chez un fœtus de mouton ayant avorté et le rattacheront au genre *Vibrio* par sa morphologie spiralée (8). Il sera appelé *Vibrio fetus* (aujourd'hui connu sous le nom de *Campylobacter fetus*) par Smith en 1918 qui le retrouvera dans des fœtus avortés de bovins. Associé communément à des pathologies d'animaux domestiques, ce n'est qu'à partir de la fin des années quarante que la bactérie commence à être retrouvée en infectiologie humaine et considérée, au début, comme opportuniste. En 1957, Elizabeth King propose de classer ces « vibrios » microaérophiles en deux groupes basés sur leur température optimale de croissance (9). Elle suggéra, par ailleurs, qu'ils seraient impliqués majoritairement dans des diarrhées aiguës chez l'Homme malgré le fait qu'ils n'aient encore jamais été isolés de coprocultures (10). Ce n'est qu'en 1963 que Sebald et Véron proposent le genre *Campylobacter* après avoir étudié ses mécanismes fermentatifs et son contenu en GC qui diffèrent du genre *Vibrio* et aboutira à la première taxonomie publiée par Véron et Chatelain en 1973. Il faudra attendre le début des années 1970 pour que soient mises au point les premières techniques de culture des *Campylobacter* à partir d'échantillons de selles humaines grâce aux travaux de Dekeyser et Butzler. Leur isolement simple et direct à partir de fèces sur milieu sélectif (gélose au sang contenant vancomycine, polymyxine et triméthoprim) dans des conditions adaptées (43°C et atmosphère microaérophile) mis au point par Martin Skirrow en 1977 permettra une révolution dans son approche épidémiologique et révélera son importance en pathologie humaine (11).

1.2 Taxonomie

La taxonomie du genre *Campylobacter* a largement évolué au fil des années surtout grâce à la possibilité d'isolement en culture ainsi qu'au développement des méthodes de classification. Ces bactéries font partie du règne des eubactéries, de la classe des protéobactéries ϵ , de l'ordre des campylobactérales. À l'intérieur de ce dernier se trouve la famille des *Helicobacteraceae* (dont le représentant le plus connu en pathologie humaine est

Helicobacter pylori), des *Hydrogenimonaceae* et des *Campylobacteraceae*. La famille des *Campylobacteraceae* compte trois genre : *Arcobacter*, *Campylobacter* et *Sulfurospirillum*. Le genre *Campylobacter* compte, à l'heure actuelle, 34 espèces (48 en incluant les sous-espèces) (12). On en dénombrait 26 en 2005.

1.3 Morphologie et conditions de culture

Campylobacter (du grec « bakteria » : bâtonnet, et « kampulos » : courbé), est un bacille gram négatif fin, incurvé, spiralé en « ailes de mouettes » ou hélicoïdal dont la taille est de 0,2 à 0,8 µm de diamètre et de 0,5 à 5 µm de longueur. Ils peuvent être retrouvés sous forme coccobacillaire (forme de résistance sur culture âgée ou en conditions non optimales). Ils sont très mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche avec un flagelle pouvant représenter 2 à 3 fois la taille de la cellule. Leur mobilité caractéristique est classiquement décrite « en vol de moucheron ». Leur métabolisme est asaccharolytique, c'est-à-dire qu'ils tirent leur énergie des acides aminés et des acides gras et non des sucres.

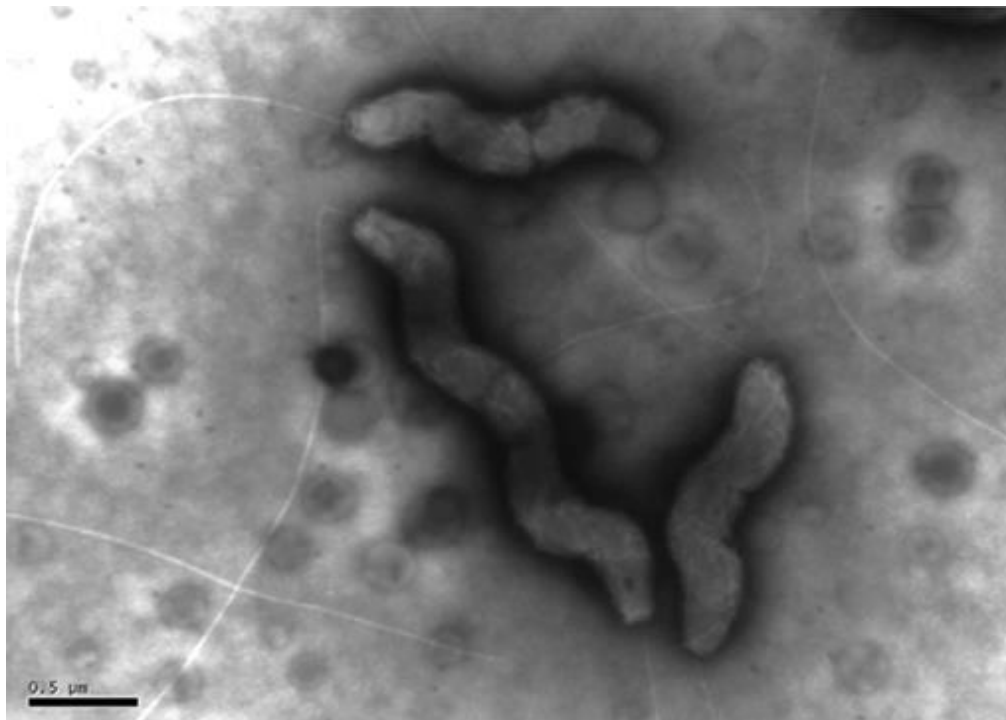


Figure 1 : Morphologie spiralée des *Campylobacter*.

Photo tirée de Revez *et al.* (13)

Leur croissance est favorisée dans une atmosphère appauvrie en oxygène où la pression partielle en O₂ est de 3-5%, en CO₂ de 5-10% et en N₂ de 85% (conditions microaérophiles) bien que certaines espèces soient anaérobies strictes. La totalité des espèces

se multiplient à 37°C mais certaines espèces dites thermotolérantes ont une température optimale de croissance de 40-42°C (*C. jejuni*, *C. coli*).

La culture sur milieux sélectifs est la méthode la plus utilisée pour isoler les *Campylobacter* à partir de prélèvements de selles. Les milieux au charbon actif (Karmali) ou au sang (Campylosetel[®], Skirrow, Butzler) contiennent des antibiotiques et antifongiques capables d'inhiber la croissance de cocci à gram positif, d'entérobactéries et de nombreux micro-organismes fongiques. La culture par la méthode de filtration utilise la mobilité et la petite taille des *Campylobacter* par rapport aux autres bactéries pour les isoler à l'aide de filtres calibrés sur milieux non sélectifs. La culture donne des petites colonies luisantes, translucides, étalées, oxydase et catalase positives.

1.4 Génome des *Campylobacter*

Le premier séquençage d'un génome entier d'une souche de *C. jejuni* NCTC11168 a été réalisé et publié par Parkhill et al (14). Il est représenté par un chromosome circulaire de 1,64 Mb (contenant 30,6 % de GC) et contenant 1654 séquences codantes. Plusieurs particularités ont été mises en évidence par l'analyse génomique : l'absence de séquence d'insertion, de transposons, de séquence d'origine phagique, et le faible nombre de séquences répétées (seulement 4 dans tout le génome). Par ailleurs, ont été trouvées, des séquences hypervariables au niveau de gènes codant pour des enzymes de biosynthèse ou impliquant une modification de structure de la membrane externe ou du flagelle, ainsi qu'à des gènes de fonction inconnue. Ces séquences auraient un rôle dans la stratégie de survie des bactéries surtout par leur capacité à coloniser l'environnement intestinal plutôt qu'à échapper au système immunitaire de l'hôte. Des arguments phénotypiques et génotypiques témoignant de la diversité des bactéries au sein du genre *Campylobacter* existaient déjà avant le séquençage complet du génome. Par exemple, des essais de sérotypage montrèrent la large variété de sérotypes pouvant exister chez *Campylobacter* (15,16). Une association significative entre certains sérotypes et le développement de syndrome de Guillain-Barré ou de Miller-Fisher a été démontrée dans plusieurs études (2,17). Les techniques de typage par séquençage multilocus (MLST), l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) et autres techniques basées sur la PCR ont, elles aussi, apporté d'autres preuves sur les variabilités génétiques des *Campylobacter* sans pour autant pouvoir bien les caractériser (18,19).

Le séquençage haut débit aussi appelé NGS (Next Generation Sequencing) a permis une avancée significative dans l'étude génétique de *Campylobacter* en se substituant à l'historique méthode de Sanger et autres méthodes citées précédemment. Il permet le

séquençage en parallèle de milliards de nucléotides par expérience (ou « run ») en un temps court et à moindre coût. Le développement de ces nouveaux séquenceurs rend désormais l'étude génomique accessible à de nombreux laboratoires, induisant une augmentation importante des publications scientifiques et des diagnostics cliniques par analyses de séquences d'acides nucléiques (20). Les applications du NGS sont particulièrement intéressantes pour l'étude comparative de génomes entiers bactériens et l'identification de facteurs de virulence et de marqueurs de résistance aux antibiotiques compte tenu de leurs implications importantes en santé humaine et dans l'évolution épidémiologique des bactéries du genre *Campylobacter*. À titre d'exemple, l'identification d'îlots de pathogénicité chez des *C. fetus*, espèce responsable de septicémie en pathologie humaine, permet d'étudier les facteurs de virulence qu'ils véhiculent et d'établir plus précisément leur rôle (adaptation à l'hôte, transfert génétique horizontal, protection cellulaire) (21).

La comparaison avec le génome de *Helicobacter pylori* (très proche phylogénétiquement) montre que seuls 55,4% des gènes de *C. jejuni* ont un orthologue chez *H. pylori* et essentiellement dans des fonctions de base (peu d'homologie dans les fonctions de survie, transmission et pathogénicité) (14). Ceci indique que les deux genres bactériens ont évolué isolément et différemment, à partir d'un ancêtre commun, dans des écosystèmes distincts.

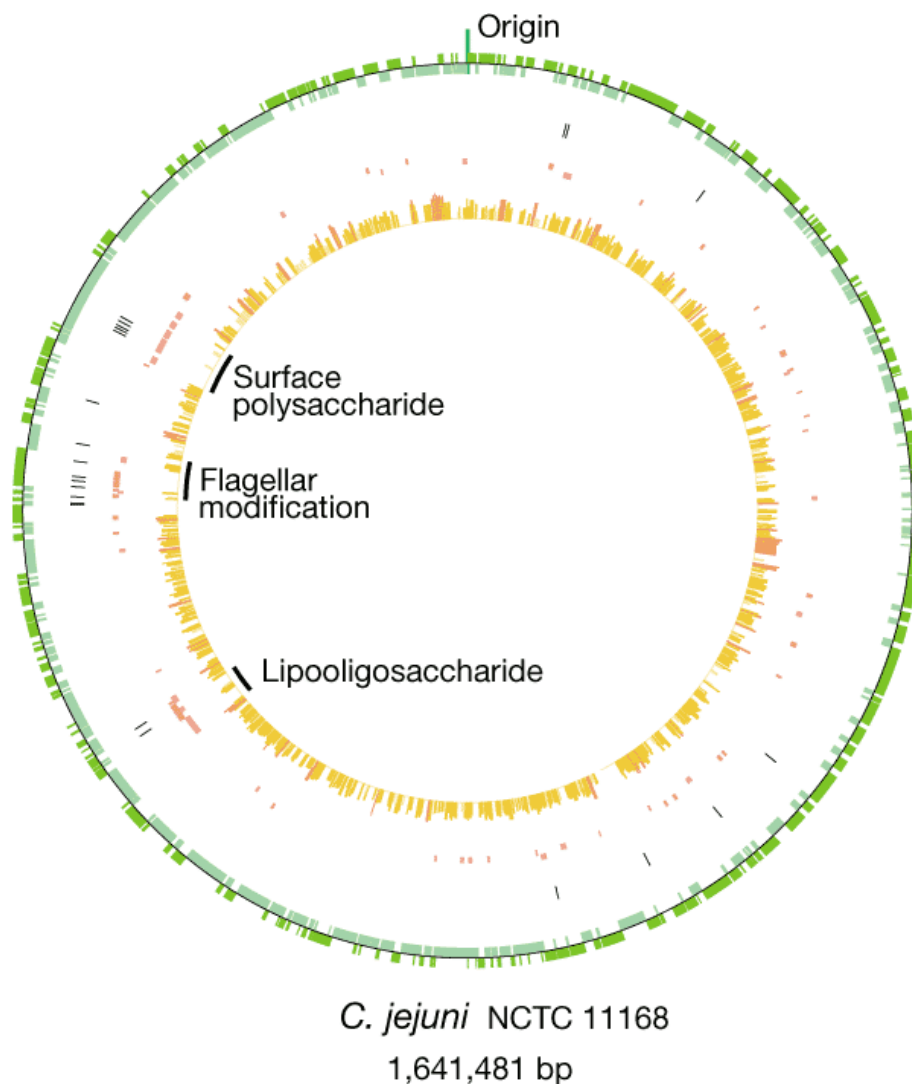


Figure 2 : Représentation circulaire du génome de *C. jejuni* (14).

De l'extérieur vers l'intérieur : séquences codantes en vert, séquences hypervariables en noir, séquences impliquées dans les structures de surface en rouge et gènes orthologues de *Helicobacter pylori* (hauteur et intensité de l'histogramme proportionnelles à leurs similitudes) en jaune-orange.

Par ailleurs, les *Campylobacter* présentent l'avantage de pouvoir s'adapter rapidement à des conditions environnementales changeantes. Cela est rendu possible, notamment, par des dérapages répliatifs dans des gènes à fort taux de mutations sur des séquences courtes répétées (13). Ces gènes sont, le plus souvent, associés à des fonctions de synthèse et de modifications d'antigènes de surface et régulés par variation de phase (22). La variation de phase est une méthode employée par les bactéries pour s'adapter, sans recourir à des mutations aléatoires, mais en générant des variations dans l'expression protéique (régulation transcriptionnelle, utilisation d'une copie d'un gène plutôt qu'une autre, etc.) lors de leur passage chez un hôte humain ou animal. Ces modifications génétiques montrent le possible rôle de l'hôte dans la sélection de bactéries plus aptes à survivre dans une niche particulière et à y induire des signes pathologiques témoignant de son pouvoir infectant. Les gènes

impliqués peuvent concerner la synthèse du lipo-oligosaccharide (LOS), la capsule, la glycosylation du flagelle ou des gènes de fonction encore inconnue (13,23).

La diversité génétique au sein des populations bactériennes peut être représentée schématiquement par quatre processus évolutifs interdépendants. Les bactéries sont des organismes haploïdes à reproduction asexuée dont chaque division cellulaire conduit, en l'absence de mutations, à deux cellules filles génétiquement identiques à la cellule mère. S'il n'y a pas d'échange génétique, les variations génétiques peuvent se propager par mutation ponctuelle et être transmises verticalement à la descendance. De plus, des transferts génétiques entre individus non apparentés peuvent survenir. On parle d'échanges génétiques horizontaux qui impliquant seulement des parties de chromosome bactérien et qui se font par des processus de conjugaison, transduction ou transformation. Des recombinaisons homologues peuvent survenir entre une bactérie donneuse et acceptrice, même distantes phylogénétiquement, à condition qu'elles aient un certain degré d'homologie dans leurs séquences nucléotidiques. Ce genre d'évènements répétés sur différentes séquences et avec différentes bactéries peuvent conduire à un génome contenant une mosaïque de variations génétiques ayant chacune une histoire évolutive différente et présentant, de ce fait, une multitude d'ancêtres parfois éloignés entre eux. Cette variabilité génétique importante chez *Campylobacter* est surtout le fait de ces réassortiments génétiques horizontaux plutôt que de mutations ponctuelles (24). La pression de sélection exercée par les conditions du milieu environnant les bactéries peut conférer un avantage à certains génotypes tout en éliminant une partie de la population, non adaptée. Cette sélection négative diminue la diversité génétique globale. Au contraire, la sélection positive favorise le développement de populations bactériennes ayant acquis des mutations leur conférant un avantage. D'autres évènements aléatoires, comme l'introduction d'un hôte dans une nouvelle niche dans laquelle il serait mieux adapté qu'une autre bactérie y résidant entraînerait sa prolifération et l'éviction totale de la population initiale (25).

1.5 Épidémiologie

1.5.1 Réservoir

La campylobactériose est une zoonose dont le principal réservoir est le tube digestif des oiseaux sauvages ou domestiques notamment des volailles. Les *Campylobacter* sont peu pathogènes pour les animaux et peuvent donc faire partie de leur flore commensale normale. D'autres animaux peuvent contribuer à leur diffusion comme les ovins et bovins voire les animaux de compagnie (chiens, chats) ou bien encore les rongeurs qui peuvent contaminer

l'environnement via leurs déjections. Certaines espèces de *Campylobacter* ont des réservoirs préférentiels. Par exemple, *C. jejuni* est essentiellement retrouvé chez les oiseaux tandis que *C. coli* colonise plus spécifiquement le tube digestif du porc. Des espèces plus rares telles *C. lari* ou *C. upsaliensis* seront retrouvées respectivement chez la mouette ou le chien.

1.5.2 Transmission

La transmission humaine se fait essentiellement indirectement par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. Le rôle de la viande de volaille consommée notamment crue ou peu cuite est largement établi et constituerait la principale cause de cas sporadiques. Les élevages de volailles permettent une large diffusion des *Campylobacter* via les fèces dans les fermes puis dans les abattoirs associés à une mauvaise maîtrise des conditions d'hygiène dans la filière agro-alimentaire. Le contage est lié, en partie, aux carcasses souillées au niveau de la peau, qui, au contact d'autres aliments consommés crus peuvent entraîner une contamination croisée chez le consommateur. La prévalence de *Campylobacter* dans les élevages est très variable d'une ferme à l'autre, d'un territoire à l'autre et peut concerner quelques individus à la quasi-totalité de la population (8). Des épidémies familiales, via la consommation de lait non pasteurisé, peuvent survenir ainsi que de plus grandes épidémies, par ingestion d'eau, en cas de défaut de chloration du réseau hydrique notamment. Les *Campylobacter* peuvent survivre plusieurs semaines dans un environnement extérieur favorable sans toutefois pouvoir s'y multiplier compte tenu de leurs exigences particulières (microaérobiose, température élevée, inhibition par le sel) et ne sont donc que rarement impliqués dans des toxi-infections alimentaires collectives. Du fait de l'absence de typage des souches isolées, les cas sporadiques décrits pourraient constituer en fait de véritables épidémies non étiquetées par diffusion de viande de volaille d'une origine donnée sur un très large territoire rendant très difficile l'établissement de liens entre les différents cas (26).

Une transmission directe peut survenir via des animaux contaminés. Les vétérinaires, fermiers, personnels d'abattoirs, professionnels au contact d'eaux usées sont plus particulièrement exposés. Le contact avec des animaux de compagnie, ou via un environnement contaminé par des déjections d'oiseaux ou d'animaux dans des lieux récréatifs existe et concerne surtout les enfants. La transmission interhumaine, plus rare, est possible et peut concerner les collectivités ou des environnements ou populations à conditions d'hygiène précaires.

1.5.3 Incidence

L'incidence des infections à *Campylobacter* est mal connue et est probablement largement sous-estimée. Elles constituent la principale cause de gastro-entérite d'origine bactérienne dans le monde devant les salmonelles.

En France, le centre national de référence des *Campylobacter* et *Helicobacter* (CNRCH) du centre hospitalier universitaire (CHU) de Bordeaux assure une surveillance des infections depuis 1986 à partir d'un réseau de laboratoires hospitaliers ainsi que de laboratoires de ville depuis 2002. L'envoi volontaire des souches isolées ne permet pas d'établir l'incidence mais assure le recueil de données épidémiologiques intéressantes. Les objectifs sont de décrire les caractéristiques épidémiologiques des infections à *Campylobacter* survenant chez l'Homme, de suivre les évolutions temporelles et spatiales de l'incidence, de décrire les espèces de *Campylobacter* en cause, de détecter les cas groupés et de surveiller la résistance aux antibiotiques. Le nombre de souches recueillies depuis 2005 a triplé en 10 ans en tenant compte des informations épidémiologiques saisies en ligne (Figure 3) et permet d'obtenir une meilleure exhaustivité quant à l'évolution des infections à *Campylobacter* en France (27).

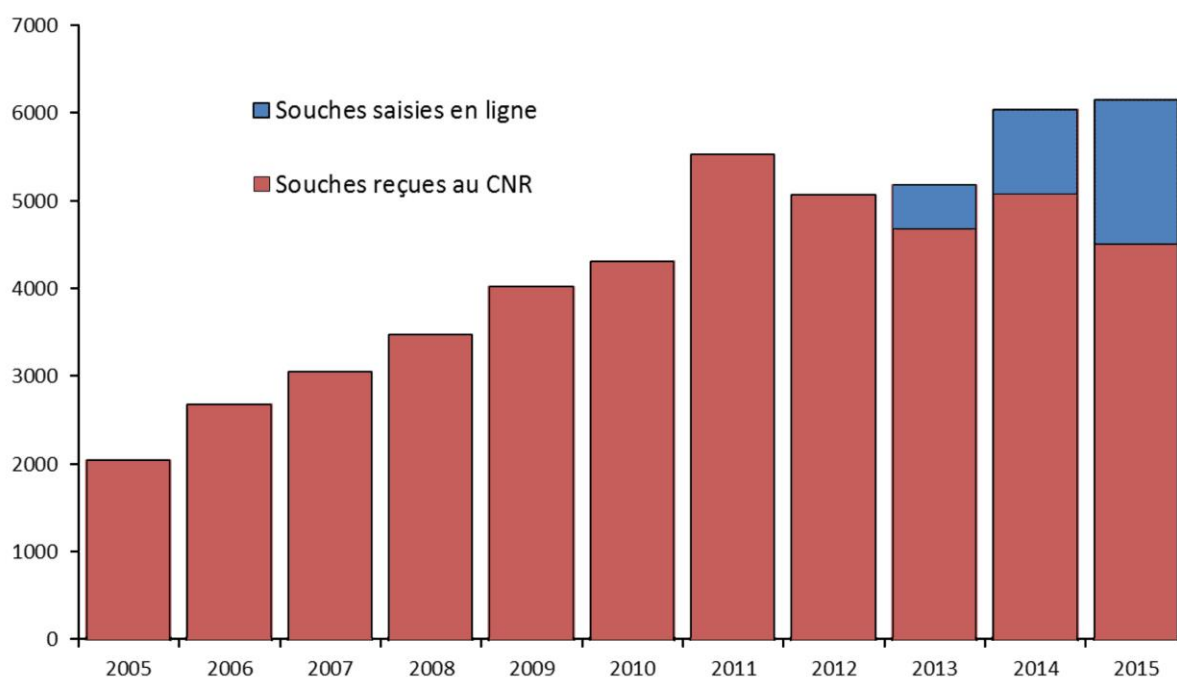


Figure 3 : Nombre de souches de *Campylobacter* (et bactéries apparentées) rapportées par le CNR et son réseau de laboratoire, France, 2005-2015 (27).

En 2015, *C. jejuni* (81%) était l'espèce la plus fréquente suivie de *C. coli* (15%) et *C. fetus* (2%). La grande majorité (97%) des souches a été isolée dans des selles et 2% ont été isolées dans des hémocultures. Parmi les souches isolées dans des selles, *C. jejuni* était majoritaire

(82%), alors que *C. fetus* représentait 52% des souches isolées dans des hémocultures. La moyenne d'âge des personnes infectées était de 31 ans et était significativement plus élevée chez les cas de *C. coli* que chez les cas de *C. jejuni* (38 ans vs 30 ans, $p < 10^{-3}$). L'incidence (nombre annuel de cas rapportés pour 100 000 habitants) était maximale chez les jeunes enfants et minimale chez les adultes ayant un âge compris entre 50 et 60 ans. Globalement l'incidence était plus élevée chez les hommes (11 cas/100 000 habitants) que chez les femmes (8 cas/100 000). Elle était plus élevée chez les hommes dans toutes les classes d'âge, sauf pour les personnes âgées de 20 à 40 ans (Figure 4) (27).

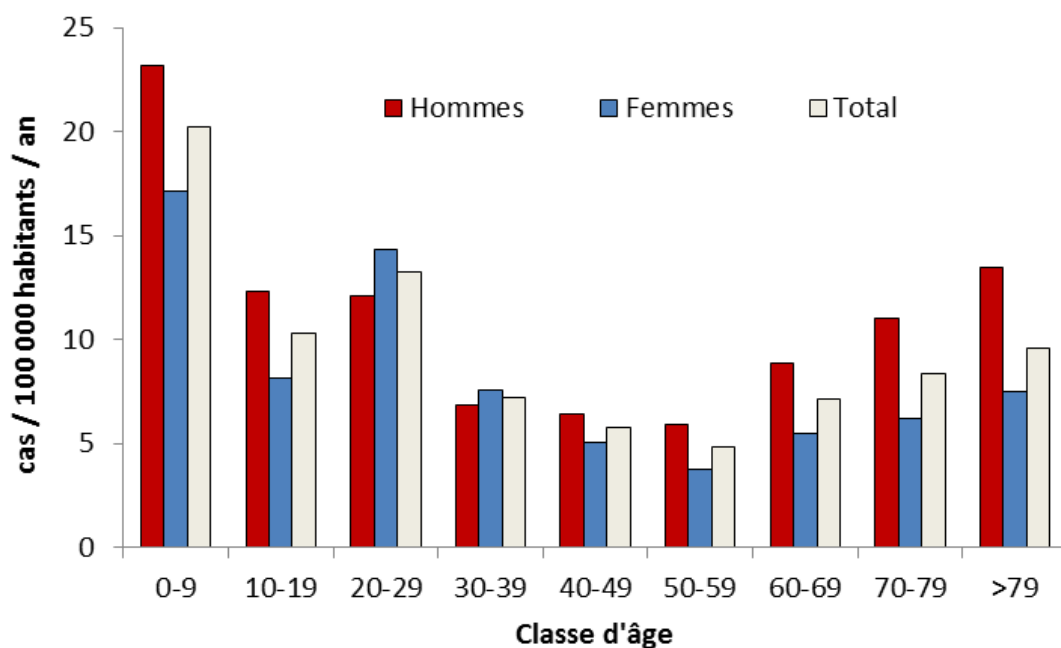


Figure 4 : Nombre annuel de cas de *Campylobacter* et bactéries apparentées pour 100 000 habitants par âge et sexe, France, 2015 (27).

Une recrudescence saisonnière des isollements de *Campylobacter* a été observée pendant la période estivale : 47% des cas ont été rapportés entre juin et septembre 2015. Cette saisonnalité est retrouvée pour *C. jejuni* et *C. coli* (Figure 5).

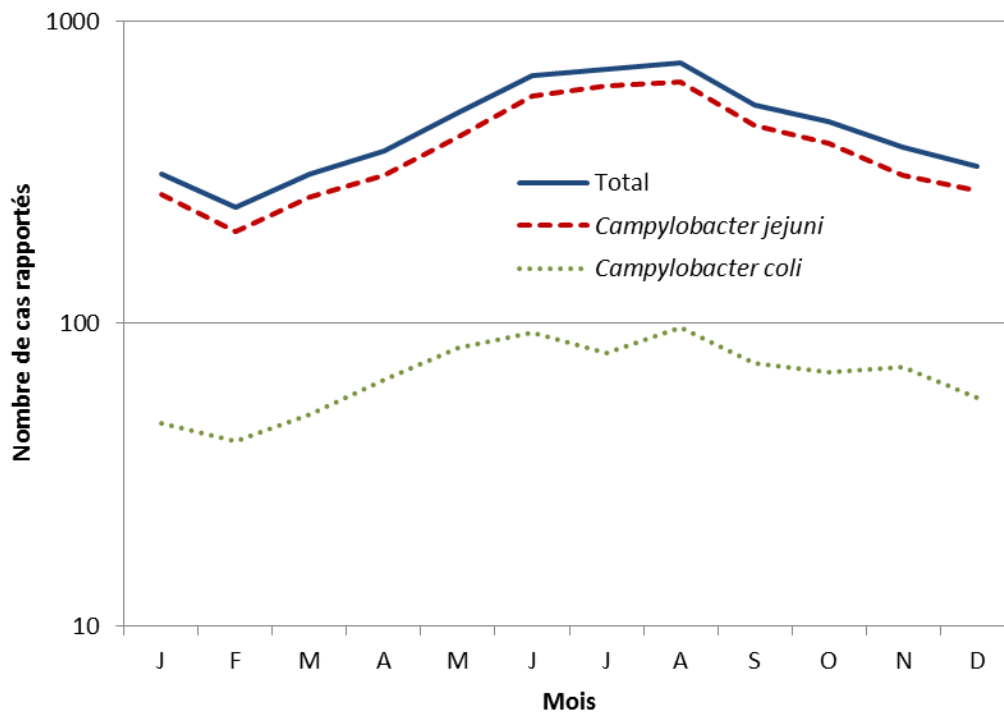


Figure 5 : Répartition des cas de *Campylobacter* et bactéries apparentées par mois, France, 2015 (27).

Parmi les 37% de cas pour lesquels l'information était disponible, 11% avaient mentionnés un voyage à l'étranger dans les 15 jours précédant l'apparition des symptômes. En 2015, la surveillance des infections à *Campylobacter* a confirmé les caractéristiques épidémiologiques observées depuis 2002 : une prédominance de l'espèce *C. jejuni* ; un nombre de cas plus élevé chez les enfants ; une prédominance des cas masculins sauf chez les personnes entre 20 et 40 ans et un pic saisonnier pendant la période estivale.

Dans les pays en voie de développement, la situation épidémiologique est différente. L'exposition aux *Campylobacter* est beaucoup plus précoce (dès les premiers mois de vie) en raison d'une promiscuité des volailles dans l'environnement de l'enfant. Ils sont protégés, au début, par des anticorps passifs transmis par la mère avant la naissance ainsi que ceux présents dans le lait maternel (28). Le risque d'infection survient au moment du sevrage et participe à la morbi-mortalité importante des pathologies diarrhéiques de l'enfant dans ces pays. Les réinfestations fréquentes contribuent à l'installation progressive d'une immunité permettant par la suite un portage sain de la bactérie (29).

1.6 Pathogénicité

Les facteurs de virulence et les mécanismes de survie des *Campylobacter* sont relativement peu connus bien que ces bactéries présentent d'excellentes capacité d'adaptation

et de résistance au stress. En effet, la route paraît longue et parsemée d'embûches pour passer d'un contaminant de l'environnement jusqu'à l'intestin humain, après avoir survécu au milieu hostile qu'est le tractus gastro-intestinal de la volaille, persister sur les carcasses de poulet et leurs conditionnements et échapper au système immunitaire, pour provoquer, dans le plus classique des cas, une gastro-entérite.

Le risque d'infection est d'autant plus grand que l'inoculum est important (30), bien que moins de 800 UFC (Unité Formant Colonie) peuvent provoquer une symptomatologie clinique (31). Les *Campylobacter* étant sensibles à l'acidité gastrique, une inoculation avec un véhicule tampon comme le lait favorisera l'infection (26). Par ailleurs, des sujets fragiles présenteront plus facilement des infections symptomatiques et qui seront plus difficiles à éradiquer. Il semblerait aussi, que le passage des bactéries chez un hôte animal porteur sain, renforcerait les pouvoirs infectant et pathogène (32). Indépendamment de cela, la colonisation d'un hôte et l'expression du pouvoir pathogène chez celui-ci nécessitent de nombreux mécanismes complémentaires.

1.6.1 Colonisation

La mobilité est très importante pour la survie des *Campylobacter* au sein du tube digestif. Elle est assurée par la présence d'un ou deux flagelles polaires et facilitée par la forme incurvée des bacilles. Cela permet un mouvement propulsif ainsi qu'une rotation en tire-bouchon des bactéries. La partie extracellulaire du filament est constituée de deux flagellines : FlaA et FlaB (codée respectivement par *flaA* et *flaB*) qui sont hautement conservées au sein du genre bactérien et dont la transcription est régulée par deux promoteurs distincts. Une mutation de *flaA*, *maf5* (facteur accessoire de mobilité) ou des gènes codant pour les promoteurs empêche la colonisation de l'intestin des volailles (33,34). Pas de mobilité sans un chimiotactisme développé pour rejoindre des milieux où les conditions sont plus favorables pour la survie de *Campylobacter*. Les facteurs chimioattractants les plus classiquement impliqués sont constitués par les mucines et glycoprotéines du mucus ainsi que par des substrats métaboliques divers comme certains acides aminés ou substances donneuses ou acceptrices d'électrons. Les chémorécepteurs des bactéries sont constitués de protéines qui vont lier les facteurs chimioattractants et induire une cascade métabolique entraînant des modifications dans les mouvements flagellaires et permettre des changements de direction des bactéries.

Une autre propriété intéressante du flagelle serait son pouvoir invasif via un système de sécrétion (T3SS) de protéines non flagellaires durant l'invasion de l'hôte. En effet, des

protéines comme FlaC, CiaB et CiaC paraissent essentielles à une colonisation maximale et à l'invasion cellulaire (35,36).

L'adhérence de *Campylobacter* aux cellules épithéliales intestinales est un prérequis indispensable pour la colonisation et va être médiée par une multitude d'adhésines présentes sur la surface bactérienne. L'adhésion à la fibronectine des cellules épithéliales via CadF va provoquer un signal cellulaire permettant l'internalisation de *Campylobacter*. Des mutations dans *cadF* entraînent une moins bonne adhérence et une réduction de l'internalisation des bactéries dans des cellules épithéliales intestinales de type INT-407 (37,38). D'autres adhésines comme FlpA, CapA ou encore Peb1 sont décrites dans la littérature et participent probablement à la pathogénicité intrinsèque des *Campylobacter* (32).

1.6.2 Production de toxines

Parmi les toxines produites par *Campylobacter*, la CDT (cytolethal distending toxin) est la plus étudiée et est retrouvée chez de nombreuses bactéries Gram négative. Elle comprend 3 sous-unités codées par *cdtA*, *cdtB* et *cdtC* qui sont essentielles à son activité. CdtA et CdtC permettent la liaison de la toxine aux récepteurs présents sur la surface cellulaire, CdtB étant la sous-unité enzymatique active. Cette dernière va pénétrer dans le noyau et induire des cassures de l'ADN double-brin conduisant à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et une apoptose par fragmentation du noyau et distension cellulaire. Son rôle est de faciliter la colonisation, d'induire une inflammation intestinale et de résister à la clairance bactérienne de l'hôte (39). D'autres toxines existent mais leurs rôles sont moins bien caractérisés.

1.6.3 Lipo-oligosaccharide et capsule

Le lipo-oligosaccharide (LOS) à la surface des *Campylobacter* possède de nombreuses fonctions ayant un rôle prépondérant dans la pathogénicité des germes. Parmi les plus clairement établies, on notera leur pouvoir d'adhérence, d'invasion et surtout d'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte. La sialylation du LOS accroît le potentiel invasif et diminue l'immunogénicité. Chez *C. jejuni*, ceci peut induire un mimétisme moléculaire avec les gangliosides des nerfs périphériques (GM1, GD1a, GQ1b...) de l'Homme et entraîner une réaction immunitaire croisée conduisant à la formation d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes du soi au niveau de la gaine de myéline des nerfs. Ce phénomène est à l'origine des neuropathies démyélinisantes que sont le syndrome de Guillain-Barré (SGB) et le syndrome de Miller-Fisher (SMF). Il existe différentes classes de LOS dont certaines sont plus

spécifiquement associées au SGB et au SMF (40) mais ne constituent pas un facteur de virulence unique et suffisant pour induire ce genre de neuropathies (2).

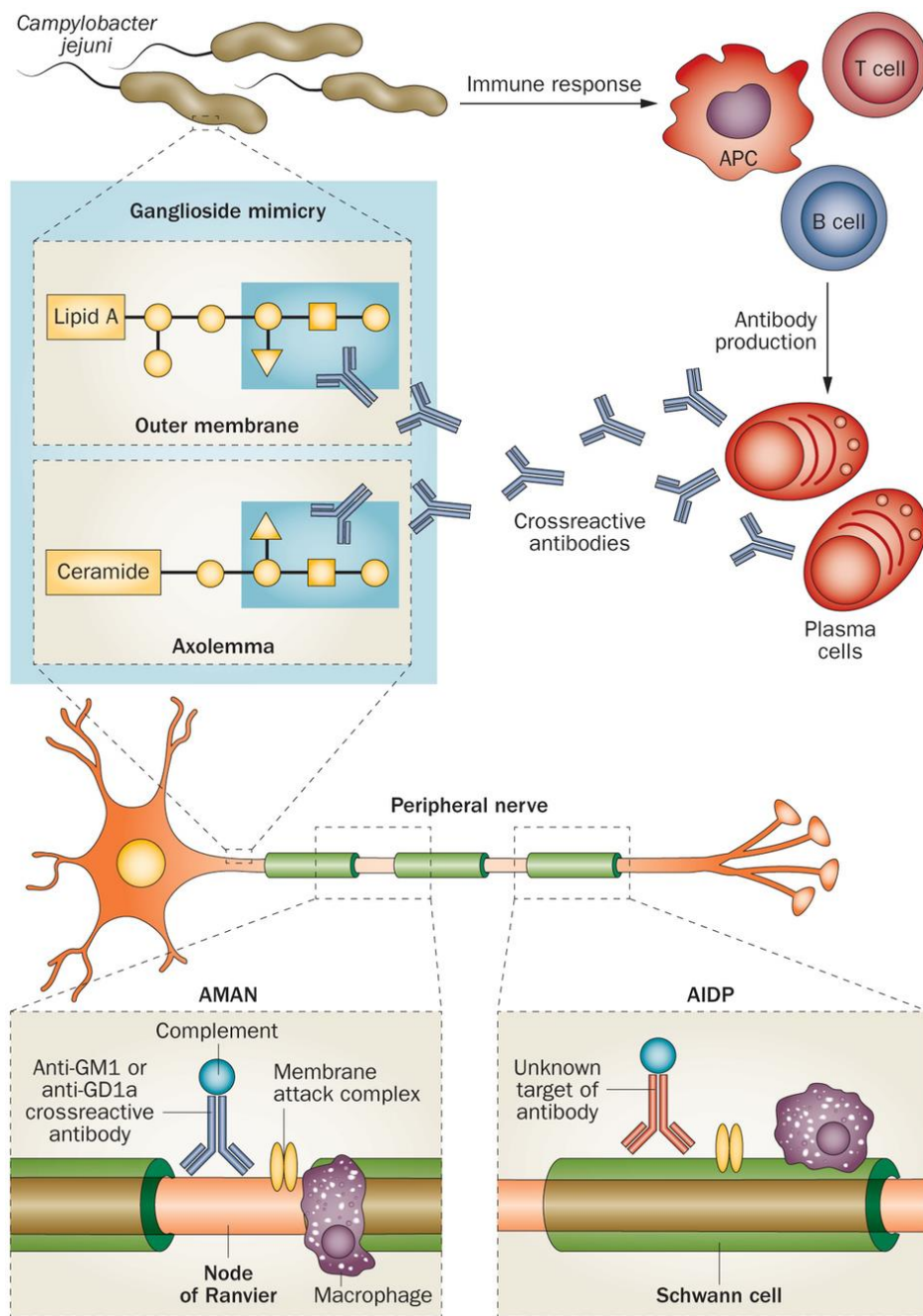


Figure 6 : Physiopathologie du syndrome de Guillain-Barré (41).

AIDP (polyneuropathie inflammatoire démyélinisante aiguë) et AMAN (neuropathie motrice axonale aiguë) constituent les 2 sous-types de SGB

Le pouvoir pathogène de la capsule polysaccharidique est comparable dans la mesure où il facilite la survie, l'adhérence, l'invasion et l'échappement au système immunitaire. Les gènes de biosynthèse de la capsule sont situés dans une région hypervariable du génome chez *C. jejuni*. Leur grande diversité couplée à la variation de phase permet d'avoir un répertoire de

sérotypes capsulaires d'une grande diversité. De même que pour le LOS, certains génotypes capsulaires sont dominants dans des souches de *Campylobacter* associées au SGB ou au SMF. Par ailleurs, une étude comparant les classes de LOS et les génotypes capsulaires a montré qu'ils sont corrélés et que certaines combinaisons LOS/capsule sont associées au SGB ou au SMF et peuvent constituer, de ce fait, des marqueurs de ces pathologies (2).

1.6.4 Autres facteurs de virulence et de survie

La virulence bactérienne est étroitement liée à la capacité à synthétiser des protéines altérant les fonctions physiologiques de l'organisme infecté. Les bactéries ont donc su développer, pour sécréter ces protéines, des systèmes de sécrétions spécifiques. Parmi eux, les systèmes de sécrétion de type IV (T4SSs ou TFSSs) permettent, non seulement, la libération d'effecteurs mais aussi l'échange génétique (conjugaison, libération d'ADN) (41). Ils sont largement répandus dans les populations bactériennes et leurs fonctions ont été largement étudiées (42–44). Leur rôle pour véhiculer des plasmides arborant des gènes de résistance aux antibiotiques est bien connu chez *Campylobacter* et ils participent activement à la dissémination de ces résistances (45–48).

Les pompes d'efflux CME (*Campylobacter* multidrug efflux) sont impliquées dans l'élimination de nombreux médicaments, dans la résistance aux sels biliaires et aux métaux lourds ainsi que d'autres agents antimicrobiens et contribuent à la survie des bactéries dans certaines conditions de stress. Par d'autres mécanismes, l'exposition aux antibiotiques d'animaux porteurs commensaux de *Campylobacter* ou d'humains infectés a entraîné l'émergence et la diffusion de résistance acquises chez *C. jejuni* et *C. coli* notamment aux tétracyclines, aux quinolones et plus récemment aux aminoglycosides.

Du fait que les campylobactérioses sont principalement provoquées par ingestion d'aliments souillés, cela implique que les bactéries ont survécu aux conditions de stress rencontrées le long de la chaîne de production de ces derniers. Ces bactéries microaérobies sont particulièrement sensibles au stress oxydatif et à la dessiccation. En conséquence, la contamination par *Campylobacter* sur la viande de bœuf, de porc et de mouton est considérablement moins importante car de l'air refroidi assèche les carcasses dans les abattoirs. Ce n'est pas le cas des carcasses de volailles qui sont trempées dans des bains chaud maintenant une certaine humidité et facilitant la survie bactérienne. La respiration aérobie de *Campylobacter* produit des espèces oxygénées réactives (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène) qui sont incomplètement réduites et vont causer des dommages aux protéines, acides nucléiques et membranes bactériennes. Ces mêmes substances peuvent être produites par le système immunitaire de l'hôte pour éliminer le pathogène. En réponse à ce stress, les

Campylobacter vont activer ou potentialiser leur système de défense antioxydant pour résister à des conditions aérobies persistantes.

1.6.5 Physiopathologie chez l'Homme

Une fois la lumière intestinale atteinte par *Campylobacter*, les bacilles vont devoir surmonter les barrières mécaniques et les mécanismes immunologiques pour provoquer une infection. Ils vont, tout d'abord, traverser la muqueuse intestinale grâce à leur morphologie et leur mobilité caractéristiques pour, ensuite, adhérer, via CadF notamment, et envahir les cellules épithéliales intestinales. L'invasion se ferait, à la fois, par liaison des adhésines bactériennes à des récepteurs spécifiques puis internalisation via une vacuole d'endocytose (mécanisme « zipper ») ainsi que par injection d'effecteurs protéiques variés dans la cellule-hôte via des systèmes de sécrétion de type III ou IV (T3SS, T4SS) induisant l'endocytose du micro-organisme (mécanisme « trigger ») (49). Certains *Campylobacter* sont capables de traverser la barrière intestinale par voie paracellulaire en altérant les jonctions serrées des entérocytes (39).

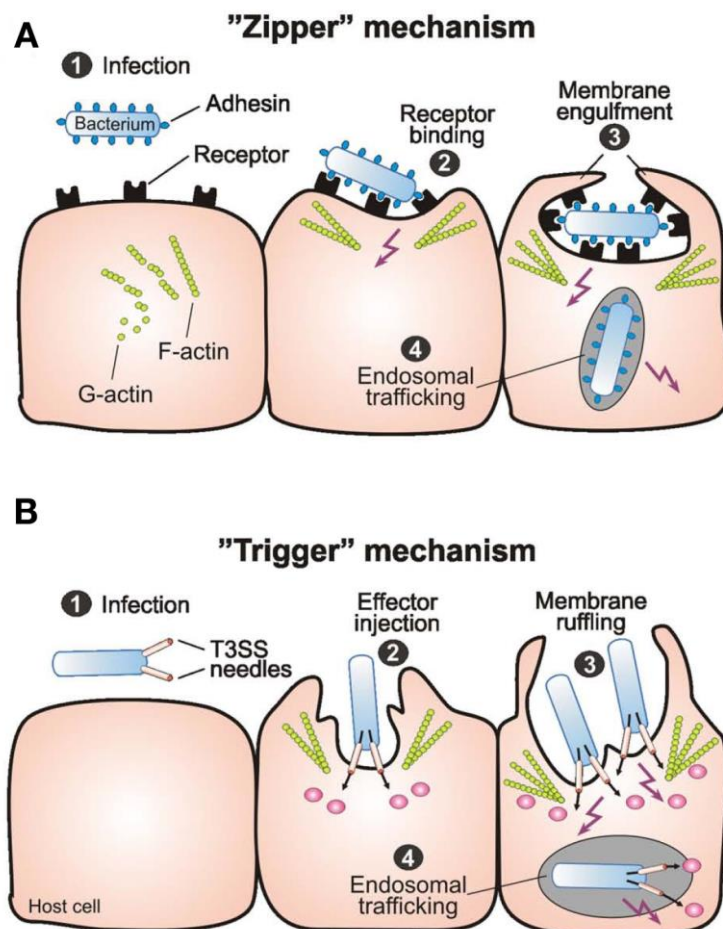


Figure 7 : Mécanismes d'invasion des cellules non phagocytaires par *Campylobacter* (49).

En réponse, les cellules vont produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 8 (IL-8) par l'activation de la voie de la MAP kinase et du facteur de transcription NF- κ B notamment, contribuant à l'inflammation et au processus de guérison. La réponse immunitaire primaire est orientée vers une réponse cellulaire médiée par les lymphocytes T_H1 impliquant probablement les cellules dendritiques et les macrophages (50). Une étude récente sur la γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) de *C. jejuni* a montré qu'elle avait la propriété d'inhiber la prolifération des cellules épithéliales et des lymphocytes humains, constituant, de ce fait, un facteur de pathogénicité non négligeable favorisant la persistance de cellules infectées (51). Certains *Campylobacter* comme *C. fetus* ou *C. rectus* possèdent une couche superficielle (couche S) recouvrant la membrane externe bactérienne et qui confère une résistance supplémentaire à la phagocytose et au pouvoir bactéricide du sérum en empêchant notamment la fixation du complément. L'hôte va également produire, pour se défendre, des anticorps dirigés contre de nombreux composants bactériens (flagelle, protéines extra-membranaires, LOS, CDT) (50).

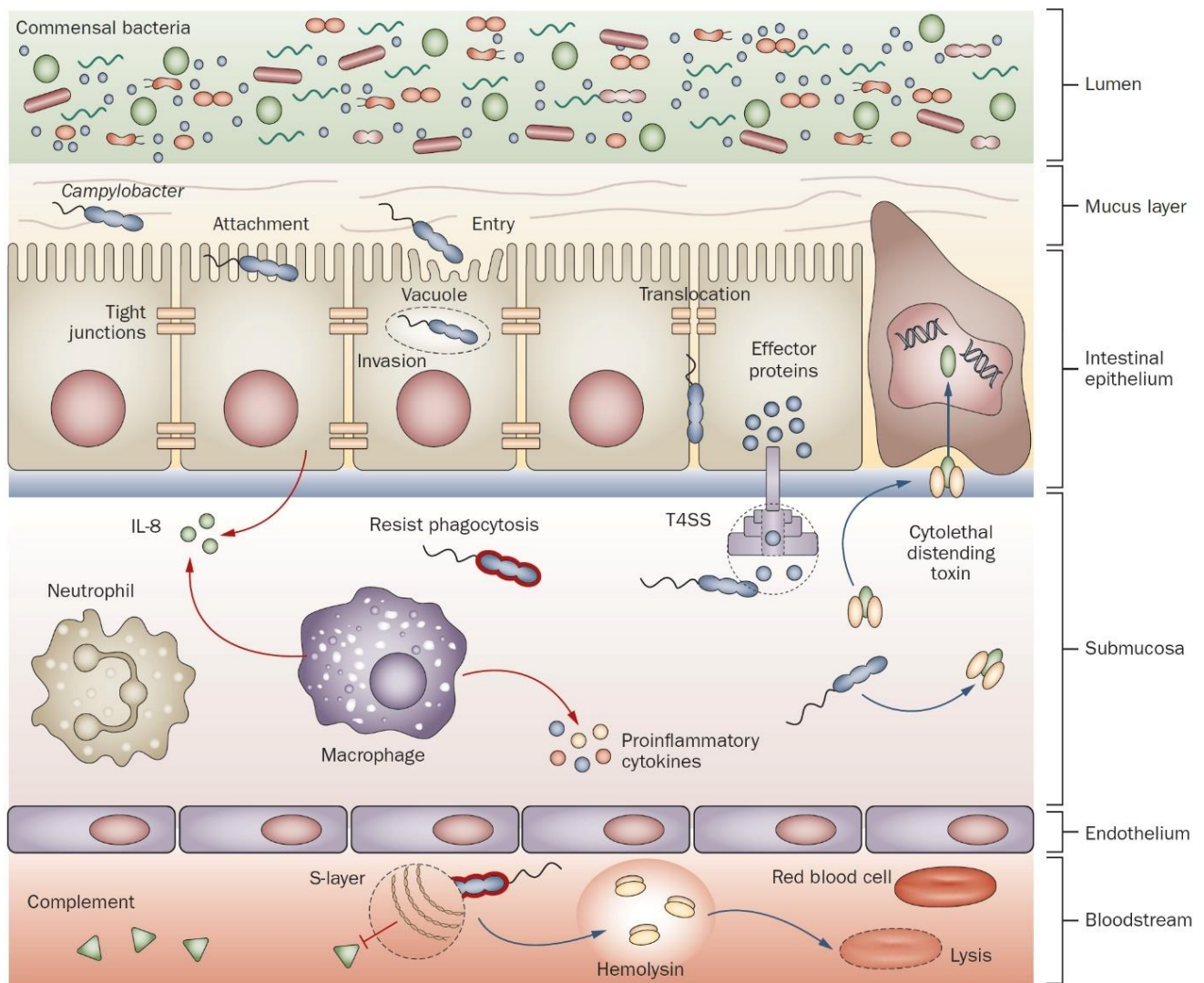


Figure 8 : Mécanismes de pathogénicité utilisés par *Campylobacter* pour traverser le tractus gastro-intestinal (39).

1.7 Aspects cliniques des infections à *Campylobacter*

Les manifestations cliniques de l'infection à *Campylobacter* sont variables en fonction de l'espèce en cause. Les infections liées à *C. jejuni* seront essentiellement responsables d'atteintes digestives, plus rarement de disséminations systémiques et de complications post-infectieuses. *C. coli*, 2^{ème} espèce la plus fréquemment isolée de prélèvements humains, présente une symptomatologie comparable à *C. jejuni*. Les infections à *C. fetus*, beaucoup plus rares, sont surtout impliquées dans des septicémies.

1.7.1 Entérite à *Campylobacter*

La durée d'incubation est, en moyenne, de 3 à 4 jours mais peut être plus longue. Elle se manifeste classiquement par des signes digestifs non spécifiques : diarrhée inflammatoire

parfois sanglante, douleurs abdominales et parfois vomissements dans de rares cas d'atteinte gastrique. Des signes généraux sont aussi présents et peuvent précéder l'épisode diarrhéique : fièvre modérée, céphalées, asthénie, anorexie mais sont souvent moins intenses que dans les infections à *Salmonella* spp. ou à *Shigella* spp. L'intensité des douleurs abdominales initiales peut faire évoquer une appendicite. L'infection est spontanément résolutive en une semaine mais une rechute peut survenir en l'absence de traitement, probablement liée à la capacité de certaines souches à persister plusieurs semaines dans les selles (11).

Chez le nourrisson, les manifestations sont identiques mais le risque de déshydratation est plus important et des convulsions peuvent survenir. L'allaitement peut présenter un rôle protecteur (29).

Chez l'immunodéprimé, les infections sont plus fréquentes, plus sévères et plus difficiles à éradiquer. Les sujets immunodéficients comme ceux souffrant d'hypogammaglobulinémie peuvent présenter un portage chronique avec survenue d'infections successives difficiles à traiter. Les malades atteints par le virus du SIDA sont également souvent infectés par *Campylobacter* suggérant aussi un rôle de l'immunité cellulaire (52).

Les complications locorégionales sont rarissimes à type de colite pseudomembraneuse, de mégacôlon toxique, d'appendicite, péritonite, cholécystite voire hépatite et pancréatite (26).

1.7.2 Complications infectieuses systémiques

Les *Campylobacter* sont des bactéries invasives qui peuvent transloquer à travers la paroi intestinale pour parvenir dans la circulation sanguine. Malgré tout, le risque de septicémie est très faible avec les *Campylobacter* thermo-tolérants car très sensibles au pouvoir bactéricide du sérum. Elles surviennent plus volontairement chez des patients âgés, immunodéprimés ou avec une pathologie sous-jacente (diabète, cirrhose, cancer, etc.) (4). L'espèce le plus fréquemment responsable de septicémie est *C. fetus* qui est rarement en cause dans des entérites. En effet, cette espèce est plus invasive grâce à la présence d'une couche de protéines de surface (S-layer proteins ou SLPs) qui empêchent la fixation de la fraction C3b du complément et ainsi prévient l'opsonisation et la destruction par les phagocytes (53). Des localisations secondaires possibles dans différents organes rendent le pronostic plus défavorable et peuvent causer décès et rechutes. Les infections fœto-maternelles à *C. fetus* sont rares mais des infections néonatales à *C. jejuni* peuvent être observées suite à l'accouchement chez une mère infectée.

1.7.3 Complications post-infectieuses

La complication post-infectieuse la plus sévère est le syndrome de Guillain-Barré (SGB) dont l'incidence est de 1/1000 infections à *C. jejuni*. C'est une polyradiculonévrite aiguë affectant les nerfs périphériques et qui se caractérise par une paralysie flasque ascendante avec aréflexie et dissociation albuminocytologique au niveau du liquide céphalo-rachidien. Plusieurs étiologies, le plus souvent infectieuses, existent mais l'infection à *C. jejuni* représenterait tout de même 20 à 50% des cas attribuables. L'affection est le plus souvent réversible en 6 à 12 mois mais des séquelles neurologiques majeures persistent dans 20% des cas et une mortalité non négligeable de 2 à 3% est imputable au SGB (11). Des cas de syndrome de Miller-Fisher caractérisé par une ataxie, une aréflexie et une ophtalmoplégie sont aussi imputables à *C. jejuni*.

Une autre complication post infectieuse due à *C. jejuni* a émergé ces dernières années : le syndrome de l'intestin irritable ou syndrome du côlon irritable. Il s'agit d'une colopathie dans laquelle des douleurs abdominales ou un inconfort digestif sont associés à une modification de la fréquence et de la consistance des selles. Un ballonnement, une distension abdominale et des troubles du transit intestinal sont également fréquemment associés. Près d'un tiers des cas font suite à une infection entérique dont la principale cause semble être *Campylobacter* (54).

Comme chez d'autres bactéries entéro-pathogènes, *C. jejuni* peut être à l'origine d'un syndrome post-infectieux à type d'arthrite réactionnelle, d'urticaire ou d'érythème noueux. Il semblerait impliqué dans d'autres complications comme notamment la maladie immunoproliférative de l'intestin grêle (55). Ces complications sont rares et peuvent survenir plusieurs jours à plusieurs semaines après l'épisode digestif.

1.8 Diagnostic

Le prélèvement de selles doit être réalisé dans un récipient stérile ou par écouvillonnage rectal et conservé à 4°C avant l'étude durant un délai inférieur à 24 heures. Il est recommandé de conserver l'échantillon dans un milieu de transport de type Cary-Blair pour éviter la dessiccation (8). La recherche de *Campylobacter* dans le sang sur hémocultures permet d'excellente performance grâce aux systèmes de détection automatisés. Tout autre type de prélèvement biologique peut être utilisé pour mettre en évidence les *Campylobacter* à conditions de respecter les conditions de culture et d'incubation.

1.8.1 Examen microscopique

L'examen d'un frottis de selles après coloration au bleu de méthylène est recommandé mais peu sensible. L'observation de polynucléaires neutrophiles et de bacilles incurvés peut orienter le diagnostic. Un état frais sur flacon d'hémoculture peut montrer des bactéries très mobiles en « vol de moucheron ». Une coloration de Gram permet d'observer des bacilles spiralés Gram négatifs.

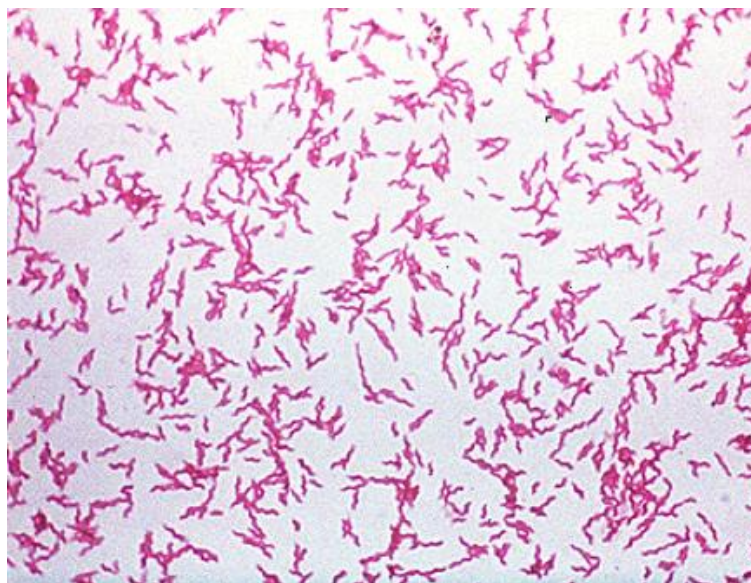


Figure 9 : *Campylobacter* observés à la coloration de Gram.

(Par Kevin Birchler, University of Glasgow)

1.8.2 Culture

La culture sur milieux sélectifs est la méthode la plus utilisée pour isoler les *Campylobacter* à partir de prélèvements de selles. Les milieux au charbon actif (Karmali), permettant de fixer les dérivés oxygénés, ou au sang (Campylosetel[®], Skirrow, Butzler), enrichis en facteurs de croissance, contiennent des antibiotiques et antifongiques capables d'inhiber la croissance de cocci à gram positif, d'entérobactéries et de nombreux micro-organismes fongiques. Des milieux d'enrichissement comme le milieu de Preston peuvent être utilisés avant mise en culture de manière à détecter des *Campylobacter* en faible concentration (contrôles sanitaires dans l'industrie agro-alimentaire, contrôles des eaux).

La culture par la méthode de filtration utilise la mobilité et la petite taille des *Campylobacter* par rapport aux autres bactéries pour les isoler à l'aide de filtres d'acétate ou de nitrate de cellulose calibrés (0,45 et 0,65 μm respectivement) déposés sur milieux non sélectifs. Le principe consiste à déposer une goutte de suspension de selles sur le filtre qui va

permettre aux *Campylobacter* de le traverser tout en retenant les autres bactéries présentes dans la suspension. Une fois le liquide filtré, le filtre est retiré et la gélose incubée 5 à 7 jours.

L'association de la filtration et des milieux sélectifs permet d'augmenter les chances d'isolement des *Campylobacter* et d'isoler des espèces moins typiques. Les milieux inoculés avec une dilution de selle doivent être incubés rapidement en atmosphère microaérobie à 37°C de préférence pour permettre la croissance de *Campylobacter* non thermotolérants comme *C. fetus*. Des colonies peuvent pousser en 24h mais les milieux doivent être conservés de 3 à 5 jours pour conclure à une négativité de la culture.

La culture donne des petites colonies luisantes, translucides dont l'identification peut être réalisée à l'aide de diverses méthodes.

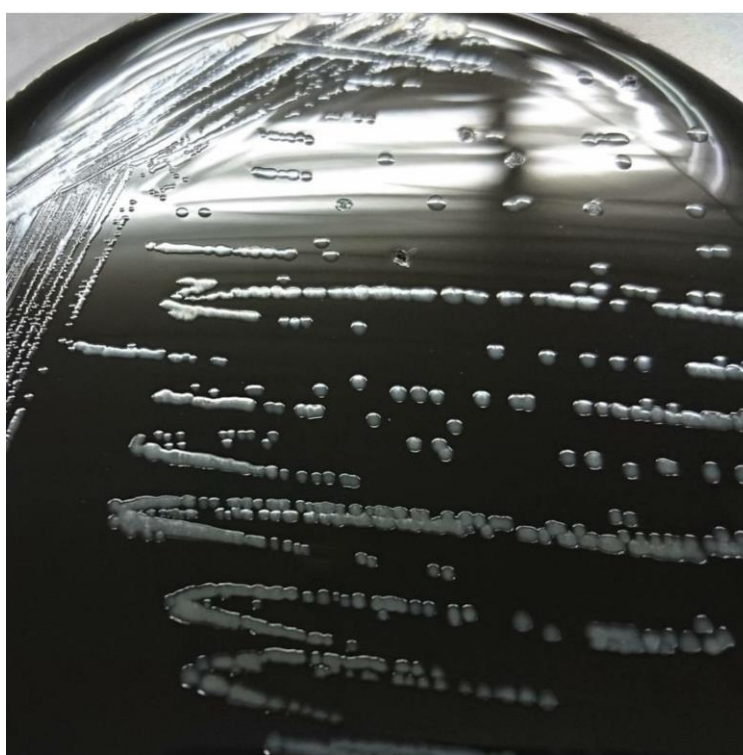


Figure 10 : Colonies de *Campylobacter* sur gélose Karmali.

Photo personnelle.

1.8.2.1 Identification phénotypique

Peu à peu délaissées au profit d'autres méthodes d'identification plus récentes et plus performantes, les caractéristiques phénotypiques permettent d'identifier ou d'orienter sur le genre voire l'espèce. Elles utilisent certaines propriétés de *Campylobacter* comme la présence d'enzyme, la tolérance à certains composés et antibiotiques ou encore la température de pousse. Il existe des galeries d'identification miniaturisées comme Api Campy® (bioMérieux) permettant de tester de manière combinée une multitude de caractéristiques spécifiques. Cette

méthode reste assez performante pour identifier *C. jejuni* mais présente des résultats variables pour d'autres espèces (erreurs ou absence d'identification, nécessité de tests complémentaires) (56). En effet, il existe certaines limites. Par exemple, l'hydrolyse de l'hippurate par l'hippuricase, présente uniquement chez *C. jejuni*, peut être absente dans 2 à 3% des souches. De plus, l'augmentation des résistances acquises à certains antibiotiques de souches naturellement sensibles complique l'identification.

1.8.2.2 Identification par biologie moléculaire

Différentes méthodes de PCR (Polymerase Chain Reaction) standard et en temps réel existent même si le séquençage de l'ARN ribosomique 16S reste la méthode de référence. Au CNRCH, une PCR en temps réel amplifiant le gène *gyrA* en dehors de la Quinolone Resistance-Determining Region (QRDR) et utilisant un système FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) en tandem a été développée et permet de distinguer les souches de *C. jejuni* et *C. coli* (57). Le gène *gyrA* a été choisi car il est essentiel pour la viabilité bactérienne et les amorces ont été désignées dans une région du gène hautement conservée chez les deux espèces. La sonde d'ancrage (anchor) présente un mésappariement n'ayant pas d'effet sur les températures de fusion (T_m) tandis que la sonde de détection (sensor) présente trois mésappariements pour *C. jejuni* permettant d'avoir une T_m des amplicons très différente de *C. coli*. En augmentant la température, le sensor, moins bien hybridé, se détachera plus facilement entraînant une T_m plus faible. Une PCR pour l'identification de *C. fetus* utilisant les mêmes sondes fluorescentes et les mêmes conditions opératoires mais des amorces différentes a aussi été mise au point par le laboratoire (57).

Ces techniques sont beaucoup plus spécifiques que l'étude phénotypique. Par exemple, des *C. jejuni* n'hydrolysant pas l'hippurate furent considérés antérieurement à tort comme des *C. coli*. L'inconvénient principal étant le délai de rendu de résultat lorsque le séquençage est nécessaire pour identifier une espèce moins fréquente. Par ailleurs, seuls des laboratoires spécialisés sont en mesure de réaliser certaines méthodes même si leur développement s'accélère.

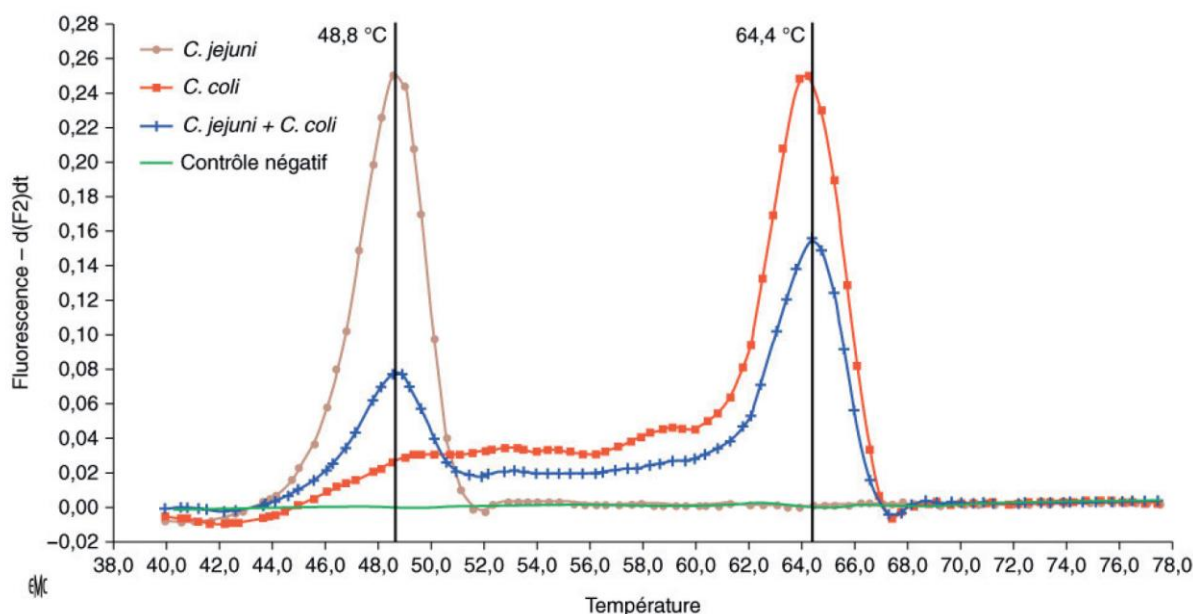


Figure 11 : Courbes de fusion obtenues par PCR en temps réel avec système FRET en tandem avec les amorces du gène *gyrA* de *C. coli* et *C. jejuni* (25).

La courbe bleue peut être observée en cas de mélange des 2 espèces avec présence de deux pics correspondant aux deux T_m spécifiques.

1.8.2.3 Identification par spectrométrie de masse

L'identification de colonies bactériennes par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of flight) est en pleine expansion et tend à remplacer les méthodes standards que ce soit dans les laboratoires hospitaliers ou de ville. Une fraction de colonie est étalée sur une cible de façon homogène avec une matrice d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique. Le dépôt sur la cible va être bombardé par un rayon laser qui va arracher, ioniser et emporter les protéines qui sont accélérées le long d'un tube de vol sous vide jusqu'à un détecteur. Les ions vont être séparés selon leur temps de vol, qui est fonction du rapport masse/charge, et donner un spectre représentant la carte d'identité de la bactérie, représentative de sa composition moléculaire spécifique. Le spectre obtenu est comparé à une base de données enrichie en permanence permettant l'obtention d'un score d'appariement et d'identification le plus plausible du micro-organisme au rang du genre, de l'espèce voire de la sous-espèce.

La première étude de MALDI-TOF MS appliquée aux *Campylobacter* a permis de mieux caractériser les spectres et démontre que cette méthode est sensible, rapide et spécifique pour l'identification de différentes espèces impliquées en pathologie humaine (58). Elle est, en outre, supérieure à l'identification phénotypique (56) et présente des performances comparables à la PCR, méthode de référence. Elle peut être réalisée sur des colonies jeunes (3-4h), sur des prélèvements primaires (hémocultures, urines, après une procédure

d'extraction) et s'affranchit du temps correspondant à la culture et autres méthodes d'identification plus longues et laborieuses. De plus, le niveau de compétence technique pour réaliser l'analyse est basique et le coût de revient est 10 à 500 fois inférieur à d'autres méthodes. Un autre intérêt de cette technologie est la possibilité de repérer ou identifier de nouvelles espèces bactériennes. A titre d'exemple, le MALDI-TOF MS a conduit à la mise en évidence d'une nouvelle espèce de *Campylobacter* (*C. iguaniorum*) isolée de fèces de reptiles (59,60). Deux analyseurs dominant actuellement le marché et sont représentés par le Vitek[®] MS (bioMérieux) et le microflex LT (Bruker). Ce dernier présente l'avantage d'avoir une base de données un peu plus fournie notamment pour les bactéries du genre *Campylobacter* et *Helicobacter*.

1.8.3 Méthodes immuno-enzymatique et immunochromatographique

Des tests immunoenzymatiques ont été développés utilisant la méthode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ou des tests immunochromatographiques. Plusieurs tests ELISA sont disponibles : le ProSpecT *Campylobacter* microplate assay[®] (Alexon-Trend), le RidaScreen *Campylobacter*[®] (r-Biopharm) et le Premier Campy[®] (Meridian Bioscience).

Deux tests immunochromatographiques, l'ImmunoCard STAT ![®] Campy (Meridian BioSciences) et le Rida[®]Quick *Campylobacter*, ont pour avantages d'être très simple d'utilisation et de donner un résultat rapide en 15-20 minutes, contrairement à la culture et aux méthodes ELISA. Ils sont par ailleurs sensibles (98,5% et 87% respectivement) et spécifiques (98,2% et 97% respectivement) (61,62).

Ces méthodes paraissent fiables et permettraient un dépistage rapide directement à partir de l'échantillon de selle et d'éviter la mise en culture en cas de résultat négatif. Ils sont notamment recommandés pour la détection de *Campylobacter* dans le cadre de dépistage pré-transplantation fécale. Cependant, ils ont comme inconvénient de ne détecter uniquement que *C. jejuni* et *C. coli* et ne suffisent donc pas pour la recherche d'autres *Campylobacter* plus atypiques ou de bactéries apparentées (*Arcobacter* spp. notamment).

1.8.4 Méthode de biologie moléculaire

Différentes PCR standards ont été développées pour l'identification des *Campylobacter* qui sont aussi utilisables pour une détection directe de ces bactéries dans les selles. De nombreux kits de PCR multiplex syndromiques permettant de détecter plusieurs bactéries entéropathogènes dans les selles commencent à être commercialisés. Les PCR en

temps réel, comme celle utilisée au CNRCH basée sur le gène *gyrA* et décrite précédemment, représente une autre alternative intéressante.

Ces méthodes ont une meilleure sensibilité que la culture et une très bonne spécificité mais leurs performances peuvent être réduites par la présence d'inhibiteurs de PCR dans l'échantillon. Elles sont rapides et automatisables mais restent assez coûteuses.

1.8.5 Sérologie

La recherche d'anticorps sanguins par sérologie trouve une utilité dans l'étude étiologique d'un syndrome post-infectieux (Syndrome de Guillain-Barré, arthrite réactionnelle) mais ne présente aucun intérêt diagnostique dans les infections intestinales à *Campylobacter*. Elle peut aussi présenter un intérêt épidémiologique pour évaluer l'exposition d'une population à ces bactéries.

Il existe un test ELISA (SERION ELISA classic® *Campylobacter jejuni* IgA, IgG et IgM, Virion-Serion) et une méthode par fixation du complément détectant IgG et IgM. Compte tenu de la fréquence d'exposition aux *Campylobacter* dans la population générale, seuls des taux élevés (>1/20) doivent être pris en compte.

1.8.6 Typage

D'intérêt surtout épidémiologique, les méthodes de typage sont nombreuses et reposent à la fois sur des méthodes phénotypiques et génotypiques.

Bien que les méthodes génotypiques supplantent largement les méthodes phénotypiques de nos jours, le sérotypage était particulièrement utilisé antérieurement. Le système Penner utilise des antigènes (Ag) thermostables (Ag O somatiques, par exemple du LOS) (63) tandis que le système Lior utilise des Ag thermolabiles (Ag H flagellaires) par agglutination sur lame (15).

Les méthodes moléculaires de typage les plus fréquemment utilisées sont représentées par l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE), la PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), le séquençage multilocus (MLST) voire, de plus en plus, le séquençage génome entier (WGS).

Elles peuvent permettre de contrôler si une même souche est en cause lors de cas groupés ou de déterminer s'il y a rechute ou réinfection en cas de récurrence chez un malade donné. Le système global le plus intéressant est la méthode MLST qui correspond au séquençage de sept gènes de ménage de la bactérie définissant des séquences types (STs) et des complexes clonaux (CCs) (64). La MLST est également utilisée pour retracer l'origine

des souches notamment pour tenter d'identifier l'origine environnementale ou vétérinaire. Cette approche présente des limites de par la variabilité potentielle des souches et la complexité des échanges inter-réservoirs. Des approches bio-informatiques basées sur l'analyse de génomes complets sont actuellement en développement et permettront à l'avenir des analyses plus fines.

1.9 Prévention

Les mesures de prévention constituent la première barrière aux infections à *Campylobacter*. Dans l'industrie agroalimentaire, des mesures d'hygiène strictes doivent être prises pour prévenir la colonisation des animaux d'élevage par la mise en place de bonnes pratiques d'hygiène, de mesures de biosécurité et de pratique d'élevage incorporés dans une analyse de risque et de maîtrise des points critiques (système HACCP). La mise en place de contrôles bactériologiques et techniques le long de la chaîne de production permet d'identifier et de réduire les causes de contamination de l'élevage des animaux jusqu'à l'emballage des produits finis. En France, il existe des autocontrôles effectués par les exploitants et des contrôles nationaux sous la responsabilité de la DGAL (Direction générale de l'alimentation) du ministère de l'Agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire et de la DGCCRF (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes) (65).

D'autres mesures concernant la surveillance des réseaux d'eaux de consommation existent et des épidémies d'origine hydriques restent très rares en France mais sont plus fréquentes dans certains pays nordiques.

Les mesures de prévention individuelle classiques en milieu domestique concernent essentiellement l'alimentation : hygiène des mains, lavages des fruits et légumes, des ustensiles et surfaces en contact avec les aliments, cuisson suffisante des viandes. Il faut aussi éviter la consommation de lait non pasteurisé et le contact avec des animaux d'élevage ou de compagnie.

La surveillance des agents infectieux responsables d'infections potentiellement alimentaires par les CNR est essentielle pour les maladies qui ne relèvent pas d'une déclaration obligatoire dédiée comme les campylobactérioses (sauf toxi-infections alimentaires collectives). Le CNR contribue à l'alerte en identifiant et signalant à l'InVS des cas groupés d'infections par exemple.

1.10 Traitement

Concernant les diarrhées infectieuses, un traitement symptomatique doit être conduit, en premier lieu, pour éviter la déshydratation par apport d'eau et d'électrolytes notamment chez les nourrissons et les sujets âgés. L'indication d'un traitement antibiotique n'est pas systématique mais il est recommandé en cas de signes de gravité (fièvre, diarrhée sanglante, syndrome dysentérique, absence d'amélioration), aux âges extrêmes de la vie, chez la femme enceinte et chez les patients à terrain fragile notamment les immunodéprimés chez lesquels l'infection peut être compliquée. Ce traitement, s'il est bien conduit et adapté, entraîne l'éradication de la bactérie. Cependant, le diagnostic est souvent porté tard, alors que les symptômes ont régressé et que les défenses de l'hôte ont suffi à se débarrasser du pathogène (temps de prise en charge, d'isolement en culture voire d'antibiogramme), d'où l'importance du diagnostic rapide chez des patients fragiles. En première intention, l'utilisation d'un macrolide comme l'azithromycine par voie orale est particulièrement adaptée. Le traitement doit être conduit pendant 5 jours. D'autres alternatives thérapeutiques existent en cas de manifestations chroniques et de résistances comme l'amoxicilline, les fluoroquinolones ou tétracyclines après évaluation de leur sensibilité par antibiogramme.

Les infections systémiques nécessitent un traitement antibiotique par une association d'un aminoglycoside comme la gentamicine et d'une β -lactamine (amoxicilline/acide clavulanique ou imipénème) ou d'une fluoroquinolone.

2. Étude de la sensibilité aux antibiotiques

2.1 Méthodes

De nombreuses méthodes existent pour évaluer la sensibilité aux antibiotiques de manière à utiliser la molécule adaptée pour traiter une infection (66). Il existe, à la fois des méthodes phénotypiques (diffusion par disques, dilution en milieu solide ou liquide, bandelettes E-test[®]) et des méthodes génotypiques (PCR, séquençage, FISH). Elles présentent une utilité majeure chez des pathogènes dont les résistances sont très variables et en constante évolution comme chez *Campylobacter*. Beaucoup de paramètres peuvent influencer l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques *in vitro* (inoculum, milieux, température, atmosphère, etc.). Des méthodes standardisées recommandées par des sociétés savantes permettent d'homogénéiser les bonnes pratiques et de diminuer les variations inter-laboratoires aussi bien au niveau national qu'international.

Les dernières recommandations préconisées par le Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) et l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) pour la réalisation de l'antibiogramme sont les suivantes :

- milieu : gélose de Mueller-Hinton au sang de cheval défibriné et additionnée de β -nicotinamide adénine dinucléotide (β -NAD) à une concentration de 20 mg/L (MH-F)
- inoculum : à partir d'une culture visible du prélèvement, réalisation d'une suspension bactérienne en solution salée (NaCl 0,9%) pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland ($\approx 10^8$ UFC/mL)
- ensemencement : par écouvillonnage dans trois directions de la totalité de la surface de la gélose puis dépôt des disques imprégnés d'antibiotiques
- lecture : après 16 à 24 h d'incubation (voire après 40-48h si pousse insuffisante) à $35\pm 2^\circ\text{C}$ en présence de 4 à 6% CO_2 en microaérobiose

Un contrôle de qualité est recommandé en parallèle avec une souche dont les diamètres d'inhibition voire les CMI sont connus (*Campylobacter jejuni* ATCC 33560) (67).

Tableau 1 : Liste des antibiotiques à tester pour *Campylobacter* spp. d'après le CASFM 2016 (67)

Liste standard	Liste complémentaire
Ampicilline	
Amoxicilline - acide clavulanique	Ertapénème
Erythromycine	Gentamicine
Ciprofloxacine	
Tétracycline	

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) est un autre moyen pour évaluer la sensibilité de *Campylobacter* aux antibiotiques et utilise des méthodes de dilution ou de diffusion en milieux liquide ou solide.

Le CASFM et son équivalent américain, le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), proposent des diamètres et concentrations critiques correspondant à des cut-offs épidémiologiques (ECOFFs) déterminés dans des études adaptées (68) mais dont l'inconvénient est de ne pas tenir compte des propriétés pharmacologiques et de l'efficacité clinique des antibiotiques correspondants.

L'étude des gènes de résistance prend de l'ampleur. Ainsi, de nombreuses études publient des résultats montrant de très bonnes corrélations génotype/phénotype de résistance. On peut supposer qu'elles supplanteront, dans un future proche, les méthodes phénotypiques actuelles utilisées majoritairement en routine dans les laboratoires à visée diagnostic.

2.2 Sensibilité naturelle

Les principales classes d'antibiotiques actives sur *Campylobacter* sont les macrolides, les tétracyclines, les pénicillines A comme l'amoxicilline (\pm acide clavulanique), les carbapénèmes, les fluoroquinolones et les aminoglycosides.

A contrario, ces bactéries présentent des résistances naturelles à de nombreuses classes de β -lactamines (carboxy-, uréido-pénicillines, monobactames et céphalosporines) de part une faible affinité aux protéines liant les pénicillines (PLP) et par défaut de pénétrations de ces molécules. Elles sont aussi naturellement résistantes aux glycopeptides, streptogramines et sulfamides. Il existe des variabilités inter-espèces. Par exemple, *C. fetus* et *C. lari* sont naturellement résistants aux quinolones (acide nalidixique mais pas aux fluoroquinolones). Il faut distinguer ces résistances intrinsèques, communes à tous les individus d'une espèce, des résistances acquises par mutations chromosomiques ou acquisition d'ADN étranger (plasmide, transposon).

2.3 Principaux mécanismes de résistance acquis

2.3.1 Résistances aux quinolones

Les quinolones représentent une des classes d'antibiotiques les plus prescrites dans le monde. À cause de leur utilisation massive (voire surutilisation), le nombre de souches bactériennes résistantes a explosé depuis les années 90. Elles font partie des résistances acquises les plus fréquentes parmi les antibiotiques utilisés pour traiter les campylobactérioses. Les quinolones agissent sur deux topo-isomérase de type II : l'ADN gyrase et la topo-isomérase IV. Ces dernières permettent la formation de points de cassure transitoires de l'ADN double brin nécessaires à la transcription et à la réplication et indispensables à la viabilité bactérienne. Par ailleurs, l'ADN gyrase est capable de créer des surenroulements négatifs de l'ADN diminuant les contraintes de torsion au niveau des fourches de réplication et du complexe transcriptionnel (69). Les quinolones vont s'insérer dans l'ADN au niveau du site de clivage, le stabiliser et empêcher la ligation, induisant des cassures permanentes de l'ADN et une mort cellulaire.

Le plus fréquemment, les résistances aux quinolones chez *Campylobacter* sont dues à une mutation unique du gène *gyrA* codant pour une sous-unité de l'ADN gyrase dans la région QRDR (Quinolone Resistance-Determining Region). Cette mutation entraîne le remplacement d'une thréonine par une isoleucine en position 86 (Thr-86-Ile), d'une façon similaire à la mutation Ser-83-Leu décrite chez *Escherichia coli* (*E. coli*) (70). Cela conduit à

une résistance de haut niveau à la ciprofloxacine et à l'acide nalidixique qui peut être maintenue de façon très stable en l'absence de pression de sélection aux antibiotiques. Il semblerait, par ailleurs, qu'elle induise un changement de la physiologie bactérienne rendant la souche mutée plus compétitive dans un environnement dépourvu d'antibiotiques (71). Une réversion de la mutation Thr-86-Ile pourrait conduire à une perte de cet avantage physiologique (72). D'autres mutations uniques moins fréquentes ont été rapportées dans la littérature ainsi que des souches présentant deux mutations conférant des CMI plus élevées aux antibiotiques testés (73). Le rôle de mutations de *gyrB* a été étudié mais n'a pas encore été démontré chez *Campylobacter*. Une mutation de *parC* (sous-unité A de la topoisomérase IV) a été décrite par Gibreel *et al.* (74) mais il semblerait que les *Campylobacter* ne possèdent pas ce gène (75).

Des pompes d'efflux, transportant l'antibiotique en dehors de la cellule, seraient également impliquées dans les résistances aux quinolones. La pompe d'efflux CmeABC serait plus particulièrement concernée. En effet, des expériences avec insertions de mutations au sein de 10 gènes codant pour des probables pompes d'efflux, ont permis des diminutions parfois importantes des CMI voire rendu sensible des souches initialement résistantes (73). De plus, des mutations dans son régulateur transcriptionnel CmeR conduisent à une résistance plus forte à la ciprofloxacine, corrélée à une surexpression de CmeABC (76). Cette pompe est aussi impliquée dans l'efflux d'autres molécules et classes d'antibiotiques comme les macrolides et tétracyclines.

Ces deux mécanismes (mutation et efflux) peuvent coexister au sein d'une même souche, agir en synergie et conférer des résistances d'autant plus importantes que les mutations sont nombreuses et que l'expression des pompes est forte (77,78). D'autres mécanismes de résistance aux quinolones moins courants et de fait moins fréquemment décrits dans la littérature existent. À titre d'exemple, des plasmides véhiculant des résistances de bas niveau aux quinolones ont été décrits chez des entérobactéries (45) mais n'ont pas été retrouvés, à l'heure actuelle, chez *Campylobacter* (79).

2.3.2 Résistances aux tétracyclines

Les résistances aux tétracyclines ont suivi la même tendance que celles aux quinolones et ont particulièrement augmentée ces dernières décennies. Une grande disparité géographique des profils de sensibilité est observée. Ce sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre, actifs à la fois sur les bactéries Gram positif et négatif, présentant une bonne diffusion tissulaire et utilisés pour de nombreuses applications à la fois vétérinaire et médicale. Ils ciblent la petite sous-unité 30S du ribosome bactérien à proximité du site A et empêchent la

reconnaissance de l' aminoacyl-ARNt par l'ARN messager (ARNm) bloquant ainsi la synthèse protéique (80). La résistance à ces antibiotiques peut être induite par divers mécanismes : efflux, protection du site de liaison par des protéines cytoplasmiques spécifiques, inactivation enzymatique ou modification de l'ARNr 16S au niveau du site de liaison.

Parmi eux, la protection du site de liaison à la tétracycline par Tet(O) est le plus répandu et induit une résistance de haut niveau aux tétracyclines. Tet(O) entre en compétition avec l'antibiotique pour la liaison et, en se liant, induit le relargage de la tétracycline déjà liée au ribosome et une modification conformationnelle du site de traduction défavorisant la liaison de l'antibiotique au profit de l' aminoacyl-ARNt (80,81). Le gène *tet(O)* peut être chromosomique ou plasmidique et la proportion de ces deux types de localisation est très variable d'une espèce à l'autre et d'une étude à l'autre (82,83). Les plasmides véhiculant ce gène présentent des tailles variables (en moyenne 30 à 40 kb) et peuvent porter d'autres gènes de résistance aux antibiotiques notamment aux aminoglycosides. Il est probable qu'ils proviennent, à l'origine, de cocci Gram positif de type *Enterococcus* par acquisition de matériel génétique dans des conditions naturelles comme le suggèrent les homologies de séquence observées dans la littérature (84). Le gène *tet(O)* chromosomique mis en évidence dans des souches de *C. jejuni* et *C. coli* sans plasmide provient très probablement de recombinaisons génétiques entre plasmide et chromosome bactérien ou de l'intégration du plasmide dans l'ADN génomique (82). Par ailleurs, il n'est pas exclu que d'autres éléments génétiques mobiles comme les transposons soient impliqués dans l'acquisition et la dissémination de ces gènes de résistance comme en atteste la présence de l'élément IS607* (présentant 55% d'homologie au niveau de la séquence d'acide aminés avec l'*orfB* du transposon IS607 décrit chez *H. pylori* (85)) dans un plasmide mis en évidence par Gibreel *et al* (84).

Une étude récente montre l'importance relative de la protéine d'efflux Tet(A), mise en évidence dans 18% de souches de *C. jejuni* et *C. coli* (n=83) isolées de carcasses de poulet en Iran, pouvant être véhiculée par des plasmides et diffuser horizontalement au sein des populations bactériennes (86,87).

2.3.3 Résistances aux β -lactamines

Les β -lactamines constituent la classe d'antibiotique la plus utilisée dans le monde, représentant plus de 50% du marché total mondial des antibiotiques. L'émergence de résistances a beaucoup compromis l'efficacité clinique de ces médicaments malgré les efforts pour développer de nouvelles générations de β -lactamines. Les mécanismes de résistance

acquis les plus fréquents inclus la production de β -lactamases, l'expression de nouvelles protéines de liaison aux pénicillines (PLPs), la mutation des porines et la production de pompes d'efflux.

La production de β -lactamases de type OXA-61 est associée à la résistance aux pénicillines A chez *Campylobacter* (88). Elle est portée par le chromosome bactérien et confère une résistance à l'ampicilline et à l'amoxicilline mais reste sensible aux inhibiteurs de β -lactamases comme l'acide clavulanique. La présence du gène *bla*_{OXA-61} ne suffit pas à elle seule pour expliquer la résistance. En effet, environ 50% des souche sensibles à l'ampicilline (Amp^S) et sans activité β -lactamase détectable possèdent ce gène. Une mutation nucléotidique unique (inversion G→T) dans son promoteur est nécessaire à l'expression de son activité (89).

2.3.4 Résistances aux macrolides et apparentés

La prévalence des résistances aux macrolides chez *Campylobacter* est relativement faible, toutes espèces confondues, en comparaison aux trois classes d'antibiotiques précédentes, ce qui en fait une option thérapeutique de première intention dans les infections digestives. *C. coli* est l'espèce la plus touchée par ces résistances et les souches en question proviennent majoritairement des élevages de porcs (90). Les macrolides agissent sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien par fixation sur un site de l'ARNr 23S et de protéines ribosomales causant le relargage du peptidyl-ARNt et le blocage de la traduction au sein du ribosome. Plusieurs mécanismes de résistance ont été décrits dans la littérature : modification de l'antibiotique, modification de la cible de l'antibiotique et efflux de la molécule de la cellule bactérienne. Seuls ces deux derniers ont été décrits chez *Campylobacter*.

La modification de la cible ribosomale est le plus commun des mécanismes. Il est principalement médié par des mutations ponctuelles de l'ARNr 23S ou dans les gènes *rplD* et *rplV* codant pour les protéines ribosomales L4 et L22. Le plus souvent, les 3 copies du gène de l'ARNr 23S sont mutées mais des mosaïques génétiques de souches sauvages et mutées ont été décrites (76). La mutation la plus fréquente est le remplacement d'une adénine par une guanine en position 2075 (A2075G). Concernant les protéines L4 et L22, les mutations détectées n'ont pas encore été bien caractérisées et des investigations supplémentaires concernant leurs implications dans la résistance aux macrolides sont nécessaires (91). Il faut noter que l'incidence de ces mutations est faible et qu'elles induiraient une modification des capacités d'adaptation des souches plutôt défavorable (92,93). Cependant, des subcultures successives de souches résistantes à l'érythromycine sur milieux non sélectifs montrent une remarquable stabilité (94).

La méthylation enzymatique de la cible ribosomale par une ARN méthylase codée par *erm(B)*, bien connue chez d'autres genres bactériens, est mieux caractérisée depuis peu chez *Campylobacter*. Elle confère une résistance de haut niveau aux macrolides et peut être transmise de manière horizontale entre *Campylobacter* thermophiles (95). Par ailleurs, dans cette étude, le gène est porté par un plasmide dans 43% des souches (n=25/58) mais l'environnement génétique n'y a pas été étudié. Au niveau chromosomique, *erm(B)* était, dans 59% des cas, situé sur un îlot génomique de multirésistance transférable par transformation naturelle. La résistance à l'érythromycine est quasi systématiquement croisée avec la clarithromycine ainsi que la clindamycine (lincosamide).

De la même manière que pour les quinolones, la pompe d'efflux CmeABC joue un rôle important dans les résistances acquises aux macrolides. L'inactivation de la pompe par un inhibiteur de pompe d'efflux spécifique a restauré la sensibilité de plusieurs souches de *Campylobacter* présentant une résistance de bas niveau. L'inactivation de *cmeB* en a fait de même et a permis une diminution importante des CMI de souches présentant aussi des mutations dans l'ARNr 23S (96). Ces deux mécanismes peuvent donc agir en synergie et conférer ainsi des résistances de haut niveau aux macrolides. L'érythromycine et la télithromycine (kétolide) semblent être de bons substrats de la pompe d'efflux à la différence de l'azithromycine dont les CMI varient peu ou pas en cas d'inactivation de celle-ci.

2.3.5 Résistances aux aminoglycosides

Les aminoglycosides constituent une classe d'antibiotique à large spectre dont l'utilisation est particulièrement intéressante voire indispensable dans le traitement de nombreuses infections et en prophylaxie dans certaines situations cliniques. L'incidence des résistances aux aminoglycosides chez *Campylobacter* est faible mais représente un phénomène émergent, en particulier dans les pays asiatiques. Les souches résistantes isolées en Europe sont sporadiques et rares. Il en est de même en Amérique du Nord.

2.3.5.1 Mécanisme d'action des aminoglycosides

L'internalisation de l'antibiotique dans la cellule bactérienne est une étape importante pour exercer son activité biologique. Celle-ci met en jeu plusieurs étapes impliquant différents composants pour permettre une bonne accumulation de la molécule dans la cellule. La première étape consiste en une liaison de l'aminoglycoside polycationique aux composants anioniques de la surface cellulaire (LPS, phospholipides...) augmentant la perméabilité de la membrane externe. La deuxième étape, permettant la pénétration totale de l'antibiotique,

utilise l'énergie de la force proton motrice de la chaîne respiratoire des bactéries aérobies et est liée à la différence de potentiel existant de part et d'autre de la membrane cytoplasmique. Ceci explique pourquoi les bactéries anaérobies présentent une résistance intrinsèque aux aminoglycosides et les bactéries anaérobies facultatives comme les entérocoques, une résistance de bas niveau.

L'aminoglycoside va agir par liaison à l'ARNr 16S de la petite sous-unité 30S du ribosome bactérien au niveau du site A (site de liaison de l'ARNt) induisant un changement de conformation du site permettant la fixation d'ARNt incorrects et provoquant des erreurs de traduction de l'ARNm. La faible quantité d'antibiotique pénétrant au début dans la cellule va altérer la synthèse des protéines, notamment celles constituant la membrane cellulaire, dégradant son intégrité et va permettre une pénétration plus importante de l'antibiotique accélérant les dommages jusqu'à la mort cellulaire (effet bactéricide). Il a, de plus, été montré que les aminoglycosides inhibaient l'assemblage de la sous-unité 30S, qui pourrait être un effet secondaire des erreurs de traduction, et avaient la capacité d'induire des cassures dans l'ARN (97).

La spectinomycine, un aminocyclitol proche des aminoglycosides, agit par inhibition de la translocation du peptidyl-ARNt du site A au site P induisant un arrêt de la synthèse protéique et n'a, en conséquence, qu'un effet bactériostatique.

2.3.5.2 Mécanismes de résistance aux aminoglycosides

Plusieurs mécanismes de résistance ont été mis en évidence et peuvent coexister simultanément dans la bactérie : diminution de la pénétration de l'antibiotique par diminution de la perméabilité ou du transport actif transmembranaire, exportation de l'aminoglycoside de la cellule par des pompes d'efflux (résistance de bas niveau), modification de la cible par mutation de l'ARNr 16S ou des protéines ribosomales ou encore par méthylation de l'ARNr 16S, et enfin, modification enzymatique de l'antibiotique, mécanisme d'importance majeure dans les isolats cliniques et sujet principal de ce travail.

2.3.5.3 Modification enzymatique des aminoglycosides

Les connaissances sur les enzymes modificatrices d'aminoglycosides se sont largement développées et sont de mieux en mieux caractérisées notamment grâce au progrès de la biologie moléculaire et de la génétique et aussi à cause de l'augmentation significative de ce type de résistance de par le monde toute espèce bactérienne confondue. Elles catalysent

la modification de groupements hydroxyles -OH et amines primaires -NH₂ du noyau 2-deoxystreptamine (ou streptidine pour la streptomycine) ou des sucres associés. Ceci a pour conséquence une diminution ou une perte de l'activité de l'aminoglycoside par altération de sa fixation au ribosome bactérien.

Il existe trois familles d'enzymes inactivatrices d'aminoglycosides regroupées en fonction de la réaction qu'elles catalysent respectivement :

- les aminoglycoside N-acétyltransférases (AACs) : acétylation d'un groupement aminé ;
- les aminoglycoside O-phosphotransférases (APHs) : phosphorylation d'un groupement hydroxyle ;
- les aminoglycoside O-nucléotidyltransférases (ANTs) : nucléotidylation d'un groupement hydroxyle.

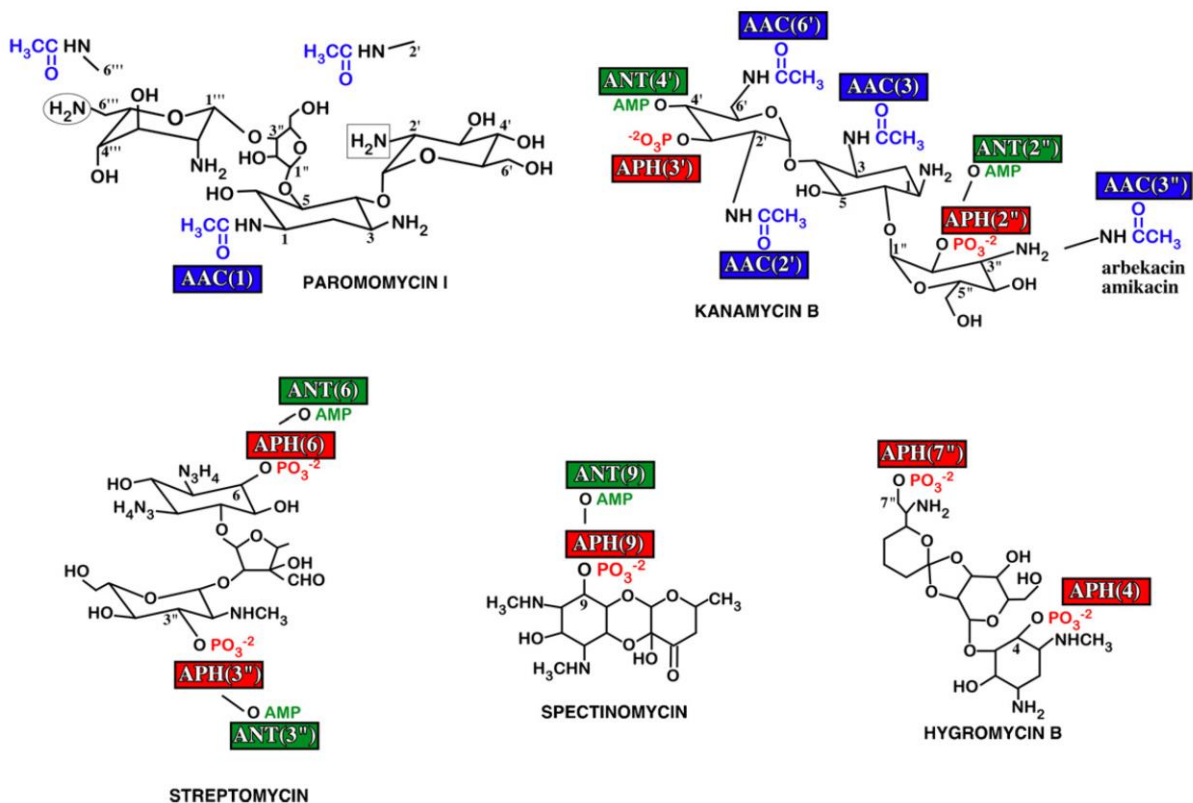


Figure 12 : Exemples de modifications enzymatiques pouvant être induites sur certains aminoglycosides (97).

Chacune des familles d'enzymes est divisée en classe en fonction du site qu'elle modifie, indiqué entre parenthèse. Elles sont, de plus, divisées en type d'enzyme selon un phénotype de résistance unique, indiqué par un chiffre romain. Enfin, les enzymes de même classe et type mais qui sont codées par différents gènes sont désignées par une lettre en minuscule. À

titre d'exemple, les AAC(3)-Ia et AAC(3)-Ib sont des acétyltransférases modifiant l'aminoglycoside en position 3 et produisant le même phénotype (résistance à la gentamicine, sisomicine et fortimicine) mais codées par deux gènes différents. Il existe une autre nomenclature qui ne sera pas détaillée ici et qui est utilisée par certains auteurs. Le fait qu'il n'y ait pas de consensus sur une nomenclature unique peut conduire à des confusions et à la description d'enzymes déjà décrites dans la littérature mais sous une appellation différente.

La combinaison de mutations génétiques, pouvant conduire à de nouveaux variants enzymatiques aux profils de résistance différents, avec la capacité de mobilisation des gènes au niveau moléculaire (intégrons, cassettes, transposons, éléments conjugatifs intégrés) ou au niveau cellulaire par conjugaison, transformation naturelle ou transduction via des plasmides permet à ces résistances d'atteindre un très grand nombre de genres et espèces bactériennes ainsi que de développer une variabilité impressionnante de phénotypes de résistance. Le niveau de résistance diffère significativement d'une espèce à l'autre, d'une souche à l'autre et dépend de nombreux facteurs comme la quantité d'enzyme produite, son efficacité catalytique et le type d'aminoglycoside qu'elle modifie. Par ailleurs, la présence d'une enzyme modificatrice ne se traduit pas forcément par la résistance à l'aminoglycoside modifié qui peut rester sensible à l'antibiogramme selon les critères de catégorisation définis pour l'espèce testée. Son effet peut alors être évalué plus précisément par la détermination des CMI des antibiotiques modifiés qui peuvent être augmentées. Une diminution de l'effet bactéricide de l'aminoglycoside pourrait constituer une autre conséquence non négligeable et redoutée lors d'une utilisation clinique. En outre, une enzyme modificatrice peut parfois neutraliser l'action d'un aminoglycoside par une liaison affine sans pour autant modifier sa structure. On parle de piégeage de l'antibiotique dans un complexe enzyme-substrat inactif mais ce mécanisme confère des résistances moins fortes en termes de CMI.

Compte tenu de ces nombreux facteurs de variabilité enzymatique, de la coexistence fréquente d'enzymes différentes au sein d'une même souche et de leur association possible avec d'autres mécanisme de résistance, la déduction du génotype de résistance à partir du phénotype observé peut être très difficile.

2.3.5.3.1 Aminoglycoside acétyltransférases

Elles font partie de la superfamille GNAT (GCN5-related N-acetyltransferase) comprenant plusieurs milliers de protéines qui catalysent l'acétylation de groupements $-NH_2$ de la molécule acceptrice en utilisant l'acétyl coenzyme A comme substrat donneur. Il y a quatre classes d'enzymes : AAC(1), AAC(3), AAC(2') et AAC(6') modifiant respectivement

l'aminoglycoside aux positions 1 et 3 du cycle 2-deoxystreptamine et aux positions 2' et 6' du cycle 6-aminohexose.

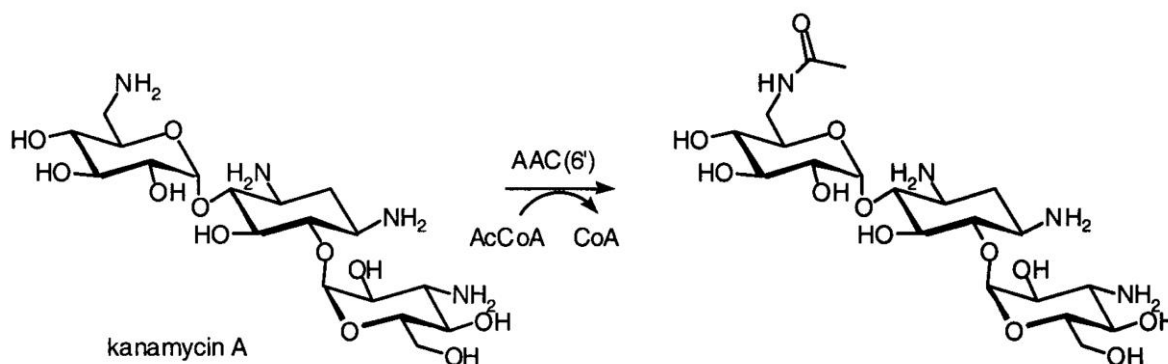


Figure 13 : Exemple de l'acétylation de la kanamycine A par une AAC(6') (98).

Les AAC(3)s constituent le 2^{ème} groupe le plus important d'acétyltransférases derrière les AAC(6') et sont largement répandues chez de nombreux genres bactériens. Leurs substrats préférentiels sont représentés par la gentamicine, la sisomicine et la tobramicine.

Les AACs décrites chez *Campylobacter* dans la littérature sont relativement rares : une seule AAC(1), des AAC(3)s et des AAC(6')s. Ces dernières sont retrouvées associées à des APH(2'')s et constituent des enzymes bifonctionnelles héritées d'entérocoques ou de staphylocoques (99,100).

2.3.5.3.2 Aminoglycoside phosphotransférases

Elles confèrent habituellement un haut niveau de résistance. Elles utilisent l'ATP (adénosine-5'-triphosphate) comme second substrat pour exercer leur activité sur toutes les classes d'aminoglycosides. Sept classes d'enzymes ont été identifiées.

La plus importante comprend sept types d'enzymes différentes modifiant le groupement -OH en 3'. Ces APH(3')s sont disséminées à la fois chez des bactéries Gram négatives et positives et possèdent des spectres de résistance plus ou moins comparables à quelques exceptions près. La plus retrouvée chez *Campylobacter* est l'APH(3')-IIIa dont le profil de résistance est le suivant : kanamycine, néomycine, amikacine, lividomycine, paromomycine, livostamycine, ribostamycine, butirosine et isépanicine. Elle est bien connue et son gène *aph(3')-IIIa* encore appelé *aphA-3* est fréquemment associé à deux autres gènes de résistance aux aminoglycosides dans le cluster de résistance *aadE-sat4-aphA-3* décrit à de multiples reprises dans la littérature, et découvert à l'origine chez *Enterococcus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* (101–103). Une autre APH(3') souvent détectée chez les *Campylobacter*, l'APH(3')-VIIa codée par le gène *aph(3')-VIIa* aussi appelé *aphA-7*, confère

un profil de résistance kanamycine et néomycine (104,105). Cependant, les confusions engendrées par les différentes nomenclatures ont conduit Zhao *et al.* (106) à classer celle-ci par erreur en tant que APH(3')-Ic, codée par le gène *apha7* (ou *aph(3')-Ic*) et non le gène *aphA-7*.

Une correction récente de la nomenclature des APH(2'')s a permis de mieux caractériser leurs profils de résistance et tient compte désormais de leurs substrats préférentiels (107). Cette famille est constituée d'enzymes très diverses génétiquement et dont l'homologie des séquences d'acides aminés peut être faible (26-30%). Par ailleurs, il a été constaté que les APH(2'')s d'isolats humains de *Campylobacter* étaient plus variables génétiquement que ceux isolés de viande de poulet sur 151 souches testées aux Etats-Unis (108). Elles constituent les enzymes de choix pour conférer la résistance à la gentamicine chez *Campylobacter*. Toutes les APH(2'')s sont des enzymes monofonctionnelles sauf l'APH(2'')-Ia qui est exprimée au niveau du domaine C-terminal de l'enzyme bi-fonctionnelle AAC(6')-Ie/APH(2'')-Ia et retrouvée essentiellement chez des bactéries Gram positives et depuis peu chez *Campylobacter* (108,109). Bien qu'il soit largement admis que les APHs utilisent l'ATP comme donneur de groupement phosphate, les données de cette étude montrent que ce n'est pas forcément le cas avec les APH(2'')s et que seule l'APH(2'')-Ib (nouvellement APH(2'')-IIa) l'utilise préférentiellement.

Tableau 2 : Nouvelle nomenclature des APH(2'')s (107)

Profil de résistance	Substrat NTP	Ancienne nomenclature		Nouvelle nomenclature	
		Enzyme	Gène	Enzyme	Gène
Kan, Gen, Tob, Net, Dbk, Sis, Ise, Amk, Neo, Par, Liv, Rib, But	GTP	APH(2'')-Ia	<i>aph(2'')-Ia</i>	APH(2'')-Ia	<i>aph(2'')-Ia</i>
Kan, Gen, Tob, Net, Dbk, Sis, Ise, Amk, Arb	ATP	APH(2'')-Ib	<i>aph(2'')-Ib</i>	APH(2'')-IIa	<i>aph(2'')-IIa</i>
Kan, Gen, Tob, Net, Dbk, Sis	GTP	APH(2'')-Ic	<i>aph(2'')-Ic</i>	APH(2'')-IIIa	<i>aph(2'')-IIIa</i>
Kan, Gen, Tob, Net, Dbk, Sis, Ise, Amk, Arb	ATP/GTP	APH(2'')-Id	<i>aph(2'')-Id</i>	APH(2'')-IVa	<i>aph(2'')-IVa</i>

Kan, kanamycine ; Gen, gentamicine ; Tob, tobramycine ; Net, nétilmicine ; Dbk, dibékacine ; Sis, sisomicine ; Ise, isépamicine ; Amk, amikacine ; Néo, néomycine B ; Par, paromomycine ; Liv, lividomycine A ; Rib, ribostamycine ; But, butirosine ; Arb, arbékacine

D'autres APH(2'')s n'ont pas été incluses dans cette analyse ou ont été découvertes a posteriori et ne suivent donc pas cette nouvelle nomenclature. C'est le cas de l'APH(2'')-Ie, très proche génétiquement de l'APH(2'')-IVa (93,7% de similitude au niveau de la séquence d'acides aminés) et détectées chez des entérocoques, qui présenterait un profil de résistance similaire.

L'APH(2'')-If, nouvellement caractérisée par Toth *et al.* (110) chez *C. jejuni*, est strictement identique à l'APH(2'') du plasmide pCG8245 du *C. jejuni* de Nirdnoy *et al.* (111) (gène *aacA/aphD*). Elle est proche de l'APH(2'')-Ia (79% d'homologie) et il n'y a aucune différence significative au niveau de leur spectre de résistance. Deux autres APH(2'')s monofonctionnelles, génétiquement proche de l'APH(2'')-If (>90% d'homologie), ont été décrites postérieurement par Zhao *et al.* (108) et nommées APH(2'')-If₁ (99,7% d'homologie) et APH(2'')-If₃ (91% d'homologie), bien que leurs profils de résistance respectifs aux aminoglycosides n'aient pas été étudiés. Dans cette même étude, l'APH(2'')-If a été retrouvée chez *Campylobacter* dans une enzyme bifonctionnelle associée à une AAC(6')-Ie mais, n'étant toutefois pas strictement homologue (92,7%), elle a été appelée APH(2'')-If₂. Parmi les 23 isolats positifs par PCR pour le gène *aph(2'')-If*, 11 souches avaient un gène présentant 88,2% d'homologie avec ce dernier. De ce fait, il a été considéré comme codant pour une nouvelle APH(2'') dénommée APH(2'')-Ih. Les APH(2'')-IIa et APH(2'')-IIIa ont été aussi, pour la première fois, retrouvées chez *Campylobacter*.

Une autre APH(2''), l'APH(2'')-Ig, découverte en 2013 dans un plasmide de *C. coli* isolé de viande de poulet vendue au détail aux Etats-Unis, confère des résistances au moins à la gentamicine et à la kanamycine (autres aminoglycosides non testés) (112). Elle présente 52% d'homologie au niveau de la séquence d'acides aminés avec l'APH(2'')-IIa, retrouvée initialement chez des bactéries comme *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* ou encore *E. coli*. Parmi 78 *Campylobacter* résistants à la gentamicine de Zhao *et al.* (106), 46% possèdent cette APH(2'')-Ig (n=36).

Concernant des souches américaines de *Campylobacter*, les gènes *aph(2'')-If* et *aph(2'')-Ig* semblent être les plus fréquemment partagés à la fois par les souches de *Campylobacter* humaines et animales (106,108). L'espèce *C. coli* possède essentiellement ces deux types d'APH(2'')s tandis que *C. jejuni* exprime surtout les *aph(2'')-Ih* et *aph(2'')-If*. Il n'y a pas d'exemple, dans les bases de données, d'APH(2'')-Ih décrites chez *C. coli*.

Deux autres classes d'enzyme, d'importance mineure car sans implication en clinique humaine, représentées par l'APH(7'')-Ia (gène *hyg* isolé de *Streptomyces hygroscopicus*) (113) et les APH(4)-Ia (gène *hph* isolé chez *E. coli*) (114), confèrent une résistance à l'hygromycine, utilisée comme anti-helminthique en médecine vétérinaire.

2.3.5.3.3 Aminoglycoside nucléotidyltransférases

L'inactivation des aminoglycosides par les ANTs est catalysée par la transfert d'un groupe AMP (adénosine monophosphate) à partir d'ATP sur un groupement hydroxyle de

l'antibiotique. Il existe cinq classes d'ANTs permettant une adénylylation en position 6, 9, 4', 2'' ou 3''. Les deux classes d'ANTs décrites dans la littérature chez *Campylobacter* sont les ANT(6)s et ANT(9)s.

Les nombreux gènes codant pour les ANT(6)s ont été appelés, selon les publications, *ant(6)-Ia*, *ant(6)*, *ant6* ou encore *aadE* pour n'en citer que certains. Ces enzymes appartiennent toutes à la même sous-classe étant donné qu'elles agissent sur le même substrat, la streptomycine, dont elles confèrent la résistance. Le gène *aadE* peut être situé sur des transposons, plasmides et/ou le chromosome bactérien mais est souvent retrouvé dans le cluster de résistance *aadE-sat4-aphA-3* (97). Une ANT(6)-Ib a, plus récemment, été identifiée chez *C. fetus* subsp. *fetus* dans un îlot de pathogénicité transférable (115).

Deux ANT(9)s ont été décrites chez des cocci Gram positif, l'ANT(9)-Ia et l'ANT(9)-Ib conférant toutes deux une résistance à la spectinomycine (97). Un gène *aad9* a été retrouvé dans le plasmide pCG8245 chez *C. jejuni* et il a été clairement démontré sa fonctionnalité (111). D'autres études ont montré l'existence d'*aad9* chez *Campylobacter* à la fois sur des éléments chromosomiques et plasmidiques (106,109).

Tableau 3 : Synthèse des principales enzymes modificatrices d'aminoglycosides d'intérêt chez *Campylobacter* et leurs substrats principaux

Enzymes	Substrats principaux
AAC(3)	Gentamicine ± sisomicine, tobramycine
APH(3')	Kanamycine, néomycine
APH(2'')	Gentamicine, kanamycine, tobramycine
ANT(6)	Streptomycine
ANT(9)	Spectinomycine

2.4 Évolution des résistances chez l'Homme

2.4.1 En France

C. coli présente, le plus souvent, les plus forts taux de résistances pour la plupart des classes d'antibiotiques testées, en comparaison à *C. jejuni* et *C. fetus*. Les chiffres présentés ci-dessous proviennent des données du réseau de surveillance du CNR des *Campylobacter* et *Helicobacter* (Hôpital Pellegrin – CHU de Bordeaux) et représentent l'évolution des résistances de *Campylobacter* sur les 30 dernières années (1986-2015) sur des souches isolées de prélèvements d'origine humaine. Il faut cependant noter que la surveillance était basée sur un réseau de laboratoires hospitaliers et universitaires jusqu'en 2002 avant de s'ouvrir au recueil des souches de laboratoires d'analyse de biologie médicale de ville volontaires.

Concernant les β -lactamines, l'amoxicilline ou l'ampicilline ont été essentiellement testées. Le pourcentage de résistance était relativement important dans les années 1980 et 1990 oscillant autour des 50% toutes espèces confondues avec une résistance légèrement supérieure pour *C. coli* par rapport à *C. jejuni* (Figure 14) mais beaucoup plus faible pour *C. fetus* (19% en moyenne sur la période 1986-2002, données non présentées) (116). Par la suite, la résistance aux aminopénicillines a globalement nettement diminué au début des années 2000 pour se stabiliser depuis et représenter, en 2015, 34,9% toutes espèces confondues (Tableau 4). Les taux de résistance sont plus élevés chez *C. jejuni* que chez *C. coli* (37,8 et 33,2% respectivement en 2015) tandis que *C. fetus* reste très sensible avec aucune souche résistante sur la même année. A noter que l'association amoxicilline + acide clavulanique reste très efficace chez *Campylobacter* avec 0,6% de résistance en 2015 et confirme le grand intérêt de ce traitement dans les infections invasives. Les rares souches confirmées résistantes étaient, en fait, majoritairement non pas des *Campylobacter* mais des souches de *Arcobacter butzleri*, genre bactérien souvent multirésistant. Il est donc important de contrôler l'antibiogramme face à ce genre de résistance ainsi que l'identification de la bactérie.

Les résistances aux tétracyclines ont, elles, considérablement augmentées sur la même période passant de 12,6% de résistance globale sur la période 1986-2002 à 51,3% en 2015 avec 48,3% pour *C. jejuni* et 71,6% pour *C. coli*. Elles s'expliquent notamment par une forte utilisation de ces antibiotiques en médecine vétérinaire.

Les taux de résistance aux quinolones ont suivi la même tendance pour atteindre, en 2015, 56,9% de résistance toutes espèces confondues avec, là encore, un taux plus élevé chez *C. coli* (65,8%). *C. fetus* n'est pas épargné par cette augmentation (38,5% d'isolats résistants en 2014 d'après les données du CNRCH) et ceci peut poser problème en traitement probabiliste d'infections invasives en cas d'intolérance aux pénicillines A.

La sensibilité aux macrolides n'a pas évolué sur cette période et reste faible en comparaison aux classes d'antibiotiques précédemment évoquées (Figure 14). Pour les deux espèces principales, le taux de résistance était significativement plus élevé pour *C. coli* que pour *C. jejuni* avec 9,4% et 0,4% de résistance, respectivement, en 2015. Les macrolides restent donc le traitement de choix en première intention pour traiter une infection digestive.

Les résistances à la gentamicine sont quasi nulles en France (0,9% toutes espèces confondues) en 2015 et restent stables dans le temps mais d'autres aminoglycosides non testés en routine comme la kanamycine présentent des résistances plus importantes compte tenu du nombre plus élevé d'enzymes inactivatrices de cet antibiotique et de leur diffusion au sein des populations bactériennes. Il faut, tout de même, surveiller de près ces résistances considérées

comme émergentes, notamment à l'étranger, et dont on commence à mieux connaître les mécanismes, leurs origines et leurs transmissions chez *Campylobacter*.

Tableau 4 : Résistance aux antibiotiques de *Campylobacter* isolés chez l'homme selon l'espèce, France, 2015, Données CNRCH (27).

	Total		<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
	N testés	% résistance	N testés	% résistance	N testés	% résistance
Erythromycine*	5 721	2,50%	4 629	0,40%	869	9,40%
Tétracycline*	5 534	51,30%	4 472	48,30%	844	71,60%
Ciprofloxacine*	5 722	56,90%	4 627	56,20%	870	65,80%
Gentamycine**	5 120	0,90%	4 115	0,80%	788	1,10%
Ampicilline**	5 729	34,90%	4 407	37,80%	837	33,20%
Amoxiclav**	5 727	0,60%	4 626	0,50%	861	0,60%

* Selon les critères de l'EUCAST

** Selon les critères CASFM

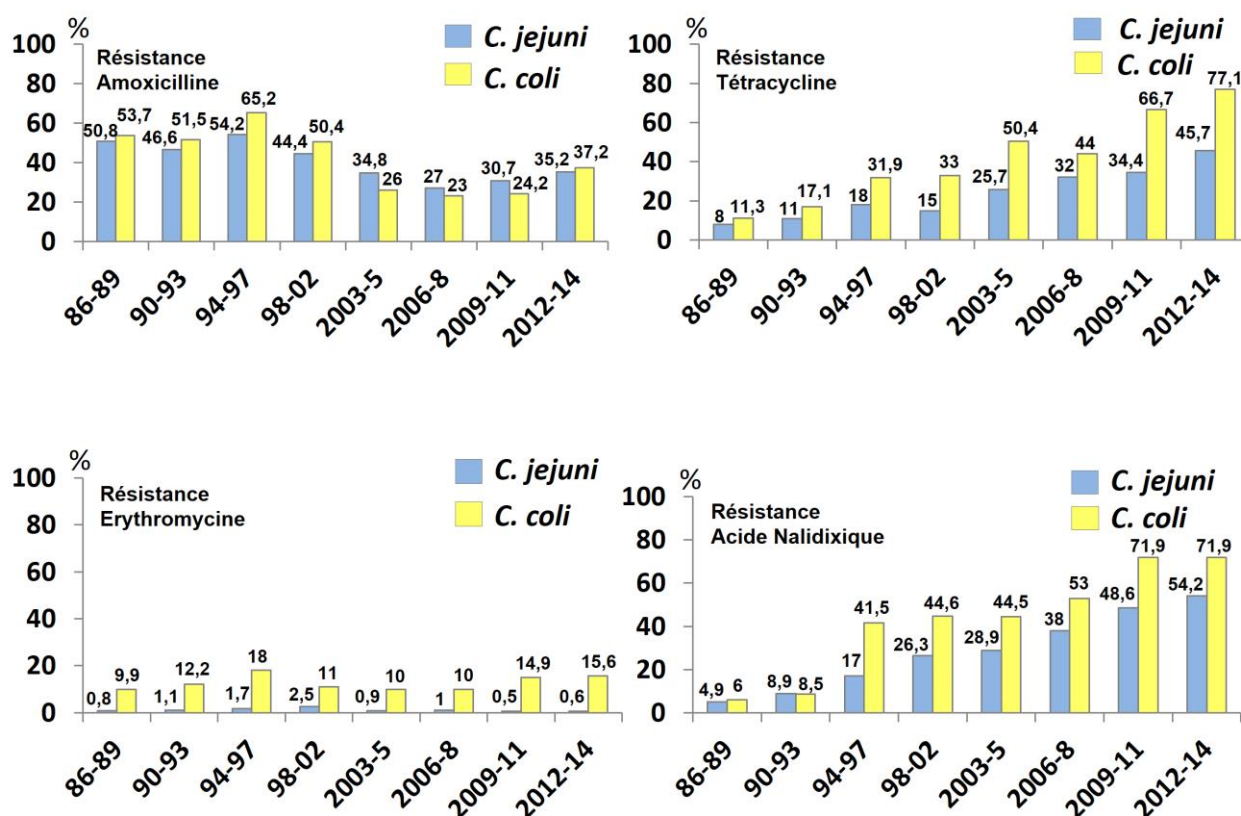


Figure 14 : Evolution des résistances aux aminopénicillines, tétracyclines, macrolides et quinolones pour *C. jejuni* et *C. coli* entre 1986 et 2014 en France (Réseau de laboratoires correspondants du CNRCH).

Pour les cyclines, la doxycycline a été testée jusqu'en 2012 puis la tétracycline. Pour les quinolones, la ciprofloxacine n'est testée seule que depuis 2013. Source : CNRCH, publication sous presse pour l'Encyclopédie Médico Chirurgicale.

2.4.2 Dans le reste du monde

L'épidémiologie des résistances est très variable d'une région du monde à l'autre, d'un pays à l'autre voire même au sein d'un même pays. Les études portent, très souvent, sur l'évolution des résistances chez des isolats de *Campylobacter* retrouvés dans le secteur agroalimentaire (élevages, abattoirs d'animaux destinés à la consommation humaine) et soumis plus intensivement à la pression de sélection des antibiotiques. On trouve, tout de même, des études et des rapports sur l'évolution des résistances des isolats « humains » de *Campylobacter*.

2.4.2.1 En Europe

La European Food Safety Authority (EFSA) and le European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) ont récemment publié un rapport sur les résistances aux antibiotiques d'isolats humains, animaux et alimentaires de *Campylobacter* et *Salmonella* en 2013 (117). Pour les *Campylobacter* isolés chez l'Homme, les données proviennent de 14 États membres ainsi que de l'Islande et de la Norvège. Une tendance globale s'observe pour certains antibiotiques bien que des disparités existent entre les différents pays sachant que l'interprétation doit tenir compte de la variabilité importante du nombre d'isolats testés selon l'origine.

Pour *C. jejuni*, plus de la moitié des souches (54,6%) étaient résistantes à la ciprofloxacine en 2013 avec des taux relativement comparables sur l'ensemble des pays inclus (Tableau 5). Les proportions les plus faibles sont observées en Norvège (20,8%) et au Danemark (23,1%) et les plus fortes en Lituanie (88,2%) et en Espagne (91,5%). Les écarts sont plus hétérogènes pour les tétracyclines, avec des extrêmes allant de 14,2% de résistance seulement en Norvège, à 80,1% en Espagne, en passant par 49,7% d'isolats résistants en France (Rapport CNRCH 2013). Les résistances à l'érythromycine et à la gentamicine sont basses en Europe et comparables entre pays.

Tableau 5 : Résistances aux antibiotiques de *C. jejuni* isolés chez l'Homme par pays en 2013 (117)

Country	Ciprofloxacin		Co-amoxiclav		Erythromycin		Gentamicin		Tetracyclines	
	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res
Austria ^(a)	303	63.0	–	–	303	0	303	0	303	21.5
Denmark ^(a)	65	23.1	–	–	65	1.5	65	0.0	65	20.0
Estonia	293	57.7	154	8.4	270	0.7	153	0.7	248	21.4
France	3,816	49.7	3,524	0.9	3,822	0.5	3,822	0.5	–	–
Italy	235	67.2	–	–	233	7.3	117	4.3	208	57.2
Lithuania	178	88.2	–	–	222	0.5	–	–	–	–
Luxembourg ^(a)	566	59.4	566	5.7	566	1.2	566	0.4	566	43.8
Malta	138	69.6	–	–	138	18.1	–	–	–	–
Netherlands	2,811	56.9	–	–	2,392	1.9	–	–	1,414	36.4
Romania ^(a)	44	77.3	–	–	44	9.1	44	0	44	56.8
Slovakia	992	39.9	116	4.3	1,205	0.7	7	NA	1,184	19.8
Slovenia	877	64.1	688	14.0	877	0.6	877	0.5	877	27.7
Spain	281	91.5	–	–	281	3.9	281	2.1	281	80.1
United Kingdom	1,110	46.9	11	NA	851	2.5	6	NA	32	34.4
Total (MSs 14)	11,709	54.6	5,059	3.5	11,269	1.5	6,241	0.6	5,222	33.5
Iceland	6	NA	–	–	6	NA	–	–	1	NA
Norway ^(a)	106	20.8	–	–	106	0	106	0.9	106	14.2

N: number of isolates tested; % Res: percentage of resistant isolates (either non-wild type by ECOFFs or clinically non-susceptible by combining resistant and intermediate categories); –: no data reported; NA: not applicable (if fewer than 20 isolates were tested resistance was not calculated); MSs: Member States.

(a): Provided measured values. Data interpreted by ECDC.

Pour *C. coli*, la comparaison des résistances est moins évidente, compte tenu du faible nombre de souches analysées pour certains pays (Tableau 6). On constate, tout de même, des résistances plus élevées que pour *C. jejuni*, comme décrit précédemment, pour la ciprofloxacine, les tétracyclines mais aussi l'érythromycine (13,4% pour cette dernière *versus* 1,5% pour *C. jejuni*). A noter, une probable erreur dans le tableau 6 concernant le taux de résistance à la gentamicine en France qui n'est pas de 14,3% (comme pour l'érythromycine) mais bien de 0,6% en 2013 ; les données de l'ECDC pour la France provenant du CNRCH.

Tableau 6 : Résistances aux antibiotiques de *C. coli* isolés chez l'Homme par pays en 2013 (117)

Country	Ciprofloxacin		Co-amoxiclav		Erythromycin		Gentamicin		Tetracyclines	
	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res
Austria ^(a)	34	61.8	–	–	34	0.0	34	0.0	34	35.3
Estonia	9	NA	8	NA	9	NA	8	NA	8	NA
France	678	71.7	632	0.9	679	14.3	679	14.3	–	–
Italy	24	79.2	–	–	22	31.8	15	NA	24	75.0
Lithuania	12	NA	–	–	15	NA	–	–	–	–
Luxembourg ^(a)	90	68.9	90	32.2	90	13.3	90	1.1	90	74.4
Malta	44	68.2	–	–	44	25.0	–	–	–	–
Netherlands	236	59.7	–	–	184	14.1	–	–	133	55.6
Romania ^(a)	5	NA	–	–	5	NA	5	NA	5	NA
Slovakia	25	36.0	15	NA	40	2.5	1	NA	40	40.0
Slovenia	73	58.9	42	16.7	73	1.4	73	0.0	73	41.1
Spain	53	94.3	–	–	53	34.0	53	15.1	53	96.2
United Kingdom	132	47.0	2	NA	102	7.8	2	NA	8	NA
Total (MSs 13)	1,415	66.6	789	6.2	1,350	13.4	960	11.1	468	58.1
Norway ^(a)	3	NA	–	–	3	NA	3	NA	3	NA

N: number of isolates tested; % Res: percentage of resistant isolates (either non-wild type by ECOFFs or clinically non-susceptible by combining resistant and intermediate categories); –: no data reported; NA: not applicable (if fewer than 20 isolates were tested resistance was not calculated); MSs: MSs.

(a): Provided measured values. Data interpreted by ECDC.

2.4.2.2 Aux États-Unis

Aux États-Unis, le NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria), un système de surveillance en santé publique, veille sur les agents pathogènes entériques et leurs résistances aux antibiotiques via le Center for Disease Control and prevention (CDC) pour les isolats humains, la Food and Drug Administration (FDA) pour les isolats de viande au détail et le United States Department of Agriculture (USDA) pour les isolats d'élevage d'animaux.

Les β -lactamines ne sont pas testées. Les résistances aux tétracyclines sont globalement stables mais élevées chez *C. jejuni* depuis 1997, évoluant autour de 45% alors qu'elles sont passées de 31,3% en 2005 à 51,4% en 2013 chez *C. coli* (nombre d'isolats peu significatifs avant 2005) (Figure 15) (118). En comparant avec les taux français, les résistances actuelles sont comparables pour *C. jejuni* mais plus élevées en France pour *C. coli*. De plus, on note une augmentation beaucoup plus franche des résistances à ces antibiotiques en France en comparant les mêmes périodes. Le constat est le même pour l'évolution des résistances aux quinolones chez les deux espèces aux États-Unis avec des résistances, là encore, plus élevées en France : 49,7% versus 22,3% et 71,5% versus 34,5%, respectivement pour *C. jejuni* et *C. coli* en France et aux États-Unis (données pour la ciprofloxacine en 2013). En ce qui concerne les macrolides, les pourcentages de résistance sont faibles et comparables à ceux observés en France, bien que l'on note une augmentation de ces résistances chez *C. coli* en 2012 et 2013. La résistance à la gentamicine est presque aussi anecdotique qu'en France malgré un sursaut du nombre d'isolats résistants chez *C. coli* en 2010-2011 et un taux

de résistance légèrement plus élevé chez cette espèce aux États-Unis (2,1% versus 0,6% en 2013).

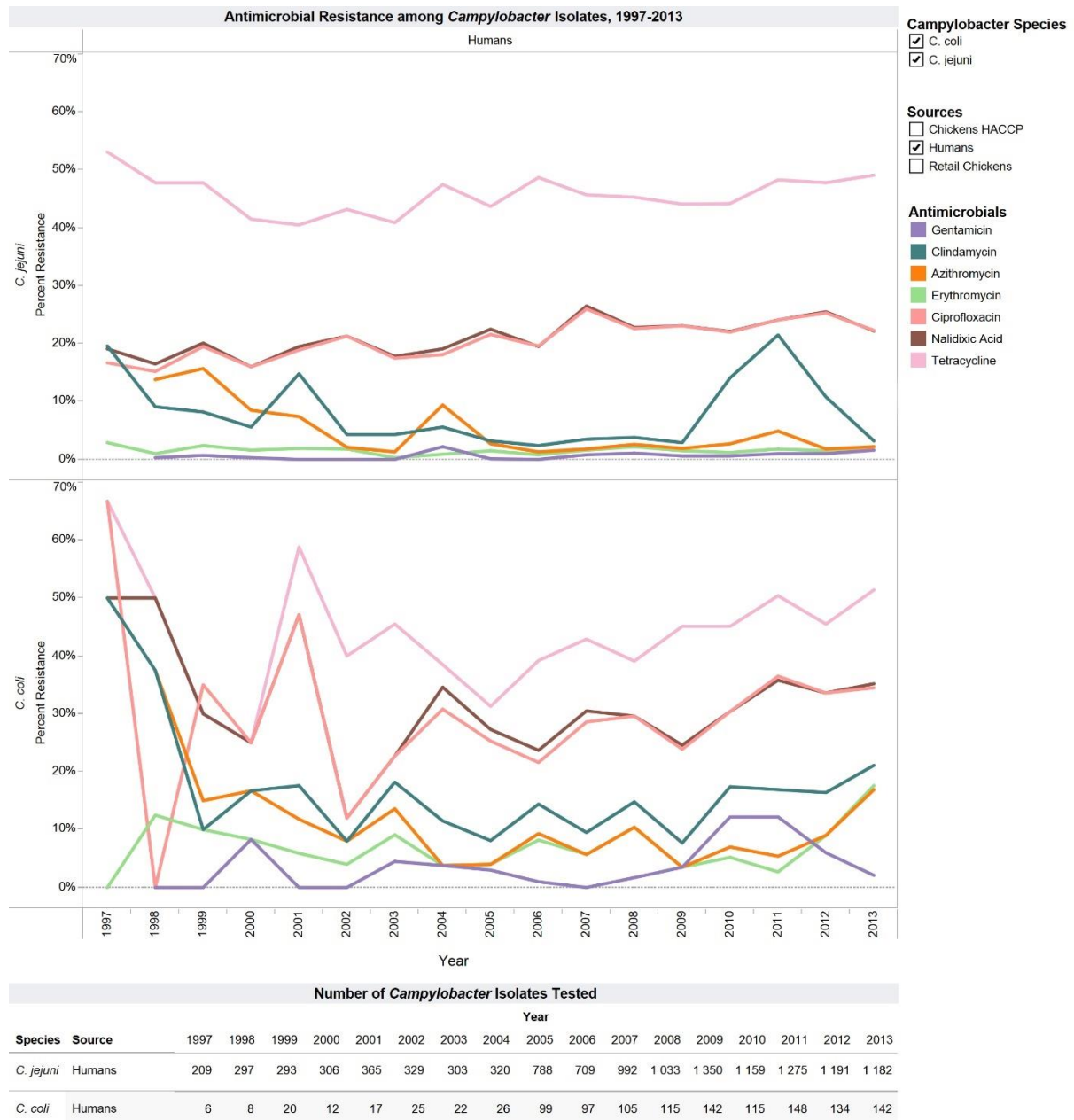


Figure 15 : Evolution des résistances aux antibiotiques chez *C. coli* et *C. jejuni* isolés chez l'Homme aux États-Unis entre 1997 et 2013.

NARMS Interactive Data Displays, FDA in consultation with the CDC and the USDA.

2.4.2.2 En Asie

Une étude sur 203 souches de *C. jejuni* isolés en Chine chez l'Homme entre 1994 et 2010 révèle une augmentation continue et significative des résistances aux quinolones, tétracyclines et phénicolés durant cette période (91). En effet, les niveaux de résistance à la

ciprofloxacine et à la tétracycline étaient, respectivement, de 50% et 77,8% entre 1994 et 1996 pour atteindre 93,1% et 100%, respectivement en 2009-2010. Les résistances à la gentamicine et à l'érythromycine sont, elles, restées stables, comme observées en Europe et aux États-Unis.

Des résultats similaires ont été décrits en Inde avec des résistances aux quinolones allant de 86 à 100% chez *C. jejuni* mais, au contraire, des résistances beaucoup moins prononcées aux tétracyclines (17-33%) (119,120). Des résistances à l'érythromycine et aux aminoglycosides semblent émerger, selon une étude rapportant 22,2% et 13,9%, respectivement, de souches résistantes parmi 36 isolats de *C. jejuni* chez des enfants présentant une diarrhée aiguë (119).

2.5 *Campylobacter* et résistance dans les filières animales

2.5.1 En France

La surveillance de *Campylobacter* et de ses résistances aux antibiotiques dans les filières avicole, porcine et bovine, principaux réservoirs de cette zoonose chez l'Homme, a été mise en place à partir 1999 après constatation de l'augmentation préoccupante des résistances aux fluoroquinolones en médecine humaine. Elle est organisée par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) et sa réalisation est sous la responsabilité des laboratoires nationaux de référence (LNR) de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) (Laboratoire de Lyon et de Plouflagran-Plouzané).

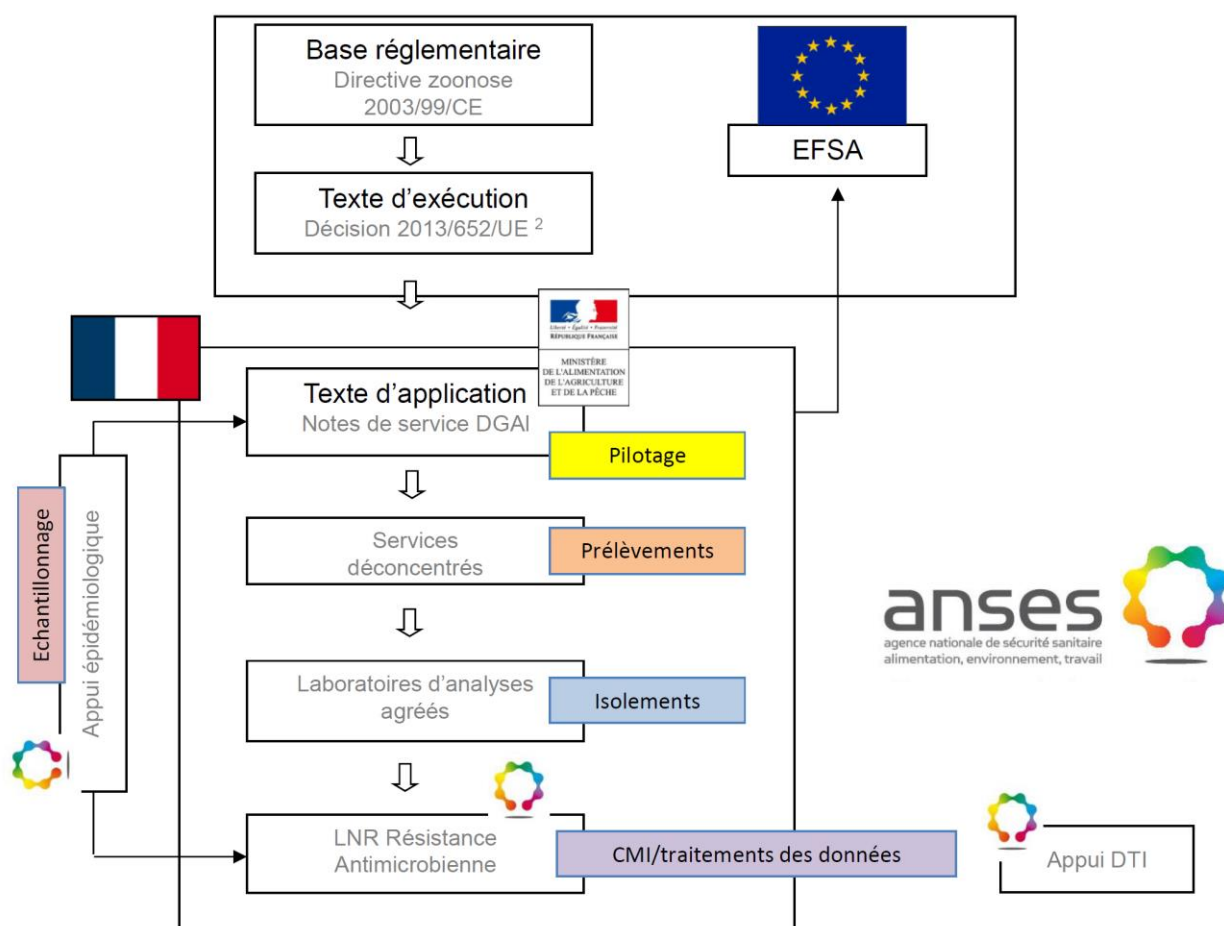


Figure 16 : Organisation de la surveillance de *Campylobacter* dans les filières animales en France. LNR, Anses.

Chez les volailles (poulets de chair et dindes d'engraissement), plus de 60% des prélèvements étaient positifs à *Campylobacter* en 2014 dont 38 à 48% étaient des *C. jejuni*. Parmi ces derniers, la résistance à la tétracycline était majoritaire avec plus de 70% des isolats concernés. En seconde position, arrivaient les quinolones avec 50 à 60% de souches résistantes. Les résistances à la gentamicine et à l'érythromycine étaient très faibles. Pour les *C. coli*, les résistances aux fluoroquinolones sont plus élevées (environ 70%) et les résistances à l'érythromycine sont plus fréquentes mais restent généralement inférieures à 20%. Pour ce qui est du produit fini, une étude conduite en 2009, sur de la viande de poulet achetée dans différentes zones géographiques, a retrouvé 76% de produits contaminés par *Campylobacter*, majoritairement par *C. jejuni* (64,7%) (121). Ces derniers présentaient exclusivement des résistances à la tétracycline et à la ciprofloxacine avec respectivement 53,6% et 32,9% de souches résistantes à ces deux antibiotiques.

Dans la filière porcine, *Campylobacter* est très fréquent avec 71% de porteurs au niveau du tube digestif surtout par *C. coli*. En 2013, 47,9% des souches de *C. coli* étaient résistantes à la ciprofloxacine contre moins de 15% au début des années 2000, 28,7% étaient

résistantes à l'érythromycine et plus de 70% l'étaient à la streptomycine (117,122). Les résistances aux tétracyclines chez cette espèce sont très élevées et atteignaient 90,4% en 2013.

Chez les bovins, le portage peut être important surtout chez les veaux (36% en 2012) lié essentiellement à *C. jejuni* (27%). Les résistances aux tétracyclines et aux quinolones sont en augmentation (Figure 17).

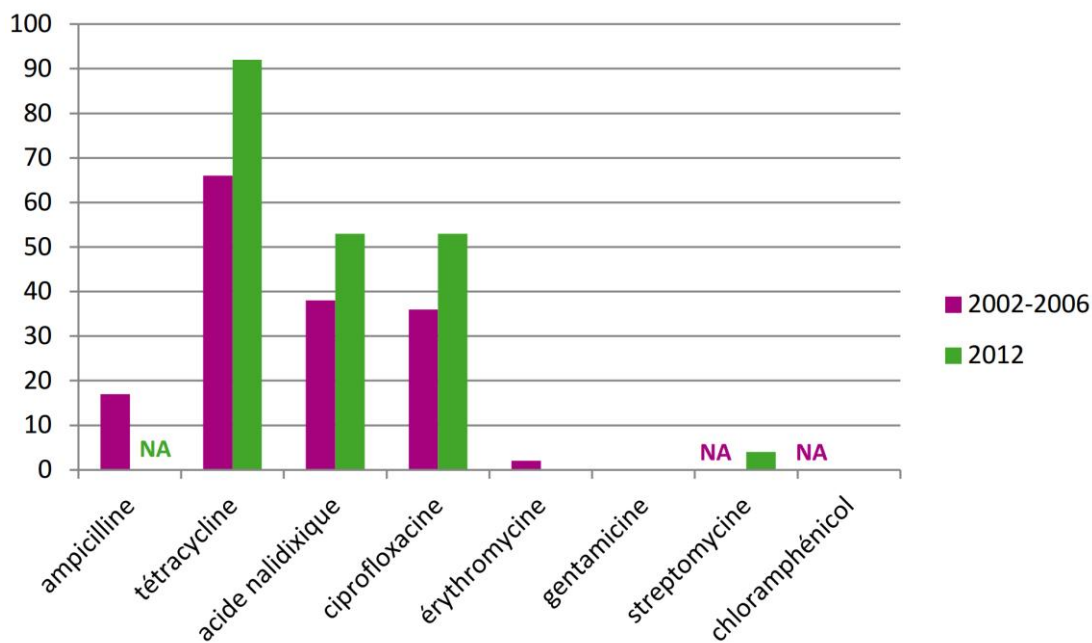


Figure 17 : Evolution des résistances aux antibiotiques de *C. jejuni* isolé chez les bovins en France sur la période 2002-2006 et en 2012. LNR de Lyon, Anses.

2.5.2 Aux États-Unis

La prévalence de *Campylobacter* est du même ordre de grandeur par rapport à la France concernant les bovins mais est bien plus faible aux États-Unis chez les porcs et les poulets (31% et 22% respectivement sur des échantillons de selles en 2013). Par ailleurs, concernant la viande de poulet au détail, la prévalence est de 38% et a baissé de 27% depuis 2003 (123).

Les résistances aux macrolides ont peu évolué chez les isolats d'animaux d'élevage contrairement aux isolats humains, représentant 14% des *C. coli* du poulet et plus de 30% des *Campylobacter* du porc en 2013.

Les résistances aux fluoroquinolones ont atteint un niveau historiquement bas chez *C. jejuni* isolé de viande de poulet (11% en 2013) et ont diminué chez *C. coli* (20%). Cette situation épidémiologique des résistances aux quinolones tranche avec celle retrouvée en France pour laquelle les résistances augmentent franchement. Malgré l'interdiction de l'utilisation des fluoroquinolones dans les filières animales depuis 2005, les résistances chez

Campylobacter semblent, tout de même, persister comme on peut le voir chez les poulets HACCP (soumis à une maîtrise stricte de l'hygiène) (Figure 18). Ceci paraît compatible avec l'hypothèse d'une amélioration de la physiologie bactérienne conférée par la mutation de *gyrA* évoquée précédemment, ou tout au plus, d'un maintien de celle-ci associée aux souches sauvages. De ce fait, une diminution de la prévalence de ces résistances semble difficile si, dans l'environnement étudié, le nombre de souches résistantes était initialement conséquent.

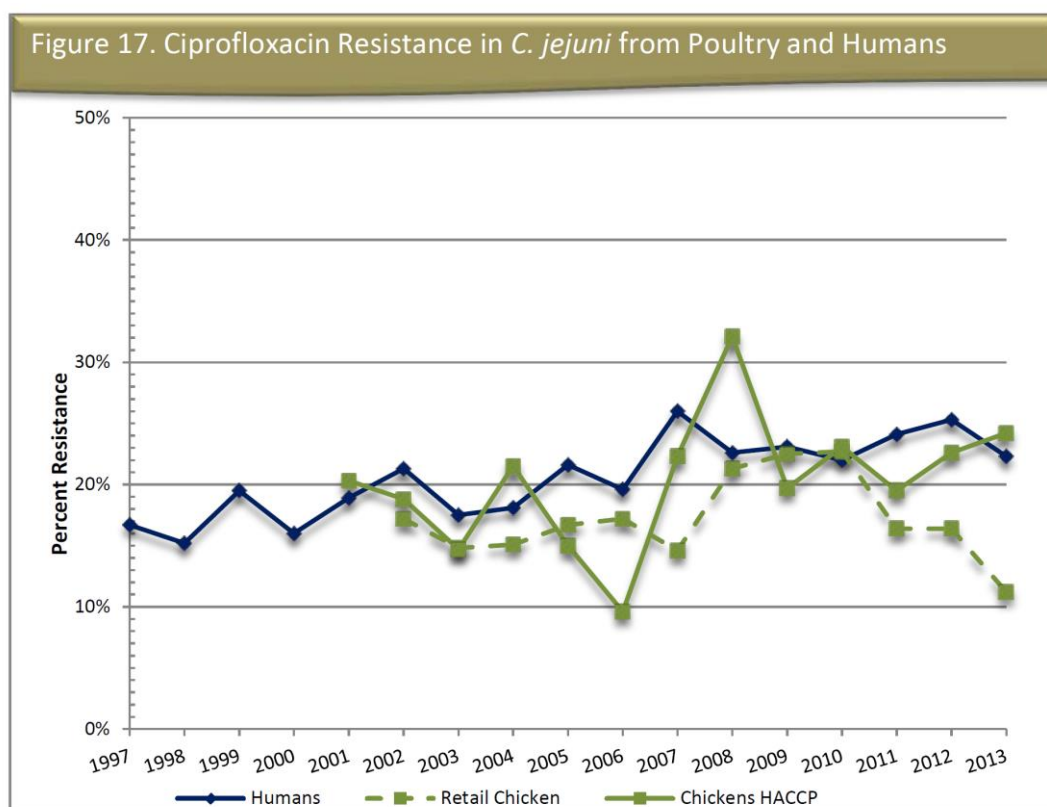


Figure 18 : Évolution de la résistance à la ciprofloxacine chez *C. jejuni* aux Etats-Unis chez l'Homme, le poulet au détail et le poulet HACCP (123).

Les résistances à la gentamicine ont globalement augmenté depuis 2007 avec un pic non expliqué en 2011, à la fois dans les isolats humains et alimentaires mais restent, en 2013, inférieures à 6% toutes sources confondues.

2.5.3 En Asie

En Chine, il n'existe pas encore de système de surveillance permettant d'évaluer la prévalence et les résistances aux antibiotiques de *Campylobacter* dans l'industrie agro-alimentaire. De ce fait, seules des études isolées peuvent apporter des éléments de réponse.

Une investigation, conduite en 2012, a « traqué » *Campylobacter* sur des prélèvements réalisés le long d'une chaîne de production de viande de poulet, des fèces de l'animal jusqu'à

la viande au détail et en passant par les carcasses des abattoirs (5). On observe une prévalence décroissante des isolats le long de la chaîne de production mais restant tout de même élevée dans le produit fini (31,3%) avec une plus grande proportion de *C. coli* que de *C. jejuni*, ce qui n'est pas en accord avec la plupart des études épidémiologiques sur le sujet dans le reste du monde. Les taux de résistance aux antibiotiques de ces 259 isolats sont extrêmement alarmants. En effet, tous ces *Campylobacter* sont résistants à au moins un antibiotique et la quasi-totalité le sont aux tétracyclines (*C. jejuni* : 100% ; *C. coli* : 98,7%) et à la ciprofloxacine (*C. jejuni* : 99,1% ; *C. coli* : 100%). Par ailleurs, une grande majorité des *C. coli* (> 90%) sont aussi résistants aux macrolides et à la gentamicine. Les souches de *C. jejuni* présentent, en comparaison, des résistances à l'érythromycine et à la gentamicine plus faibles (16% et 53,8% respectivement) mais très supérieurs à ceux observés dans d'autres pays.

Ces observations confirment des résultats similaires obtenus par Chen *et al.* sur des *Campylobacter* isolés de fèces de poulet dans une autre province chinoise et issus de cinq abattoirs différents (124). Ils sont inquiétants et reflètent probablement le mésusage des antibiotiques qui sont directement disponibles pour les producteurs dans les fermes chinoises, sans concertations avec des vétérinaires ni de limitations légales de leur utilisation. La très forte prévalence de *C. coli* multirésistants dans la première étude pourrait être le fruit d'une sélection et d'un remplacement progressif de *C. jejuni*, moins adapté pour résister aux traitements antibiotiques massifs usités. Cette tendance est confirmée par l'étude de Wang *et al.* rapportant une prévalence de 75,6% de *C. jejuni* chez le poulet en Chine en 2008 et tombée depuis à 29,9% en 2014, la prévalence de *C. coli* passant de 19,3% à 70,1% sur la même période (125). Les campylobactérioses chez l'Homme étant le plus fréquemment contractées par contamination alimentaire, elles pourraient devenir un véritable problème de santé publique avec un risque d'échec et d'impasse thérapeutique dans des infections sévères.

2.6 Résistances multiples aux antibiotiques (Multi-Drug Resistance ou MDR)

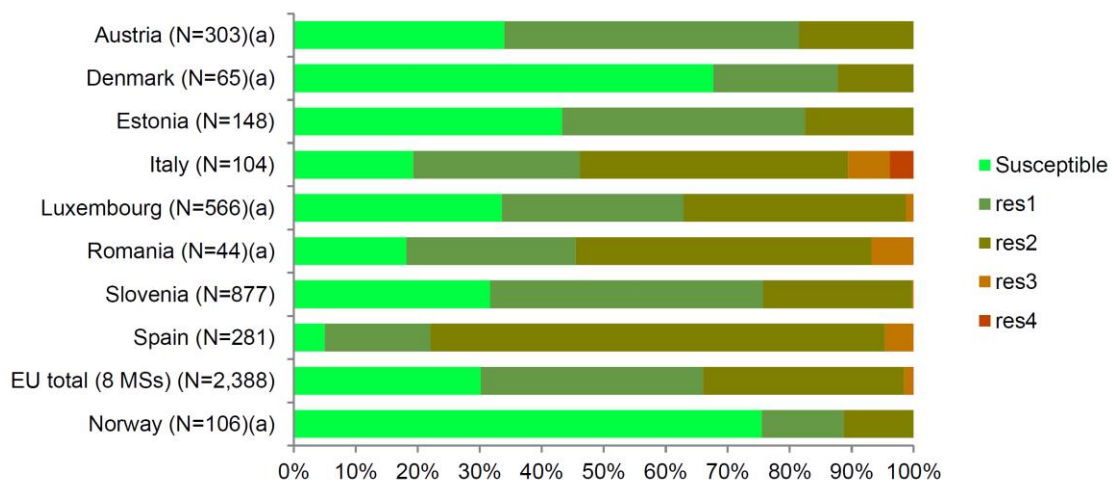
Les *Campylobacter* MDR correspondent à des souches présentant des résistances acquises à trois ou plus de trois antibiotiques appartenant à différentes classes. Régulièrement, ces résistances sont codées par des gènes associés dans des îlots génomiques ou sur des plasmides pouvant transiter en bloc entre isolats bactériens.

2.6.1 Chez l'Homme

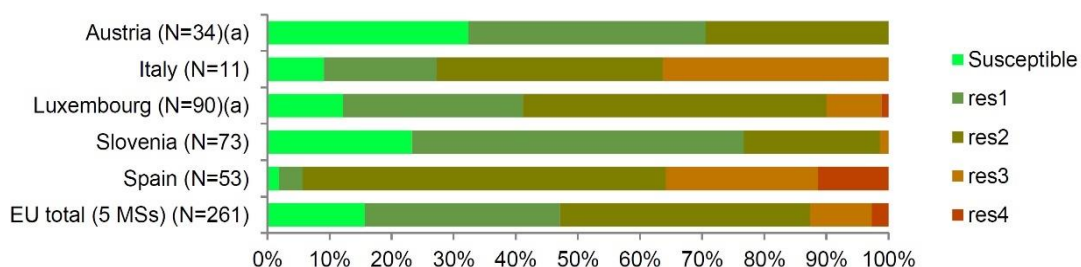
Les données sur les souches MDR se focalisent sur les antibiotiques considérés comme ayant un intérêt clinique majeur chez l'Homme.

En Europe, les quatre classes d'antibiotiques d'intérêt pour traiter les campylobactérioses sont représentées par les fluoroquinolones, les macrolides, les tétracyclines et les aminoglycosides. Des disparités non négligeables sont parfois observées au sein des différents pays comparés en 2013 (117). À titre d'exemple, l'Espagne ne compte que 5% d'isolats de *C. jejuni* sensibles à la totalité des classes alors que la Norvège en compte 75,5%. Les *C. jejuni* MDR sont en faible proportion dans les neuf États comparés, avec quatre pays n'en présentant aucun et un taux maximum en Italie (10,6%). En comparaison, *C. coli* présentent plus d'isolats résistants à au moins une classe d'antibiotique (84,3%) avec une proportion de MDR plus importante mais le nombre d'États inclus dans la comparaison est plus faible (Figure 19).

(a)



(b)



N: number of isolates tested for susceptibility against the four antimicrobial classes included in the multi-drug resistance analysis; MSs: Member State; Susceptible: total number of isolates susceptible to all four antimicrobial classes included in the multi-drug resistance analysis; res1–res4: total number of isolates resistant to one to four antimicrobial classes.

(a): Provided measured values. Data interpreted by ECDC.

**Figure 19 : Distribution des *C. jejuni* (a) et des *C. coli* (b) isolés chez l'Homme, sensibles et résistants de une à quatre classes d'antibiotiques, 2013 (117).
res3 et res4 : *Campylobacter* MDR**

Aux États-Unis, les *C. jejuni* MDR sont restés stables entre 2005 et 2013 avec des proportions oscillant entre 1,3% et 7,5% pour les souches résistantes à au moins trois classes d'antibiotiques. Les *C. coli* MDR ont, eux, augmentés considérablement sur la même période, d'au moins un facteur trois (118).

En Asie, les données sont moins nombreuses chez l'Homme. Une étude réalisée sur 36 *C. jejuni* isolés de selles diarrhéiques chez des enfants hospitalisés en Inde a détecté une proportion importante de souches MDR (41,7%) (119). En Chine, les souches de *C. jejuni* MDR semblent avoir aussi augmentées de manière significative en 1994 et 2010 (91).

2.6.2 Dans les filières animales

La prévalence des *Campylobacter* MDR n'est pas très différente dans les isolats issus des filières animales que ce soit en Europe ou aux États-Unis. Par contre, en Asie, leur taux est très important mais difficilement comparable à celui rencontré chez les humains, les études s'y rapportant étant peu nombreuses. Ceci s'explique essentiellement par le fait que les animaux de fermes reçoivent de nombreux antibiotiques que ce soit pour un usage vétérinaire ou pour améliorer la croissance et que leur utilisation n'est pas contrôlée dans certains pays et contribue à l'émergence de bactéries multirésistantes.

Matériels et méthodes

1. Les souches de *Campylobacter*

Les 12 souches séquencées de *C. coli* et *C. jejuni* de ce travail ont été sélectionnées pour leur résistance à la gentamicine *in vitro* et ont été isolées essentiellement à partir de prélèvements d'origine humaine. La plupart des souches proviennent du Centre National de Référence des *Campylobacter* et *Helicobacter* (CNRCH - Bordeaux) à l'exception de 4 souches de *C. coli* multirésistantes provenant du Portugal (Laboratoire National de Référence des infections gastro-intestinales – Lisbonne). Parmi les souches du CNRCH, 4 souches proviennent de laboratoires d'analyse de biologie médicale de ville et 2 souches ont été isolées dans des laboratoires hospitaliers.

Parmi elles, la souche de *C. jejuni* 2012/2640 contenant un plasmide de multirésistance aux antibiotiques a été utilisée pour des essais de conjugaison bactérienne en tant que donatrice.

L'identification des souches a été contrôlée, à la fois, par méthode phénotypique, par biologie moléculaire (57) et par spectrométrie de masse. Toutes les souches ont été conservées à -80°C en bouillon brucella supplémenté avec du glycérol peptoné.

2. Conditions de culture

Les *Campylobacter* ont été cultivés sur milieux commerciaux trypticase soja avec 5% de sang de cheval (TSH) ou sur milieux maison Mueller-Hinton avec 5% de sang de cheval défibriné (MH-F) additionnée de β -nicotinamide adénine dinucléotide (β -NAD) à une concentration de 20 mg/L. Des antibiotiques étaient ajoutés si nécessaire aux MH-F lors des expériences de conjugaisons bactériennes (voir paragraphe 8.2). Les milieux ont été incubés en conditions microaérophiles (6% O₂, 10% CO₂, 85% N₂, 5% H₂) à 37°C.

3. Étude de la sensibilité aux antibiotiques

3.1 Méthode par diffusion en milieu gélosé

La méthode EUCAST par disque sur milieu MH-F a été utilisée, avec un inoculum à 0,5 standard McFarland (McF) (126) puis incubation en atmosphère microaérophile à 37°C pendant 24 à 48h. Les diamètres d'inhibition ont été mesurés manuellement pour

l'ampicilline, l'amoxicilline, la ciprofloxacine, l'érythromycine, la lincomycine, la tétracycline et/ou les aminoglycosides (kanamycine, tobramycine, gentamicine, spectinomycine, streptomycine).

3.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices par E-test®

En utilisant les mêmes conditions de culture que la méthode des disques, une bandelette E-test® contenant un gradient de concentration stable et calibré d'antibiotique est déposée sur la gélose MH-F. La lecture se fait au niveau de la plus petite concentration inhibant la pousse selon les recommandations du fournisseur.

4. Séquençage génome entier

Les ADN des 12 souches de *C. coli* et *C. jejuni* sélectionnées pour leur résistance à la gentamicine in vitro ont été séquencés. L'extraction de l'ADN génomique, à partir de culture bactérienne pure, a été réalisée à l'aide du QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen). L'ADN extrait a, ensuite, été quantifié sur Qubit® (ThermoFisher scientific).

La préparation de l'ADN pour le séquençage a été réalisée avec le Nextera® XT DNA Library Preparation Kit (Illumina). Le séquençage génome entier a été fait dans un système MiSeq (Illumina) en « paired-end » (2 x 150 pb ou 2 x 250 pb) puis l'analyse bio-informatique des résultats a permis l'assemblage *de novo* des données FASTQ et FASTX via le programme Velvet (version 1.2.10) (European Bioinformatics Institute). Le processus d'assemblage a été optimisé en utilisant le script VelvetOptimiser (version 2.2.5) (Victorian Bioinformatics Consortium). Les contigs finaux ont été inspectés visuellement avec Tablet (version 1.14.04.10) et corrigés de manière appropriée pour éliminer les erreurs d'assemblage. La recherche de probables plasmides au sein des souches a été réalisée en étudiant les contigs de plus de 1000 pb avec une grande résolution dans la couverture génomique et la preuve de circularité, tandis que la présence de plasmides connus a été examinée par une cartographie de référence utilisant la version 2.1.0 de Bowtie2 (Johns Hopkins University) par comparaison avec des plasmides déjà décrits pour *Campylobacter* spp.

5. Identification des gènes de résistances et alignement

Le serveur RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) a été utilisé pour l'annotation du génome entier permettant d'identifier des gènes par reconnaissance de

variants fonctionnels (127,128). Après avoir fait une recherche bibliographique approfondie sur les gènes de résistance codant pour les principales familles d'antibiotiques chez *Campylobacter*, ils ont été recherchés dans le génome annoté puis comparés à une base de données de séquences connues (nucléotidiques et/ou protéiques) via le programme en ligne BLAST (Basic Local Alignment Search Tool[®], National Center for Biotechnology Information). Ce dernier permet, entre autres, de rechercher de manière rapide et automatisée des segments de séquences localement homologues à une séquence-test fournie par l'utilisateur et d'identifier des domaines génétiques spécifiques conservés. Il utilise, pour cela, une matrice de similarité pour calculer des scores d'alignement et utilise ce score pour donner une évaluation statistique de la pertinence de cet alignement (probabilité qu'il soit dû au hasard). En comparant deux séquences protéiques, le pourcentage d'identité est établi grâce aux acides aminés identiques et présents aux mêmes positions tandis que le pourcentage de similarité tient compte, en plus, des substitutions par des acides aminés aux mêmes propriétés physico-chimiques (ayant peu d'impact sur la fonction protéique).

Les séquences (nucléotidiques ou protéiques) codant pour des probables gènes de résistance similaires ont ensuite été alignées entre elles, au sein des génomes séquencés dans ce travail, et avec des gènes de résistances connus issus de la littérature pour évaluer leur degré d'homologie et leurs mutations éventuelles. Ceci a été rendu possible grâce à l'utilisation du programme en ligne MultAlin (multiple sequence alignment by Florence Corpet, Institut national de la recherche agronomique) (129) ainsi que via BLAST.

6. Analyses phylogénétiques

Des arbres phylogénétiques ont été créés de manière à visualiser les relations entre les différentes enzymes de certaines familles et situer les nouvelles enzymes de résistance identifiées. Pour cela, le logiciel MEGA 7 a été utilisé après alignement des séquences protéiques désirées via ClustalW. L'histoire évolutive a été construite en utilisant la méthode Neighbor-joining et avec la méthode matricielle de Dayhoff pour calculer les distances évolutives (analyse répétée 1000 fois).

7. Détection des *Campylobacter* par biologie moléculaire

7.1 Extraction rapide de l'ADN bactérien

Le protocole d'extraction de l'ADN bactérien a consisté en une lyse thermique simple sans purification de l'extrait. 10 à 20 µL de bouillon de conservation de chaque souche était mis en suspension dans 200 µL de tampon de lyse puis chauffé à 100°C et vortexé toutes les 5 min pendant 20 min. Les échantillons étaient ensuite centrifugés à 13000 rpm pendant 2 min. L'extrait a ensuite été utilisé immédiatement ou congelé à -20°C.

7.2 Détection de gènes spécifiques par PCR

Les gènes plasmidiques *virB4* et *incQ* (faisant partie d'un système de sécrétion de type IV), de la souche *C. jejuni* 2012/2640, ont été amplifiés par PCR à l'aide d'une Taq polymérase haute performance (GoTaq® G2, Promega) et d'amorces spécifiques sens (Forward – F) et anti-sens (Reverse – R) (Tableau 7). Leur présence a été recherchée sur 100 souches de *C. coli* et *C. jejuni*, sélectionnées pour leur sensibilité ou non aux tétracyclines, en proportion équivalente par espèce et par phénotype de résistance, pour déterminer leur prévalence dans ces populations. Ils ont, de plus, été recherchés sur les produits des conjugaisons bactériennes.

L'amplification du gène de résistance *tet(O)* a été réalisée sur une des souches sensibles à la tétracycline (*C. coli* 2014/2129).

Tableau 7 : Amorces utilisées et séquences nucléotidiques associées pour la mise en évidence des gènes *virB4*, *incQ* et *tet(O)*

Amorce	Taille	Séquence nucléotidique	Taille du produit de PCR
F- <i>virB4</i>	21 pb	AAATTGCTGGGGYGAYGCTGT	812 pb
R- <i>virB4</i>	22 pb	CATTTTCTARCCACTTCCAAGC	
F- <i>incQ</i>	22 pb	GCTCTTGGCATTTTAATTTTGC	208 pb
R- <i>incQ</i>	22 pb	CACCTCCTTGTAGTGTGATTTG	
F- <i>tetO</i>	19 pb	GGCGTTTTGTTTATGTGCG	559 pb
R- <i>tetO</i>	20 pb	ATGGACAACCCGACAGAAGC	

Y ou R : C ou T

7.3 Identification de *Campylobacter* par PCR en temps réel

Cette méthode permet une identification précise du genre et de l'espèce de la bactérie par amplification du gène *gyrA* spécifique de *Campylobacter* et dont la variabilité permet

d'identifier l'espèce (*C. coli*, *C. jejuni*, *C. fetus*). Le principe est détaillé dans le paragraphe 1.8.2.2 de l'analyse bibliographique de ce travail.

L'ADN des 100 souches de *C. coli* et *C. jejuni*, sélectionnées pour leur sensibilité ou non aux tétracyclines, a été extrait selon le protocole d'extraction rapide précédemment évoqué. Le mix PCR est réalisé à l'aide du kit LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (eau, MgCl₂, Mix FastStart 10x) ainsi que les sondes (Sensor et Anchor C/J) et amorces (F3-GyrA-cccj et R4-GyrA-cccj) désignées par le laboratoire (57) (Tableau 8).

Tableau 8 : Réactifs et volumes des différents réactifs constituant le mix pour la PCR en temps réel du gène *gyrA*

Réactifs	Volume* (µl) pour un échantillon
Eau	3,8
MgCl ₂ 25mM	0,58
F3-GyrA-cccj 10µM	0,49
R4-GyrA-cccj 10µM	0,49
Sensor C/J 10µM	0,12
Anchor C/J 10µM	0,12
Mix FastStart 10x	0,7
Mix	6,3
ADN	0,7
Volume final	7

*à multiplier par un facteur n pour n échantillons + un volume mort

Chaque échantillon (mix + ADN) est déposé dans un capillaire disposé dans le rotor du LightCycler™ 1.0 (Roche Diagnostics) dans lequel se déroulera le run de PCR selon un protocole prédéfini.

8. Conjugaisons bactériennes

8.1 Principe de la conjugaison et sélection des souches

La conjugaison est un mécanisme de transfert génétique horizontal utilisé par les bactéries afin de s'échanger des informations génétiques et d'assurer une certaine diversité au sein des populations bactériennes. C'est un phénomène naturel qui peut être reproduit dans des conditions de laboratoire. Le transfert d'un plasmide conjugatif d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice se fait en quatre étapes principales :

- Reconnaissance entre donatrice et réceptrice grâce à un pilus sexuel ;
- Transfert d'un des deux brins du plasmide ;

- Synthèse du brin complémentaire chez la réceptrice ;
- Recircularisation du plasmide chez la réceptrice.

L'efficacité ou fréquence du transfert s'exprime par le rapport « $\frac{\text{nombre de transconjugants}}{\text{nombre de donatrices}}$ ». Il

existe de nombreux facteurs intrinsèques l'influençant (caractéristiques du plasmide, de la donatrice, de la réceptrice, inhibition de fertilité, exclusion de surface, incompatibilité, restriction) ainsi que des facteurs exogènes comme l'environnement par exemple.

Pour les expériences de conjugaison *in vitro* réalisées dans ce travail, le plasmide était porteur de gènes codant pour des résistances aux antibiotiques. La souche donatrice et la souche réceptrice doivent donc avoir une résistance différente à deux antibiotiques distincts pour permettre la sélection des transconjugants. A titre d'exemple, la conjugaison d'une bactérie donatrice X présentant un plasmide contenant un gène de résistance à l'antibiotique « x » avec une bactérie Y présentant une résistance à l'antibiotique « y » pourra potentiellement donner, par conjugaison, des transconjugants Y, résistants aux antibiotiques « x » et « y ». Dans notre étude, la souche *C. jejuni* 2012/2640, portant le plasmide pCJ2640, constitue la souche donatrice. Ce plasmide contient des gènes codant pour des résistances probables aux aminoglycosides (kanamycine, tobramycine, gentamicine) et aux tétracyclines. Les souches réceptrices sélectionnées et utilisées ne présentaient pas ces résistances mais étaient, soit résistantes à l'ampicilline, soit à l'érythromycine. Les conjugaisons ont été réalisées selon la méthode sur filtre décrite par Taylor *et al.* (130) bien que légèrement modifiée.

8.2 Milieux de culture utilisés et contrôle

Les milieux suivant ont été réalisés :

- MH-F + kanamycine (50 µg/mL) pour la numération de la donatrice et contrôle de l'inhibition de la culture de la réceptrice ;
- MH-F + érythromycine (32 µg/mL) ou amoxicilline (16 µg/mL) pour contrôle de l'inhibition de la culture de la donatrice avec respectivement une réceptrice résistante à l'érythromycine ou à l'amoxicilline ;
- MH-F + kanamycine (50 µg/mL) + érythromycine (32 µg/mL) ou MH-F + kanamycine (50 µg/mL) + amoxicilline (16 µg/mL) pour la sélection des transconjugants avec respectivement une réceptrice résistante à l'érythromycine ou à l'amoxicilline et contrôle de l'inhibition de la culture des deux souches initiales.

8.3 Conjugaison sur filtre

Des pré-cultures des deux souches (donatrice et réceptrice) en bouillon brucella additionné de sérum de veau fœtal (10%) ont été réalisées et incubées pendant 18h à 37°C en atmosphère microaérobie et sous agitation. 1 mL de chaque culture a ensuite été mélangé dans un tube eppendorf puis centrifugé. Le surnageant était éliminé par retournement et le culot bactérien, repris dans le liquide restant, déposé sur filtre de 0,22 µm (MF-Millipore™, Merck), lui-même déposé sur gélose TSH. Le tout était laissé sécher sous atmosphère protégée puis incubé 18-24h à 37°C en microaérobiose. Le filtre a ensuite été récupéré dans 1 mL de bouillon brucella et vortexé pour décrocher les bactéries. À partir de cette suspension, des dilutions sériées étaient effectuées et ensemencées sur milieux sélectifs pour sélectionner les transconjugants, permettre une numération de la donatrice et évaluer la fréquence de transfert. Les milieux ont été incubés 24 à 72h en microaérobiose à 37°C. Les transconjugants éventuels ont ensuite été réisolés pour antibiogramme, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et conservation des souches.

9. Typage par Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Il s'agit d'une technique de PCR utilisant des amorces courtes (10 paires de base environ) pouvant s'hybrider de manière aléatoire à plusieurs endroits d'un génome et permettant d'amplifier plusieurs fragments aléatoires d'ADN génomique créant un profil particulier après analyse électrophorétique des produits de PCR (131). Cette technique a été effectuée dans ce travail de manière à déterminer si les transconjugants présentaient le même profil que la bactérie réceptrice et ainsi affirmer leur identité et la réussite de la conjugaison, en parallèle avec l'antibiogramme. Cinq amorces différentes ont été utilisées, chacune testée isolément dans un mix de PCR (Tableau 9). L'ADN des souches utilisées a été préalablement extrait sur l'automate Arrow (DiaSorin) après digestion du culot bactérien par une protéinase K (Qiagen). Les ADN ont été quantifiés avec un spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) puis ajusté à la même concentration de 10 ng/µL.

Tableau 9 : Amorces RAPD utilisées et séquences nucléotidiques associées

Amorce	Taille	Séquence nucléotidique
1254	10 pb	CCGCAGCCAA
1290	10 pb	GTGGATGCGA
HLWL85	10 pb	ACAACCTGCTC
HLWL74	10 pb	ACGTATCTGC
MADD	10 pb	CCTGTTAGCC

Résultats

1. Génomes et profils de résistance

Les résultats des séquençages complets des 12 souches de ce travail révèlent des génomes de taille homogène allant de 1,65 à 1,85 Mb avec un pourcentage de GC oscillant entre 30,1 et 31,5 % (Tableau 10), ce qui est comparable aux autres génomes publiés antérieurement (14,18,21,112,132).

Tableau 10 : Génomes bactériens analysés dans ce travail

Souche	Espèce	Source/origine	Génomes			
			Taille (pb)	% GC	Contigs	Séquences codantes
2006/550	<i>C. coli</i>	Humaine/France	1,753,999	31,3	28	1832
2014/1809	<i>C. coli</i>	Humaine/Portugal	1,733,603	31,4	30	1808
226199	<i>C. coli</i>	Viande porc/Portugal	1,848,415	31,1	54	1943
2006/490H	<i>C. coli</i>	Humaine/France	1,654,914	31,5	30	1702
2010/378	<i>C. coli</i>	Humaine/France	1,804,469	31,0	60	1874
2012/873	<i>C. coli</i>	Humaine/Portugal	1,780,367	31,1	31	1840
2007/817	<i>C. coli</i>	Humaine/France	1,722,896	31,3	93	1785
2010/223	<i>C. coli</i>	Humaine/Portugal	1,853,178	31,0	78	1940
2006/1293	<i>C. jejuni</i>	Humaine/France	1,703,186	30,6	22	1763
2014/105H	<i>C. jejuni</i>	Humaine/France	1,815,943	30,1	71	1925
2009/2424	<i>C. jejuni</i>	Humaine/France	1,803,379	30,4	35	1924
2012/2640	<i>C. jejuni</i>	Humaine/France	1,672,987	30,4	49	1732

La sélection de ces mêmes souches a été réalisée, pour rappel, pour leur résistance à la gentamicine *in vitro*. L'évaluation plus étendue de leurs profils de résistance montre que la totalité des souches sont résistantes à au moins trois classes d'antibiotiques.

Concernant les aminoglycosides, les souches sont toutes résistantes à la kanamycine et à la tobramycine tandis que les profils sont plus variables concernant les autres aminoglycosides. Les résistances à la spectinomycine et la streptomycine sont fréquentes (10 souches résistantes à au moins l'un d'entre eux dont 5 résistantes aux deux).

Toutes les souches sont résistantes à la ciprofloxacine et aux tétracyclines. Huit souches sont résistantes à l'ampicilline et six souches le sont à l'érythromycine. Seules trois souches restent sensibles à la fois à l'érythromycine et à l'ampicilline (Tableau 11).

Tableau 11 : Profils de résistance des souches étudiées

Souche	Espèce	Profil de résistance		CMI Gentamicine
		Aminoglycosides	Autres antibiotiques	
2006/550	<i>C. coli</i>	Kan Tob Gen Spc Stp	Cip Tet Amp	>256
2006/1293	<i>C. jejuni</i>	Kan Tob Gen Spc Stp	Cip Tet	>256
2014/1809	<i>C. coli</i>	Kan Tob Gen Spc Stp	Cip Tet Amp Ery	48
226199	<i>C. coli</i>	Kan Tob Gen Spc Stp	Cip Tet Ery	8
2006/490H	<i>C. coli</i>	Kan Tob Gen Spc Stp	Cip Tet Amp	64
2010/378	<i>C. coli</i>	Kan Tob Gen Spc	Cip Tet Amp Ery	96
2014/105H	<i>C. jejuni</i>	Kan Tob Gen Spc	Cip Tet Amp	32
2012/873	<i>C. coli</i>	Kan Tob Gen Spc	Cip Tet Amp Ery	64
2007/817	<i>C. coli</i>	Kan Tob Gen Stp	Cip Tet Amp Ery	>256
2009/2424	<i>C. jejuni</i>	Kan Tob Gen Stp	Cip Tet	48
2012/2640	<i>C. jejuni</i>	Kan Tob Gen	Cip Tet	>256
2010/223	<i>C. coli</i>	Kan Tob Gen	Cip Tet Amp Ery	64

Kan, kanamycine ; Tob, tobramycine ; Gen, gentamicine ; Spc, spectinomycine ; Stp, streptomycine ; Cip, ciprofloxacine ; Tet, tétracycline ; Amp, ampicilline ; Ery, érythromycine ; CMI en mg/L.

2. Identification des gènes de résistance aux aminoglycosides et alignements

2.1 Aminoglycosides acétyltransférases

L'annotation automatique des génomes par RAST a identifié des aminoglycosides N3'-acétyltransférases (encore appelées N-acétyltransférases ou acétyltransférases) qui, après analyse dans BLASTP (BLAST des séquences Protéiques), donnent le même type d'annotation. On en retrouve d'une à trois parmi toutes les souches génotypées (Tableau 12). Ces acétyltransférases, après alignement des séquences avec des AAC(3)s connues dans la littérature ne donnent que très peu d'homologie au niveau des séquences en acides aminés (données non présentées).

L'alignement de la totalité des probables AAC(3)s de nos souches permet de montrer la diversité de celles-ci, bien que certaines présentent une forte homologie entre elles (Figure 20). On constate, par ailleurs, que des AAC(3)s identiques sont retrouvées à la fois chez *C. jejuni* et *C. coli*. La probable aminoglycoside N3'-acétyltransférase de la souche *C. jejuni* 2012/2640 est identique à celle présente dans le génome de la souche de référence *C. jejuni* 81-176 (GenBank : AAW56175.1), connue pour ne présenter de résistance, ni à la gentamicine ni à la kanamycine (133,134). Une autre souche (*C. coli* 2014/1809), contient cette même AAC(3) mais présente des substitutions sur deux acides aminés (99,2% d'homologie).

L'alignement de la protéine codée par le gène *aac* (ORF12 du plasmide pCG8245), décrite par Nirdnoy *et al.* (111) et annotée comme une acétyltransférase de type GNAT, avec les AAC(3)s ne permet d'identifier aucune homologie aussi bien avec celles de la littérature qu'avec celles des souches de ce travail. La superfamille des GCN5-related N-acetyltransferase ou GNAT compte plus de 100 000 protéines parmi les eucaryotes et procaryotes et est divisée en différents groupes en fonction de la spécificité de leurs substrats (aminoglycosides, peptidoglycanes, histones, etc.) (135). En alignant cette séquence protéique avec les enzymes de type GNAT identifiées dans les 12 génomes séquencés de notre étude, on obtient une identité parfaite de cette enzyme avec celle de trois de nos souches (*C. coli* 2006/550, *C. coli* 2010/378 et *C. jejuni* 2014/105H) (Figure 21). Or, Nirdnoy a démontré que cette AAC est bien fonctionnelle et confère une résistance à la kanamycine. De plus, elle est, ici, systématiquement incluse au sein d'un îlot génomique de multirésistance (présenté dans le paragraphe 2.4). Elle présente, par ailleurs, 49% d'identité et 72% d'homologie (sur une requête couvrant 97% de la séquence) avec une autre GNAT présente dans les souches *C. coli* 2007/817, *C. jejuni* 2012/2640 et *C. jejuni* 2006/1293. Les enzymes de type GNAT sont abondantes dans les génomes bactériens séquencés (3 à 7 par génome, n = 57).

Une autre acétyltransférase (dans la souche 226199), délaissée dans un premier temps car annotée via RAST comme une chloramphénicol acétyltransférase, a été identifiée comme une aminocyclitol acétyltransférase de type ApmA via BLASTP. L'alignement protéique avec l'ApmA, connue dans la littérature depuis 2011 pour conférer une résistance à l'apramycine et retrouvée chez des *Staphylococcus aureus* méthi-R issus de la filière animale (136), révèle 100% d'identité avec cette dernière (Figure 22).

Tableau 12 : Acétyltransférases présentes au sein des génomes analysés

Souche	Espèce	Acétyltransférases			
		AAC(3)	AAC Nirdnoy <i>et al.</i> (111)	GNAT	ApmA
2006/550	<i>C. coli</i>	x1	x1	x6	
2006/1293*	<i>C. jejuni</i>	x3		x6	
2014/1809	<i>C. coli</i>	x1		x3	
226199	<i>C. coli</i>	x1		x7	x1
2006/490H	<i>C. coli</i>	x1		x4	
2010/378*	<i>C. coli</i>	x1	x1	x6	
2014/105H	<i>C. jejuni</i>	x1	x1	x4	
2012/873	<i>C. coli</i>	x2		x3	
2007/817	<i>C. coli</i>	x1		x4	
2009/2424	<i>C. jejuni</i>	x2		x3	
2012/2640*	<i>C. jejuni</i>	x1		x5	
2010/223	<i>C. coli</i>	x3		x6	

* : souche contenant un plasmide de résistance

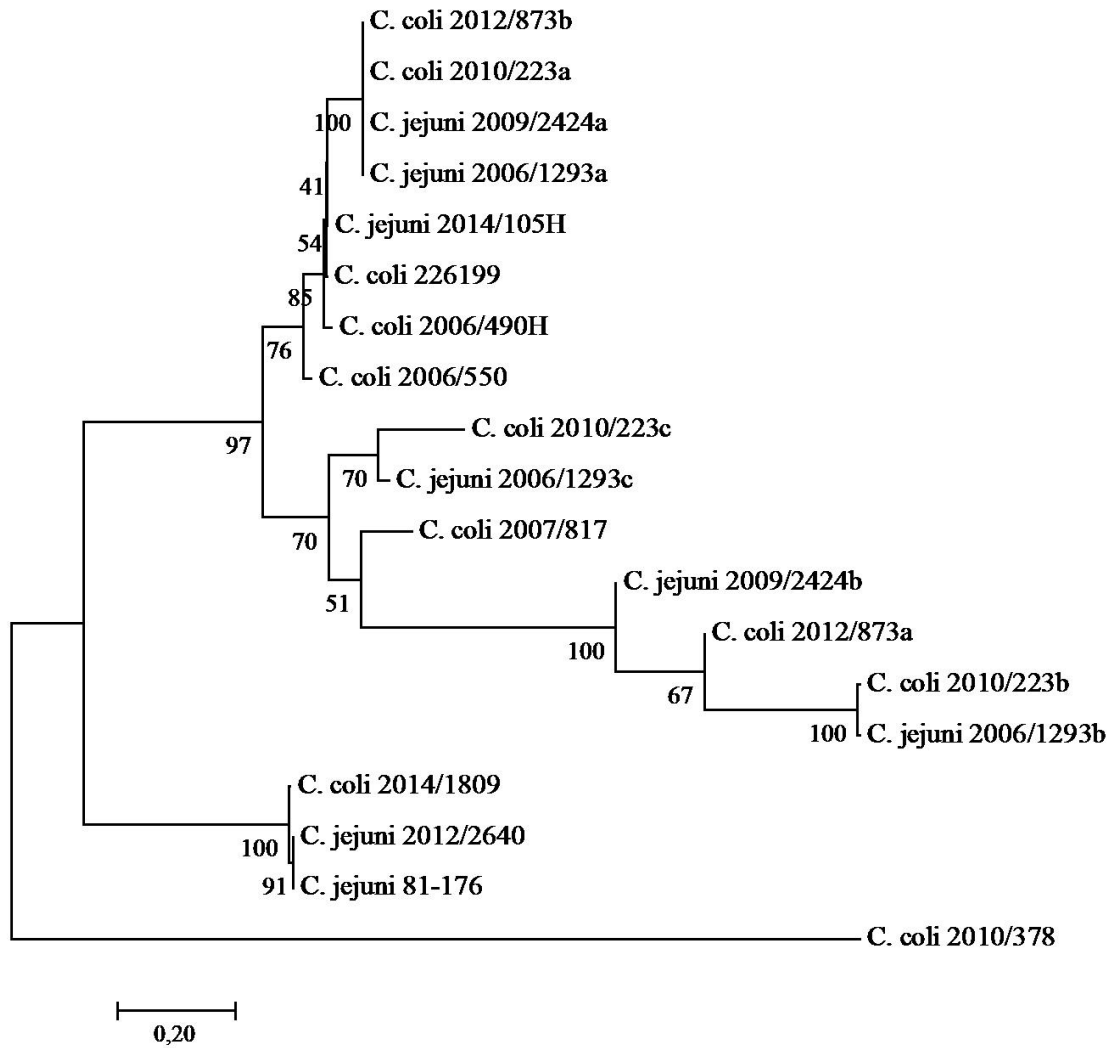


Figure 20 : Relations phylogénétiques entre les différentes AAC(3)s de nos souches (séquences protéiques).

Les lettres a, b et c sont utilisées pour distinguer les différentes enzymes au sein d'une même souche.



Figure 21 : (a) Alignements de six GNATs de nos souches possédant une AAC (gène *aac*) homologue à celle de Nirdnoy *et al.* (111). (b) Souches ayant une AAC identique à celle de Nirdnoy *et al.*

Un alignement préalable de toutes les GNATs (n=57) a permis de sélectionner celles présentant le plus d'identité avec l'AAC de Nirdnoy *et al.* (données non présentées). Trois souche possèdent une AAC totalement identique.

```

1
apmA MKTRLEQVLERYLNGREVVWGVPTRRLLRALKPFKFRVDDRVPQYHYVVAVNDDDLSDFLSDEQSKSFQYANDYLTFDDEGGELPFERMCFNVPVGRQ 100
226199 MKTRLEQVLERYLNGREVVWGVPTRRLLRALKPFKFRVDDRVPQYHYVVAVNDDDLSDFLSDEQSKSFQYANDYLTFDDEGGELPFERMCFNVPVGRQ
Consensus MKTRLEQVLERYLNGREVVWGVPTRRLLRALKPFKFRVDDRVPQYHYVVAVNDDDLSDFLSDEQSKSFQYANDYLTFDDEGGELPFERMCFNVPVGRQ

101
apmA TYFGDGVVGACKNGYIKSIGQFTSINGTAEIHVNHQLNMTFVSDDIQNFFNEESMAIFHEKLRKDPKHPYAYSKEPMTIGSDVYIGAHAFINASTVTSIG 200
226199 TYFGDGVVGACKNGYIKSIGQFTSINGTAEIHVNHQLNMTFVSDDIQNFFNEESMAIFHEKLRKDPKHPYAYSKEPMTIGSDVYIGAHAFINASTVTSIG
Consensus TYFGDGVVGACKNGYIKSIGQFTSINGTAEIHVNHQLNMTFVSDDIQNFFNEESMAIFHEKLRKDPKHPYAYSKEPMTIGSDVYIGAHAFINASTVTSIG

201
apmA DGAIIGSGAVVLENVPPFAVVVGVPARIKRYRFSKEMIETLLRVKWWDWSIEEINENADALISPELFMKKYGGL 274
226199 DGAIIGSGAVVLENVPPFAVVVGVPARIKRYRFSKEMIETLLRVKWWDWSIEEINENADALISPELFMKKYGGL
Consensus DGAIIGSGAVVLENVPPFAVVVGVPARIKRYRFSKEMIETLLRVKWWDWSIEEINENADALISPELFMKKYGGL

```

Figure 22 : Alignement de l'aminocyclitol acétyltransférase du *C. coli* 226199 avec la protéine ApmA.

Numéro d'accèsion GenBank : ApmA (YP_006958157.1, *S. aureus*).

2.2 Aminoglycosides phosphotransférases

On retrouve des APH(3')s dans 9 des 12 souches séquencées. En alignant leurs séquences protéiques avec celles de la littérature les plus rencontrées chez *Campylobacter* (APH(3')-IIIa et APH(3')-VIIa), on constate qu'elles codent toutes pour l'APH(3')-IIIa. Deux souches (*C. coli* 226199 et *C. jejuni* 2009/2424) possèdent ce gène à l'intérieur du cluster de résistance *aadE**-*sat4*-*aphA*-3. L'identité au niveau de la séquence protéique est totale pour la plupart des gènes (7/9) par rapport à la séquence de référence (GenBank : V01547.1 *Enterococcus faecalis* (101)). L'enzyme APH(3')-IIIa du *C. coli* 2010/378 présente une substitution sur un acide aminé en position 105 tandis que celle du *C. coli* 226199 présente une substitution en position 168 (Figure 24).

Le *C. coli* 2006/550 possède une protéine présentant un motif conservé (d'après BLASTP) avec la famille des aminoglycoside 3'-phosphotransférase et choline kinase. Après alignement de sa séquence avec les APH(3')s connues, aucune similitude n'a été observée (données non présentées) mais elle présente, par contre, une forte homologie avec celle codée par le gène *aph2* du plasmide du *C. jejuni* CG8245 décrit par Nirdnoy *et al.*(111), bien que, en partie tronquée par rapport à cete dernière. Ce gène *aph2*, après analyse dans cette même étude, ne semble pas conférer de résistance à la gentamicine comme supposé au départ. Sa fonction reste, de fait, encore inconnue.

Une plus grande variabilité est observée concernant la diversité des APH(2'')s. Seule une souche (*C. coli* 226199) parmi les 12 souches de *Campylobacter* séquencées ne possède pas d'APH(2''). Le système RAST annotait celles-ci, soit en tant qu'enzyme bi-fonctionnelle de type AAC(6')-APH(2''), soit en kanamycine kinase ou APH. Après analyse des séquences par BLAST, elles étaient tantôt identifiées comme une APH(2'') ou une enzyme bi-fonctionnelle. Après alignement de nos séquences d'APH(2'') avec cette enzyme bi-fonctionnelle (GenBank : AAA88548.1), on constate qu'une homologie n'est présente qu'au niveau de la partie C-terminale qui est donc celle portant les motifs conservés des APH(2'')s (données non présentées). Cette confusion avec une enzyme bi-fonctionnelle réside dans le fait que la première APH(2'') identifiée (APH(2'')-Ia) était très souvent associée et fusionnée avec une AAC(6')-Ie originellement retrouvée chez des bactéries Gram positive (staphylocoques, streptocoques, entérocoques) (99,100).

En alignant les séquences d'APH(2'')s des *Campylobacter* de ce travail avec les multiples APH(2'')s déjà décrites dans la littérature, plusieurs enzymes existantes ont pu être identifiées au sein de nos souches ainsi que deux nouvelles APH(2'')s non décrites à ce jour d'après les recherches effectuées. Tout d'abord, concernant les APH(2'')s connues, trois souches possèdent une APH(2'')-IIIa (99% d'identité) et trois autres souches possèdent une APH(2'')-If (100% d'identité) (Figures 23) (Tableau 13). Les deux nouvelles APH(2'')s découvertes sont présentes dans cinq souches différentes et sont génétiquement proches de l'APH(2'')-If et de l'APH(2'')-Ih (entre 80 et 83%

d'identité, 90 et 92% d'homologie) et très proches entre elles (96% d'identité) (Figures 23). Dans la continuité des dénominations déjà utilisées et pour éviter toute confusion, ces enzymes seront appelées APH(2'')-Ii₁ et APH(2'')-Ii₂ malgré le fait que leurs profils de résistance et leurs substrats préférentiels soient encore indéterminés. Cette appellation ne s'inscrit donc pas dans la nouvelle nomenclature cadrée par Toth *et al.* (110) et nécessitera des études complémentaires pour y figurer.

Tableau 13 : Aminoglycosides phosphotransférases présentes au sein des génomes analysés

Souche	Espèce	Aminoglycosides phosphotransférases				
		APH(3')-IIIa	APH(2'')-IIIa	APH(2'')-If	APH(2'')-Ii ₁	APH(2'')-Ii ₂
2006/550	<i>C. coli</i>			x1		
2006/1293*	<i>C. jejuni</i>	x1			x1	
2014/1809	<i>C. coli</i>	x1	x1			
226199	<i>C. coli</i>	x1				
2006/490H	<i>C. coli</i>		x1			
2010/378*	<i>C. coli</i>	x1		x1		
2014/105H	<i>C. jejuni</i>			x1		
2012/873	<i>C. coli</i>	x1				x1
2007/817	<i>C. coli</i>	x1			x1	
2009/2424	<i>C. jejuni</i>	x1	x1			
2012/2640*	<i>C. jejuni</i>	x1			x1	
2010/223	<i>C. coli</i>	x1				x1

* : souche contenant un plasmide de résistance ; *aphA-3* = *aph(3')-IIIa*

Nouvelles APH(2'')s

Dans le cluster *aadE**-*sat4*-*aphA-3*

Dans le cluster *aadE**-*sat4**-*aph(2'')-IIIa*

L'analyse phylogénétique des APH(2'')s fait suite à celle réalisée par Zhao *et al.* (108) lors de la découverte de l'APH(2'')-Ih et tient compte des deux variants de la nouvelle APH(2'')-Ii identifiée dans ce travail. Cela confirme que cette dernière est plus proche phylogénétiquement des APH(2'')-If et -Ih, dérivant probablement d'une séquence protéique ancestrale commune, et montre qu'elle constitue tout de même une sous-famille à part entière au sein des APH(2'')s (Figure 23).

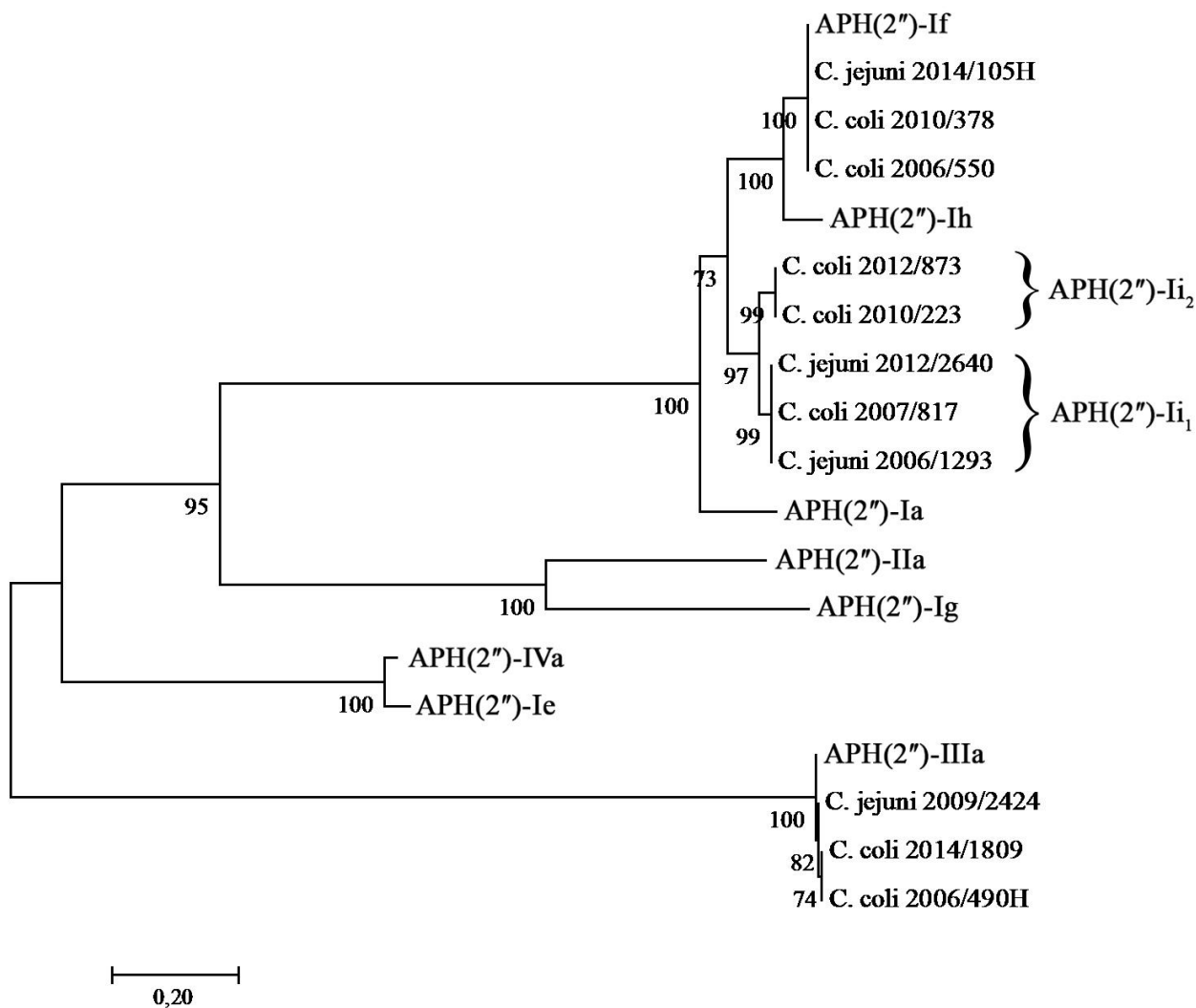


Figure 23 : Relations phylogénétiques entre les différentes APH(2'')s (séquences protéiques).

Numéros d'accèsion GenBank : APH(2'')-Ia (BAB47534.1, *S. aureus*), APH(2'')-IIa (AF207840.1, *Enterococcus faecium*), APH(2'')-IIIa (U51479.1, *Enterococcus gallinarum*), APH(2'')-IVa (AF016483.1, *Enterococcus casseliflavus*), APH(2'')-Ie (AY939911.1, *E. casseliflavus*), APH(2'')-If (AAW34150.1, *C. jejuni*), APH(2'')-Ig (AGV10818.1, *C. coli*), APH(2'')-Ih (KF652096.1, *C. jejuni*).

Deux souches (*C. coli* 2006/490H et *C. coli* 2006/550) possèdent une protéine annotée en tant qu'hygromycine B phosphotransférase, connue pour conférer, en principe, une résistance à l'hygromycine. Après alignement des deux séquences en question avec celles codées par les gènes *hyg* et *hph* de la littérature, on obtient un pourcentage d'homologie relativement faible mais meilleur pour l'enzyme Hph avec 57% d'homologie (96% de la séquence couverte). Par contre l'alignement protéique est parfait, malgré une partie N-terminale tronquée dans la souche *C. coli* 2006/550, avec la protéine codée par le gène *hph* de Nirdnoy *et al.* dont il a démontré la fonctionnalité (après clonage dans un vecteur et mutagenèse) (111) (Figure 25).

	1	100
APH3' -IIIa	MAKMRI SPELKKLIEKYRCVKDTEGMSPAKVYKLVGENENLYLKMTDSRYKGTTYDVEREKDMLLWLEGKLPVPKVLHFERHDGWSNLLMSEADGVLCS	
2012/2640	MAKMRI SPELKKLIEKYRCVKDTEGMSPAKVYKLVGENENLYLKMTDSRYKGTTYDVEREKDMLLWLEGKLPVPKVLHFERHDGWSNLLMSEADGVLCS	
2006/1293	MAKMRI SPELKKLIEKYRCVKDTEGMSPAKVYKLVGENENLYLKMTDSRYKGTTYDVEREKDMLLWLEGKLPVPKVLHFERHDGWSNLLMSEADGVLCS	
2009/2424	MAKMRI SPELKKLIEKYRCVKDTEGMSPAKVYKLVGENENLYLKMTDSRYKGTTYDVEREKDMLLWLEGKLPVPKVLHFERHDGWSNLLMSEADGVLCS	
2014/1809	MAKMRI SPELKKLIEKYRCVKDTEGMSPAKVYKLVGENENLYLKMTDSRYKGTTYDVEREKDMLLWLEGKLPVPKVLHFERHDGWSNLLMSEADGVLCS	
2007/817	MAKMRI SPELKKLIEKYRCVKDTEGMSPAKVYKLVGENENLYLKMTDSRYKGTTYDVEREKDMLLWLEGKLPVPKVLHFERHDGWSNLLMSEADGVLCS	
2010/223	MAKMRI SPELKKLIEKYRCVKDTEGMSPAKVYKLVGENENLYLKMTDSRYKGTTYDVEREKDMLLWLEGKLPVPKVLHFERHDGWSNLLMSEADGVLCS	
2012/873	MAKMRI SPELKKLIEKYRCVKDTEGMSPAKVYKLVGENENLYLKMTDSRYKGTTYDVEREKDMLLWLEGKLPVPKVLHFERHDGWSNLLMSEADGVLCS	
226199	MAKMRI SPELKKLIEKYRCVKDTEGMSPAKVYKLVGENENLYLKMTDSRYKGTTYDVEREKDMLLWLEGKLPVPKVLHFERHDGWSNLLMSEADGVLCS	
2010/378	MAKMRI SPELKKLIEKYRCVKDTEGMSPAKVYKLVGENENLYLKMTDSRYKGTTYDVEREKDMLLWLEGKLPVPKVLHFERHDGWSNLLMSEADGVLCS	
Consensus	MAKMRI SPELKKLIEKYRCVKDTEGMSPAKVYKLVGENENLYLKMTDSRYKGTTYDVEREKDMLLWLEGKLPVPKVLHFERHDGWSNLLMSEADGVLCS	
	101	200
APH3' -IIIa	EYEDEQSPEKIELYAECIRLFHSDIDSDCPYTNSLDSRLAELDYLNNLADVDCENWEEDTPFKDPRELYDFLKTEKPEEELVFSHGDLGDSNIFVKD	
2012/2640	EYEDEQSPEKIELYAECIRLFHSDIDSDCPYTNSLDSRLAELDYLNNLADVDCENWEEDTPFKDPRELYDFLKTEKPEEELVFSHGDLGDSNIFVKD	
2006/1293	EYEDEQSPEKIELYAECIRLFHSDIDSDCPYTNSLDSRLAELDYLNNLADVDCENWEEDTPFKDPRELYDFLKTEKPEEELVFSHGDLGDSNIFVKD	
2009/2424	EYEDEQSPEKIELYAECIRLFHSDIDSDCPYTNSLDSRLAELDYLNNLADVDCENWEEDTPFKDPRELYDFLKTEKPEEELVFSHGDLGDSNIFVKD	
2014/1809	EYEDEQSPEKIELYAECIRLFHSDIDSDCPYTNSLDSRLAELDYLNNLADVDCENWEEDTPFKDPRELYDFLKTEKPEEELVFSHGDLGDSNIFVKD	
2007/817	EYEDEQSPEKIELYAECIRLFHSDIDSDCPYTNSLDSRLAELDYLNNLADVDCENWEEDTPFKDPRELYDFLKTEKPEEELVFSHGDLGDSNIFVKD	
2010/223	EYEDEQSPEKIELYAECIRLFHSDIDSDCPYTNSLDSRLAELDYLNNLADVDCENWEEDTPFKDPRELYDFLKTEKPEEELVFSHGDLGDSNIFVKD	
2012/873	EYEDEQSPEKIELYAECIRLFHSDIDSDCPYTNSLDSRLAELDYLNNLADVDCENWEEDTPFKDPRELYDFLKTEKPEEELVFSHGDLGDSNIFVKD	
226199	EYEDEQSPEKIELYAECIRLFHSDIDSDCPYTNSLDSRLAELDYLNNLADVDCENWEEDTPFKDLRELYDFLKTEKPEEELVFSHGDLGDSNIFVKD	
2010/378	EYEDKQSPEKIELYAECIRLFHSDIDSDCPYTNSLDSRLAELDYLNNLADVDCENWEEDTPFKDPRELYDFLKTEKPEEELVFSHGDLGDSNIFVKD	
Consensus	EYEDEQSPEKIELYAECIRLFHSDIDSDCPYTNSLDSRLAELDYLNNLADVDCENWEEDTPFKDPRELYDFLKTEKPEEELVFSHGDLGDSNIFVKD	
	201	264
APH3' -IIIa	GKVS GFIDLGRS GRADKWDIAFCVRS IREDIGEEQYVELFFDLLG IKPDWEKIKYYILLDEL F	
2012/2640	GKVS GFIDLGRS GRADKWDIAFCVRS IREDIGEEQYVELFFDLLG IKPDWEKIKYYILLDEL F	
2006/1293	GKVS GFIDLGRS GRADKWDIAFCVRS IREDIGEEQYVELFFDLLG IKPDWEKIKYYILLDEL F	
2009/2424	GKVS GFIDLGRS GRADKWDIAFCVRS IREDIGEEQYVELFFDLLG IKPDWEKIKYYILLDEL F	
2014/1809	GKVS GFIDLGRS GRADKWDIAFCVRS IREDIGEEQYVELFFDLLG IKPDWEKIKYYILLDEL F	
2007/817	GKVS GFIDLGRS GRADKWDIAFCVRS IREDIGEEQYVELFFDLLG IKPDWEKIKYYILLDEL F	
2010/223	GKVS GFIDLGRS GRADKWDIAFCVRS IREDIGEEQYVELFFDLLG IKPDWEKIKYYILLDEL F	
2012/873	GKVS GFIDLGRS GRADKWDIAFCVRS IREDIGEEQYVELFFDLLG IKPDWEKIKYYILLDEL F	
226199	GKVS GFIDLGRS GRADKWDIAFCVRS IREDIGEEQYVELFFDLLG IKPDWEKIKYYILLDEL F	
2010/378	GKVS GFIDLGRS GRADKWDIAFCVRS IREDIGEEQYVELFFDLLG IKPDWEKIKYYILLDEL F	
Consensus	GKVS GFIDLGRS GRADKWDIAFCVRS IREDIGEEQYVELFFDLLG IKPDWEKIKYYILLDEL F	

Figure 24 : Aligement des APH(3')s de nos souches avec l'APH(3')-IIIa.

APH(3')-IIIa (GenBank : V01547.1, *Enterococcus faecalis*)

	1	100
hphNirdnoy	MKSDYSKESITEFLSRKYGEDIRLFP IKEGQESQAYWFSRGGREYVVRINSNMEGFKKDKYAYEHFRSDRVPIPEVVETGNFDGTHYFCISVKADGITYE	
2006/490H	MKSDYSKESITEFLSRKYGEDIRLFP IKEGQESQAYWFSRGGREYVVRINSNMEGFKKDKYAYEHFRSDRVPIPEVVETGNFDGTHYFCISVKADGITYE	
2006/550	MKSDYSKESITEFLSRKYGEDIRLFP IKEGQESQAYWFSRGGREYVVRINSNMEGFKKDKYAYEHFRSDRVPIPEVVETGNFDGTHYFCISVKADGITYE	
Consensus	MKSDYSKESITEFLSRKYGEDIRLFP IKEGQESQAYWFSRGGREYVVRINSNMEGFKKDKYAYEHFRSDRVPIPEVVETGNFDGTHYFCISVKADGITYE	
	101	200
hphNirdnoy	DSDEETVVRL LGDITDVTEAISRTDISGTS GCGVFDSDTGNAPFY SWREYLA EVFERDWTAVSR SYVNL SLIDELLAAYRELI SYCPEERALFHGDFGSN	
2006/490H	DSDEETVVRL LGDITDVTEAISRTDISGTS GCGVFDSDTGNAPFY SWREYLA EVFERDWTAVSR SYVNL SLIDELLAAYRELI SYCPEERALFHGDFGSN	
2006/550	DSDEETVVRL LGDITDVTEAISRTDISGTS GCGVFDSDTGNAPFY SWREYLA EVFERDWTAVSR SYVNL SLIDELLAAYRELI SYCPEERALFHGDFGSN	
Consensus	DSDEETVVRL LGDITDVTEAISRTDISGTS GCGVFDSDTGNAPFY SWREYLA EVFERDWTAVSR SYVNL SLIDELLAAYRELI SYCPEERALFHGDFGSN	
	201	300
hphNirdnoy	NVIVGKKSRI SGVIDWDCAAYGDFLYDIATAYFWRTWLMCMEKTAAYWERKYSHLPRYTERILCYELRIGLTEIYENAVENDTETTEWLQNRCREILREY	
2006/490H	NVIVGKKSRI SGVIDWDCAAYGDFLYDIATAYFWRTWLMCMEKTAAYWERKYSHLPRYTERILCYELRIGLTEIYENAVENDTETTEWLQNRCREILREY	
2006/550	NVIVGKKSRI SGVIDWDCAAYGDFLYDIATAYFWRTWLMCMEKTAAYWKT SRKIDF	
Consensus	NVIVGKKSRI SGVIDWDCAAYGDFLYDIATAYFWRTWLMCMEKTAAYWerkyshlpryterilcyelriglteiyenavendtettewlqnrcreilrey	
	301	
hphNirdnoy	RQRKA	
2006/490H	RQRKA	
2006/550		
Consensus	rqrka	

Figure 25 : Alignements de la séquence protéique Hph de Nirdnoy *et al.* (111) avec celles des souches *C. coli* 2006/490H et *C. coli* 2006/550.

2.3 Aminoglycosides nucléotidyltransférases

Pour rappel les deux classes d'aminoglycosides nucléotidyltransférases retrouvées chez *Campylobacter* sont les ANT(6)s et ANT(9)s et confèrent des résistances, respectivement, à la streptomycine et à la spectinomycine.

Sept souches de notre collection possèdent des probables ANT(6)s. Parmi elles, quatre souches en possèdent plusieurs (deux ou trois) qui sont génétiquement différentes et trois souches disposent d'une ANT(6) intégrée dans un cluster de résistance. Elles ont été tout d'abord identifiées par RAST en aminoglycoside 6-adenylyltransférase, de même avec BLASTP, qui les dénommait aussi en tant que streptomycine adenylyltransférase.

La plupart des souches (6/7) possèdent une ANT(6) identique à celle décrite par Nirdnoy *et al.* (gène *aadE*, ORF2 du plasmide pCG8245) (111) qui a montré qu'elle était bien fonctionnelle à la fois chez *C. jejuni* et *E. coli*. En la comparant avec les ANT(6)s de la littérature, elle présente le plus de lien (73% d'identité et 86% d'homologie sur une requête couvrant 97% de la séquence) avec une ANT(6)-Ib décrite et identifiée sur un îlot de pathogénicité d'une souche de *C. fetus* subsp. *fetus* (115). Cette ANT(6) est dénommée ANT(6)-If dans ce travail pour faire suite aux ANT(6)s précédemment identifiées (115) (Figure 26).

Trois souches (*C. jejuni* 2009/2424, *C. coli* 2006/490H, *C. coli* 226199) possèdent une même ANT(6) incluse dans deux clusters de résistance différents. Cette ANT(6) est identique à celle décrite par Nirdnoy *et al.* dans le cluster de résistance *aadE-sat4-aphA-3* (ORF23 du plasmide pCG8245) et paraît non fonctionnelle car tronquée et limitée à la partie carboxy-terminale (163/302 acides aminés) de l'ANT(6)-Ia originelle fortement disséminée chez les bactéries Gram positive (Figure 26) (Tableau 14). La souche *C. coli* 2014/1809 possède cette même ANT(6) (2014/1809a) mais encore plus tronquée (39 acides aminés dont 26 aa identiques), ce qui n'est pas en faveur d'une quelconque activité enzymatique dirigée contre les aminoglycosides.

Une 4^{ème} probable ANT(6) a été identifiée parmi trois souches de ce travail (*C. coli* 2006/550, *C. coli* 2006/490H, *C. coli* 226199). Après analyse dans BLASTP, cette séquence protéique est identifiée tantôt comme une protéine inconnue, tantôt comme une ANT(6). L'alignement avec les ANT(6)s de la littérature montre qu'elle semble assez distante génétiquement (environ 30% d'identité) mais peut présenter tout de même jusqu'à 55% d'homologie. Cette ANT(6) est dénommée ANT(6)-Ig dans ce travail et pourrait constituer une nouvelle enzyme de cette famille (Figure 26).

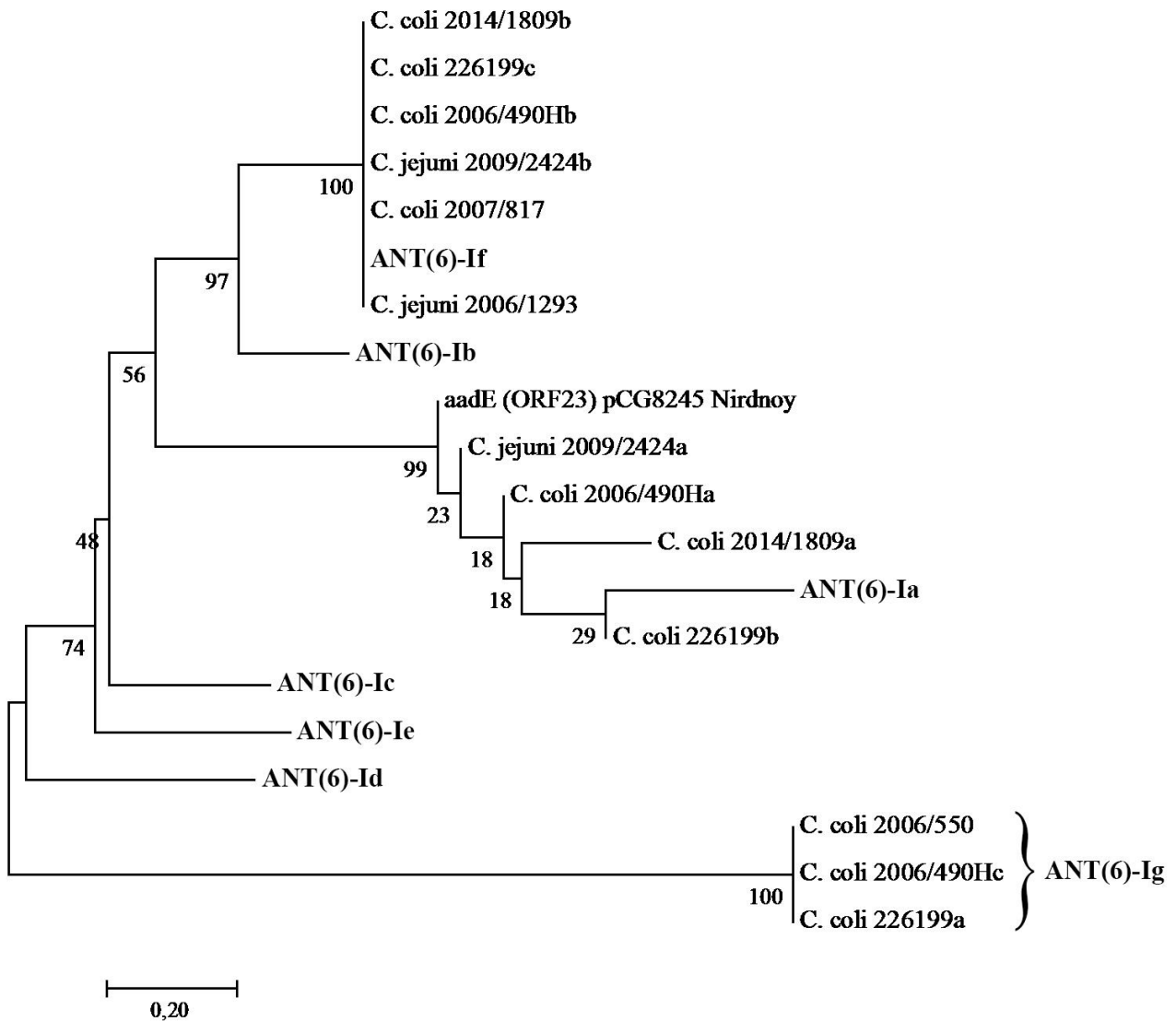


Figure 26 : Relations phylogénétiques entre les différentes ANT(6)s (séquences protéiques).

Numéros d'accèsion GenBank : ANT(6)-Ia (ZP_05574545.1, *E. faecalis*), ANT(6)-Ib (CBH51824.1, *C. fetus*), ANT(6)-Ic (AAR10415.1, *E. faecium*), ANT(6)-Id (P12055.1, *S. aureus*), ANT(6)-Ie (M26879.1, *Bacillus subtilis*). ANT(6)-If (AAW34139.1, *C. jejuni*): codée par le gène *aadE* (ORF2) de Nirdnoy *et al.* (111).

Concernant les ANT(9)s, elles sont retrouvées dans la quasi-totalité des souches (7/8) présentant une résistance à la spectinomycine (Tableaux 11 et 14). Cinq parmi celles-ci (*C. coli* 2006/550, *C. jejuni* 2006/1293, *C. coli* 226199, *C. coli* 2010/378, *C. jejuni* 2014/105H) ont une ANT(9) quasiment identique (99% d'identité sur la séquence d'aa) tandis qu'une autre (*C. coli* 2006/490H) présente cette même séquence mais amputée de 40 aa (sur 258) à son extrémité C-terminale. Cette ANT(9) est identique à celle identifiée par Nirdnoy *et al.* (111) et conférerait, selon cette précédente étude, la résistance à la spectinomycine. Elle présente, respectivement, 67% et 58% d'homologie avec les ANT(9)-Ia et ANT(9)-Ib connues de la nomenclature. Elle est dénommée ANT(9)-Ic dans ce travail (Figure 27) (Tableau 14).

Le *C. coli* 2014/1809 se démarque des autres souches car il possède une ANT(9) différente et qui n'a été décrite que récemment dans la littérature (137). Elle a d'abord été retrouvée dans l'environnement génétique de *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM) (138,139) mais serait, en fait, issue d'entérocoques. Elle est codée par le gène *spw* et est tronquée au niveau de sa partie N-terminale dans notre souche de *Campylobacter* (161/242 aa) (Figure 28). La protéine codée par le gène *spw* comporte deux domaines fonctionnels conservés : au niveau N-terminal, un domaine kanamycine nucléotidyltransférase et au niveau C-terminal, un domaine de fonction inconnu. On peut supposer que ce dernier est responsable de l'inactivation enzymatique de la spectinomycine mais des études complémentaires sont nécessaires pour l'affirmer.

Tableau 14 : Aminoglycosides nucléotidyltransférases présentes au sein des génomes analysés

Souche	Espèce	Aminoglycosides nucléotidyltransférases				
		ANT(6)-If	ANT(6)-Ig	ANT(6)-Ia*	ANT(9)-Ic	ANT(9) spw*
2006/550	<i>C. coli</i>		x1		x1	
2006/1293*	<i>C. jejuni</i>	x1			x1	
2014/1809	<i>C. coli</i>	x1		x1*		x1
226199	<i>C. coli</i>	x1	x1	x1	x1	
2006/490H	<i>C. coli</i>	x1	x1	x1	x1*	
2010/378*	<i>C. coli</i>				x1	
2014/105H	<i>C. jejuni</i>				x1	
2012/873	<i>C. coli</i>					
2007/817	<i>C. coli</i>	x1				
2009/2424	<i>C. jejuni</i>	x1		x1		
2012/2640*	<i>C. jejuni</i>					
2010/223	<i>C. coli</i>					

* : souche contenant un plasmide de résistance ; enzyme* tronquée ; *aphA-3* = *aph(3')-IIIa*

Nouvelle ANT(6)

Dans le cluster *aadE*-sat4-aphA-3*

Dans le cluster *aadE*-sat4*-aph(2'')-IIIa*

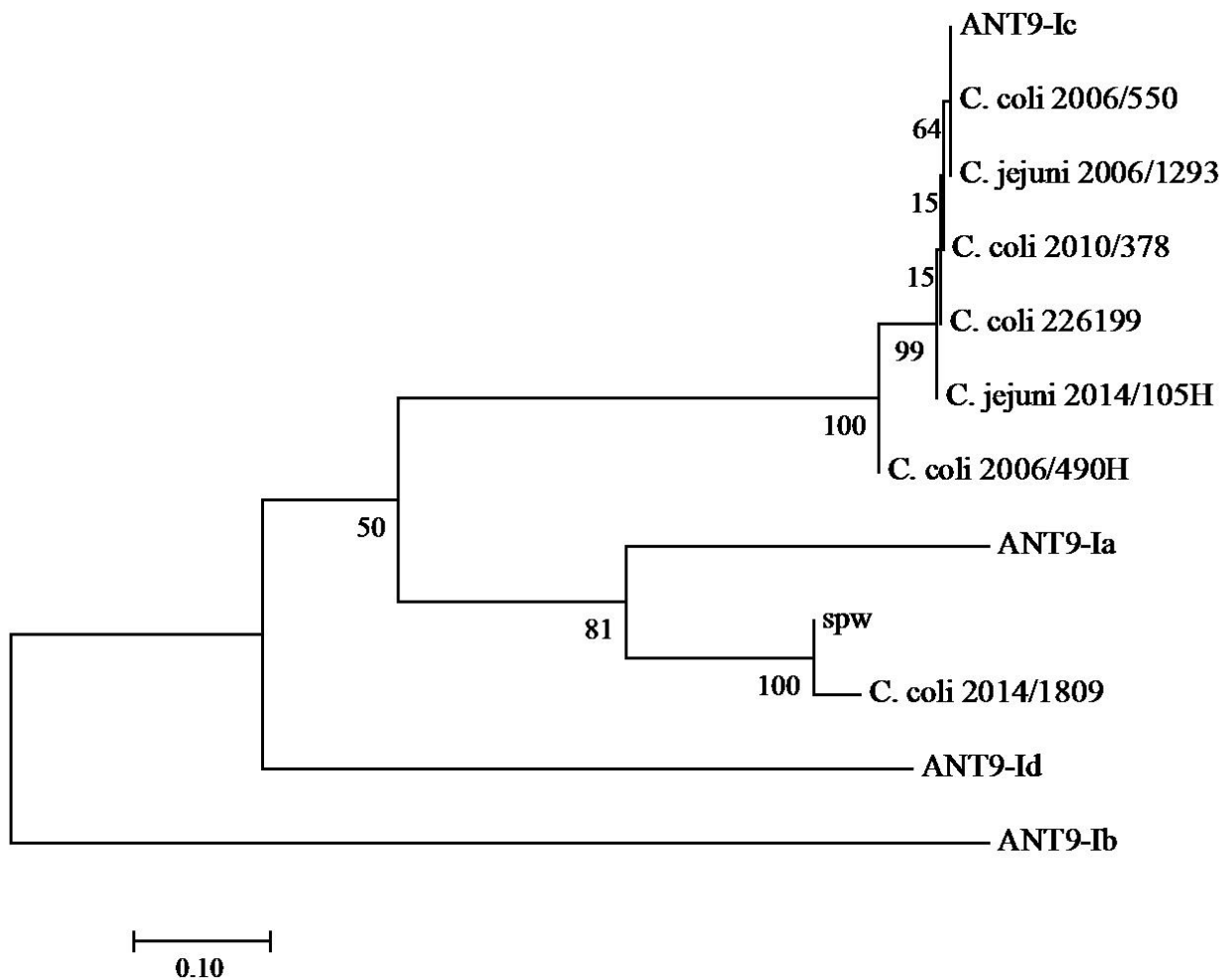


Figure 27 : Relations phylogénétiques entre les différentes ANT(9)s (séquences protéiques).

Numéros d'accèsion GenBank : ANT(9)-Ia (X02588.1, *S. aureus*), ANT(9)-Ib (M69221.1, *E. faecalis*), ANT(9)-Ic (AAW34145.1, *C. jejuni*) d'après Nirdnoy *et al.* (111), ANT(9)-Id (JN625765.1), ANT(9) spw (AFU35063, *S. aureus*) d'après Wendlandt *et al.* (137).

	1		100
spw	MLIGVYLYGSAVMGGLRMNSD	DILVITNQSLSEKTRRNLTNR	LMLISGKIGNIKDMRPLEVTVINQKD
2014/1809			IPWHFPPKYEFMYGEWLREQFEKGEIPEST
ConsensusMYGEWLREQFEKGEIPEST
	101		200
spw	YDPDLAILLAQLRKNSINLLGPKATEVIEPVPMTDIRKAIKESLPGLIASINGDERNVILTLARMWLTASTGEIRSKDLAAEWAI PQLPDEHATLLNKAR		
2014/1809	YDPDLAILLAQLRKNSINLLGPKATEVIEPVPMTDIRKAIKESLPGLIASINGDERNVILTLARMWLTASTGEIRSKDLAAEWAI PQLPDEHATLLNKAR		
Consensus	YDPDLAILLAQLRKNSINLLGPKATEVIEPVPMTDIRKAIKESLPGLIASINGDERNVILTLARMWLTASTGEIRSKDLAAEWAI PQLPDEHATLLNKAR		
	201	242	
spw	EAYLGECVDKWEKMESEVAELVNHMKKSI	ESSLNIQLPFRIV	
2014/1809	EAYLGECVDKWEKMESEVAELVNHMKKSI	ESSLNIQLPFRIV	
Consensus	EAYLGECVDKWEKMESEVAELVNHMKKSI	ESSLNIQLPFRIV	

Figure 28 : Alignement de la protéine codée par *spw* avec celle de la souche *C. coli* 2014/1809.

Numéro d'accèsion GenBank : ANT(9) *spw* (AFU35063.1, *S. aureus*)

Une probable streptomycine 3''-adénylyltransférase (ANT(3'')) a été annotée comme telle via RAST dans la souche *C. coli* 2006/550, puis, après analyse dans BLASTP, semble présenter un domaine semblable à la grande famille des nucléotidyltransférases ainsi qu'un autre domaine conservé de fonction inconnue. Après alignement avec des ANT(3'') connues de la littérature, très peu d'identités sont observées au niveau des séquences protéiques. Par contre, elle est strictement identique au gène *aadA* de Nirdnoy *et al.* (111) qui paraît ne conférer de résistance, d'après cette précédente étude, ni à la streptomycine, ni à la spectinomycine (données non présentées).

Une autre aminoglycoside nucléotidyltransférase, présente chez *C. jejuni* 2014/105H et *C. coli* 2010/378, est étiquetée après analyse dans BLASTP comme une ANT(2'') ou une lincosamide nucléotidyltransférase. L'alignement de la séquence avec l'ANT(2'')-Ia connue ne donne que peu d'homologie (donnée non présentée). Par contre l'alignement avec des séquences codants pour des enzymes de résistance aux lincosamides semble plus prometteur. En effet, la séquence protéique possède 60% d'identité et 76% d'homologie avec celle codée par le gène *lnu(C)* versus 62% d'identité et 75% d'homologie avec celle codée par le gène *lnu(D)* (Figure 29). Le gène retrouvé dans nos deux souches de *Campylobacter* et appelé ici *lnu(G)* est donc, très probablement, un nouveau gène de résistance à la lincomycine (Figure 30). Ceci sera discuté dans le paragraphe 3.4.

```

1                                                                                               100
2010/378 MVRTEDACEI IKYALQNEIKVYLDGGWGV DALLKRESRIHNDIDL FVELKHYHDYIYVIKQHGFEVNTDYTTDGHTVWKDDKQRIIDLHCFEFTDDGI-
2014/105H MVRTEDACEI IKYALQNEIKVYLDGGWGV DALLKRESRIHNDIDL FVELKHYHDYIYVIKQHGFEVNTDYTTDGHTVWKDDKQRIIDLHCFEFTDDGI-
lnuD      MVNKADAIEI ILYAEENEIDIWLDGGWGV DALLGEE TRSHNDIDL FVEEKNGKTFIEILKEKGFTEVIEAYTTT DHTVWKDDKDRIIDLHVFEFNEQGDL
lnuC      MVNITDVNQIFQFAIDAEIKVFLDGGWGV DALLGYQSR AHNDIDI FVEKNDYQNFIEIMKANGFYEIKMEYTTLNHTVWEDLKNRIIDLHCFEYTDGEIEI
Consensus MVnteDaceIikyAlqnEikvyLDGGWGV DALLgresRiHNDIDL FVELkhyhdfIeiiKqhGFeevntdyTTdgHTVWkDdKqRIIDLHCFEftddGi.

101                                                                                               166
2010/378 VYEGDIFPSKTFSGIGKVGDITVSCIEPLSQVMLHLGYEHDKNDVHDVMLLCETFQIAIPDEYKEK
2014/105H VYEGDIFPSKTFSGIGKVGDITVSCIEPLSQVMLHLGYEHDKNDVHDVMLLCETFQIAIPDEYKEK
lnuD      VFEGESYPSNVFSGIGKIGNKVVKCIDAENQVLFHLGYEHDENDVHDVRLLCERYNIPVPSEYK
lnuC      LYDGD CFPVETLSGKGRIEEIEVSCIEPYSQVMFHLGYEFDEN DAHDV KLLCETLHIEIPNEYR
Consensus vyeGdifPsktfsGIGkigditVsCIeplsQVmfHLGYEhDeNDvHDVmLLCETFqIaiPdEYk..

```

Figure 29 : Alignement des enzymes Lnu(C) et Lnu(D) avec les lincosamide nucléotidyltransférases de nos souches.

GenBank : Lnu(C) (AY928180.1, *Streptococcus agalactiae*), Lnu(D) (EF452177.1, *Streptococcus uberis*).

```

1                                                                                               100
2010/378 MVRTEDACEI IKYALQNEIKVYLDGGWGV DALLKRESRIHNDIDL FVELKHYHDYIYVIKQHGFEVNTDYTTDGHTVWKDDKQRIIDLHCFEFTDDGIV
2014/105H MVRTEDACEI IKYALQNEIKVYLDGGWGV DALLKRESRIHNDIDL FVELKHYHDYIYVIKQHGFEVNTDYTTDGHTVWKDDKQRIIDLHCFEFTDDGIV
Consensus MVRTEDACEI IKYALQNEIKVYLDGGWGV DALLKRESRIHNDIDL FVELKHYHDYIYVIKQHGFEVNTDYTTDGHTVWKDDKQRIIDLHCFEFTDDGIV

101                                                                                               165
2010/378 YEGDIFPSKTFSGIGKVGDITVSCIEPLSQVMLHLGYEHDKNDVHDVMLLCETFQIAIPDEYKEK
2014/105H YEGDIFPSKTFSGIGKVGDITVSCIEPLSQVMLHLGYEHDKNDVHDVMLLCETFQIAIPDEYKEK
Consensus YEGDIFPSKTFSGIGKVGDITVSCIEPLSQVMLHLGYEHDKNDVHDVMLLCETFQIAIPDEYKEK

```

Figure 30 : Alignement de la nouvelle Lnu(G) identique dans les deux souches *C. coli* 2010/378 et *C. jejuni* 2014/105H.

2.4 Gènes de résistance, îlots génomiques, clusters, plasmides et leurs environnements génétiques

Plusieurs îlots génomiques portant de multiples gènes de résistance aux aminoglycosides sont présents au sein de notre collection de souches ainsi que différents clusters de résistance. Par ailleurs, trois souches (*C. jejuni* 2012/2640, *C. jejuni* 2006/1293 et *C. coli* 2010/378) possèdent des plasmides arborant un ou plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques. L'étude de l'environnement génétique de proximité de ces structures et de ces gènes a pour but de déterminer si les sites d'intégration des gènes identifiés sont conservés au sein de nos différentes souches.

La souche *C. coli* 2006/550 possède un îlot génomique homologue avec une souche de la littérature. En effet, le *C. coli* 2006/550 possède une suite de gènes de résistance caractérisés ou de probables gènes de résistance comprenant une probable AAC(3), une APH(2'')-If, le gène *aac*, une probable streptomycine 3''-adénylyltransférase (ANT(3''), gène *aadA*), une probable APH(3') (gène *aph2**), une ANT(9)-Ic et une hygromycine B phosphotransférase (gène *hph* tronqué). Une partie de cet îlot est homologue à 94% avec une zone du plasmide pCG8245 de Nirdnoy *et al.* (111) allant de l'ORF8 à l'ORF13 et comprenant les mêmes gènes de résistance que la souche *C. coli* 2006/550 de l'APH(2'')-If jusqu'à l'ANT(9)-Ic. Les seules différences observées sont liées à des parties tronquées de la probable APH(3') et d'une protéine de fonction inconnue précédant l'ANT(9)-Ic. La souche *C. coli* 2006/550 possède donc, en outre, une probable AAC(3) et une hygromycine B phosphotransférase, respectivement à chaque extrémité de son îlot (Figure 31) (Tableau 15).

Cet îlot de multirésistance présente, dans son environnement génétique, des gènes codant pour des protéines de la superfamille des N-acétyltransférases (dont une enzyme de résistance codée par le gène *aac*) ainsi qu'une aminopeptidase de type zinc-peptidase et une phosphorylase semblant tronquée. Il y a aussi des protéines de fonction inconnue. L'ANT(6)-Ig, non incluse dans cet îlot, est située entre une hélicase et une NAD(P)H-oxydoréductase.

Tableau 15 : Annotations des gènes de résistance aux aminoglycosides du *C. coli* 2006/550 et leur environnement génétique

Gène/ORF	Région codante (pb)	Longueur (acides aminés)		Identité séquence protéique (%)	Annotation via BLASTP
		Souche	Protéine homologue		
CONTIG 17					
<i>orf1</i>	61654-62592	312	437	310/312(99%)	Aminopeptidase [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>aac(3)</i>	62589-63284	231	263	221/226(98%)	Putative N-acetyltransferase [<i>Campylobacter coli</i> 1948]
<i>aph(2'')-If</i>	63517-64410	297	297	297/297(100%)	Bifunctional aminoglycoside modifying enzyme [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>aac</i>	64410-64838	142	142	142/142(100%)	Acetyltransferase [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>aadA</i>	64862-65656	264	264	264/264(100%)	Adenyltransferase [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>aph2*</i>	65657-66295	212	265	210/212(99%)	Aph2 [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>orf7</i>	66570-66932	120	120	118/120(98%)	Hypothetical protein [<i>Peptoclostridium difficile</i>]
<i>ant(9)-Ic</i>	67272-68048	258	258	258/258(100%)	Aminoglycoside nucleotidyltransferase ANT9-Aad9 [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>orf9</i>	68073-68240	55	74	54/55(98%)	Truncated phosphorylase Pnp/Udp family protein [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>hph*</i>	68477-69247	256	305	248/249(99%)	Hygromycin-B-phosphotransferase [<i>Campylobacter coli</i> RM2228]
<i>orf11</i>	69307-69852	181	181	172/181(95%)	Hypothetical protein [<i>Campylobacter coli</i>]
CONTIG 9					
<i>orf1</i>	8202-10940	912	912	907/912(99%)	Helicase [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>ant(6)-Ig</i>	11101-12000	299	299	299/299(100%)	Hypothetical protein [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>orf3</i>	12107-12616	169	169	168/169(99%)	MULTISPECIES: NAD(P)H oxidoreductase [<i>Campylobacter</i>]

aac, *aadA*, *aph2** : d'après Nirdnoy *et al.* (111)

*gène tronqué

La souche *C. jejuni* 2006/1293 possède un plasmide de résistance de 61,4 kb (appelé ici pCJ1293) portant la plupart des gènes de résistance présents dans cette souche et ayant notamment les mêmes APHs que la souche *C. jejuni* 2012/2640 (Figure 32). Elle possède deux exemplaires de *tet(O)* situés au niveau plasmidique et au niveau chromosomique. On retrouve de nouveau une phosphorylase dans l'environnement de l'ANT(9)-Ic mais celle-ci paraît non tronquée contrairement à celle présente dans la souche *C. coli* 2006/550. À noter, la présence d'une acétyltransférase type GNAT adjacente au gène *aph(2'')-Ii1* et de plusieurs protéines de fonction inconnue dispersée à plusieurs endroits de l'îlot.

Tableau 16 : Annotations des gènes de résistance du plasmide pCJ1293 (séquence partielle) du *C. jejuni* 2006/1293 et leur environnement génétique

Gène/ORF	Région codante (pb)	Longueur (acides aminés)		Identité séquence protéique (%)	Annotation via BLASTP
		Souche	Protéine homologue		
CONTIG 18					
<i>orf1</i>	3830-4009	59	59	59/59(100%)	MULTISPECIES: hypothetical protein [<i>Campylobacter</i>]
<i>tet(O)</i>	4368-6287	639	639	637/639(99%)	Tetracycline resistance ribosomal protection protein [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>ant(6)-If</i>	7314-8180	288	288	288/288(100%)	MULTISPECIES: aminoglycoside 6-adenylyltransferase [Bacteria]
<i>orf4</i>	8372-8830	152	152	152/152(100%)	Hypothetical protein [<i>Blautia schinkii</i>]
<i>ant(9)-Ic</i>	9117-9896	259	259	259/259(100%)	MULTISPECIES: aminoglycoside nucleotidyltransferase ANT9 [<i>Campylobacter</i>]
<i>orf6</i>	9921-10691	256	256	256/256(100%)	MULTISPECIES: phosphorylase [Bacteria]
<i>orf7</i>	10716-11870	384	264	233/235(99%)	OrfY [<i>Trueperella pyogenes</i>] ET
<i>orf8</i>	11958-12386	142	142	152/153(99%) 142/142(100%)	DNA-binding protein [<i>Bacteroides fragilis</i>] GNAT family N-acetyltransferase [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>orf9</i>	12903-13355	150	150	150/150(100%)	RNA polymerase sigma factor, sigma-70 family [<i>Bacteroides dorei</i> 5_1_36/D4]
<i>orf10</i>	13348-14013	221	224	221/221(100%)	Hypothetical protein BSEG_01714 [<i>Bacteroides dorei</i> 5_1_36/D4]
<i>aph(3')-IIIa</i>	14121-14915	264	264	264/264(100%)	MULTISPECIES: APH(3') family aminoglycoside O-phosphotransferase [Bacteria]
<i>aph(2'')-Ii1</i>	15063-15956	297	297	297/297(100%)	2-aminoglycoside phosphotransferase [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>orf13</i>	15956-16387	143	130	130/130(100%)	GNAT family acetyltransferase [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>orf14</i>	16406-16528	40	187	29/29(100%)	Hypothetical protein [<i>Campylobacter coli</i>]

Un îlot génomique contenant une ANT(6)-Ia*, une APH(2'')-IIIa, le gène *spw** et une APH(3')-IIIa est retrouvé dans le *C. coli* 2014/1809. La souche présente au sein de cet îlot une protéine annotée comme une enzyme de recombinaison plasmidique ainsi qu'une protéine de fonction inconnue. L'ANT(6)-If, située dans un autre contig, est elle aussi encadrée par deux protéines de fonction inconnue.

Tableau 17 : Annotations des gènes de résistance aux aminoglycosides du *C. coli* 2014/1809 et leur environnement génétique

Gène/ORF	Région codante (pb)	Longueur (acides aminés)		Identité séquence protéique (%)	Annotation via BLASTP
		Souche	Protéine homologue		
CONTIG 14					
<i>ant(6)-Ia*</i>	54-173	39	177	31/36(86%)	Streptomycin aminoglycoside 6-adenyltransferase [<i>Campylobacter coli</i> CVM N29716]
<i>aph(2'')-IIIa</i>	160-1083	307	306	305/307(99%)	Aminoglycoside O-phosphotransferase APH(2'')-IIIa [<i>Allofustis seminis</i>]
<i>orf3</i>	1601-2953	450	415	290/300(97%)	Plasmid recombination enzyme [<i>Geobacillus stearothermophilus</i>]
<i>spw*</i>	3413-3898	161	242	161/161(100%)	Putative spectinomycin adenylyltransferase [<i>Enterococcus faecalis</i>]
<i>aph(3')-IIIa</i>	4604-5398	264	264	264/264(100%)	MULTISPECIES: APH(3') family aminoglycoside O-phosphotransferase [Bacteria]
<i>orf6</i>	5506-6171	221	224	221/221(100%)	Hypothetical protein BSEG_01714 [<i>Bacteroides dorei</i> 5_1_36/D4]
CONTIG 43					
<i>orf1</i>	389-862	157	157	153/157(97%)	Conserved hypothetical protein [<i>Bacteroides</i> sp. 1_1_14]
<i>ant(6)-If</i>	950-1816	288	288	288/288(100%)	MULTISPECIES: aminoglycoside 6-adenylyltransferase [Bacteria]
<i>orf3</i>	1992-2432	146	181	145/146(99%)	Hypothetical protein [<i>Campylobacter jejuni</i>]

*gène tronqué

L'ANT(6)-Ig du *C. coli* 226199 est également située à proximité d'une hélicase et d'une NAD(P)H-oxydoréductase comme dans la souche *C. coli* 2006/550. Cette souche possède un cluster *aadE**-*sat4*-*aphA*-3 qui est quasiment identique (99% d'identité) à celui décrit par Nirdnoy *et al.* (101) contenu dans un plasmide conjugatif de *C. jejuni* et possédant une *aadE* tronquée (*aadE**) non fonctionnelle. L'ANT(9) est, elle, proche d'une phosphorylase identique à celle de la souche *C. jejuni* 2006/1293. Le gène *apmA* est localisé à proximité d'un gène codant pour une pyrophosphatase inorganique ainsi que deux GNATs. L'ANT(6)-If et le cluster de résistance sont tous deux encadrés par des protéines de fonction inconnue.

Tableau 18 : Annotations des gènes de résistance aux aminoglycosides du *C. coli* 226199 et leur environnement génétique

Gène/ORF	Région codante (pb)	Longueur (acides aminés)		Identité séquence protéique (%)	Annotation via BLASTP
		Souche	Protéine homologue		
CONTIG 15					
<i>orf1</i>	119689-120198	169	169	168/169(99%)	NAD(P)H oxidoreductase [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>ant(6)-Ig</i>	120305-121204	299	299	299/299(100%)	Hypothetical protein [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>orf3</i>	121365-124103	912	912	907/912(99%)	Helicase [<i>Campylobacter coli</i>]
CONTIG 16					
<i>orf1</i>	1095-1760	221	224	221/221(100%)	Hypothetical protein BSEG_01714 [<i>Bacteroides dorei</i> 5_1_36/D4]
<i>aph(3')-IIIa</i>	1868-2662	264	264	264/264(100%)	AphA3 protein [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>sat4</i>	2736-3278	180	190	180/180(100%)	Streptothricin N-acetyltransferase Sat4 [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>ant(6)-Ia*</i>	3275-3790	171	206	171/171(100%)	Streptomycin adenylyltransferase [<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i> YIT 12067]
<i>orf5</i>	1349-1798	149	149	149/149(100%)	MULTISPECIES: hypothetical protein [<i>Campylobacter</i>]
CONTIG 29					
<i>orf1</i>	436-882	148	157	144/148(97%)	Conserved hypothetical protein [<i>Bacteroides</i> sp. 1_1_14]
<i>ant(6)-If</i>	970-1836	288	288	288/288(100%)	MULTISPECIES: aminoglycoside 6-adenylyltransferase [Bacteria]
<i>orf3</i>	2012-2452	146	181	146/146(100%)	Hypothetical protein [<i>Campylobacter jejuni</i>]
CONTIG 64					
<i>orf1</i>	261-689	142	142	140/142(99%)	GNAT family N-acetyltransferase [<i>Streptococcus suis</i>]
<i>orf2</i>	649-1152	167	162	79/139(57%)	GNAT family acetyltransferase [<i>Streptococcus oralis</i>]
<i>orf3</i>	1185-1507	107	107	77/107(72%)	Inorganic pyrophosphatase [<i>Treponema brennaborensis</i>]
<i>apmA</i>	1601-2425	274	274	274/274(100%)	Aminocyclitol acetyltransferase [<i>Staphylococcus aureus</i>]
CONTIG 73					
<i>ant(9)-Ic</i>	330-1106	258	258	258/258(100%)	Aminoglycoside nucleotidyltransferase ANT9 [<i>Oscillibacter</i> sp. ER4]
<i>orf2</i>	1131-1901	256	256	255/256(99%)	MULTISPECIES: phosphorylase [Bacteria]

*gène tronqué ; *ant(6)-Ia* = *aadE* ; *aph(3')-IIIa* = *aphA*-3

Le *C. coli* 2006/490H semblait posséder un cluster similaire à celui décrit dans la souche précédente, mais, après analyse dans BLAST et alignement des séquences protéiques, celui-ci paraît assez particulier. En effet, à l'exception de cette même *aadE* tronquée en amont du cluster, il possède un gène *sat4* tronqué (63/180 aa) avec une partie N-terminale différente des précédentes souches, associée ensuite, non pas avec une classique APH(3')-IIIa, mais une APH(2'')-IIIa. Ce cluster particulier de type *aadE**-*sat4**-*aph(2'')*-IIIa n'avait, à ce jour, jamais été décrit dans la littérature. L'ANT(9) de cette souche possède, elle aussi, dans son environnement génétique de proximité, une phosphorylase. L'ANT(6)-Ig est située à proximité d'une hélicase et d'une NAD(P)H-oxydoréductase comme dans la souche *C. coli* 2006/550 tandis que l'ANT(6)-If est entourée de protéines de fonction inconnue.

Tableau 19 : Annotations des gènes de résistance aux aminoglycosides du *C. coli* 2006/490H et leur environnement génétique

Gène/ORF	Région codante (pb)	Longueur (acides aminés)		Identité séquence protéique (%)	Annotation via BLASTP
		Souche	Protéine homologue		
CONTIG 27					
<i>orf1</i>	246-1016	256	256	256/256(100%)	Phosphorylase [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>ant(9)-Ic*</i>	1041-1697	218	218	218/218(100%)	Streptomycin 3"-adenylyltransferase [<i>Campylobacter coli</i> CVM N29716]
<i>orf3</i>	2019-2564	181	181	181/181(100%)	Hypothetical protein [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>hph</i>	2624-3541	305	305	305/305(100%)	Hygromycin-B-phosphotransferase [<i>Campylobacter coli</i> RM2228]
CONTIG 29					
<i>ant(6)-Ia*</i>	72-587	171	206	171/171(100%)	Streptomycin adenylyltransferase [<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i> YIT 12067]
<i>sat4*</i>	584-1132	182	118	118/118(100%)	GNAT family N-acetyltransferase, partial [<i>Staphylococcus aureus</i>]
<i>aph(2'')-IIIa</i>	1210-2133	307	306	305/307(99%)	Aminoglycoside O-phosphotransferase APH(2'')-IIIa [<i>Allofustis seminis</i>]
CONTIG 52					
<i>orf1</i>	72-512	146	181	138/146(95%)	Hypothetical protein [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>ant(6)-If</i>	688-1554	288	288	288/288(100%)	MULTISPECIES: aminoglycoside 6-adenylyltransferase [Bacteria]
<i>orf3</i>	1642-2142	166	166	138/154(90%)	Hypothetical protein [<i>Campylobacter coli</i>]
CONTIG 9					
<i>orf1</i>	8254-10992	912	912	912/912(100%)	Helicase [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>ant(6)-Ig</i>	11153-12052	299	299	299/299(100%)	Hypothetical protein [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>orf3</i>	12248-12667	139	139	139/139(100%)	NAD(P)H oxidoreductase [<i>Campylobacter coli</i>]

*gène tronqué ; *ant(6)-Ia* = *aadE*

Les souches *C. coli* 2010/378 et *C. jejuni* 2014/105H présentent des îlots génomiques de multirésistance aux aminoglycosides très similaires. La seule différence notable repose sur la présence d'une APH(3')-IIIa dans l'îlot de la souche *C. coli* 2010/378 qui est absente de l'autre souche. Le reste de l'îlot est identique à 99% sur la séquence d'acides aminés (100% d'homologie). Cet îlot comprend le gène *lnu(G)* décrit précédemment (paragraphe 2.3), une ANT(9)-Ic, le gène *aac* codant pour une acétyltransférase de type GNAT et une APH(2'')-If (Figure 31) (Tableau 20 et 21). Une phosphorylase identique à celle de la souche *C. jejuni* 2006/1293 se retrouve entre le gène *lnu(G)* et l'ANT(9)-Ic. Dans le reste de l'îlot génétique de multirésistance, on trouve une transposase et des protéines de fonction inconnue.

Tableau 20 : Annotations des gènes de résistance du *C. coli* 2010/378 et leur environnement génétique

Gène/ORF	Région codante (pb)	Longueur (acides aminés)		Identité séquence protéique (%)	Annotation via BLASTP
		Souche	Protéine homologue		
CONTIG 22					
<i>lnu(G)</i>	281-778	165	165	165/165(100%)	MULTISPECIES: aminoglycoside nucleotidyltransferase [Clostridiales]
<i>orf2</i>	1027-1797	256	256	256/256(100%)	Phosphorylase [<i>Campylobacter coli</i> CVM 41953]
<i>ant(9)-Ic</i>	1822-2598	258	258	258/258(100%)	Aminoglycoside nucleotidyltransferase ANT9 [<i>Oscillibacter</i> sp. ER4]
<i>orf4</i>	2798-3076	92	181	84/87(97%)	Hypothetical protein [<i>Peptoclostridium difficile</i>]
<i>aac</i>	3066-3494	142	142	142/142(100%)	Acetyltransferase [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>aph(2'')-If</i>	3494-4387	297	297	297/297(100%)	Bifunctional aminoglycoside modifying enzyme [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>orf7</i>	4468-5751	427	427	422/427(99%)	Transposase, IS605OrfB family [<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i> 00-2544]
<i>aph(3')-IIIa</i>	5835-6629	264	264	263/264(99%)	MULTISPECIES: aminoglycoside 3'-phosphotransferase [Bacteria]
<i>orf9</i>	7044-7568	174	174	174/174(100%)	Hypothetical protein cco55_08848 [<i>Campylobacter coli</i> 1909]

Tableau 21 : Annotations des gènes de résistance du *C. jejuni* 2014/105H et leur environnement génétique

Gène/ORF	Région codante (pb)	Longueur (acides aminés)		Identité séquence protéique (%)	Annotation via BLASTP
		Souche	Protéine homologue		
CONTIG 28					
<i>lnu(G)</i>	284-781	165	165	165/165(100%)	MULTISPECIES: aminoglycoside nucleotidyltransferase [Bacteria]
<i>orf2</i>	1030-1800	256	256	256/256(100%)	phosphorylase [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>ant(9)-Ic</i>	1825-2601	258	258	258/258(100%)	aminoglycoside nucleotidyltransferase ANT9 [<i>Oscillibacter</i> sp. ER4]
<i>orf4</i>	2801-3079	92	181	83/87(95%)	MULTISPECIES: hypothetical protein [Bacteria]
<i>aac</i>	3069-3497	142	142	142/142(100%)	MULTISPECIES: acetyltransferase [Bacteria]
<i>aph(2'')-If</i>	3497-4390	297	297	297/297(100%)	bifunctional aminoglycoside modifying enzyme [<i>Campylobacter jejuni</i>]

Le *C. coli* 2012/873 présente un îlot contenant seulement trois gènes de résistance situés successivement et représentés par *tet(O)*, un gène *aph(2'')-Ii₂* codant pour une APH(2'')-Ii₂ et un gène *aph(3')-IIIa*. Ils sont encadrés par une acétyltransférase de type GNAT ainsi qu'une hémérythrine du côté de *tet(O)*.

Tableau 22 : Annotations des gènes de résistance du *C. coli* 2012/873 et leur environnement génétique

Gène/ORF	Région codante (pb)	Longueur (acides aminés)		Identité séquence protéique (%)	Annotation via BLASTP
		Souche	Protéine homologue		
CONTIG 7					
<i>orf1</i>	56540-56755	71	339	29/69(42%)	GNAT family N-acetyltransferase [<i>Erysipelotrichaceae bacterium</i> NK3D112]
<i>aph(2'')-Ii₂</i>	56760-57653	297	297	284/297(96%)	2-aminoglycoside phosphotransferase [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>aph(3')-IIIa</i>	58390-59184	264	264	264/264(100%)	MULTISPECIES: APH(3') family aminoglycoside O-phosphotransferase [Bacteria]
<i>tet(O)</i>	59515-61434	639	639	639/639(100%)	tetracycline resistance ribosomal protection protein [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>orf5</i>	62107-62445	112	112	110/112(98%)	MULTISPECIES: hemerythrin [<i>Campylobacter</i>]

La souche *C. coli* 2007/817 a un îlot génomique contenant une ANT(6)-If, un nouveau gène de résistance codant pour une APH(2'')-Ii₁ et une APH(3')-IIIa.

On retrouve essentiellement des protéines de fonction inconnue dans l'environnement génétique des gènes de résistance de cette souche à l'exception d'une GNAT.

Tableau 23 : Annotations des gènes de résistance aux aminoglycosides du *C. coli* 2007/817 et leur environnement génétique

Gène/ORF	Région codante (pb)	Longueur (acides aminés)		Identité séquence protéique (%)	Annotation via BLASTP
		Souche	Protéine homologue		
CONTIG 2					
<i>orf1</i>	361-861	166	166	138/154(90%)	hypothetical protein [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>ant(6)-If</i>	949-1815	288	288	288/288(100%)	MULTISPECIES: aminoglycoside nucleotidyltransferase [Bacteria]
<i>orf3</i>	1991-2431	146	181	129/145(89%)	hypothetical protein [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>orf4</i>	3056-3508	150	150	150/150(100%)	RNA polymerase sigma factor, sigma-70 family [<i>Bacteroides dorei</i> 5_1_36/D4]
<i>orf5</i>	3501-4166	221	224	220/221(99%)	hypothetical protein [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>aph(3')-IIIa</i>	4274-5068	264	264	264/264(100%)	MULTISPECIES: APH(3') family aminoglycoside O-phosphotransferase [Bacteria]
<i>aph(2'')-Ii₁</i>	5216-6109	297	297	297/297 (100)	2-aminoglycoside phosphotransferase [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>orf8</i>	6109-6540	143	130	130/130(100%)	GNAT family acetyltransferase [<i>Campylobacter coli</i>]

Des protéines de fonction inconnue sont situées à proximité du cluster *aadE**-*sat4*-*aphA-3* ainsi que de l'ANT(6)-If dans la souche *C. jejuni* 2009/2424. L'environnement de l'APH(2'') et de *tet(O)* est plus intéressant car entouré d'une enzyme de recombinaison plasmidique, d'une protéine de réplication plasmidique et d'une protéine semblant issue d'un transposon.

Tableau 24 : Annotations des gènes de résistance du *C. jejuni* 2009/2424 et leur environnement génétique

Gène/ORF	Région codante (pb)	Longueur (acides aminés)		Identité séquence protéique (%)	Annotation via BLASTP
		Souche	Protéine homologue		
CONTIG 13					
<i>orf1</i>	1020-1685	221	224	221/221(100%)	hypothetical protein [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>aph(3')-IIIa</i>	1793-2587	264	264	264/264(100%)	MULTISPECIES: APH(3') family aminoglycoside O-phosphotransférase [Bacteria]
<i>sat4</i>	2751-3293	180	190	180/180(100%)	streptothricin N-acetyltransferase Sat4 [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>ant(6)-Ia*</i>	3290-3805	171	206	171/171(100%)	streptomycin adenylyltransferase [<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i> YIT 12067]
CONTIG 45					
<i>orf1</i>	83398-83805	135	157	120/124(97%)	conserved hypothetical protein [<i>Bacteroides</i> sp. 1_1_14]
<i>ant(6)-If</i>	83893-84759	288	288	288/288(100%)	MULTISPECIES: aminoglycoside 6-adenylyltransferase [Bacteria]
<i>orf3</i>	84935-85375	146	181	136/146(93%)	hypothetical protein [<i>Campylobacter coli</i>]
CONTIG 6					
<i>orf1</i>	3200-3604	134	120	105/117(90%)	Plasmid recombination enzyme [<i>Staphylococcus hominis</i>]
<i>aph(2'')-IIIa</i>	4134-5054	306	306	305/306(99%)	aminoglycoside O-phosphotransférase APH(2'')-IIIa [<i>Allofustis seminis</i>]
<i>orf3</i>	5132-5371	79	120	79/79(100%)	replication protein [Enterococcus faecium]
<i>tet(O)</i>	5779-7698	639	639	638/639(99%)	tetracycline resistance ribosomal protection protein [<i>Campylobacter jejuni</i>]
<i>orf5</i>	8065-8190	41	83	41/41(100%)	transposon-encoded protein TnpV, partial [uncultured bacterium]

*gène tronqué ; *ant(6)-Ia* = *aadE* ; *aph(3')-IIIa* = *aphA-3*

La souche *C. jejuni* 2012/2640 possède un plasmide conjugatif de 49,8 kb contenant plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques ainsi qu'un système de sécrétion de type IV (T4SS). Il contient un gène *tet(O)* de résistance à la tétracycline ainsi que deux gènes codant pour des aminoglycosides phosphotransférases dont une nouvelle APH(2'') appelée APH(2'')-Ii₁. Les gènes de résistance, inclus dans le plasmide du *C. jejuni* 2012/2640, sont accolés à des protéines de fonction inconnue, à une GNAT ainsi qu'à une protéine cas1 (impliquée dans des associations avec des protéines CRISPR).

Tableau 25 : Annotations des gènes de résistance du plasmide pCJ2640 (séquence partielle) du *C. jejuni* 2012/2640 et leur environnement génétique

Gène/ORF	Région codante (pb)	Longueur (acides aminés)		Identité séquence protéique (%)	Annotation via BLASTP
		Souche	Protéine homologue		
CONTIG 12					
<i>tet(O)</i>	21-1940	639	639	636/639(99%)	MULTISPECIES: tetracycline resistance ribosomal protection protein [Bacilli]
<i>orf2</i>	2315-2794	159	299	67/149(45%)	subtype II CRISPR-associated endonuclease Cas1 [<i>Clostridium perfringens</i>]
<i>orf3</i>	3168-3290	40	187	27/28(96%)	hypothetical protein [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>orf4</i>	3309-3740	143	130	130/130(100%)	GNAT family acetyltransférase [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>aph(2'')-Ii₁</i>	3740-4633	297	297	297/297(100%)	2-aminoglycoside phosphotransférase [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>aph(3')-IIIa</i>	4781-5575	264	264	264/264(100%)	MULTISPECIES: APH(3') family aminoglycoside O-phosphotransférase [Bacteria]
<i>orf7</i>	5683-6348	221	224	221/221(100%)	hypothetical protein [<i>Campylobacter coli</i>]

La souche *C. coli* 2010/223 présente seulement deux enzymes de résistance aux aminoglycosides (APH(2'')-Ii₂ et APH(3')-IIIa) qui sont associées à deux GNATs dans leur environnement génétique.

Tableau 26 : Annotations des gènes de résistance aux aminoglycosides du *C. coli* 2010/223 et leur environnement génétique

Gène/ORF	Région codante (pb)	Longueur (acides aminés)		Identité séquence protéique (%)	Annotation via BLASTP
		Souche	Protéine homologue		
CONTIG 43					
<i>aph(3')-IIIa</i>	358-1152	264	264	264/264(100%)	MULTISPECIES: APH(3') family aminoglycoside O-phosphotransférase [Bacteria]
<i>orf2</i>	1623-1889	88	129	57/78(73%)	GNAT family acetyltransférase [<i>Campylobacter jejuni</i> CVM 41912]
<i>aph(2'')-Ii₂</i>	1889-2782	297	297	284/297(96%)	2-aminoglycoside phosphotransférase [<i>Campylobacter coli</i>]
<i>orf4</i>	2787-3002	71	339	29/69(42%)	GNAT family N-acetyltransférase [<i>Erysipelotrichaceae bacterium</i> NK3D112]

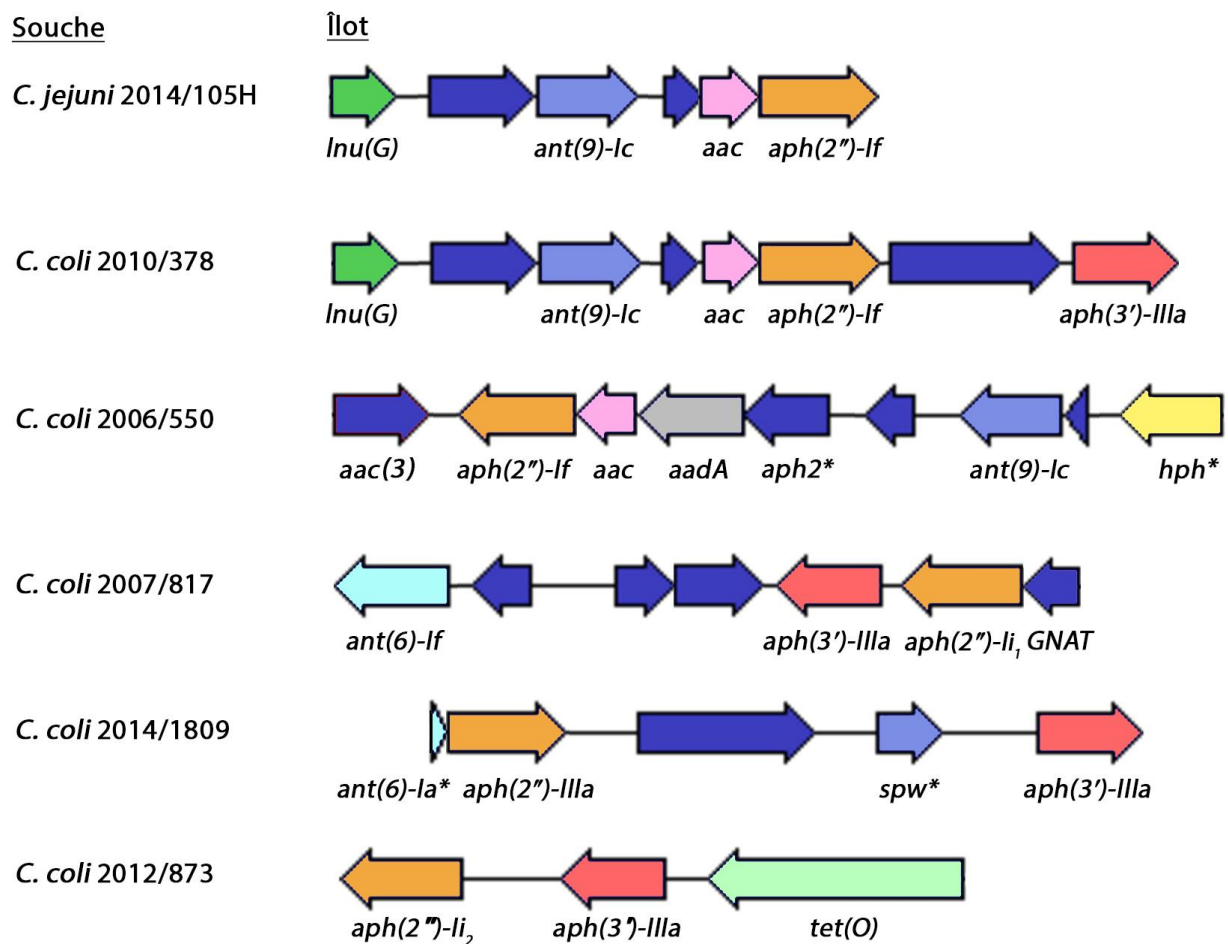


Figure 31 : Illustration des îlots génomiques de multirésistance présents au sein de nos souches.

* : gène tronqué. Les flèches en bleu foncé correspondent à des gènes ne codant pas pour des enzymes de résistance ou étant de fonction inconnue. Les couleurs des autres flèches sont associées aux différents types d'enzyme présents.

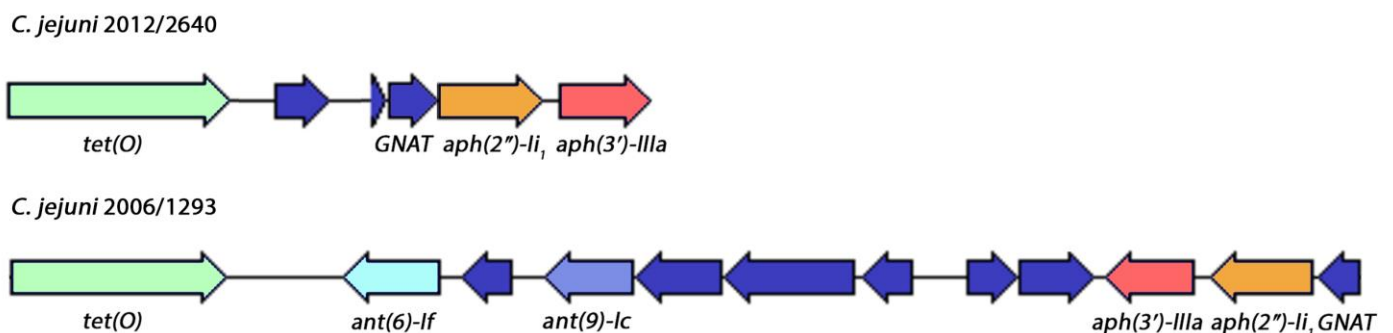


Figure 32 : Représentation schématique des îlots de résistance des plasmides pCJ2640 et pCJ1293 (séquences partielles).

Le plasmide de la souche *C. coli* 2010/378, de taille plus réduite (28,6 kb) et contenant uniquement le gène de résistance *tet(O)* n'est pas illustré. Les flèches en bleu foncé correspondent à des gènes ne codant pas pour des enzymes de résistance ou étant de fonction inconnue. Les couleurs des autres flèches sont associées aux différents types d'enzyme présents.

Les trois souches séquencées dans cette étude et ayant un plasmide de résistance, possèdent, associé à celui-ci, un système de sécrétion de type IV (T4SS) et ont en commun la présence du gène *tet(O)*. Pour analyser la proportion de ces plasmides associés à un T4SS chez des souches de *Campylobacter* résistants aux tétracyclines, une amplification par PCR des gènes spécifiques *virB4* et *incQ* au sein de 100 souches de *C. jejuni* et *C. coli* résistantes ou non a été réalisée. Les souches ont été sélectionnées au hasard et sur cinq années différentes (2010-2014) au sein des collections du CNRCH et du laboratoire du Dr Mónica Oleastro.

17% des souches présentent un plasmide associé à un T4SS. Parmi elles, 94% (16/17) sont résistantes aux tétracyclines (Tétra-R). Seule une souche (*C. coli* 2014/2129) possède donc un plasmide sans présenter de résistance aux tétracyclines. On observe, de plus, une plus forte proportion de *C. jejuni* Tétra-R possédant ce type de plasmide que de *C. coli* Tétra-R (48% vs 16% respectivement) (Tableau 27). L'analyse par année ne présente pas d'intérêt compte tenu du faible échantillonnage dans chaque catégorie.

Une confirmation de la PCR sur ces deux mêmes gènes a été faite sur la souche sensible *C. coli* 2014/2129 ainsi qu'une PCR sur le gène *tet(O)* pour affirmer son absence (Figure 33).

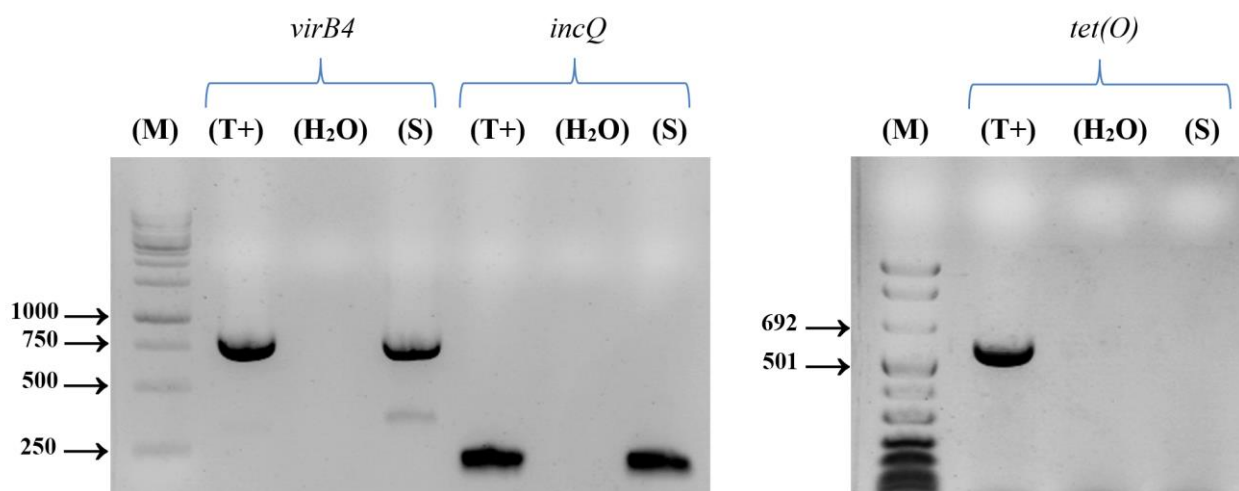


Figure 33 : Exemple de résultats des produits de PCR *virB4* (812 pb), *incQ* (208 pb) et *tet(O)* (559 pb) sur la souche *C. coli* 2014/2129 après migration sur gel d'agarose (1,5%).

(M) : marqueur de taille ; (T+) : souche *C. jejuni* 2012/2640 ; (H₂O) : eau pour PCR (témoin négatif) ; (S) : souche *C. coli* 2014/2129.

Un screening similaire a été réalisé par le Laboratoire National de Référence des Infections Gastro-intestinales (Institut National de la Santé Dr. Ricardo Jorge, Lisbonne, Portugal) sous la responsabilité du Dr Mónica Oleastro (Chercheur) et portant sur 94 souches de *C. jejuni* et *C. coli*. Les résultats obtenus sont concordants en ce qui concerne *C. jejuni* avec 46,4% (13/28) des souches résistantes à la tétracycline présentant les deux gènes plasmidiques et aucune souche sensible n'est positive pour ces mêmes gènes par PCR. Pour *C. coli*, aucune souche sensible ne possède les gènes

plasmidiques mais l'échantillon analysé est moins conséquent (9 souches seulement). Les souches résistantes de cette même espèce possédant les gènes plasmidiques *virB4* et *incQ* sont, par ailleurs, plus nombreuses proportionnellement (40,6% versus 16%) (données non publiées, communiquées par le Dr M. Oleastro) (Tableau 27).

Tableau 27 : Screening des gènes *virB4* et *incQ* portés par le T4SS au sein de *Campylobacter* sensibles ou résistants aux tétracyclines

Tétracycline	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>		Total
	S	R	S	R	
n (France)	25	25	25	25	100
<i>virB4</i> et <i>incQ</i>	0	12	1	4	17
%	0%	48%	4%	16%	17%
n (Portugal)	25	28	9	32	94
<i>virB4</i> et <i>incQ</i>	0	13	0	13	26
%	0%	46,4%	0,0%	40,6%	27,7%

De plus, une confirmation de l'identification de chacune des 100 souches a été réalisée par PCR en temps réel en système FRET sur le gène *gyrA*.

Pour confirmer les résistances portées par le plasmide pCJ2640, des expériences de conjugaison ont été réalisées en utilisant la souche *C. jejuni* 2012/2640 comme donatrice.

2.5 Résultats de la transmission horizontale par conjugaison de gènes de résistance aux antibiotiques portés par un plasmide

Les conjugaisons de la souche donatrice *C. jejuni* 2012/2640 (D) réalisées avec la souche réceptrice *C. jejuni* 2012/237H, résistante à l'érythromycine, n'ont pas donné de transconjugants. Par contre, une des conjugaisons réalisées avec une souche présentant une résistance isolée à l'ampicilline, la souche réceptrice *C. jejuni* 2015/64 (R), a permis d'obtenir des transconjugants sur milieux sélectifs contenant deux antibiotiques (kanamycine et amoxicilline). Les dilutions ont permis d'évaluer la fréquence de transfert à $4,1 \cdot 10^{-6}$. Un antibiogramme des transconjugants a confirmé la transmission et l'acquisition des résistances portées par le plasmide pCJ2640 (kanamycine, gentamicine, tobramycine et tétracycline) en association avec la résistance à l'ampicilline préexistante dans la souche réceptrice. Par ailleurs, une PCR sur les gènes plasmidiques *virB4*, *incQ* et sur le gène *tet(O)* a été réalisée sur les transconjugants, chez lesquels ces gènes sont bien présents (Figure 34). Pour déterminer si les transconjugants correspondaient bien à la souche réceptrice ayant acquis le plasmide pCJ2640, une étude des profils RAPD a été réalisée sur cinq amorces. Les résultats ont été concluant pour deux amorces (1254 et 1290) et

confirment la réussite de la conjugaison (profils de la réceptrice identiques à ceux des transconjugants et différents de ceux de la donatrice, Figure 35).

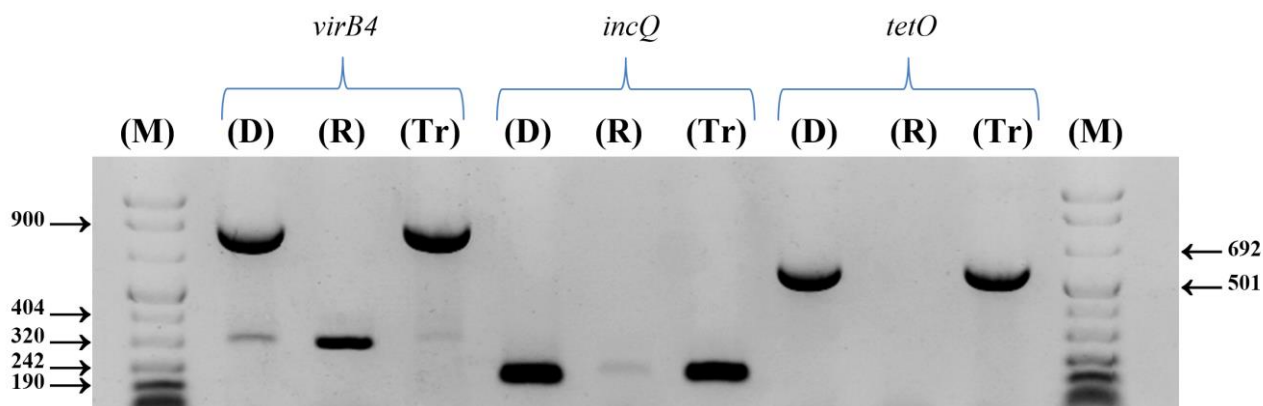


Figure 34 : PCR sur les gènes *virB4* (812 pb), *incQ* (208 pb) et *tet(O)* (559 pb) après conjugaison.

M : marqueur de taille ; D : donatrice ; R : réceptrice ; Tr : transconjugant.

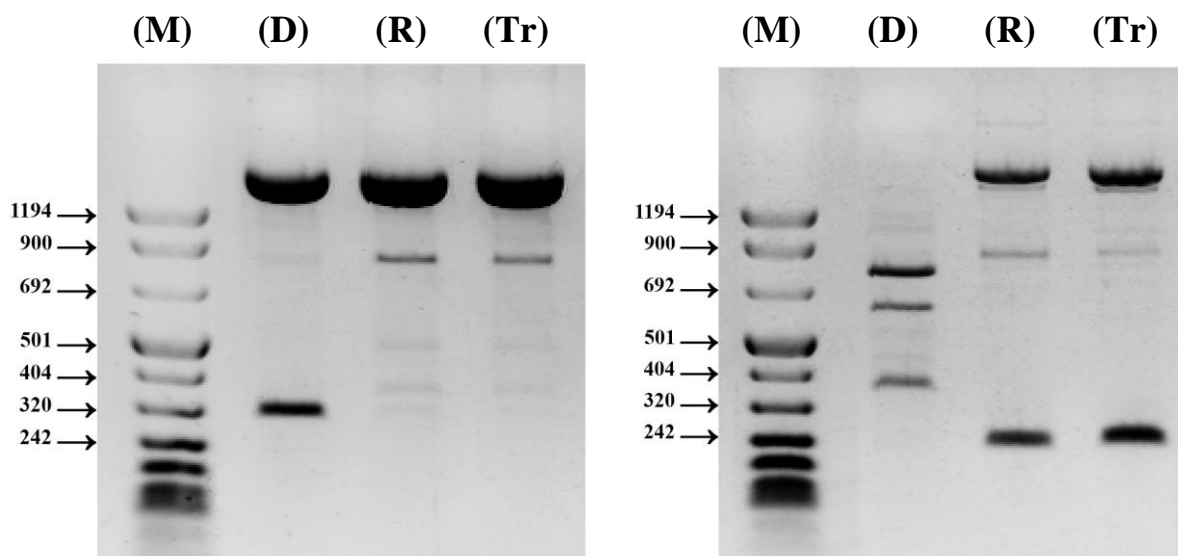


Figure 35 : Profils RAPD 1254 (à gauche) et 1290 (à droite).

Les profils (R) et (Tr) sont identiques et différents de ceux de la donatrice confirmant qu'ils correspondent à la même souche *C. jejuni* 2015/64 ayant acquis le plasmide pCJ2640.

M : marqueur de taille ; D : donatrice ; R : réceptrice ; Tr : transconjugant.

3. Autres mécanismes de résistance aux antibiotiques identifiés

3.1 Gène *tet(O)* et résistance aux tétracyclines

La totalité des 12 souches de *Campylobacter* de ce travail sont résistantes aux tétracyclines. La recherche du gène *tet(O)* a été fructueuse pour la totalité d'entre elles. Cependant, des disparités

au niveau de la séquence protéique sont observées en fonction des souches. En effet, quatre souches possèdent une protéine tronquée au niveau de la partie C-terminale : le *C. coli* 2006/490H a une partie N-terminale de 346 aa (contre 639 pour la séquence protéique complète) tandis que les trois autres ont une protéine Tet(O) encore plus réduite et faisant 244 aa (données non présentées). L'identité des séquences protéiques est forte et au-delà de 96% sur la partie non tronquée. Le *C. coli* 2010/223 présente une partie N-terminale tronquée (615/639 aa). Il y a probablement eu un problème lors de l'assemblage de la séquence de *tet(O)* car la partie tronquée est retrouvée dans un autre contig pour chacune des souches. Le gène *tet(O)* de ces souches est donc probablement intact. Les sept autres souches présentent des protéines Tet(O) entières ayant 92 à 99% d'identité entre elles et/ou avec celles de la littérature (données non présentées). Concernant les trois souches portant un plasmide de résistance (*C. jejuni* 2006/1293, *C. coli* 2010/378, *C. jejuni* 2012/2640), elles contiennent toutes, au moins un gène *tet(O)* plasmidique.

3.2 Gène *gyrA* et résistance aux quinolones

La mutation classique du gène *gyrA* dans la région QRDR conduisant à la substitution Thr-86-Ile est présente dans la totalité des souches étudiées qui sont, par ailleurs, toutes résistantes à la ciprofloxacine (Figure 36). La recherche d'autres mutations moins fréquentes et associées à des niveaux de résistance modérés aux quinolones s'est révélée négative.

	51					100		
NCTC11168	...ILYAMQ	NDEA	KSRTDFV	KSA	RIVGAVIGRY	HPHGDIAVYD ALVRMAQDFS...		
2006/1293	...ILYAMQ	NDEA	KSRTDFV	KSA	RIVGAVIGRY	HPHGDIAVYD ALVRMAQDFS...		
2009/2424	...ILYAMQ	NDEA	KSRTDFV	KSA	RIVGAVIGRY	HPHGDIAVYD ALVRMAQDFS...		
2012/2640	...ILYAMQ	NDEA	KSRTDFV	KSA	RIVGAVIGRY	HPHGDIAVYD ALVRMAQDFS...		
2014/105H	...ILYAMQ	NDEA	KSRTDFV	KSA	RIVGAVIGRY	HPHGDIAVYD ALVRMAQDFS...		
2006/550	...ILYAMNDL	GV	GSR	SAYK	KSA	RIVG	DLVIGKY	HPHGDIAVYD ALVRMAQDFS...
2007/817	...ILYAMNDL	GV	GSR	SAYK	KSA	RIVG	DLVIGKY	HPHGDIAVYD ALVRMAQDFS...
2012/873	...ILYAMNDL	GV	GSR	SAYK	KSA	RIVG	DLVIGKY	HPHGDIAVYD ALVRMAQDFS...
226199	...ILYAMNDL	GV	GSR	SAYK	KSA	RIVG	DLVIGKY	HPHGDIAVYD ALVRMAQDFS...
2014/1809	...ILYAMNDL	GV	GSR	SAYK	KSA	RIVG	DLVIGKY	HPHGDIAVYD ALVRMAQDFS...
2010/378	...ILYAMNDL	GV	GSR	SAYK	KSA	RIVG	DLVIGKY	HPHGDIAVYD ALVRMAQDFS...
2010/223	...ILYAMNDL	GV	GSR	SAYK	KSA	RIVG	DLVIGKY	HPHGDIAVYD ALVRMAQDFS...
2006/490H	...ILYAMNDL	GV	GSR	SAYK	KSA	RIVG	DLVIGKY	HPHGDIAVYD ALVRMAQDFS...

Figure 36 : Alignement de la gyrase A de nos souches avec la souche de référence *C. jejuni* NCTC11168.

L'acide aminé surligné en jaune correspond à la Thr en position 86 remplacée par une Ile dans les autres souches.

3.3 Résistance enzymatique aux β -lactamines

La présence du gène *bla_{OXA-61}*, codant pour la β -lactamase la plus fréquemment retrouvée chez *Campylobacter*, a été recherchée dans les douze génomes séquencés dans notre étude. Dix souches possèdent ce gène dont huit ont l'inversion nucléotidique G→T dans leur région

promotrice permettant l'expression de son activité (Figure 37). Seules ces huit dernières sont résistantes aux aminopénicillines.

```

ATCGATGGATTGCTTTAATGGTTACAATTTTAGAAAATTCAGTTCATGTTAAAGGATATTTAAATTAAAAATAAAGCTTTA
AAAAGTATTTTGTTTTAAAAATTATTTAAATAGAAAGATATTTTATGAAAAAATAACTTTATTTTTACTTTTTCTTAAATTT
AGTGTTTGGGCAAGATAAGATATTAATAAATTGGTTTAAAGAATATAATACAAGCGGCACTTTTGTTTTTTTATGATGGAA
AACTTGGGCGAGTAACGACTTTTCAAGGGCTATGGAGACTTTCTCTCCGCTTCCACTTTTAAATTTTTAATGCTCTA
ATTGCACTTGATAGTGGTGTGATAAAAACTAAAAAGAAATTTTTTATCACTATAGAGGTGAAAAAGTATTTTTATCTTC
TTGGGCGCAAGATATGAATTTAAGTTCAGCTATAAAATATTCTAATGTTCTTGCTTTTAAAGAAGTGGCAAGAAGAATTG
GTATCAAACTATGCAAGAATATTTAAACAAGCTTCATTATGGTAATGCTAAAATTTCCAAGATCGATACTTTTTGGCTT
GACAACTCACTAAAAATAAGCGCTAAAGAACAAGCAATTTTGCTTTTTAGACTTTCACAAAATAGCTTACCTTTTTCTCA
AGAAGCAATGAATAGTGTTAAGGAAATGATTTATTTAAAAAATATGGAAAATTTAGAGCTTTTGGAAAAACAGGTTTTA
ATGATGAGCAAAAAATTGCTTGGATTGTAGGTTTTGTGTATTTAAAGATGAAAATAAATATAAGGCTTTTCGCGCTAAAT
TTAGATATTGATAAATTTGAAGATTTATATAAAAGAGAAAAAATTTAGAAAATATTTAGATGAACTTGTATAAAAAAGT
TAAAAATGATGGCTAG

```

Figure 37 : Séquence nucléotidique du gène *bla*_{OXA-61} et de son promoteur.

Promoteur en gris, inversion nucléotidique G→T en jaune et séquence de *bla*_{OXA-61}.

Une autre protéine annotée en tant que métallobéta-lactamase a été retrouvée dans trois *C. jejuni* différents (*C. jejuni* 2006/1293, *C. jejuni* 2009/2424 et *C. jejuni* 2014/105H). Cette enzyme est en fait une glyoxalase II qui n'est pas associée, comme précédemment démontré, à la résistance aux β-lactamines et ne présente pas d'orthologue chez *C. coli* (140).

3.4 Gènes de résistance aux macrolides et aux lincosamides

La mutation A2075G de l'ARNr 23S est présente dans toutes les souches résistantes à l'érythromycine et absente dans les autres souches. Par ailleurs, le gène *erm(B)* n'a été retrouvé dans aucune souches résistantes.

Un probable nouveau gène de résistance codant pour une lincosamides O-nucléotidyltransférases a été mis en évidence dans deux souches (*C. coli* 2010/378 et *C. jejuni* 2014/105H). Après évaluation de la sensibilité à l'érythromycine, la clindamycine et la lincomycine chez les deux souches présentant ce nouveau gène, appelé *lnu(G)*, la souche *C. coli* 2010/378 est résistante aux trois antibiotiques (phénotype MLS_B probable) tandis que la souche *C. jejuni* 2014/105H est résistante uniquement à la lincomycine. Cette résistance isolée à la lincomycine est très probablement liée à la présence de ce nouveau gène de résistance.

La construction de l'arbre phylogénétique des lincosamide O-nucléotidyltransférases fait suite à celui établi par Petinaki *et al.* (141) et intègre la probable nouvelle enzyme de résistance à la

lincomycine dénommée Lnu(G). Cette dernière est proche phylogénétiquement de Lnu(C) et de Lnu(D) (Figure 38).

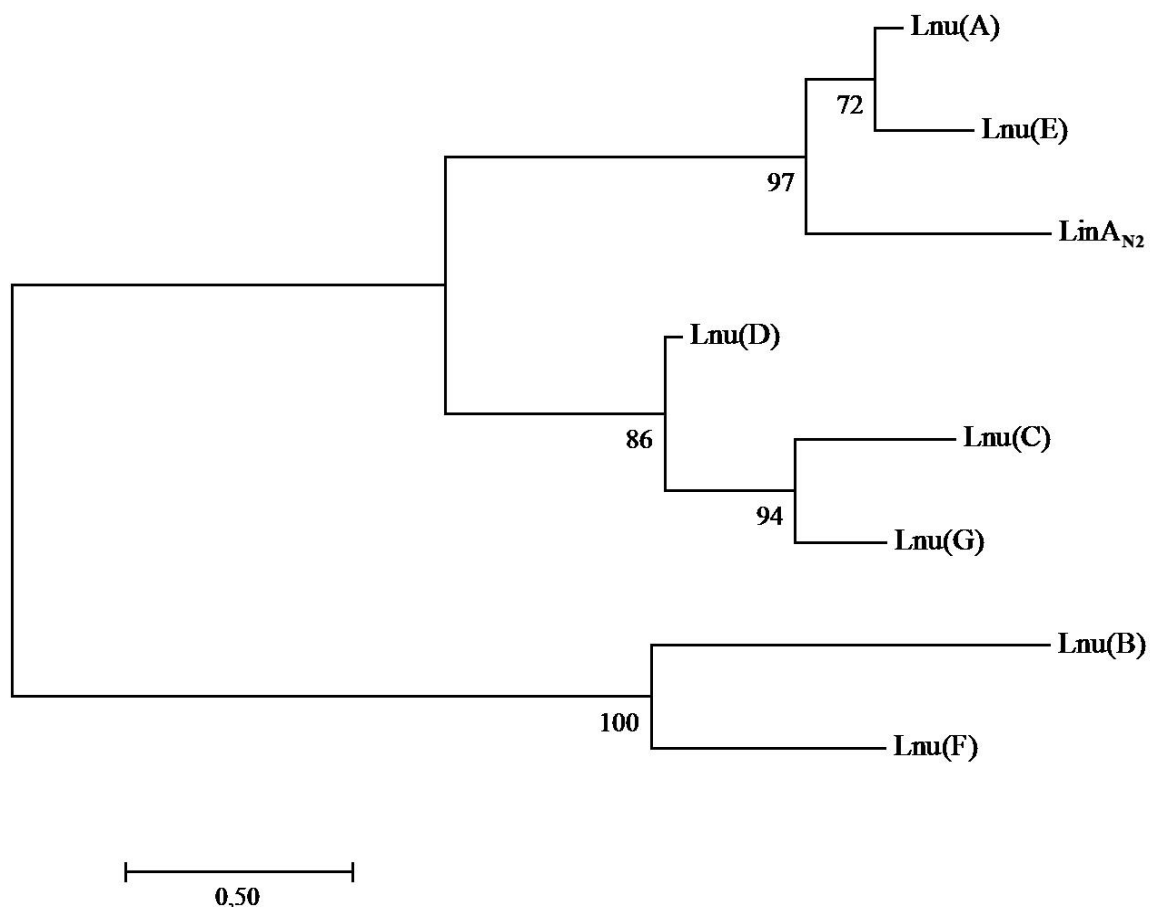


Figure 38 : Relations phylogénétiques entre les différentes lincosamide O-nucléotidyltransférases (séquences protéiques).

Numéros d'accèsion GenBank : Lnu(A) (NC_019146.1, *S. aureus*), LinA_{N2} (AAF74724, *B. fragilis*), Lnu(B) ou LinB (AF110130.1 *E. faecium*), Lnu(C) (AY928180.1, *Streptococcus agalactiae*), Lnu(D) (EF452177.1, *Streptococcus uberis*), Lnu(E) (KF287643.1), Lnu(F) (EU118119.1, *Salmonella enterica*).

4. Corrélation génotype/phénotype de résistance

La totalité des souches de notre étude sont résistantes à la ciprofloxacine et possèdent la mutation Thr-86-Ile du gène *gyrA*. La corrélation entre le phénotype de résistance et le génotype pour ce gène est donc de 100%.

Il en est de même pour le gène *tet(O)* qui est présent dans toutes les souches qui sont elles aussi toutes résistantes aux tétracyclines.

La corrélation entre génotype et phénotype de résistance est totale entre la présence de *bla*_{OXA-61}, son promoteur muté et la résistance aux aminopénicillines. En effet, dix souches possèdent ce gène mais seulement huit sont résistantes et ces huit souches résistantes ont toutes la

transversion G→T dans leur promoteur permettant l'expression de l'activité de la β-lactamase. Les quatre isolats n'ayant pas *bla_{OXA-61}* ou ayant *bla_{OXA-61}* avec un promoteur non muté restent donc sensibles. La corrélation est donc elle aussi de 100% pour les souches sensibles.

Pour les macrolides, la corrélation entre la présence de la mutation A2075G et la résistance à l'érythromycine est parfaite avec 100% des souches résistantes la possédant et suffit pour affirmer son rôle. Il n'a pas été retrouvé de gène *erm(B)* dans ces mêmes souches.

Concernant les aminoglycosides, la corrélation génotype/phénotype est plus complexe à établir compte tenu de la présence de nombreux gènes de résistance connus ou supposés parmi certaines souches (deux à sept gènes sans tenir compte des probables AAC(3)s et GNATs). Pour la gentamicine, les douze souches sont résistantes contact au disque sauf la souche *C. coli* 226199 (diamètre d'inhibition = 12 mm). Cette dernière est d'ailleurs la seule souche qui ne possède pas, dans son génome une APH(2"), connue pour conférer, entre autres, cette résistance. En s'intéressant aux CMI, on constate d'ailleurs logiquement, que le *C. coli* 226199 a une CMI plus faible (8 mg/L versus ≥ 32 mg/L pour les autres souches) (Tableau 11). Cette résistance, que l'on peut qualifier de limite ou intermédiaire, s'explique en fait par la présence du gène *apmA*, codant pour une aminocyclitol acétyltransférase et conférant une résistance à l'apramycine. En effet, les rares publications dans lesquelles est étudié cette enzyme, les souches présentent aussi une résistance intermédiaire à la gentamicine, sans autre gène de résistance identifié pouvant l'expliquer, avec des CMI également évaluées à 8 mg/L (134,143). C'est la première fois que ce gène est retrouvé dans une souche de *Campylobacter*.

En considérant et supposant que la nouvelle APH(2") identifiée dans cinq souches de ce travail, l'APH(2")-Ii, possède un profil de résistance similaire aux autres enzymes de sa famille et que le gène *apmA* est responsable de la résistance intermédiaire à la gentamicine de la souche 226199, la corrélation phénotype/génotype de résistance à cet antibiotique serait de 100%.

La corrélation entre la présence d'une ANT(6) et la résistance *in vitro* à la streptomycine est de 100% en considérant que la nouvelle ANT(6)-Ig est fonctionnelle. C'est presque le cas pour la résistance à la spectinomycine dont seule une souche (*C. coli* 2012/873), parmi les huit souches résistantes à cet antibiotique, ne possède pas d'ANT(9). Concernant cette dernière, une recherche d'APH(9), autre gène de résistance à la spectinomycine, a été réalisée, mais elle a été infructueuse. De plus, une recherche de mutation du gène *rpsE*, codant pour la protéine S5 de la sous-unité 30S du ribosome bactérien et ayant été précédemment décrite chez *E. coli*, *Pasteurella multocida* et *Neisseria gonorrhoeae* (143–145), a été réalisée et n'a pas retrouvé d'anomalie. Enfin, l'analyse de la séquence nucléotidique de l'ARNr 16S de la petite sous-unité du ribosome a permis d'identifier une transition C1273T qui pourrait être à l'origine de la résistance. En effet, cette mutation correspond à la substitution C1192T (numérotation de *E. coli*) de la partie supérieure de l'hélice 34

identifiée chez *E. coli* ainsi que chez d'autres espèces bactériennes et conférant une résistance de haut niveau à la spectinomycine (146–149). Des investigations supplémentaires seront, bien entendu, nécessaires pour l'affirmer. La corrélation génotype/phénotype serait donc de 100% pour la spectinomycine en considérant que l'ANT(9) tronquée de la souche *C. coli* 2006/490H est fonctionnelle, que le gène *spw* tronqué de la souche *C. coli* 2014/1809 l'est aussi et que la mutation C1273T du *C. coli* 2012/873 est bien en cause.

Tableau 28 : Corrélation entre phénotype et génotype de résistance au sein des souches de *Campylobacter* séquencées dans ce travail

Classe d'antibiotique	Antibiotique(s) testé(s)	Nombre de souches R (n = 12)	Gène(s) de résistance ou mutation(s) correspondant au phénotype de résistance	Corrélation entre génotype et phénotype (%)
Aminoglycosides	Gen	12	<i>aph(2'')-IIIa</i> , <i>aph(2'')-If</i> , <i>aph(2'')-Ii₁</i> , <i>aph(2'')-Ii₂</i> , <i>apmA</i>	100 (12/12)
	Kan	12	<i>aph(2'')-IIIa</i> , <i>aph(2'')-If</i> , <i>aph(2'')-Ii₁</i> , <i>aph(2'')-Ii₂</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>aac</i>	100 (12/12)
	Tob	12	<i>aph(2'')-IIIa</i> , <i>aph(2'')-If</i> , <i>aph(2'')-Ii₁</i> , <i>aph(2'')-Ii₂</i>	100 (12/12)
	Str	7	<i>ant(6)-If</i> , <i>ant(6)-Ig</i>	100 (7/7)
	Spc	8	<i>ant(9)-Ic</i> , <i>spw*</i> , ARNr 16S C1192T	100 (8/8)
Tétracyclines	Tet	12	<i>tet(O)</i>	100 (12/12)
Quinolones	Cip	12	GyrA Thr-86-Ile	100 (12/12)
β-lactamines	Amp	8	<i>bla_{OXA-61}</i> G→T	100 (8/8)
Macrolides	Ery	6	ARNr 23S A2075G	100 (6/6)

Gen, gentamicine ; Kan, kanamycine ; Tob, tobramycine ; Stp, streptomycine ; Spc, spectinomycine ; Tet, tétracycline ; Cip, ciprofloxacine ; Amp, ampicilline ; Ery, érythromycine

Discussion

Un des objectifs majeurs de ce travail était d'identifier les gènes de résistances aux antibiotiques à partir du séquençage génome entier de souches de *Campylobacter* multirésistantes de manière à établir une corrélation entre le génotype et le phénotype de résistance et permettant de prédire ce dernier. Ce faisant, 17 gènes de résistance ou mutations associées à des résistances ont été identifiés avec, parmi eux, de nouveaux gènes codant pour des enzymes modificatrices d'aminoglycosides ainsi qu'un probable nouveau gène de résistance à la lincomycine. D'autre part, les essais de conjugaisons réalisés avaient pour but de montrer que ces gènes de résistance, quand ils sont portés par un plasmide, peuvent diffuser d'une souche de *Campylobacter* à une autre par transmission horizontale.

1. Identifications des gènes de résistance aux antibiotiques et corrélation avec le phénotype

Un premier screening des gènes de résistance au sein des génomes annotés dans ce travail via RAST a, tout d'abord, permis d'orienter vers les types d'enzymes présents au sein de chaque génome. L'analyse dans BLAST de ces séquences protéiques ou nucléotidiques codant pour des probables enzymes ou gènes de résistance a permis de mieux caractériser leurs fonctions (domaines conservés) permettant ainsi de les classer dans leurs familles respectives et éventuellement de les identifier formellement pour les enzymes déjà caractérisées dans la littérature. Cela a, en outre, permis d'évaluer leur pourcentage d'identité et d'homologie avec des protéines déjà connues. Dans un second temps, l'alignement des probables enzymes de résistance entre elles et avec les enzymes connues de la littérature a été une étape indispensable complémentaire pour identifier ces enzymes.

Les protéines identifiées comme des probables aminoglycoside N-acétyltransférases de type 3 (AAC(3)s) dans les souches de ce travail ne donnent que très peu d'homologie avec les celles connues dans la littérature (97). Elles semblent donc génétiquement assez éloignées d'enzymes connues pour acétyler les aminoglycosides et il n'est donc pas possible de prédire un quelconque phénotype de résistance associé. Cependant le gène *aac* décrit par Nirdnoy *et al.* (111) et codant pour une acétyltransférase de type GNAT est retrouvé parmi les GNATs de certaines de nos souches et semble conférer une résistance à la kanamycine dans cette précédente étude (autres aminoglycosides non testés). Ceci ouvre une porte pour des explorations futures sur ce type d'enzyme. En effet, l'étude du profil de résistance complet aux aminoglycosides et du mode d'action de cette enzyme serait particulièrement intéressant ainsi que celui des autres AAC(3)s et

GNATs présentes chez *Campylobacter*. Ces dernières pourraient constituer elles-mêmes des enzymes de résistance, à défaut d'avoir été étudiées, dont l'importance dans l'émergence et la diffusion des résistances aux aminoglycosides serait probablement sous-estimée. La présence du gène *aac* dans des îlots MDR semblables, à la fois dans la souche de Nirdnoy *et al.* (111) et dans les nôtres, suggère par ailleurs sa probable dissémination au sein des *Campylobacter* MDR résistants aux aminoglycosides.

La découverte du gène *apmA* de résistance à l'apramycine et conférant une résistance intermédiaire à la gentamicine permet d'expliquer le phénotype particulier de la souche *C. coli* 226199, seule souche ne possédant pas d'APH(2"). Ce gène a été identifié en premier lieu dans des souches de SARM de séquence type 398 issus de bovins et porcins en Allemagne, souvent considérés comme des contaminants de la peau et des muqueuses et qui ont été impliqués, à de rares occasions, dans des infections chez le porc (136). L'apramycine est un antibiotique de la famille des aminoglycosides uniquement utilisé en médecine vétérinaire pour des infections à bactéries Gram négatives de type *Salmonella* ou *Escherichia coli* chez le porc mais aussi dans d'autres élevages animaliers. Classiquement les résistances à l'apramycine sont médiées via l'AAC(3) de type IV, le plus souvent localisée au niveau plasmidique chez les entérobactéries, et conférant une résistance croisée à la gentamicine (142). Ce n'est pas le cas dans notre souche de *Campylobacter* qui possède une acétyltransférase de type ApmA et qui est donc, pour la première fois retrouvée chez ce genre bactérien, ce qui implique qu'elle a été héritée probablement d'un *Staphylococcus aureus*, par transfert génétique horizontal. Une étude plus récente, portant sur des plasmides véhiculant le gène *apmA*, a retrouvé ce dernier chez des SARMs et des SASMs isolés d'élevage de porcs au Portugal (150). Ce n'est probablement pas une coïncidence si notre souche qui la porte soit la seule qui provienne de viande de porc, qui plus est d'origine portugaise.

Concernant les aminoglycosides phosphotransférases, elles sont omniprésentes dans toutes les souches de ce travail. On trouve une APH(3')-IIIa dans 9 souches dont 2 possèdent son gène dans le cluster *aadE*-sat4-aphA-3* précédemment décrit (111). Cette enzyme est bien connue chez *Campylobacter* et souvent retrouvée dans les souches résistantes à la kanamycine. La diversité des APH(2")s identifiées paraît plus intéressante à étudier. Six souches présentent des APH(2")s connues (APH(2")-IIIa et APH(2")-If) tandis que cinq autres possèdent, chacune, une des deux APH(2")s nouvellement identifiées dans ce travail et dénommées APH(2")-Ii₁ et APH(2")-Ii₂. Ces deux APH(2")s présentant plus de 96% d'identité (97% d'homologie), il semblerait qu'elles représentent deux variants d'une même enzyme. A titre de comparaison, il existe quatre exemplaires différents décrits à ce jour de l'APH(2")-If (108). Les résultats expérimentaux (conjugaisons) suggèrent que le phénotype de résistance à la gentamicine de ces souches est probablement dû à la présence de cette nouvelle phosphotransférase de type APH(2")-Ii.

En s'intéressant aux niveaux de CMI à la gentamicine, on constate que les trois souches possédant l'APH(2'')-Ii₁ ont toutes des CMI élevées (>256 mg/L), ce qui n'est pas le cas des deux souches ayant l'APH(2'')-Ii₂ (CMI = 64 mg/L). Le variant 1 conférerait donc potentiellement un plus haut niveau de résistance à la gentamicine que l'autre. Une autre souche présente une CMI à la gentamicine > 256 mg/L (*C. coli* 2006/550) mais celle-ci ne paraît pas explicable par la seule présence de l'APH(2'')-If dont le niveau de CMI conféré est évalué à 32 mg/L dans la littérature (110) ce qui semble compatible avec les CMI des deux autres souches de notre étude arborant cette même enzyme (*C. jejuni* 2014/105H, CMI = 32 mg/L ; *C. coli* 2010/378, CMI = 96 mg/L). On peut donc supposer qu'il y a probablement une autre enzyme ou un autre mécanisme de résistance non identifié se surajoutant à l'effet de l'APH(2'')-If dans cette souche.

La présence d'îlots génomique de multirésistance aux aminoglycosides très similaires d'une souche de *Campylobacter* à l'autre suggère que ces îlots ont, soit été transmis par recombinaison homologue, soit été intégrés à l'aide d'éléments génétiques mobiles (transposons), soit dérivent de plasmides ayant perdu leur capacité de se répliquer et ont été par la suite intégrés au génome cellulaire. En effet, l'environnement génétique des gènes de résistances aux aminoglycosides de nos souches paraît assez conservé. Pas moins de six souches possèdent une phosphorylase, intacte ou tronquée, associée à un gène codant pour une ANT(9). La nouvelle ANT(6) (ANT(6)-Ig) est systématiquement entourée d'une hélicase et d'une NAD(P)H-oxdoréductase. Cette dernière a été décrite peu de temps avant l'édition de ce mémoire, par une équipe finlandaise qui a confirmé sa capacité à induire une résistance à la streptomycine à la fois chez *Campylobacter* mais aussi chez *E. coli* (151). Ce gène, appelé *ant-like gene A* dans cette précédente publication, semble d'ailleurs particulièrement disséminé parmi *C. coli* et inhérent à cette espèce. D'autres gènes d'intérêt constituent l'environnement génétique de nos souches séquencées comme la transposase du *C. coli* 2010/378 au sein de l'îlot de multirésistance. La souche *C. jejuni* 2009/2424 possède des gènes particulièrement intéressants codant pour un transposon, une enzyme de réplication et une enzyme de recombinaison plasmidique. La présence de ces gènes codant pour des transposases ou enzymes plasmidiques constituent autant d'indices soutenant les hypothèses sus-citées.

La mise en évidence d'un nouveau gène de résistance à la lincomycine (*lnu(G)*) chez deux espèces de *Campylobacter* est particulièrement intrigante. Le mécanisme principal de résistance aux lincosamides est la méthylation de l'adénine en position 2058 de l'ARNr 23S par une ARN méthyltransférase codée par le gène *erm* et conférant une résistance croisée aux macrolides et à la streptogramine B (Phénotype MLS_B) (152). Cependant, il existe un mécanisme de résistance spécifique aux lincosamides par inactivation enzymatique via des phosphotransférases ou des nucléotidyltransférases. Ces dernières, appelées lincosamides O-nucléotidyltransférases, sont codées par des gènes *lnu* (anciennement *lin*). Le gène *lnu(C)* a été décrit pour la première fois chez

une souche de *Streptococcus agalactiae* résistante à la lincomycine mais sensible à la clindamycine ainsi qu'à l'érythromycine et aux streptogramines (152) contrastant avec le phénotype habituel MLS_B. Ce gène a été retrouvé récemment et pour la première fois chez *Campylobacter* par Zhao *et al.* (106). *lnu(D)* a, pour sa part, été découvert chez *Streptococcus uberis* mais n'a pas encore été décrit chez *Campylobacter* (141). Ces gènes *lnu* semblent provenir de nucléotidyltransférases ancestrales d'actinobactéries qui n'étaient pas originellement des enzymes de résistance aux lincosamides mais qui ont probablement évolué comme tel par la pression de sélection des antibiotiques après transfert horizontal chez des bactéries pathogènes (153).

En tenant compte de la nouvelle APH(2'')-Ii, de la nouvelle ANT(6) identifiée (ANT(6)-Ig), des gènes *spw* (bien que partiel) et *apmA* décrit pour la première fois chez *Campylobacter*, de la probable implication des GNATs dans le phénotype de résistance, de la découverte d'un probable nouveau gène *lnu(G)* de résistance à la lincomycine ainsi que de la description d'un nouveau cluster de résistance atypique (*aadE**-*sat4**-*aph(2'')-IIIa*), l'analyse de génomes entiers de *Campylobacter* multirésistants est particulièrement propice à l'étude et à la découverte de nouveaux gènes de résistance.

La corrélation globale entre génotype et phénotype de résistance pour les aminoglycosides est excellente. La seule discordance qui paraissait exister pour la spectinomycine chez la souche *C. coli* 2012/873, est gommée, *a priori*, par l'identification de la mutation C1192T de l'ARNr 16S découverte pour la première fois chez *Campylobacter*.

La corrélation entre le génotype/phénotype de résistance est de 100% pour les tétracyclines, quinolones, aminopénicillines et macrolides, ce qui laisse transparaître que l'analyse de génomes par NGS pour la recherche des gènes de résistance est un excellent moyen pour prédire le phénotype de résistance à ces antibiotiques.

Ces résultats confirment ceux de précédentes études ayant elles-mêmes utilisées le NGS chez *Campylobacter* pour analyser les gènes de résistances et les corrélés au phénotype. De nouveaux gènes de résistance sont régulièrement décrits et l'excellente corrélation génotype/phénotype de résistance est comparable aux résultats obtenus dans ce travail (106,108,111,112,151). L'identification de ces nouvelles enzymes ou mécanismes de résistance aux antibiotiques décrits pour la première fois chez *Campylobacter* en analysant seulement 12 génomes entiers montre le potentiel énorme que cette technique peut apporter à la microbiologie actuelle.

Néanmoins, il semble y avoir encore quelques limites à la prédiction génotypique des résistances aux antibiotiques. Celle-ci repose sur des connaissances approfondies des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques concernés et la disposition de base de données de gènes de résistances connus. Elle ne permet pas d'identifier formellement des mécanismes de résistance

qui n'ont pas encore été élucidés. De plus, la technologie NGS permet l'obtention d'un génome fragmenté assemblé ensuite en contigs pouvant rendre certains gènes indétectables et pouvant rendre difficile la détermination de la localisation chromosomique ou plasmidique des gènes de résistance. Enfin, le niveau d'expression des gènes ainsi que les effets synergiques de divers mécanismes de résistance ne sont pas évaluables par WGS alors qu'ils peuvent avoir une grande influence sur les niveaux de CMI.

2. Échanges génétiques et dissémination des résistances

Des plasmides conjugatifs contenant des gènes de résistance ont été identifiés dans trois souches. Ils contiennent tous *tet(O)* plus ou moins des gènes de résistance aux aminoglycosides et sont similaires à d'autres plasmides décrits chez *Campylobacter* dans la littérature. La réussite de la conjugaison du plasmide pCJ2640 dans la souche *C. jejuni* 2015/64 a confirmé les résistances portées par celui-ci et démontre que ce type de plasmide peut diffuser horizontalement dans d'autres souches de *Campylobacter* dans des conditions expérimentales, comme cela a déjà été montré dans la littérature (46,48,111,130). De ces observations, on pourrait extrapoler que ce phénomène serait possible de façon naturelle dans des conditions environnementales favorables. La fréquence de transfert obtenue est relativement comparable à celles observées dans de nombreuses publications. Les plasmides pCJ1293 du *C. jejuni* 2006/1293 et pCJ2640 sont assez similaires dans leur construction au plasmide pTet (45,2 kb) de la souche *C. jejuni* 81-176 et pCC31 (44,7 kb) du *C. coli* CC31 portant lui aussi un gène de résistance à la tétracycline et un T4SS (48). Il en est de même avec le plasmide pN29710-1 (55 kb) du *C. coli* N29710 (112) contenant de nombreux gènes de résistance aux aminoglycosides. En comparant notre plasmide conjugatif pCJ2640 avec ces 4 autres plasmides, on obtient des pourcentages d'identité entre 89% et 98% (79-90% de la séquence nucléotidique couverte). Ces plasmides associés à un système de sécrétion de type IV (T4SS) semblent assez répandus parmi les populations de *Campylobacter* et plus particulièrement dans les souches résistantes aux tétracyclines. Ces T4SS permettent des échanges génétiques et semblent indispensables à la conjugaison bactérienne. Il semblerait que l'utilisation des tétracyclines chez les animaux d'élevage ait largement contribué à la dissémination de ces plasmides (48). Ils sont également capables d'arborer d'autres gènes de résistance et de contribuer à l'émergence de souches multirésistantes.

L'identification des gènes *spw** et *apmA*, pour la première fois retrouvés chez *Campylobacter* et issus de staphylocoques et d'entérocoques, démontre, une fois de plus, que des échanges génétiques entre des espèces d'autres genres bactériens et *Campylobacter* sont possibles et peuvent contribuer à l'émergence de résistance via des mécanismes non soupçonnés au départ.

Perspectives

L'analyse du génome de *Campylobacter* comme alternative aux antibiogrammes classiques semble prometteuse. Elle peut prédire et affirmer précisément le phénotype de résistance d'une bactérie à un antibiotique donné pour lequel le(s) mécanisme(s) est (sont) préalablement connu(s). Par ailleurs, la démocratisation du séquençage génomique, dont les techniques et les coûts ont considérablement évolué ces dernières années les rendant plus accessibles aux laboratoires non spécialisés et structures ayant un volume analytique important, pourrait, dans un futur proche, contribuer à remplacer l'antibiogramme classique. De plus, alors que l'antibiogramme permet de ne tester qu'un panel limité d'antibiotique, les données du séquençage génome entier peuvent révéler la totalité des éléments génétiques associés aux résistances, incluant les antibiotiques non testés à l'antibiogramme. Et cela serait, bien entendu, extensible à la totalité des espèces bactériennes isolées. Enfin, la connaissance étendue des gènes de résistance parmi les populations bactériennes semble cruciale de manière à développer de nouvelles stratégies pour combattre ces résistances aux antibiotiques et améliorer les systèmes de surveillance. À titre d'exemple, des moyens pour contrer l'action des enzymes modificatrices d'aminoglycosides émergent avec le développement de nouvelles molécules comme la plazomicine, capable d'échapper à presque toutes ces enzymes de résistance, ou la mise au point d'inhibiteurs enzymatiques ou de l'expression des gènes de résistance (97,98,154–156). Malgré tout, les meilleures stratégies pour lutter contre l'émergence des résistances restent la promotion d'une utilisation raisonnable des antibiotiques, à la fois en médecine humaine, animale et dans l'industrie agroalimentaire ainsi qu'un renforcement des moyens de surveillance et de contrôle de ces résistances.

Bibliographie

1. Organization WH, others. The global view of Campylobacteriosis: report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, 9-11 July 2012. 2013 [cited 2015 Oct 11]; Available from: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/80751>
2. Heikema AP, Islam Z, Horst-Kreft D, Huizinga R, Jacobs BC, Wagenaar JA, et al. *Campylobacter jejuni* capsular genotypes are related to Guillain–Barré syndrome. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Sep;21(9):852.e1-852.e9.
3. Aarestrup FM, Bager F, Jensen NE, Madsen M, Meyling A, Wegener HC. Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic-, zoonotic- and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). *APMIS*. 1998 Jul 1;106(7–12):745–70.
4. Pacanowski J, Lalande V, Lacombe K, Boudraa C, Lesprit P, Legrand P, et al. *Campylobacter* Bacteremia: Clinical Features and Factors Associated with Fatal Outcome. *Clin Infect Dis*. 2008 Sep 15;47(6):790–6.
5. Ma L, Wang Y, Shen J, Zhang Q, Wu C. Tracking *Campylobacter* contamination along a broiler chicken production chain from the farm level to retail in China. *Int J Food Microbiol*. 2014 Jul 2;181:77–84.
6. Center for Disease Control and Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Enteric Bacteria 2011 Human Isolates Final Report 2011. [Internet]. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services; 2013 [cited 2015 Nov 15]. Available from: <http://www.cdc.gov/narms/pdf/2011-annual-report-narms-508c.pdf>
7. Kist M. Who discovered *Campylobacter jejuni/coli* ? A review of hitherto disregarded literature. *Zentralblatt Für Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene Medizinische Mikrobiologie Infektionsdisziplin Virologie Parasitologie*. 1986 Apr;261(2):177–86.
8. Butzler J-P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Oct;10(10):868–76.
9. Luangtongkum T. *Campylobacter* spp. in conventional and organic poultry operations [Internet]. The Ohio State University; 2005 [cited 2015 Oct 11]. Available from: https://etd.ohiolink.edu/!etd.send_file?accession=osu1123790867&disposition=inline
10. King EO. Human Infections with *Vibrio Fetus* and a Closely Related *Vibrio*. *J Infect Dis*. 1957 Sep 1;101(2):119–28.
11. Moore JE, Corcoran D, Dooley JSG, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, et al. *Campylobacter*. *Vet Res*. 2005 May;36(3):351–82.
12. Euzéby J. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature : a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol*. 1997;(47):590–592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>).

13. Revez J, Schott T, Llarena A-K, Rossi M, Hänninen M-L. Genetic heterogeneity of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 upon human infection. *Infect Genet Evol.* 2013 Jun;16:305–9.
14. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature.* 2000;403(6770):665–668.
15. Lior H, Woodward DL, Edgar JA, Laroche LJ, Gill P. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J Clin Microbiol.* 1982 May 1;15(5):761–8.
16. Kapperud G, Lassen J, Lauwers S, Rosef O. Serotyping and biotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from sporadic cases and outbreaks in Norway. *J Clin Microbiol.* 1984 Feb 1;19(2):157–60.
17. Lastovica AJ, Goddard EA, Argent AC. Guillain-Barré Syndrome in South Africa Associated with *Campylobacter jejuni* O:41 Strains. *J Infect Dis.* 1997 Dec 1;176(Supplement 2):S139–43.
18. Revez J, Llarena A-K, Schott T, Kuusi M, Hakkinen M, Kivistö R, et al. Genome analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from a waterborne outbreak. *BMC Genomics.* 2014;15(1):768.
19. Cody AJ, McCarthy ND, Jansen van Rensburg M, Isinkaye T, Bentley SD, Parkhill J, et al. Real-Time Genomic Epidemiological Evaluation of Human *Campylobacter* Isolates by Use of Whole-Genome Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol.* 2013 Aug;51(8):2526–34.
20. Grada A, Weinbrecht K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *J Invest Dermatol.* 2013 Aug;133(8):e11.
21. Ali A, Soares SC, Santos AR, Guimarães LC, Barbosa E, Almeida SS, et al. *Campylobacter fetus* subspecies: Comparative genomics and prediction of potential virulence targets. *Gene.* 2012 Oct;508(2):145–56.
22. Wilson DL, Rathinam VAK, Qi W, Wick LM, Landgraf J, Bell JA, et al. Genetic diversity in *Campylobacter jejuni* is associated with differential colonization of broiler chickens and C57BL/6J IL10-deficient mice. *Microbiology.* 2010 Jul;156(Pt 7):2046–57.
23. Jerome JP, Bell JA, Plovanich-Jones AE, Barrick JE, Brown CT, Mansfield LS. Standing Genetic Variation in Contingency Loci Drives the Rapid Adaptation of *Campylobacter jejuni* to a Novel Host. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 Jan 24 [cited 2015 Nov 29];6(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3025981/>
24. Sheppard SK, Maiden MCJ. The Evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Aug 1;7(8):a018119.
25. Ketley JM, Konkel ME. *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology.* Horizon Scientific Press; 2005. 464 p.
26. Mégraud F, Bessède E, Lehours P. *Campylobacter.* *Encycl Méd Chir.* 2012;8(1):1–8.
27. Van Cauteren D, Lehours P, Bessède E, De Valk H, Mégraud F. Bilan de la surveillance des infections à *Campylobacter* chez l’homme en France en 2015 [Internet]. Institut de veille sanitaire, Département des maladies infectieuses, Saint-Maurice; 2016 [cited 2016 Feb 20] p. 5.

Available from: <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Campylobacter/Donnees-epidemiologiques-des-infections-a-Campylobacter-en-France>

28. Mégraud F, Boudraa G, Bessaoud K, Bensid S, Dabis F, Soltana R, et al. Incidence of *Campylobacter* infection in infants in western Algeria and the possible protective role of breast feeding. *Epidemiol Infect.* 1990 Aug;105(1):73–8.
29. Lehours P, Aladjidi N, Sarlangue J, Mégraud F. Infections à *Campylobacter* chez l'enfant. *Arch Pédiatrie.* 2012 Jun;19(6):629–34.
30. Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ. Experimental *Campylobacter jejuni* Infection in Humans. *J Infect Dis.* 1988 Mar 1;157(3):472–9.
31. Teunis P, Van den Brandhof W, Nauta M, Wagenaar J, Van den Kerkhof H, Van Pelt W. A reconsideration of the *Campylobacter* dose-response relation. *Epidemiol Infect.* 2005 Aug;133(4):583–92.
32. Bolton DJ. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiol.* 2015 Jun;48:99–108.
33. Jones MA, Marston KL, Woodall CA, Maskell DJ, Linton D, Karlyshev AV, et al. Adaptation of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 to High-Level Colonization of the Avian Gastrointestinal Tract. *Infect Immun.* 2004 Jul 1;72(7):3769–76.
34. Fernando U, Biswas D, Allan B, Willson P, Potter AA. Influence of *Campylobacter jejuni* *fliA*, *rpoN* and *flgK* genes on colonization of the chicken gut. *Int J Food Microbiol.* 2007 Sep 15;118(2):194–200.
35. Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V, Monteville MR, Biswas D, Raphael B, et al. Secretion of Virulence Proteins from *Campylobacter jejuni* Is Dependent on a Functional Flagellar Export Apparatus. *J Bacteriol.* 2004 Jun 1;186(11):3296–303.
36. Song YC, Jin S, Louie H, Ng D, Lau R, Zhang Y, et al. FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. *Mol Microbiol.* 2004 Jul 1;53(2):541–53.
37. Krause-Gruszczynska M, Alphen LB van, Oyarzabal OA, Alter T, Hänel I, Schliephake A, et al. Expression patterns and role of the CadF protein in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2007 Sep 1;274(1):9–16.
38. Monteville MR, Yoon JE, Konkel ME. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology.* 2003;149(1):153–65.
39. Man SM. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011 Dec;8(12):669–85.
40. Godschalk PCR, Heikema AP, Gilbert M, Komagamine T, Ang CW, Glerum J, et al. The crucial role of *Campylobacter jejuni* genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barré syndrome. *J Clin Invest.* 2004 Dec 1;114(11):1659–65.
41. Lavigne J-P, Botella E, O'Callaghan D. Les systèmes de sécrétions de type IV et leurs effecteurs. *Pathol Biol.* 2006 May;54(5):296–303.

42. Fronzes R, Schäfer E, Wang L, Saibil HR, Orlova EV, Waksman G. Structure of a Type IV Secretion System Core Complex. *Science*. 2009 Jan 9;323(5911):266–8.
43. Fischer W, Haas R, Odenbreit S. Type IV secretion systems in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol IJMM*. 2002 Sep;292(3–4):159–68.
44. Backert S, Meyer TF. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Apr;9(2):207–17.
45. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*. 2013 Aug;303(6–7):298–304.
46. Schmidt-Ott R, Pohl S, Burghard S, Weig M, Groß U. Identification and characterization of a major subgroup of conjugative *Campylobacter jejuni* plasmids. *J Infect*. 2005 Jan;50(1):12–21.
47. Bacon DJ, Alm RA, Burr DH, Hu L, Kopecko DJ, Ewing CP, et al. Involvement of a Plasmid in Virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun*. 2000 Aug;68(8):4384–90.
48. Batchelor RA. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiology*. 2004 Oct 1;150(10):3507–17.
49. Ó Cróinín T, Backert S. Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism? *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:25.
50. Young KT, Davis LM, DiRita VJ. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Sep;5(9):665–79.
51. Floch P, Pey V, Castroviejo M, Dupuy JW, Bonneu M, de la Guardia AH, et al. Role of *Campylobacter jejuni* gamma-glutamyl transpeptidase on epithelial cell apoptosis and lymphocyte proliferation. *Gut Pathog*. 2014 Jun 12;6:20.
52. Fernandez-Cruz A, Munoz P, Mohedano R, Valerio M, Marin MP, Alcalá LP, et al. *Campylobacter* Bacteremia: Clinical Characteristics, Incidence, and Outcome Over 23 Years. *Medicine (Baltimore)*. 2010 Sep;89(5):319–30.
53. Thompson SA. *Campylobacter* Surface-Layers (S-Layers) and Immune Evasion. *Ann Periodontol Am Acad Periodontol*. 2002 Dec;7(1):43–53.
54. Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, et al. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut*. 2000 Dec 1;47(6):804–11.
55. Lecuit M, Lortholary O. Maladie immunoproliférative de l'intestin grêle associée à *Campylobacter jejuni*. *Médecine Mal Infect*. 2005 Jun;35, Supplement 2:S56–8.
56. Martiny D, Dediste A, Debruyne L, Vlaes L, Haddou NB, Vandamme P, et al. Accuracy of the API Campy system, the Vitek 2 Neisseria–Haemophilus card and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Campylobacter* and related organisms. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Jul;17(7):1001–6.
57. Ménard A, Datchet F, Prouzet-Mauleon V, Oleastro M, Mégraud F. Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to identify the main pathogenic *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Apr;11(4):281–7.

58. Mandrell RE, Harden LA, Bates A, Miller WG, Haddon WF, Fagerquist CK. Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*, and *C. upsaliensis* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Oct;71(10):6292–307.
59. Benejat L, Gravet A, Sifré E, Ben Amor S, Quintard B, Mégraud F, et al. Characterization of a *Campylobacter fetus*-like strain isolated from the faeces of a sick leopard tortoise (*Stigmochelys pardalis*) using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight as an alternative to bacterial 16S rDNA phylogeny. *Lett Appl Microbiol.* 2014 Apr 1;58(4):338–43.
60. Gilbert MJ, Kik M, Miller WG, Duim B, Wagenaar JA. *Campylobacter iguaniorum* sp. nov., isolated from reptiles. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(3):975–82.
61. Gómez-Camarasa C, Gutiérrez-Fernández J, Rodríguez-Granger JM, Sampedro-Martínez A, Sorlózano-Puerto A, Navarro-Marí JM. Evaluation of the rapid RIDAQUICK *Campylobacter*® test in a general hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014 Feb;78(2):101–4.
62. Granato PA, Chen L, Holiday I, Rawling RA, Novak-Weekley SM, Quinlan T, et al. Comparison of Premier CAMPY Enzyme Immunoassay (EIA), ProSpecT *Campylobacter* EIA, and ImmunoCard STAT! CAMPY Tests with Culture for Laboratory Diagnosis of *Campylobacter* Enteric Infections. *J Clin Microbiol.* 2010 Nov;48(11):4022–7.
63. Penner JL, Hennessy JN. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J Clin Microbiol.* 1980 Dec;12(6):732–7.
64. Kovanen SM, Kivistö RI, Rossi M, Schott T, Kärkkäinen U-M, Tuuminen T, et al. Multilocus Sequence Typing (MLST) and Whole-Genome MLST of *Campylobacter jejuni* Isolates from Human Infections in Three Districts during a Seasonal Peak in Finland. *J Clin Microbiol.* 2014 Dec 1;52(12):4147–54.
65. Lombard B, Danan C, Agbessi A, Laloux L. BEH Hors-série - Risques microbiologiques alimentaires dans les produits d'origine animale : surveillance et évaluation. Systèmes de surveillance des microorganismes dans la chaîne alimentaire : finalités, base réglementaire et organisation en France [Internet]. Institut de veille sanitaire; 2012. Available from: http://www.invs.sante.fr/content/download/36107/174711/version/4/file/beh_hors-serie_2012.pdf
66. Ge B, Wang F, Sjölund-Karlsson M, McDermott PF. Antimicrobial resistance in *Campylobacter*: Susceptibility testing methods and resistance trends. *J Microbiol Methods.* 2013 Oct;95(1):57–67.
67. CASFM. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie - Recommandations Février 2016 V.1.0 [Internet]. Société Française de Microbiologie; 2016. Available from: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFMV2_030915.pdf
68. Sifré E, Salha BA, Ducournau A, Floch P, Chardon H, Mégraud F, et al. EUCAST recommendations for antimicrobial susceptibility testing applied to the three main *Campylobacter* species isolated in humans. *J Microbiol Methods.* 2015 Dec;119:206–13.
69. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry (Mosc).* 2014 Mar 18;53(10):1565–74.

70. Wang Y, Huang WM, Taylor DE. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Mar;37(3):457–63.
71. Luo N, Pereira S, Sahin O, Lin J, Huang S, Michel L, et al. Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 18;102(3):541–6.
72. Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol.* 2009 Mar;4(2):189–200.
73. Ge B, McDermott PF, White DG, Meng J. Role of Efflux Pumps and Topoisomerase Mutations in Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Aug;49(8):3347–54.
74. Gibreel A, Sjögren E, Kaijser B, Wretling B, Sköld O. Rapid Emergence of High-Level Resistance to Quinolones in *Campylobacter jejuni* Associated with Mutational Changes in *gyrA* and *parC*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Dec;42(12):3276–8.
75. Luo N, Sahin O, Lin J, Michel LO, Zhang Q. In Vivo Selection of *Campylobacter* Isolates with High Levels of Fluoroquinolone Resistance Associated with *gyrA* Mutations and the Function of the CmeABC Efflux Pump. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Jan;47(1):390–4.
76. Payot S, Bolla J-M, Corcoran D, Fanning S, Mégraud F, Zhang Q. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect.* 2006 Jun;8(7):1967–71.
77. Ruiz J, Moreno A, Jimenez de Anta MT, Vila J. A double mutation in the *gyrA* gene is necessary to produce high levels of resistance to moxifloxacin in *Campylobacter* spp. clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2005 Jun;25(6):542–5.
78. Pumbwe L, Randall LP, Woodward MJ, Piddock LJV. Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiple-antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Aug 1;54(2):341–7.
79. Chatzipanagiotou S, Ioannidou V, Ioannidis A, Nicolaou C, Papavasileiou E, Chaniotaki S, et al. Absence of the plasmid-mediated quinolone resistance *qnrA* gene among *Campylobacter jejuni* clinical isolates from Greece. *Int J Antimicrob Agents.* 2005 Sep;26(3):261–2.
80. Li W, Atkinson GC, Thakor NS, Allas Ü, Lu C, Chan K-Y, et al. Mechanism of Tetracycline Resistance by Ribosomal Protection Protein Tet(O). *Nat Commun.* 2013 Feb 12;4:1477.
81. Connell SR, Trieber CA, Dinos GP, Einfeldt E, Taylor DE, Nierhaus KH. Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. *EMBO J.* 2003 Feb 17;22(4):945–53.
82. Pratt A, Korolik V. Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Apr 1;55(4):452–60.
83. Dasti JI, Groß U, Pohl S, Lugert R, Weig M, Schmidt-Ott R. Role of the plasmid-encoded *tet(O)* gene in tetracycline-resistant clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Med Microbiol.* 2007;56(6):833–7.

84. Gibreel A, Sköld O, Taylor DE. Characterization of plasmid-mediated *aphA-3* kanamycin resistance in *Campylobacter jejuni*. *Microb Drug Resist*. 2004;10(2):98–105.
85. Kersulyte D, Mukhopadhyay AK, Shirai M, Nakazawa T, Berg DE. Functional Organization and Insertion Specificity of IS607, a Chimeric Element of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 2000 Oct;182(19):5300–8.
86. Guay GG, Rothstein DM. Expression of the *tetK* gene from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*: comparison of substrate specificities of TetA(B), TetA(C), and TetK efflux proteins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Feb;37(2):191–8.
87. Abdi-Hachesoo B, Khoshbakht R, Sharifiyazdi H, Tabatabaei M, Hosseinzadeh S, Asasi K. Tetracycline Resistance Genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Isolated From Poultry Carcasses. *Jundishapur J Microbiol* [Internet]. 2014 Sep [cited 2016 Jan 20];7(9). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4255377/>
88. Griggs DJ, Peake L, Johnson MM, Ghori S, Mott A, Piddock LJV. β -Lactamase-Mediated β -Lactam Resistance in *Campylobacter* Species: Prevalence of Cj0299 (*bla_{OXA-61}*) and Evidence for a Novel β -Lactamase in *C. jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Aug 1;53(8):3357–64.
89. Zeng X, Brown S, Gillespie B, Lin J. A single nucleotide in the promoter region modulates the expression of the β -lactamase OXA-61 in *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother*. 2014 May 1;69(5):1215–23.
90. Aarestrup FM, Nielsen EM, Madsen M, Engberg J. Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Oct;41(10):2244–50.
91. Zhou J, Zhang M, Yang W, Fang Y, Wang G, Hou F. A seventeen-year observation of the antimicrobial susceptibility of clinical *Campylobacter jejuni* and the molecular mechanisms of erythromycin-resistant isolates in Beijing, China. *Int J Infect Dis*. 2016 Jan;42:28–33.
92. Han F, Pu S, Wang F, Meng J, Ge B. Fitness cost of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Nov;34(5):462–6.
93. Zeitouni S, Collin O, Andraud M, Ermel G, Kempf I. Fitness of Macrolide Resistant *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Microb Drug Resist*. 2012 Feb 10;18(2):101–8.
94. Gibreel A, Kos VN, Keelan M, Trieber CA, Levesque S, Michaud S, et al. Macrolide Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Molecular Mechanism and Stability of the Resistance Phenotype. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul 1;49(7):2753–9.
95. Wang Y, Zhang M, Deng F, Shen Z, Wu C, Zhang J, et al. Emergence of multidrug-resistant *Campylobacter* species isolates with a horizontally acquired rRNA methylase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Sep;58(9):5405–12.
96. Cagliero C, Mouline C, Payot S, Cloeckert A. Involvement of the CmeABC efflux pump in the macrolide resistance of *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Nov 1;56(5):948–50.
97. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*. 2010 Dec;13(6):151–71.

98. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Jul 1;16(3):430–50.
99. Ferretti JJ, Gilmore KS, Courvalin P. Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2''-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. *J Bacteriol.* 1986 Aug 1;167(2):631–8.
100. Rouch DA, Byrne ME, Kong YC, Skurray RA. The *aacA-aphD* Gentamicin and Kanamycin Resistance Determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: Expression and Nucleotide Sequence Analysis. *Microbiology.* 1987;133(11):3039–52.
101. Trieu-Cuot P, Courvalin P. Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5''-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene.* 1983 Sep;23(3):331–41.
102. Derbise A, Dyke KGH, El Solh N. Characterization of a *Staphylococcus aureus* Transposon, Tn5405, Located within Tn5404 and Carrying the Aminoglycoside Resistance Genes, *aphA-3* and *aadE*. *Plasmid.* 1996 May;35(3):174–88.
103. Schwarz FV, Perreten V, Teuber M. Sequence of the 50-kb Conjugative Multiresistance Plasmid pRE25 from *Enterococcus faecalis* RE25. *Plasmid.* 2001 Nov;46(3):170–87.
104. Tenover FC, Elvrum PM. Detection of two different kanamycin resistance genes in naturally occurring isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988 Aug 1;32(8):1170–3.
105. Tenover FC, Gilbert T, O'Hara P. Nucleotide sequence of a novel kanamycin resistance gene, *aphA-7*, from *Campylobacter jejuni* and comparison to other kanamycin phosphotransferase genes. *Plasmid.* 1989 Jul;22(1):52–8.
106. Zhao S, Tyson GH, Chen Y, Li C, Mukherjee S, Young S, et al. Whole-Genome Sequencing Analysis Accurately Predicts Antimicrobial Resistance Phenotypes in *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2016 Jan 15;82(2):459–66.
107. Toth M, Chow JW, Mobashery S, Vakulenko SB. Source of Phosphate in the Enzymic Reaction as a Point of Distinction among Aminoglycoside 2''-Phosphotransferases. *J Biol Chem.* 2009 Mar 13;284(11):6690–6.
108. Zhao S, Mukherjee S, Chen Y, Li C, Young S, Warren M, et al. Novel gentamicin resistance genes in *Campylobacter* isolated from humans and retail meats in the USA. *J Antimicrob Chemother.* 2015 May 1;70(5):1314–21.
109. Qin S, Wang Y, Zhang Q, Chen X, Shen Z, Deng F, et al. Identification of a Novel Genomic Island Conferring Resistance to Multiple Aminoglycoside Antibiotics in *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Oct 1;56(10):5332–9.
110. Toth M, Frase H, Antunes NT, Vakulenko SB. Novel Aminoglycoside 2''-Phosphotransferase Identified in a Gram-Negative Pathogen. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jan;57(1):452–7.
111. Nirdnoy W, Mason CJ, Guerry P. Mosaic Structure of a Multiple-Drug-Resistant, Conjugative Plasmid from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jun 1;49(6):2454–9.
112. Chen Y, Mukherjee S, Hoffmann M, Kotewicz ML, Young S, Abbott J, et al. Whole-Genome Sequencing of Gentamicin-Resistant *Campylobacter coli* Isolated from U.S. Retail Meats

- Reveals Novel Plasmid-Mediated Aminoglycoside Resistance Genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Nov;57(11):5398–405.
113. Zalacain M, González A, Guerrero MC, Mattaliano RJ, Malpartida F, Jiménez A. Nucleotide sequence of the hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygroscopicus*. *Nucleic Acids Res.* 1986 Feb 25;14(4):1565–81.
 114. Gritz L, Davies J. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 1983 Nov;25(2–3):179–88.
 115. Abril C, Brodard I, Perreten V. Two Novel Antibiotic Resistance Genes, tet(44) and ant(6)-Ib, Are Located within a Transferable Pathogenicity Island in *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jul;54(7):3052–5.
 116. Mégraud F, Prouzet-Mauleon V. BEH N°32-33 - Évolution de la résistance des *Campylobacters* aux antibiotiques en France (1986-2002). Institut de veille sanitaire, Saint Maurice; 2004.
 117. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013 [Internet]. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) and EFSA (European Food Safety Authority); 2015 [cited 2016 Feb 20] p. 178. (EFSA Journal 2015). Report No.: 13(2):4036. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-zoonotic-bacteria-humans-animals-food-EU-summary-report-2013.pdf>
 118. Center for Disease Control and Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS) : Human Isolates Final Report, 2013 [Internet]. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services; 2015 [cited 2016 Feb 20]. Available from: <http://www.cdc.gov/narms/pdf/2013-annual-report-narms-508c.pdf>
 119. Ghosh R, Uppal B, Aggarwal P, Chakravarti A, Jha AK. Increasing Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* Isolated from Paediatric Diarrhea Cases in A Tertiary Care Hospital of New Delhi, India. *J Clin Diagn Res JCDR.* 2013 Feb;7(2):247–9.
 120. Mukherjee P, Ramamurthy T, Bhattacharya MK, Rajendran K, Mukhopadhyay AK. *Campylobacter jejuni* in Hospitalized Patients with Diarrhea, Kolkata, India. *Emerg Infect Dis.* 2013 Jul;19(7):1155–6.
 121. Guyard-Nicodème M, Rivoal K, Houard E, Rose V, Quesne S, Mourand G, et al. Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* from chicken meat sold in French retail outlets. *Int J Food Microbiol.* 2015 Jun 16;203:8–14.
 122. Kempf I, Mourand G, Châtre P, Haenni M, Santolini J, Madec J-Y. BEH Hors-série - Risques microbiologiques alimentaires dans les produits d'origine animale : surveillance et évaluation. Antibiorésistance de *Campylobacter* dans différentes filières animales (avicole, bovine, porcine) en France : principales tendances [Internet]. Institut de veille sanitaire; 2012. Available from: http://www.invs.sante.fr/content/download/36107/174711/version/4/file/beh_hors-serie_2012.pdf
 123. Center for Disease Control and Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System Integrated Report : 2012-2013 [Internet]. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services; 2014 [cited 2016 Feb 21]. Available from:

<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/ucm059103.htm>

124. Chen X, Naren G-W, Wu C-M, Wang Y, Dai L, Xia L-N, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. *Vet Microbiol*. 2010 Jul 29;144(1–2):133–9.
125. Wang Y, Dong Y, Deng F, Liu D, Yao H, Zhang Q, et al. Species shift and multidrug resistance of *Campylobacter* from chicken and swine, China, 2008–14. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Nov 14;dkv382.
126. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Apr;20(4):O255–66.
127. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan 1;42(D1):D206–14.
128. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*. 2008 Feb 8;9:75.
129. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*. 1988 Nov 25;16(22):10881–90.
130. Taylor DE, De Grandis SA, Karmali MA, Fleming PC. Transmissible plasmids from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1981;19(5):831–835.
131. Hadrys H, Balick M, Schierwater B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol*. 1992 May 1;1(1):55–63.
132. Takamiya M, Ozen A, Rasmussen M, Alter T, Gilbert T, Ussery DW, et al. Genome Sequence of *Campylobacter jejuni* strain 327, a strain isolated from a turkey slaughterhouse. *Stand Genomic Sci*. 2011 Apr 25;4(2):113–22.
133. Akiba M, Lin J, Barton Y-W, Zhang Q. Interaction of CmeABC and CmeDEF in conferring antimicrobial resistance and maintaining cell viability in *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Jan 1;57(1):52–60.
134. Poly F, Threadgill D, Stintzi A. Genomic diversity in *Campylobacter jejuni*: identification of *C. jejuni* 81-176-specific genes. *J Clin Microbiol*. 2005 May;43(5):2330–8.
135. Favrot L, Blanchard JS, Vergnolle O. Bacterial GCN5-related N-acetyltransferases: From Resistance to Regulation. *Biochemistry (Mosc)* [Internet]. 2016 Jan 27 [cited 2016 Jan 31]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01269>
136. Feßler AT, Kadlec K, Schwarz S. Novel Apramycin Resistance Gene *apmA* in Bovine and Porcine Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jan 1;55(1):373–5.
137. Wendlandt S, Li B, Lozano C, Ma Z, Torres C, Schwarz S. Identification of the novel spectinomycin resistance gene *spw* in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Jul 1;68(7):1679–80.

138. Li B, Wendlandt S, Yao J, Liu Y, Zhang Q, Shi Z, et al. Detection and new genetic environment of the pleuromutilin–lincosamide–streptogramin A resistance gene *lsa(E)* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of swine origin. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Jun 1;68(6):1251–5.
139. Lozano C, Aspiroz C, Sáenz Y, Ruiz-García M, Royo-García G, Gómez-Sanz E, et al. Genetic environment and location of the *lnu(A)* and *lnu(B)* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci of animal and human origin. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Dec 1;67(12):2804–8.
140. Alfredson DA, Korolik V. Identification of putative zinc hydrolase genes of the metallo- β -lactamase superfamily from *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007 Feb 1;49(1):159–64.
141. Petinaki E, Guérin-Faublée V, Pichereau V, Villers C, Achard A, Malbruny B, et al. Lincomycin Resistance Gene *lnu(D)* in *Streptococcus uberis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Feb 1;52(2):626–30.
142. Kadlec K, Feßler AT, Hauschild T, Schwarz S. Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Aug;18(8):745–55.
143. Ilina E, Malakhova M, Bodoev I, Filimonova A, Oparina N, Govorun V. Mutation in ribosomal protein S5 leads to spectinomycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Resist Chemother.* 2013;4:186.
144. Kehrenberg C, Schwarz S. Mutations in 16S rRNA and Ribosomal Protein S5 Associated with High-Level Spectinomycin Resistance in *Pasteurella multocida*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Jun 1;51(6):2244–6.
145. Unemo M, Golparian D, Skogen V, Olsen AO, Moi H, Syversen G, et al. *Neisseria gonorrhoeae* Strain with High-Level Resistance to Spectinomycin Due to a Novel Resistance Mechanism (Mutated Ribosomal Protein S5) Verified in Norway. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Feb 1;57(2):1057–61.
146. Galimand M, Gerbaud G, Courvalin P. Spectinomycin Resistance in *Neisseria* spp. Due to Mutations in 16S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 May 1;44(5):1365–6.
147. Poggi D, Giuseppe PO de, Picardeau M. Antibiotic Resistance Markers for Genetic Manipulations of *Leptospira* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Jul 15;76(14):4882–5.
148. O'Connor M, Dahlberg AE. Isolation of Spectinomycin Resistance Mutations in the 16S rRNA of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Expression in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Curr Microbiol.* 2002 Dec;45(6):0429–33.
149. Brink MF, Brink G, Verbeet M, Boer HA de. Spectinomycin interacts specifically with the residues G1064 and C1192 in 16S rRNA, thereby potentially freezing this molecule into an inactive conformation. *Nucleic Acids Res.* 1994 Feb 11;22(3):325–31.
150. Kadlec K, Feßler AT, Couto N, Pomba CF, Schwarz S. Unusual small plasmids carrying the novel resistance genes *dfrK* or *apmA* isolated from methicillin-resistant or -susceptible staphylococci. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Oct 1;67(10):2342–5.

151. Olkkola S, Culebro A, Juntunen P, Hänninen M-L, Rossi M. Functional genomics in *Campylobacter coli* identified a novel streptomycin resistance gene located in a hypervariable genomic region. *Microbiology* [Internet]. 2016 [cited 2016 May 14]; Available from: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000304.v1>
152. Achard A, Villers C, Pichereau V, Leclercq R. New *Inu(C)* Gene Conferring Resistance to Lincomycin by Nucleotidylation in *Streptococcus agalactiae* UCN36. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul 1;49(7):2716–9.
153. Stogios PJ, Evdokimova E, Morar M, Koteva K, Wright GD, Courvalin P, et al. Structural and Functional Plasticity of Antibiotic Resistance Nucleotidyltransferases Revealed by Molecular Characterization of Lincosamide Nucleotidyltransferases Lnu(A) and Lnu(D). *J Mol Biol*. 2015 Jun 19;427(12):2229–43.
154. Landman D, Kelly P, Bäcker M, Babu E, Shah N, Bratu S, et al. Antimicrobial activity of a novel aminoglycoside, ACHN-490, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from New York City. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Feb 1;66(2):332–4.
155. Karaiskos I, Souli M, Giamarellou H. Plazomicin: an investigational therapy for the treatment of urinary tract infections. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015 Nov 2;24(11):1501–11.
156. Syue L-S, Chen Y-H, Ko W-C, Hsueh P-R. New drugs for the treatment of complicated intra-abdominal infections in the era of increasing antimicrobial resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Apr;47(4):250–8.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Adrien FABRE

Analyse du génome de *Campylobacter* : une alternative aux antibiogrammes classiques ?

Thèse de Docteur en Pharmacie, Bordeaux, 2016, 134 p.

Résumé:

Les bactéries du genre *Campylobacter* sont des bactéries impliquées en pathologie humaine, le plus souvent dans des infections intestinales de type entérite et ont pour origine, dans la majorité des cas, les animaux d'élevage (volailles, porcins) consommés dans l'alimentation. Le traitement antibiotique de ces infections entériques, bien que non systématique, est souvent conduit à l'aide de macrolides ou fluoroquinolones mais les infections systémiques peuvent nécessiter l'utilisation d'aminoglycosides comme la gentamicine. Des études récentes rapportent une augmentation de l'incidence de souches de *Campylobacter* présentant une résistance à la gentamicine. Par ailleurs, de telles souches présentent fréquemment de multiples résistances associées ce qui limite les alternatives thérapeutiques.

L'analyse de douze génomes entiers de *Campylobacter* multirésistants a permis d'identifier de nouveaux gènes codant pour des enzymes modificatrices d'aminoglycosides ainsi qu'un probable nouveau gène de résistance à la lincomycine. Par ailleurs, des gènes de résistance connus dans d'autres genres bactériens ont été mis en évidence pour la première fois chez *Campylobacter*. La corrélation entre génotype et phénotype est de 100 % pour les tétracyclines, les quinolones, l'ampicilline, l'érythromycine et les aminoglycosides suggérant que l'analyse du génome de *Campylobacter* est un outil très performant pour la surveillance des résistances aux antibiotiques et pourrait constituer à l'avenir un substitut de l'antibiogramme. D'autre part, les essais de conjugaisons réalisés ont permis de montrer que ces gènes de résistance, quand ils sont portés par un plasmide, peuvent diffuser d'une souche de *Campylobacter* à une autre par transmission horizontale et ainsi contribuer à leur dissémination et à l'émergence de souches multirésistantes.

Whole-genome sequence analysis of *Campylobacter* : an alternative to conventional antimicrobial susceptibility testing ?

Campylobacter are bacteria involved in human pathology, usually in enteritis infection, and are caused, in most cases, by farm animals (poultry, pigs) consumed in foodstuffs. Antibiotic treatment of these enteric infections, although not systematic, is often conducted using macrolides and fluoroquinolones but severe systemic infections may require the use of aminoglycosides such as gentamicin. Recent studies report an increased incidence of *Campylobacter* strains resistant to gentamicin. Furthermore, such strains frequently have multiple resistances which limit therapeutic alternatives.

Whole-genome analysis of twelve multiresistant *Campylobacter* leads up to identify novel genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and a probable new gene associated with lincomycin resistance. Moreover, some resistance genes previously described in other bacteria have been identified for the first time in *Campylobacter*. A perfect correlation between genotype and phenotype was found for tetracyclines, quinolones, ampicillin, erythromycin and aminoglycosides suggesting that the analysis of *Campylobacter* genomes is a powerful tool for monitoring antibiotic resistance and could be, in the future, a substitute for classic antibiotic susceptibility testing. Finally, conjugations experiments have shown that these resistance genes, when carried by a plasmid, can transfer to another strain of *Campylobacter* by horizontal transmission, thus contributing to its dissemination and the emergence of multiresistant strains.

Mots clés:

Antibiotiques

Génome

Résistance

Aminoglycosides

Génotype

Séquençage

Campylobacter

Multirésistance

Université de Bordeaux - U.F.R des Sciences Pharmaceutiques

146 rue Léo Saignat - 33076 Bordeaux cedex