Université de Bordeaux

U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2016 N° 3127

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement à Bordeaux le 21 octobre 2016 par

Naël ZEMALI

Né le 28 janvier 1985 à Jonzac (17)

Génotypage et détection des mutations de *gyrA* par PCR HRM de *Campylobacter* isolé chez l'Homme et l'animal à La Réunion

Directeur : Dr Julien JAUBERT
Rapporteur : Pr Charles CAZANAVE

Jury

Pr F. MEGRAUD	Professeur des Universités, Praticien Hospitalier	Président
Dr I. ACCOCEBERRY	Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier	Assesseur
Dr B. ROQUEBERT	Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier	Assesseur
Dr P. GERARDIN	Praticien Hospitalier	Assesseur
Dr J. JAUBERT	Praticien Hospitalier	Directeur

Ce travail est dédié à la mémoire du Dr Alain Michault, décédé le 5 août 2015.

Il est l'initiateur de ce projet et de bien d'autres tant il débordait d'idées. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir accepté au sein de son laboratoire et de m'avoir associé à certains de ses projets pour pouvoir m'enseigner la Biologie Moléculaire. Nul doute que son compagnonnage au quotidien pendant presque deux années a modelé mon esprit de jeune microbiologiste et ma manière de pratiquer cette discipline dont il était le pionnier à l'île de La Réunion.

Je souhaite que nous ayons réussi à avancer ce travail dans l'esprit et la rigueur avec lesquels il avait commencé à le diriger.

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements :

Aux membres de mon jury :

Au ***Pr F. Mégraud*** (PU-PH / Chef de service du laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux / Directeur du CNR Campylobacters et Helicobacters) pour avoir accepté de présider mon jury de thèse et d'apporter son expertise sur le sujet. Merci aussi pour les conseils dans le déroulement des travaux (tant sur *Campylobacter* que sur *Helicobacter* !) et pour l'aide apportée *via* le CNR.

Au ***Dr J. Jaubert*** (PH au laboratoire de Bactériologie / Virologie au CHU Sud Réunion de Saint-Pierre) pour la reprise de la direction de ce travail, le temps dédié et les innombrables mais néanmoins souvent très pertinents conseils. Merci aussi pour la formation au quotidien.

Au ***Dr I. Accoceberry*** (MCU-PH au laboratoire de Parasitologie / Mycologie au CHU de Bordeaux) pour avoir accepté d'être membre de mon jury et de m'avoir accueilli au laboratoire pour l'un de mes meilleurs stages d'internat ! Merci aussi d'avoir œuvré pour que je puisse suivre le M2 sur Bordeaux.

Au ***Dr B. Roquebert*** (MCU-PH au laboratoire de Bactériologie / Virologie au CHU Félix Guyon de Saint-Denis) pour avoir accepté d'être membre de mon jury et pour l'encadrement du DES à La Réunion.

Au ***Dr P. Gérardin*** (PH au Centre d'Investigation Clinique au CHU Sud Réunion de Saint-Pierre) pour avoir accepté d'être membre de mon jury et pour l'aide précieuse lors de la publication de mes travaux précédents.

Au ***Pr C. Cazanave*** (PU-PH au service des Maladies Infectieuses au CHU de Bordeaux) pour avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail après l'avoir déjà découvert et jugé lors de mon M2.

Aux personnes ayant contribué pour beaucoup au projet :

Au ***Dr E. Cardinale*** (Vétérinaire épidémiologiste et microbiologiste au CIRAD Réunion Mayotte) pour le soutien apporté dans l'encadrement du M2 et dans le financement du projet.

Au **Pr T. Noël** (Directeur de l'unité *Candida* et pathogénicité au Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité à l'Université de Bordeaux) pour l'accord à suivre le Master 2 MiMu qui nous a permis de commencer nos travaux.

A ***Lucie Bénéjat-Bruhl*** (Ingénieur au CNR Campylobacters et Helicobacters) pour la formation aux techniques utilisées au CNR en avril et novembre 2014 et pour le temps consacré.

A ***Florence Naze*** (Technicienne de biologie moléculaire au laboratoire de Bactériologie du CHU Sud Réunion de Saint-Pierre) pour son apport dans le bon déroulement des manipulations.

A ceux qui m'ont formé pendant presque 12 ans :

Au ***Pr M.E. Lafon*** (PU-PH au laboratoire de Virologie de Bordeaux) pour ses cours de Virologie passionnants, pour son initiation à la recherche dans le cadre des MSBM / UER et pour sa gentillesse.

Au ***Pr C. Bébéar*** (PU-PH au laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux et Coordonnatrice du D.E.S. de Biologie Médicale à l'Université de Bordeaux) pour avoir soutenu mes projets au cours de ma formation (maquette de formation en microbiologie, formation à l'Institut Pasteur, …).

Au ***Pr P. Lehours*** (PU-PH au laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux, Directeur adjoint du CNR Campylobacters et Helicobacters) pour ses conseils suite aux premiers travaux sur *Campylobacter* dans le cadre de mon M2.

Au ***Dr S. Picot*** (PH / Chef de service du laboratoire de Bactériologie / Virologie du CHU Sud Réunion de Saint-Pierre) pour l'accueil au laboratoire, pour sa formation pendant ces trois dernières années et sa souplesse dans l'organisation du planning !

Aux ***Dr A. Clabé***, ***V. Coulon***, ***N. Hamdani***, ***G. Hoarau***, ***C. Lemonnier***, ***H. Lheureux***, ***E. Magny***, et ***B. Rajoely*** (PH des laboratoires du CHU Sud Réunion de Saint-Pierre) pour l'ambiance sur le caillou !

A l'ensemble des ***Techniciens*** des laboratoires de Bactériologie, de Sérologie et de Biologie moléculaire du CHU Sud Réunion de Saint-Pierre qui rendent cet endroit formateur et convivial.

Aux ***Techniciens*** et ***Aides-labos*** des laboratoires du CHU de Bordeaux pour mes deux premières années d'internat. Merci entre autres à ***Lucie*** pour les bons moments passés au PTRR.

Et bien sûr à ma famille, à mes amis et aux belles rencontres faites durant ma formation :

A ***mes parents***, mon frère ***Yacine*** et ma sœur ***Delphine***.

A mes compagnons de galère de Médecine : ma chère ***Leste*** en tête, fidèle alliée de la P1 à la D4***, Sadaf*** (et ***Nabil***), ***Pascaline*** (et ***Arnaud***), ***Mélissa***, ***Marie D.***, ***Ben***, ***Paf***, ***Bibi***, ***Marie B.***, ***Jean, Stan, Antoine, Charlie***, ***Florent*** et les autres …

A mes co-internes et apparentés : ***Anne-Sophie***, ***Antoine, Benoît, Camille, Damien, Edona***, ***Elise***, ***Isabelle***, ***Marine***, ***Olivier***, ***Romain*** (et ***Mél***), ***Vincent***, … Mention spéciale pour ***Célia***, binôme de luxe de mon Internat bordelais.

A mes Amis : ***Audrey*** et ***Fred***, ***Julien***, ***Natha***, ***Seb***, …

A ***Manu***, pour la relecture, les bons plans et tout le reste !

A ***Loper***, *Canidus splendidus* d'exception.

A mon ***Asus UX302*** qui a supporté mes humeurs pendant ces quelques années de travail ;-)

A nous les fils d'Artaud …

Table des matières

Introduction 9

1 - Etat de l'art 11
1.1 - Caractéristiques microbiologiques 11
1.2 - Epidémiologie de *Campylobacter* 11
1.2.1 - Réservoirs 11
1.2.2 - Transmission à l'Homme 11
1.2.3 - Impact des infections à *Campylobacter* 12
1.2.4 - Caractéristiques épidémiologiques des infections chez l'Homme 13
1.2.4.1 - En France 13
1.2.4.2 - En Europe 14
1.2.4.3 - A La Réunion 15
1.2.4.4 - Dans les pays en voie de développement 16
1.2.5 - *Campylobacter* dans la filière animale 16
1.2.5.1 - En France chez le poulet 16
1.2.5.2 - En France chez le porc 17
1.2.5.3 - A La Réunion 17
1.3 - Pathogénicité de *Campylobacter* 17
1.4 - Prévention 18
1.4.1 - Prévention individuelle 18
1.4.2 - Prévention collective 18
1.5 - Manifestations cliniques de l'infection à *Campylobacter* 19
1.5.1 - Entérites 19
1.5.2 - Infections extra-intestinales 19
1.5.3 - Complications aiguës 19
1.5.4 - Complications post-infectieuses 19
1.6 - Diagnostic microbiologique de l'infection à *Campylobacter* 20
1.6.1 - Diagnostic direct 20
1.6.1.1 - Culture et identification 20
1.6.1.2 - Biologie moléculaire 21
1.6.1.3 - Tests immuno-enzymatiques 21
1.6.2 - Diagnostic indirect 21
1.7 - Résistance aux antibiotiques de *Campylobacter* 22
1.7.1 - Mécanismes de résistance 22
1.7.1.1 - Généralités 22
1.7.1.2 - Mécanismes de résistance aux quinolones 22
1.7.2 - Méthodes de détection des résistances 24
1.7.2.1 - Méthodes phénotypiques 24
1.7.2.2 - Méthodes moléculaires 24
1.7.3 - Epidémiologie des résistances en pathologie humaine 24
1.7.3.1 - En France 24
1.7.3.2 - En Europe 26
1.7.3.3 - A La Réunion 26
1.7.3.4 - Origine de la résistance en pathologie humaine 27
1.7.4 - Epidémiologie des résistances dans la filière animale 28
1.7.4.1 - En France 28
1.7.4.2 - En Europe 28
1.7.4.3 - A La Réunion 28
1.7.5 - Impact clinique de la résistance aux quinolones 28

1.8 - Traitement des campylobactérioses 29
1.8.1 - Traitement des entérites à *Campylobacter* 29
1.8.2 - Traitement des infections systémiques à *Campylobacter* 29
1.9 - Typage de *Campylobacter* 29
1.9.1 - Généralités sur le typage bactérien 29
1.9.2 - Méthodes de typage de *Campylobacter* 30
1.9.3 - Génotypage par PCR HRM 32
1.9.3.1 - Principe de la PCR HRM 32
1.9.3.2 - Génotypage par PCR HRM de *flaA* 33
1.9.3.3 - Génotypage par MLST *via* PCR HRM 33

2 - Matériels et méthodes 34
2.1 - Isolats bactériens, culture et extraction nucléique 34
2.1.1 - Isolats d'origine humaine 34
2.1.2 - Isolats d'origine animale 34
2.1.2.1 - Isolats d'origine aviaire 34
2.1.2.2 - Isolats d'origine porcine 35
2.1.3 - Identification bactérienne 35
2.1.4 - Extraction d'ADN 35
2.2 - Génotypage de *Campylobacter* 35
2.2.1 - Génotypage par PCR HRM de *flaA* 36
2.2.2 - Génotypage par MLST *via* PCR HRM 36
2.2.3 - Analyse des courbes HRM et clustering *via* le logiciel ScreenClust® 37
2.3 - Détection des mutations de *gyrA* par PCR HRM 41
2.3.1 - Profils de résistance phénotypiques des isolats testés 41
2.3.2 - Profils de résistance génotypiques des isolats testés 41
2.3.3 - Validation de la détection des mutations *gyrA* par séquençage 42
2.4 - Rendu des résultats finaux *via* le logiciel Phyloviz 42
2.5 - Validation des méthodes de biologie moléculaire 43

3 - Résultats 44
3.1 - Génotypage de *Campylobacter* 44
3.1.1 - Isolats inclus pour les techniques de génotypage 44
3.1.2 - Détermination des zones de pré-melt et post-melt 44
3.1.3 - Génotypage des isolats de *Campylobacter jejuni* 45
3.1.4 - Génotypage des isolats de *Campylobacter coli* 52
3.1.5 - Validation des méthodes de typage 52
3.2 - Détection des mutations de *gyrA* par PCR HRM 53
3.2.1 - Profils de résistance phénotypiques des isolats testés 53
3.2.2 - Profils de résistance génotypiques des isolats testés 54
3.2.3 - Validation de la détection des mutations *gyrA* par séquençage 56

4 - Discussion 57
4.1 - Génotypage de *Campylobacter* 57
4.1.1 - Méthodes de génotypage 57
4.1.2 - Résultats des travaux de génotypage 57
4.1.3 - Perspectives sur le génotypage de *Campylobacter* à La Réunion 59
4.2 - Détection des mutations de *gyrA* par PCR HRM 60
4.2.1 - Méthode de détection des mutations *gyrA* 60
4.2.2 - Résultats des travaux de détection des mutations *gyrA* 60
4.2.3 - Perspectives sur la détection des mutations de *gyrA* par PCR HRM 62

5 - Références bibliographiques 63

Tables des figures et tableaux

Table des figures

Figure 1 : Réservoirs, transmissions et clinique de l'infection à Campylobacter (d'après Kaakoush et al.) [19] 12
Figure 2 : Nombre de cas de C. jejuni et C. coli rapportés par mois en France en 2015 (CNR 2016) [22] 13
Figure 3 : Nombre de cas confirmés des 5 principales zoonoses en Europe en 2014 (d'après EFSA) [7] 14
Figure 4 : Répartition des espèces de Campylobacter isolées au CHU Sud Réunion de 2006 à 2015 15
Figure 5 : Nombre de C. jejuni et C. coli identifiés par année au CHU de Saint-Pierre de 2006 à 2015 15
Figure 6 : Campylobacter jejuni (cf flèches) à la coloration de Gram (Kamata et Tokuda, 2014) [48] 20
Figure 7 : Culture de Campylobacter jejuni sur gélose Karmali (Photographie personnelle) 21
Figure 8 : Mécanismes possibles de résistance aux quinolones (d'après Mérens et al.) [57] 23
Figure 9 : Résistance aux antibiotiques des Campylobacter isolés en France entre 1986 et 2014 (CNR 2015) [86] 25
Figure 10 : Evolution des méthodes de typage de Campylobacter jejuni (d'après Ahmed et al.) [103] 30
Figure 11 : Organisation des gènes fla et régions étudiées suivant les techniques de typage [107] 31
Figure 12 : Principe d'action des différents agents intercalants utilisés pour la PCR en temps réel [111] 32
Figure 13 : Principe de la PCR HRM (http://fr.wikipedia.org/wiki/High_Resolution_Melt) 33
Figure 14 : Normalisation des courbes HRM par ScreenClust® (Manuel ScreenClust®) [115] 38
Figure 15 : Création des courbes résiduelles par ScreenClust® (Manuel ScreenClust®, Qiagen) [115] 39
Figure 16 : Résultats rendus par ScreenClust® pour le typage de 40 C. jejuni via PCR HRM flaA 45
Figure 17 : Répartition des 74 isolats de C. jejuni typables au sein des clusters définis par ScreenClust® 46
Figure 18 : Arbre couvrant minimum des ST des C. jejuni typés 48
Figure 19 : Arbre couvrant minimum des ST des C. jejuni typés en fonction de l'année d'isolement 49
Figure 20 : Arbre couvrant minimum des ST des C. jejuni typés en fonction du lieu d'isolement 50
Figure 21 : Arbre couvrant minimum des ST des C. jejuni typés en fonction du typage flaA 51
Figure 22 : Répartition des 51 isolats de C. coli typables au sein des clusters définis par ScreenClust® 52
Figure 23 : Résultats rendus par ScreenClust® pour l'étude du profil de gyrA pour 33 (1) et 43 (2) C. jejuni 54
Figure 24 : Arbre couvrant minimum des ST des C. jejuni typés en fonction du profil gyrA. 55
Figure 25 : Alignement de la séquence gyrA de l'isolat 13R6 avec celle de l'isolat 14S6 56

Table des tableaux

Tableau 1 : Résistance de C. jejuni et C. coli isolés chez l'Homme en France en 2015 (CNR 2016) [22] 24
Tableau 2 : Résistances aux antibiotiques de C. jejuni et C. coli en Europe en 2014 (d'après EFSA 2016) [76] 26
Tableau 3 : Résistance de C. jejuni et C. coli identifiés au CHU Sud Réunion de 2013 à 2015 27
Tableau 4 : Principales techniques de génotypage de Campylobacter jejuni (d'après Ahmed et al.) [103] 30
Tableau 5 : Amorces utilisées pour la technique PCR HRM de flaA [107] 36
Tableau 6 : Amorces utilisées pour la technique MLST via HRM (Lévesque et al., 2011) [112] 37
Tableau 7 : Amorces utilisées pour la technique PCR HRM de gyrA [61] 41
Tableau 8 : Limites des zones « pré-melt » et « post-melt » retenues pour l'analyse HRM de chaque amplicon. 44
Tableau 9 : Caractéristiques des 76 C. jejuni génotypés chez l'Homme (NT : Non Typable, WT : Wild Type) 47
Tableau 10 : Reproductibilité, typabilité et index de pouvoir discriminant des techniques de typage 52
Tableau 11 : Sensibilité vis-à-vis des quinolones des 76 isolats de C. jejuni typés en gyrA 53

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CIRAD	Centre International en Recherche Agronomique pour le Développement
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CNR	Centre National de Référence
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUCAST	EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HRM	High Resolution Melt
InVS	Institut de Veille Sanitaire
LOS	Lipooligosaccharide
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight
MH	Mueller Hinton
MHF	Mueller Hinton Fastidious
MLST	MultiLocus Sequence Typing
MST	Minimum Spanning Tree
PC	Composante Principale (Principal Component)
PDB	Paires De Bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR BIT	PCR Binary Typing
PCR DGGE	PCR Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
PCR SSCP	PCR Single Strand Conformation Polymorphism
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PVX	PolyViteX
QRDR	Quinolone Resistance Determining Region
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
rep-PCR	Repetitive Element PCR
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ST	Sequence Type
SVR	Short Variable Region
Tm	Température de fusion

Introduction

Campylobacter est un bacille Gram négatif responsable d'une maladie zoonotique : la campylobactériose. Les volailles sont considérées comme étant le réservoir naturel de *Campylobacter jejuni* et le porc celui de *Campylobacter coli* [1]. La transmission à l'Homme de cette bactérie est essentiellement indirecte et repose principalement sur la manipulation et la consommation d'aliments contaminés (viandes de volailles notamment) [2–6].

Les campylobactérioses sont actuellement considérées comme la première étiologie de gastro-entérites aiguës infectieuses et comme la première cause de maladies infectieuses d'origine alimentaire chez l'Homme dans les pays développés [7]. En France, l'incidence annuelle des campylobactérioses est presque trois fois supérieure à celle des salmonelloses [8]. La morbidité associée à ces infections se traduit par une augmentation des consultations médicales, des arrêts de travail et des frais d'hospitalisations [9]. Les coûts engendrés pour les systèmes de santé publique et en termes de pertes de productivité sont évalués à près de 2,4 milliards d'euros chaque année pour l'ensemble de l'Union Européenne [10]. L'impact sanitaire et économique des campylobactérioses fait de cette pathologie un problème de santé publique majeur. La prévention de ces infections repose sur la mise en œuvre de mesures de lutte à tous les stades de la chaîne alimentaire, de la production agricole au niveau d'une ferme jusqu'à la transformation, la fabrication et la préparation des aliments en milieu industriel ou domestique.

A La Réunion, les données épidémiologiques sur *Campylobacter* sont parcellaires. Au CHU Sud Réunion de Saint-Pierre, on observe depuis 10 ans une augmentation quasi-continue des isolements humains de *Campylobacter* provenant de laboratoires d'analyse de biologie médicale privés ou de patients hospitalisés. Chez l'animal, des études récentes ont montré une forte prévalence du portage de *Campylobacter* dans les élevages de l'île. Ainsi, plus de la moitié des élevages de poulets et près de 100 % des élevages porcins sont contaminés par *Campylobacter* [11,12]. Par analogie avec les mécanismes de transmission décrits dans la littérature, ces résultats suggèrent que ces animaux pourraient être une source essentielle de contamination à l'origine des cas d'infections chez l'Homme sur l'île. Cependant, les modes de contamination et les voies de transmissions à l'Homme n'ont jamais été étudiés à La Réunion. Pourtant, la compréhension de ces mécanismes est indispensable pour prioriser les stratégies de prévention et de contrôle et pour au final tenter de diminuer la morbidité et le coût imputable.

Dans ce contexte, la première partie de notre travail sera consacrée à l'étude de l'épidémiologie moléculaire de *Campylobacter* à La Réunion et aura pour objectifs :
- De mettre au point des techniques de génotypage de *Campylobacter* adaptables aux équipements du laboratoire de bactériologie du CHU Sud Réunion ;
- D'établir le profil génétique de *Campylobacter* chez l'Homme et chez les animaux d'élevage (poulet et porc) ;
- De comparer les profils génétiques des *Campylobacter* isolés chez l'Homme et l'animal ;
- De comparer les performances des deux techniques mises en place.

Cela pourrait permettre de formuler des hypothèses sur les modalités de transmission de *Campylobacter* entre l'Homme et l'animal à La Réunion.

Par ailleurs, la résistance aux antibiotiques de *Campylobacter* isolé chez l'Homme est partiellement connue à La Réunion, notamment grâce à la réalisation d'antibiogrammes de manière systématique dès qu'une souche est isolée. En revanche, il n'existe pas à ce jour pour cette région ultramarine de données d'antibiorésistance chez les animaux d'élevage. Leurs connaissances passent par l'utilisation de méthodes de screening rapides et abordables financièrement comme cela existe déjà par exemple pour les macrolides [13].

La seconde partie de ce travail s'attachera donc à contribuer à approfondir nos connaissances sur les résistances de *Campylobacter* à la Réunion et aura pour objectif :

- De développer et de valider une technique de détection de la résistance aux fluoroquinolones performante, rapide, peu coûteuse et utilisable à des fins de screening notamment.

1 - Etat de l'art

1.1 - Caractéristiques microbiologiques

Les espèces du genre *Campylobacter* appartiennent au groupe des Epsilonprotéobactéries, à l'ordre des Campylobactérales et à la famille des *Campylobacteraceae* (qui inclut aussi les genres *Arcobacter* et *Sulfurospirillum*). Ces bactéries sont des bacilles à Gram négatif de 0,5-5 µm de long et 0,2-0,9 µm d'épaisseur, incurvées, spiralées et mobiles grâce à un flagelle unique, polaire et non engainé [1]. Une de leurs particularités notable est d'avoir un métabolisme micro-aérobie et asaccharolytique.

Le genre bactérien *Campylobacter* comprend actuellement 28 espèces et 13 sous-espèces [14] divisées en 3 groupes :
- Les *Campylobacter* dit thermotolérants, se développant à plus de 40°C, parmi lesquels 2 sont d'intérêt majeur en pathologie humaine : *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*, tous deux responsables d'entérites ;
- Les *Campylobacter* du groupe *fetus,* se développant préférentiellement à 25°C, parmi lesquels on retrouve *Campylobacter fetus*, responsable de bactériémies chez l'Homme ;
- Les *Campylobacter* dit « anaérobies », commensaux du carrefour oro-pharyngé chez l'Homme et peu pathogènes.

1.2 - Epidémiologie de *Campylobacter*

1.2.1 - Réservoirs

Campylobacter appartient à la flore digestive commensale des animaux homéothermes, notamment des animaux de production tels que les oiseaux domestiques (poulets, dindes, canards, …) ou les mammifères d'élevage (porcins, bovins). Les volailles sont considérées comme étant le réservoir naturel de *C. jejuni* et le porc comme étant celui de *C. coli.* D'autres espèces sont commensales du chien (*C. upsaliensis*), de la mouette (*C. lari*) [1] ou d'autres animaux [15]. *C. fetus* se retrouve quant à lui chez les animaux d'élevage et peut être responsable d'avortement chez les bovins.

1.2.2 - Transmission à l'Homme

La transmission à l'Homme de cette bactérie zoonotique est principalement indirecte et repose sur la consommation de denrées contaminées et consommées crues ou insuffisamment cuites *(Figure 1).* Les viandes sont les produits les plus souvent en cause [2–6] et notamment celle de volaille, préférentiellement contaminée par l'espèce C. *jejuni* [16] et responsable de la majorité des cas sporadiques d'infections. La viande de porc, préférentiellement contaminée par l'espèce *C. coli,* peut aussi être incriminée. La transmission à l'Homme repose davantage sur un défaut d'hygiène en cuisine, responsable d'une contamination croisée, que sur une cuisson insuffisante. Les plans de travail ou ustensiles de cuisine sont contaminés au contact de la viande crue et sont ensuite vecteurs de la bactérie vers des aliments consommés crus ou peu cuits [1,16,17]. Le lait non pasteurisé et les eaux non traitées sont également sources de contamination, les animaux porteurs ou malades tels les oiseaux sauvages contaminant les systèmes d'adduction d'eau. [17,18].

Une contamination directe peut aussi avoir lieu *via* les animaux de compagnie [1]. Plus rarement, l'Homme malade ou porteur peut également être une source de contamination.

Les épidémies à *Campylobacter* sont peu fréquentes et les quelques cas décrits le sont essentiellement en communauté (crèches, …) où le lait et l'eau semblent être les origines les plus fréquentes de la contamination [1,16,17]. La grande majorité des infections à *Campylobacter* est donc constituée de cas sporadiques, bien qu'il soit envisageable qu'une même souche issue d'un même animal en cause soit responsable de plusieurs cas synchrones mais géographiquement éloignés, compte tenu des méthodes de distribution actuelles de la viande (grossiste intermédiaire revendant à différents distributeurs).

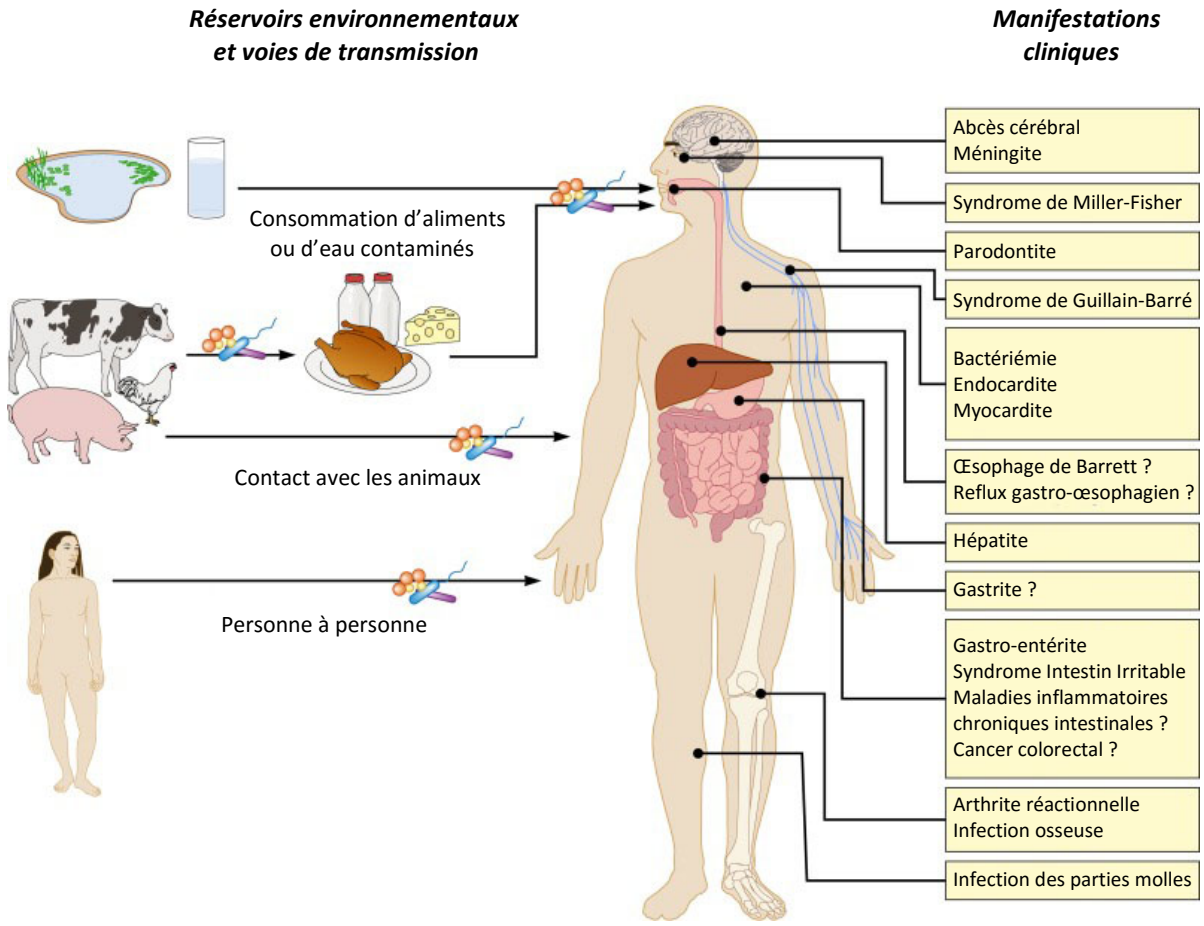


Figure 1 : Réservoirs, transmissions et clinique de l'infection à Campylobacter (d'après Kaakoush et al.) [19]

1.2.3 - Impact des infections à *Campylobacter*

Dans les pays développés, les infections à *Campylobacter* ont un réel impact sur la morbidité se traduisant par une augmentation des consultations médicales, des arrêts de travail, voire des hospitalisations [9]. Ces dernières sont estimées à plus de 5000 par an en France [8]. Les coûts engendrés pour les systèmes de santé publique et en termes de perte de productivité sont évalués à près de 2,4 milliards d'euros chaque année pour l'ensemble de l'Union Européenne [10]. Ces infections ont par ailleurs un impact sur la mortalité avec un risque relatif de décès estimé à 1,3 dans les 6 mois à un an suivant une infection gastro-intestinale à *Campylobacter* au Danemark, pays aux conditions socio-économiques proches de la France [20].

Dans les pays en voie de développement, les infections à *Campylobacter* ont également un impact non négligeable sur la mortalité, notamment infantile [19,21].

1.2.4 - Caractéristiques épidémiologiques des infections chez l'Homme

1.2.4.1 - En France

En France, la surveillance des infections humaines à *Campylobacter* est supervisée par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) et est basée sur un réseau de laboratoires volontaires qui envoient chaque souche isolée au Centre National de Référence (CNR) des Campylobacters et Hélicobacters situé au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux. Les objectifs de cette surveillance sont de :
- Décrire les caractéristiques épidémiologiques des infections à *Campylobacter* chez l'Homme ;
- Détecter les cas groupés ;
- Décrire les espèces de *Campylobacter* en cause dans les cas d'infections humaines ;
- Surveiller la résistance aux antibiotiques.

Une étude récente réalisée par le CNR estime l'incidence annuelle des campylobactérioses à 842 cas pour 100 000 habitants (presque 3 fois supérieure à celle des salmonelloses) [8]. Le nombre annuel de souches reçues au CNR a augmenté de 97 % entre 2003 et 2010 [16] et est en augmentation quasi-constante depuis 2003 [22]. En 2015, l'incidence des cas recensés par le CNR a atteint 85 cas pour 100 000 habitants. Cette incidence était maximale chez les enfants de moins de 10 ans (20 cas/100 000 habitants) et minimale chez les adultes de 50 à 60 ans (5 cas/100 000 habitants). Par ailleurs, l'incidence était globalement plus élevée chez les hommes que chez les femmes (sex-ratio à 1,37) [22].

Les patients infectés par *Campylobacter* ont une moyenne d'âge de 33 ans en France en 2015 [22]. L'âge des patients présentant une infection à *C. coli* est plus élevé que celui des patients présentant une infection à *C. jejuni* (respectivement 38 ans et 30 ans en 2015 [22]). Par ailleurs, la classe d'âge des enfants de moins de 10 ans est la plus touchée, représentant à elle seule 25 % des cas confirmés [22]. Ces données sont observées depuis plusieurs années maintenant [16,23].

Concernant les souches recensées par le CNR en 2015, la grande majorité d'entre elles a été isolée des selles (97 %) et seulement 2 % l'ont été dans des hémocultures. Parmi les 6154 souches recensées, 5800 ont pu être identifiées à l'espèce. *C. jejuni* était alors l'espèce la plus fréquente (81 %) suivie de *C. coli* (15 %) [22]. Cette répartition des espèces en cause est comparable à celles observées en France depuis l'année 2003 [16,23]. Le CNR retrouve par ailleurs un risque d'infection par *C. coli* plus élevé chez les patients ayant voyagé à l'étranger dans les 2 semaines précédant le syndrome infectieux et un risque d'infection par *C. jejuni* plus élevé en période estivale [22]. Le CNR note d'ailleurs classiquement une recrudescence des isolements de *Campylobacter* pendant la période estivale, comme cela fut encore le cas en 2015 où 47 % des souches ont été isolés entre juin et septembre *(Figure 2).*

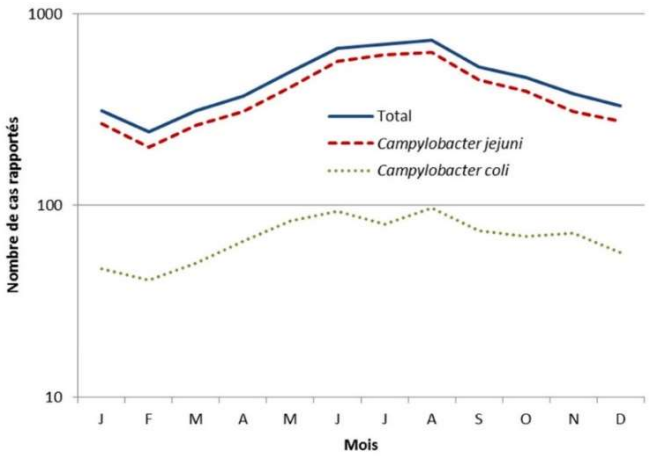


Figure 2 : Nombre de cas de C. jejuni et C. coli rapportés par mois en France en 2015 (CNR 2016) [22]

1.2.4.2 - En Europe

L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) et le Centre européen pour la prévention et le contrôle des maladies (ECDC) publient annuellement un rapport sur les zoonoses et les épidémies d'origine alimentaire dans l'Union Européenne en se basant sur les données de plusieurs pays européens.

En 2014, 32 pays ont participé et le rapport de l'EFSA place les infections à *Campylobacter* en tête des maladies d'origine alimentaire les plus fréquemment signalées avec 236 851 cas recensés, soit près de 3 fois plus de cas que pour les salmonelloses *(Figure 3).* Par ailleurs, le nombre de campylobactérioses signalées est en augmentation constante depuis 2008 [7]. Enfin, une étude de 2013 a estimé l'incidence des campylobactérioses de 2005 à 2009 et a retrouvé 1860 cas pour 100 000 habitants [24].

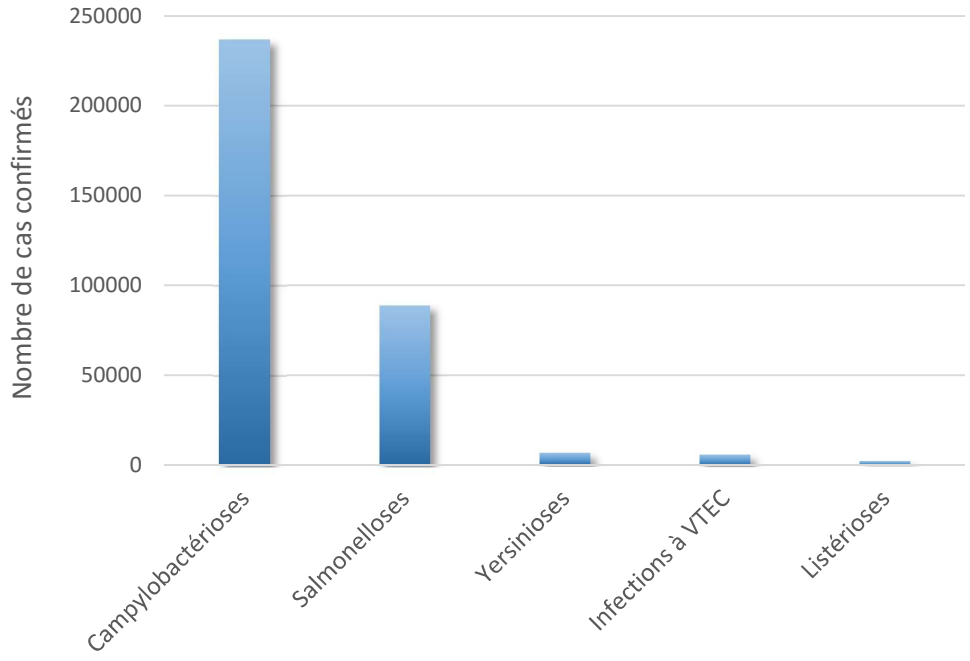


Figure 3 : Nombre de cas confirmés des 5 principales zoonoses en Europe en 2014 (d'après EFSA) [7]

Les caractéristiques épidémiologiques observées en Europe sont semblables à celles observées en France. Gillespie *et al.* ont confirmé une différence d'âge significative entre les patients infectés par l'espèce *C. coli* et ceux infectés par *C. jejuni* à l'échelle européenne sans toutefois pourvoir en déterminer la cause [25].

En 2015, *C. jejuni* reste l'espèce majoritairement isolée au niveau européen (82 %) mais la proportion de *C. coli* isolés est plus élevée en 2015 en France (15 %) [22] qu'en Europe (7 % en moyenne) [7], probablement en raison d'habitudes alimentaires différentes [23]. Ces données sont observées depuis plusieurs années maintenant [7,26]. Par ailleurs, Guzman-Herrador *et al.* [27] en Norvège et Strachan *et al.* [28] en Ecosse retrouvent un risque d'infection par *C. coli* majoré chez les patients ayant voyagé à l'étranger.

Enfin, le pic saisonnier observé pendant la période estivale en France est aussi retrouvé au sein de l'Europe [7,26] et s'explique pour certains auteurs par une contamination plus importante de la nourriture, notamment des volailles, en raison de l'augmentation de la température ambiante [29].

1.2.4.3 - A La Réunion

A ce jour, l'épidémiologie humaine de *Campylobacter* à La Réunion n'a pas été décrite et les seules données dont nous disposons sont celles issues de notre laboratoire.

Sur 10 ans (de 2006 à 2015), le laboratoire a identifié et réalisé un antibiogramme pour 371 *Campylobacter* issus de prélèvements de selles pour la majorité (99 %) provenant de services hospitaliers ou de laboratoires d'analyses privés. L'espèce la plus souvent retrouvée est *C. jejuni* avec 310 isolats (83,6 %) puis vient *C. coli* avec 34 isolats (9,2 %). Ces fréquences d'isolement sont plus proches de celles observées au niveau européen que de celles observées en France. A noter qu'au CHU Sud Réunion, *C. lari* est la troisième espèce la plus souvent isolée sur la période avec 19 isolats (5,1 %), soit une fréquence plus élevée qu'en France (0,3 %) [22] et qu'en Europe (0,13 %) [7]. La *Figure 4* illustre cette répartition des espèces de *Campylobacter* isolées au laboratoire.

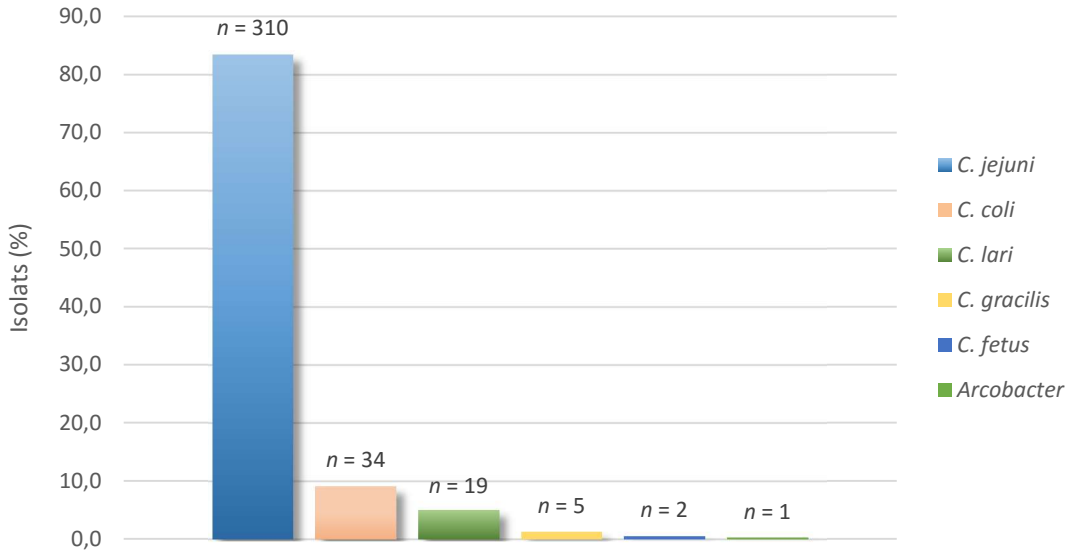


Figure 4 : Répartition des espèces de Campylobacter isolées au CHU Sud Réunion de 2006 à 2015

Sur cette période (2006 à 2015), on observe une importante augmentation de l'identification au laboratoire de souches de *Campylobacter* et notamment de l'espèce C. *jejuni*. Ainsi, le laboratoire a identifié en 2015 65 *C. jejuni* et 5 *C. coli* alors qu'il n'en identifiait respectivement que 7 et 3 en 2006, soit une augmentation d'un facteur 10 en 10 ans pour l'espèce *C. jejuni (Figure 5).*

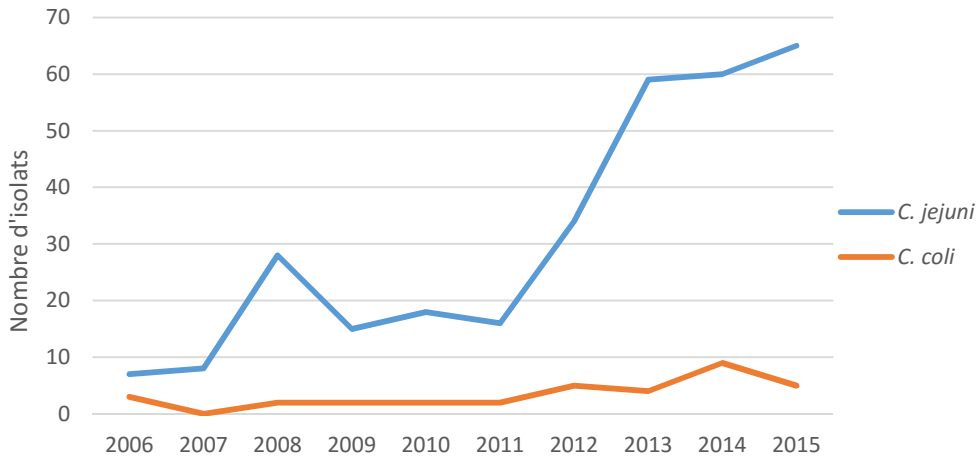


Figure 5 : Nombre de C. jejuni et C. coli identifiés par année au CHU de Saint-Pierre de 2006 à 2015

Concernant les caractéristiques épidémiologiques de l'infection à *Campylobacter*, on retrouve au CHU Sud Réunion ce qui est observé en France et en Europe. On constate en effet un sex-ratio égal à 1,18, un âge plus jeune pour les patients infectés par *C. jejuni* (17,4 ans) que pour les patients infectés par *C. coli* (22,2 ans) et une infection plus fréquente chez les enfants de moins de 10 ans par rapport aux autres classes d'âge. Etonnamment, 60 % des patients infectés à *C. jejuni* et 50 % des patients infectés à *C. coli* à La Réunion ont moins de 10 ans alors qu'ils ne représentent que 25 % des patients infectés en France.

Enfin, il ne semble pas exister de pic saisonnier comme cela est le cas en France et en Europe mais il est difficile de conclure vu la taille relativement faible des échantillons annuels au laboratoire.

1.2.4.4 - Dans les pays en voie de développement

Les caractéristiques épidémiologiques observées dans les pays en voie de développement sont différentes de celles observées dans les pays industrialisés. Dans ces pays, les nourrissons sont exposés très précocement à *Campylobacter*. Dans les premiers mois de vie, l'enfant est protégé par les anticorps maternels et les premiers signes d'une infection à *Campylobacter* s'observent donc après le sevrage. La bactérie est alors souvent incriminée dans les cas de gastro-entérites et se retrouve en troisième position des causes de diarrhées la première année de vie et en seconde position la deuxième année [30]. L'enfant s'immunise ensuite en raison des expositions répétées à la bactérie et les infections à *Campylobacter* sont moins fréquentes à l'âge adulte dans ces pays.

1.2.5 - *Campylobacter* dans la filière animale

1.2.5.1 - En France chez le poulet

Campylobacter évolue principalement dans le mucus intestinal des volailles et n'entraîne pas de réaction immunitaire efficace chez les oiseaux qui restent contaminés quelle que soit la durée d'élevage, à des taux très élevés. Les risques de souillures digestives de la carcasse et de la peau lors de l'abattage sont dans ces conditions élevés, en particulier lors de l'étape du bain chaud en vue du plumage ou lors de l'étape d'éviscération. A l'abattoir, les bactéries sont capables de survivre tout au long de la chaîne de production et ce jusqu'à la cuisine du consommateur.

Dans la filière *Gallus gallus* (aussi dit « poulet de chair »), *Campylobacter* est présent à tous les stades de la chaîne et ce avec une très forte prévalence : 70 % à 100 % des lots de poulets à leur arrivée à l'abattoir, 88 % des carcasses et 76 % des produits au niveau de la distribution [31]. Au niveau des élevages, 40,5 % des lots sont contaminés par *C. jejuni*, 29,7 % par *C. coli* et 1,7 % par les deux espèces. Par ailleurs, plus les animaux sont âgés, plus la prévalence de la bactérie est élevée (jusqu'à 98 % à plus de 68 jours selon certains auteurs) [31]. Les animaux seraient essentiellement contaminés par les excréments, l'alimentation ou bien encore par aérosols [32].

1.2.5.2 - En France chez le porc

Le porc charcutier est aujourd'hui identifié comme un réservoir naturel de *Campylobacter* [33]. La localisation préférentielle de la bactérie reste le contenu intestinal même si le portage gastrique est très fréquent (51,5 %). En moyenne, 65,5 % des individus sont excréteurs dans leurs matières fécales et 71 % sont porteurs au niveau du tube digestif [31]. Chez cet animal, le portage intestinal est quasi exclusivement lié à *C. coli* [33]. La présence de la bactérie est démontrée dans de nombreux élevages (de 69,2 % à 100 % selon les études [31]) mais il apparaît que des pratiques de biosécurité peuvent réduire significativement la contamination des animaux. Enfin, la prévalence moyenne de contamination des carcasses est variable en fonction de la maîtrise du processus d'abattage, mais le niveau moyen de contamination observé est plus faible que celui des poulets (processus mieux maîtrisé) [31].

1.2.5.3 - A La Réunion

La Réunion est une région très consommatrice de poulet et celui-ci est souvent consommé dans son entièreté (viande, abats et peau). L'élevage de poulet est pratiqué sur l'île depuis plus de 60 ans [11] et représente l'industrie agro-alimentaire la plus importante du département. Par ailleurs, le porc se classe en seconde position avec 26 600 tonnes consommées chaque année à La Réunion et dont la moitié sont produites localement. Une étude du Centre International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) Océan Indien montre que 54 % des élevages de poulets de l'île sont infectés par *Campylobacter* : 30 % par *C. coli*, 17 % par *C. jejuni* et 7 % par les deux espèces [11]. D'autres travaux en cours de publication révèlent que 96 % des élevages porcins sont contaminés par *C. coli* [12]. Cependant, dans les produits finis (saucisses de porc ou de poulets très consommées à La Réunion), *Campylobacter* est peu présent (1,5 % des produits) [34]. Ces chiffres laissent donc penser que contrairement à ce qui est observé en France, *Campylobacter* serait moins isolé au niveau des élevages à La Réunion et l'espèce *C. coli* serait plus souvent retrouvée chez le poulet.

1.3 - Pathogénicité de *Campylobacter*

La pathogénicité des espèces du genre *Campylobacter* reste à ce jour mal connue notamment en raison de l'absence de modèle animal fiable (la bactérie étant souvent portée de manière asymptomatique chez de nombreux animaux) [35].

Il est aujourd'hui connu que *C. jejuni* possède la capacité d'adhérer et de pénétrer au sein des cellules intestinales, préférentiellement au niveau de l'iléon et du colon (contrairement à ce que son nom pourrait laisser penser). Différentes molécules d'adhésion sont impliquées ainsi que des protéines permettant l'internalisation de la bactérie dans la cellule hôte. Par ailleurs, le flagelle contribue aussi activement à la pathogénicité de la bactérie, non seulement en lui permettant d'être mobile mais aussi en synthétisant des protéines d'invasion cellulaire. Enfin, *C. jejuni* serait en mesure d'induire l'apoptose de la cellule hôte *via* la sécrétion d'une toxine [35].

C. fetus est quant à lui plus à même d'être responsable de bactériémies en raison de sa capacité à échapper au système immunitaire inné. Une de ses protéines de surface lui confère en effet une résistance à l'attaque du complément lors de l'étape de défense immune précoce chez l'Homme [36].

1.4 - Prévention

1.4.1 - Prévention individuelle

La prévention individuelle de l'infection à *Campylobacter* passe essentiellement par le respect des bonnes pratiques d'hygiène lors de la manipulation et de la préparation des viandes. Ainsi, des informations diffusées régulièrement et à un large public sur les risques de campylobactérioses et sur les mesures d'hygiène préventives en cuisine ont montré leur efficacité en Nouvelle Zélande par exemple [37]. Par ailleurs, des mesures d'hygiène générale (lavage des mains, etc.) permettent aussi de réduire les transmissions directes de la bactérie (par les animaux infectés entre autres).

1.4.2 - Prévention collective

La prévention collective est un moyen de lutte efficace contre les infections à *Campylobacter*. Cette prévention repose sur la mise en œuvre de mesures de lutte à tous les stades de la chaîne alimentaire, de la production agricole au niveau d'une ferme jusqu'à la transformation, la fabrication et la préparation des aliments en milieu industriel ou domestique. Le poulet étant l'animal à l'origine du plus grand nombre de cas, les mesures de prévention et de biosécurité sont à adopter en priorité dans cette industrie.

L'éradication de la bactérie au niveau des élevages est jugée illusoire mais il est possible de diminuer sa prévalence notamment en nettoyant régulièrement les locaux avec du détergent et en utilisant des désinfectants au cours de l'élevage, par exemple pour traiter l'eau de boisson des poulets pouvant être à l'origine de la contamination. Ces mesures sont d'autant plus recommandées que la température ambiante de l'élevage est élevée car la bactérie peut alors se répliquer aisément. D'autres mesures, plus difficiles à mettre en œuvre, ont prouvé leur efficacité. L'éloignement des élevages les uns des autres ou encore la lutte contre les petits rongeurs, hôtes possibles de *Campylobacter* et vecteurs de la bactérie entre les élevages en sont des exemples [11]. Plusieurs approches complémentaires sont en cours d'études : utilisation de bactériocines, peptides antimicrobiens produits par les bactéries dont certains sont actifs contre *Campylobacter* ; utilisation de bactériophages ou encore de probiotiques [19]. Enfin, des essais de vaccination des animaux ont été tentés mais aucun n'a permis d'obtenir un résultat satisfaisant. D'autres essais plus prometteurs sont actuellement en cours [19].

Par ailleurs, des moyens de lutte existent au cours du processus de transformation. Ainsi, il est possible de décontaminer chimiquement les abattoirs et les carcasses [38] ou encore d'irradier ou de congeler les viandes afin de tuer les bactéries [39]. Cependant, ces méthodes sont coûteuses pour la filière de production et ont pour effet d'altérer la qualité gustative de la viande.

1.5 - Manifestations cliniques de l'infection à *Campylobacter*

Les principales manifestations cliniques prouvées ou suspectées de l'infection à *Campylobacter* sont rappelées en *Figure 1*.

1.5.1 - Entérites

Classiquement, *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* sont reconnus comme cause majeure d'entérites. Après une période d'incubation de 2 à 5 jours en moyenne, les signes cliniques observés sont généralement ceux d'une gastro-entérite aiguë, le plus souvent bénigne et spontanément résolutive. Une diarrhée, parfois sanglante, est le symptôme le plus fréquemment observé (90 % des cas) [16], associée ou non à des douleurs abdominales ou à une fièvre en règle modérée. Asthénie, céphalées, myalgies et nausées sont aussi fréquentes. Chez l'immunodéprimé, des infections sévères, persistantes ou récidivantes peuvent être observées.

1.5.2 - Infections extra-intestinales

Plus rarement, on observe des infections extra-intestinales pouvant aller jusqu'à la bactériémie, même si cette dernière est plus souvent décrite à *C. fetus* en raison de sa plus forte résistance au pouvoir bactéricide du sérum. Cependant, les septicémies à *C. jejuni* ou à *C. coli* par translocation intestinale existent et sont possiblement sous-estimées compte tenu de l'absence fréquente de prélèvement d'hémocultures dans un contexte de gastro-entérite [40].

1.5.3 - Complications aiguës

Les complications aiguës associées à ces infections à *Campylobacter* sont rares mais parfois graves. Elles comprennent les adénites mésentériques, les colites pseudo-membraneuses, les appendicites, les péritonites, les pancréatites, les hépatites, etc.

1.5.4 - Complications post-infectieuses

Les complications post-infectieuses décrites sont essentiellement le syndrome de Reiter (arthrite réactionnelle) et le syndrome de Guillain-Barré, complication la plus sévère [41,42]. L'incidence de cette dernière est d'environ 1 pour 1000 infections à *C. jejuni* [16] et 20 % à 50 % des syndromes de Guillain-Barré seraient précédés par une infection à *Campylobacter* [43]. Malgré une prise en charge médicale en service de réanimation, des séquelles neurologiques peuvent persister dans 20 % des cas et la mortalité reste non négligeable [44]. La physiopathologie de cette polyradiculonévrite post-infectieuse réversible est à présent bien comprise. Il s'agit d'une démyélinisation et d'une réaction lymphocytaire localisée au niveau de la membrane nerveuse due à un mimétisme antigénique. La structure terminale de l'oligosaccharide du LPS de certains *Campylobacter* (notamment du sérogroupe O:19) est en effet identique à la structure terminale du ganglioside GM1 de la fibre nerveuse [45]. Les anticorps produits et dirigés contre *Campylobacter* sont donc aussi dans ce contexte dirigés contre le « soi ». Par ailleurs, une proportion importante de syndromes de l'intestin irritable fait suite à une infection intestinale à *C. jejuni* [46] et la bactérie serait aussi responsable d'un nombre non négligeable de cas de dyspepsie fonctionnelle [47].

1.6 - Diagnostic microbiologique de l'infection à *Campylobacter*

1.6.1 - Diagnostic direct

1.6.1.1 - Culture et identification

Le diagnostic de l'infection intestinale à *Campylobacter* repose à l'heure actuelle essentiellement sur la pratique d'une coproculture en cas de symptomatologie évocatrice. *Campylobacter*, compte tenu de sa fréquence, doit toujours être recherché dans ce type de prélèvement. L'échantillon de selles doit être acheminé et techniqué rapidement au laboratoire, la bactérie étant particulièrement fragile. Un examen microscopique peut être réalisé et se révéler contributif [48]. L'état frais peut en effet montrer dans la phase aiguë de l'infection une mobilité dite « en vol de moucheron », proche de celle observée pour *Vibrio cholerae*. Par ailleurs, la coloration de Gram peut mettre en évidence de petits bacilles incurvés Gram négatifs *(Figure 6).*

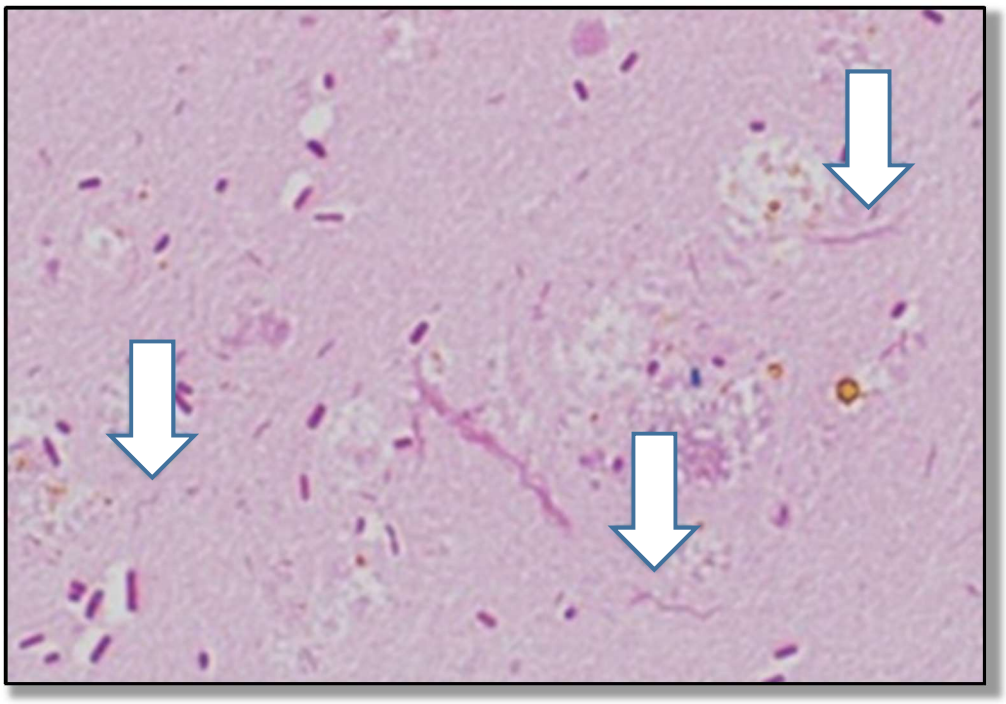


Figure 6 : Campylobacter jejuni (cf flèches) à la coloration de Gram (Kamata et Tokuda, 2014) [48]

Malgré les informations apportées par la microscopie, la culture reste indispensable et peut être réalisée sans étape d'enrichissement préalable. L'utilisation de milieu sélectif est en revanche nécessaire pour faciliter la pousse et l'identification visuelle (milieu au sang Skirrow [49] ou milieu au charbon Karmali [50] par exemple). L'incubation à 37°C pendant au moins 24 heures doit être réalisée en micro-aérobiose. Les colonies, petites, lisses, luisantes et souvent étalées ou en nappe sont relativement faciles à reconnaître sur les milieux usuels *(Figure 7).* Une autre technique d'ensemencement par filtration basée sur le fait que la bactérie soit de petite taille et mobile existe et peut aussi être utilisée. Elle consiste à filtrer une goutte de suspension de selles au travers d'une membrane au-dessus d'une gélose et d'incuber ensuite le milieu en atmosphère micro-aérobie.

Les hémocultures permettent de mettre en évidence une bactériémie à *Campylobacter* mais elles sont peu réalisées en pratique. Si ce genre est suspecté à l'examen direct, il faut alors placer les subcultures en atmosphère micro-aérobie. Dans ces conditions, la sensibilité des hémocultures est bonne [17].

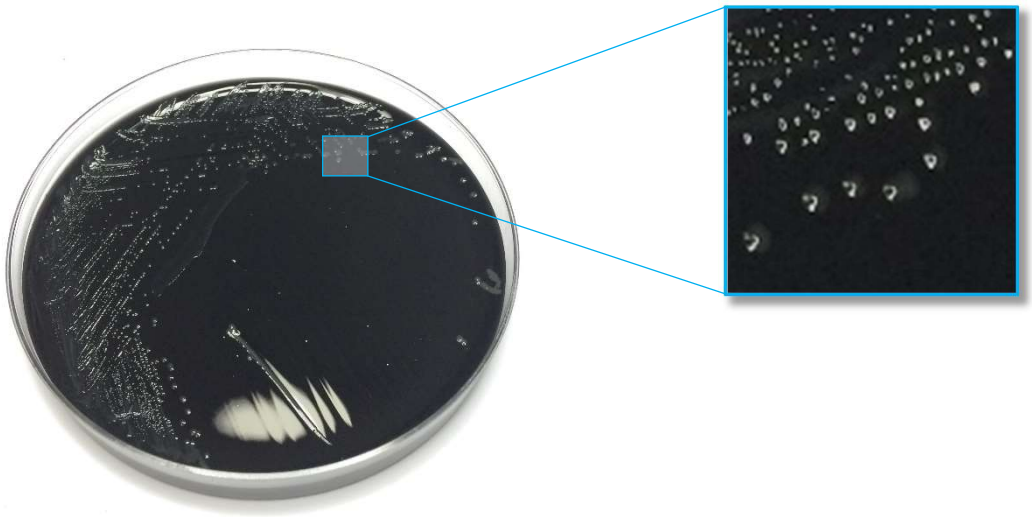


Figure 7 : Culture de Campylobacter jejuni sur gélose Karmali (Photographie personnelle)

Une fois les colonies repérées sur gélose, l'identification de l'espèce peut se faire soit par étude des caractères phénotypiques (activités enzymatiques, température de pousse, résistance à certains antibiotiques, etc.), à l'aide de galeries miniaturisées par exemple, soit par spectrométrie de masse type MALDI-TOF. Cette dernière technique a depuis quelques années révolutionné l'étape d'identification bactérienne grâce à sa simplicité et à ses excellentes performances. Elle tend à se généraliser au sein des laboratoires d'analyses médicales même si le coût initial de l'automate reste important. Les espèces de *Campylobacter* sont identifiées *via* cette méthode avec une très bonne sensibilité et une très bonne spécificité [51].

1.6.1.2 - Biologie moléculaire

La biologie moléculaire réalisée sur des prélèvements de selles occupe une place de plus en plus importante au sein de l'arsenal diagnostique de l'infection à *Campylobacter*. L'avènement récent des approches syndromiques *via* PCR multiplex [52] permet en effet à ces techniques de s'introduire peu à peu au sein des laboratoires de diagnostic biologique. D'autres méthodes plus classiques en PCR temps réel sont aussi utilisables [53]. De très bonnes sensibilités et spécificités [17,52], au moins équivalentes à la culture [52], ainsi qu'un délai de rendu très inférieur à la culture sont les principaux avantages de ces techniques. Cependant, le prix encore élevé ainsi que le fait de ne pas pouvoir réaliser d'antibiogramme *via* la même technique restent des aspects négatifs de la biologie moléculaire.

1.6.1.3 - Tests immuno-enzymatiques

Des tests immuno-enzymatiques permettant la recherche de *Campylobacter* dans les selles sont aussi disponibles mais leur spécificité semble moyenne [54]. Leur place en routine reste donc encore floue mais ces techniques pourraient être utilisables à des fins de dépistage.

1.6.2 - Diagnostic indirect

La sérologie est aussi de faible intérêt et n'est utile qu'en cas de pathologies post-infectieuses de type arthrite ou syndrome de Guillain-Barré. Diverses méthodes existent (ELISA [55], etc.) et permettent de mettre en évidence des séquelles sérologiques d'infection à *Campylobacter* [41,43].

1.7 - Résistance aux antibiotiques de *Campylobacter*

1.7.1 - Mécanismes de résistance

1.7.1.1 - Généralités

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Campylobacter* peuvent être chromosomiques ou plasmidiques. Ils sont communs à ceux décrits chez les autres espèces bactériennes : modification de la cible, inactivation enzymatique et efflux actif [56].

Notre travail ayant essentiellement porté sur la mise au point d'une technique moléculaire de détection des résistances aux quinolones, nous nous limiterons, dans cette partie, à la description des résistances de *Campylobacter* à cette famille d'antibiotiques.

1.7.1.2 - Mécanismes de résistance aux quinolones

Les quinolones forment une large classe d'antibactériens de synthèse qui comprend les dérivés de l'acide nalidixique. L'ajout d'un atome de fluor à la structure de base des quinolones dans les années 1980 a permis d'augmenter fortement leur pénétration dans les cellules. Les fluoroquinolones alors obtenues sont de puissants antibiotiques bactéricides largement utilisés aujourd'hui, notamment en raison de leur excellente diffusion tissulaire et intracellulaire.

Les quinolones ciblent les topoisomérases de type II que sont l'ADN gyrase et la topoisomérase IV [57]. Ces enzymes permettent la bonne réplication de l'ADN bactérien et sont impliquées dans le compactage et la régulation de la conformation de l'ADN double brin dans cette étape de la multiplication bactérienne. Elles interviennent aussi lors de la transcription et de la recombinaison de l'ADN bactérien. Ce sont des enzymes hétérotétramériques composées de paires de 2 sous-unités : *gyrA* et *gyrB* pour l'ADN gyrase et *parC* et *parE* pour la topoisomérase IV. L'ADN gyrase régule le niveau de surenroulement négatif de la double hélice d'ADN et possède également une fonction de relâchement de l'ADN afin de permettre la progression de la polymérase le long de la fourche de réplication. La topoisomérase IV intervient quant à elle dans le désenchevêtrement de l'ADN. Chez certaines bactéries, cette enzyme est absente et c'est alors l'ADN gyrase qui prend en charge ce travail. Cette dernière devient dès lors la seule cible des quinolones [57].

Les quinolones interagissent avec le complexe ADN/ADN gyrase en formant un complexe ADN/ADN gyrase/Quinolone. L'hypothèse du mode d'action est le blocage du changement conformationnel de l'enzyme lors de son travail, empêchant alors l'ADN d'être religaturé après coupure. A cette action bactériostatique s'ajoute une activation du système SOS en réponse à l'accumulation d'ADN coupé. *In fine*, cela aboutit à l'apoptose de la bactérie (versant bactéricide de cette classe d'antibiotiques).

La résistance aux quinolones chez *Campylobacter* repose sur différents mécanismes cumulables *(Figure 8)* : modification de la cible (*gyrA*), efflux actif (CmeABC) et diminution de la perméabilité membranaire [58,59]. De plus, un état d'hyper-mutabilité médié par le locus *mfd* (Mutant Frequency Decline) influence également l'émergence de résistance aux fluoroquinolones chez cette espèce [60]. Par ailleurs et contrairement à d'autres genres, aucune résistance aux quinolones d'origine plasmidique n'a été décrite chez *Campylobacter*. Ces bactéries ne présentent donc pas de résistance *via* protection de la cible (gènes *qnr*) ou *via* inactivation enzymatique (gène *aac*).

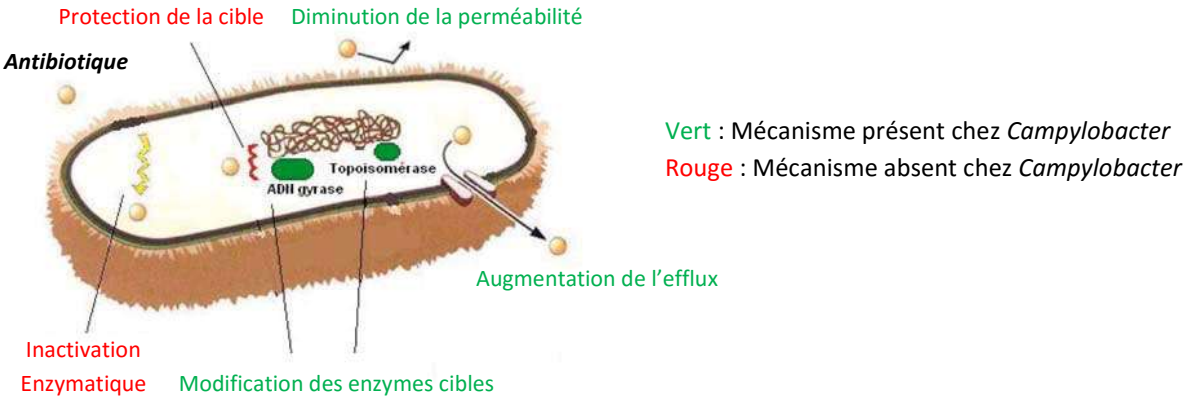


Figure 8 : Mécanismes possibles de résistance aux quinolones (d'après Mérens et al.) [57]

Mutation du gène *gyrA*

Le principal mécanisme de résistance aux quinolones chez *Campylobacter* est la mutation de la cible de l'antibiotique, l'ADN gyrase, notamment au niveau des régions QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) du gène *gyrA* codant sa sous-unité A [61]. Contrairement à d'autres bactéries, la résistance acquise aux fluoroquinolones chez *Campylobacter* n'est pas une résistance par accumulation de mutations successives. En effet, une mutation unique dans *gyrA* (apparaissant spontanément à des fréquences allant de 10^{-3} à 10^{-9}), confère directement une résistance de haut niveau à la ciprofloxacine (CMI ≥ 32 mg/L) [62]. La mutation la plus fréquemment rencontrée est Thr86Ile (C257T) [61,63,64], responsable de plus de 98 % [65] des phénotypes de haute résistance (quinolones et fluoroquinolones). Plus rarement sont retrouvées d'autres mutations telle Asp90Asn, responsables de niveaux de résistances intermédiaires (CMI de 1 à 4 mg/L) [59,61] ou des mutations Thr86Ala, conférant une résistance aux quinolones mais pas aux fluoroquinolones [66].

Enfin, il est à noter qu'aucune mutation de *gyrB* responsable d'une résistance aux quinolones n'a été décrite chez *Campylobacter* et que les espèces de ce genre ne possèdent pas les gènes *parC* et *parE* codant pour la topoisomérase IV, autre cible des quinolones [67].

Efflux *via* CmeABC

Un mécanisme d'efflux actif multi-drogues *via* la pompe CmeABC codée par le locus *cmeABC* participe également à la résistance acquise aux quinolones chez *Campylobacter* [68]. La pompe est faiblement exprimée à l'état sauvage grâce à un répresseur transcriptionnel (*cmeR*) mais peut être surexprimée en cas de pression de sélection antibiotique. Chez les souches résistantes par mutations de *gyrA*, une inactivation *in vitro* de la pompe diminue les CMI de la ciprofloxacine pour les ramener au niveau de celles des souches sauvages sensibles ce qui indique que les deux mécanismes fonctionnent en coopération [69,70].

Etat d'hypermutabilité *via* le locus *mfd*

Des travaux ont montré que les mutations de *gyrA* étaient potentialisées chez *C. jejuni* en présence de ciprofloxacine par l'induction du locus *mfd*. L'expression de ce locus favorise la sélection de mutants résistants par un facteur 10 [60]. Le fait qu'une unique mutation de *gyrA* suffise à conférer une résistance de haut niveau, associé à cet état d'hypermutabilité sous pression antibiotique pourrait expliquer l'évolution rapide de la résistance chez les patients ou les animaux traités [71].

1.7.2 - Méthodes de détection des résistances

1.7.2.1 - Méthodes phénotypiques

L'antibiogramme de *Campylobacter* peut être réalisé lorsque cette bactérie est isolée chez l'Homme. Il permet d'un point de vue individuel d'adapter la thérapeutique aux molécules actives *in vitro* et d'un point de vue communautaire de connaître l'évolution des résistances de ce genre bactérien. Il est réalisé en France selon les recommandations émises périodiquement par le CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) et l'EUCAST (EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [72,73]. Les molécules à tester en première intention selon le CA-SFM version 1.0 de février 2016 [72] sont : l'ampicilline, l'amoxicilline / acide clavulanique, la ciprofloxacine, l'érythromycine et la tétracycline. La gentamicine et les carbapénèmes peuvent être testés en seconde intention.

D'autres méthodes peuvent aussi être utilisées pour mettre en évidence les résistances de *Campylobacter* et notamment la mesure des CMI, l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé ne permettant d'obtenir que des mesures de diamètres d'inhibition catégorisant les bactéries en sensibles, intermédiaires ou résistantes, mais pas de valeurs de CMI.

1.7.2.2 - Méthodes moléculaires

Des méthodes moléculaires peuvent être utilisées afin de déterminer le profil génétique d'isolats de *Campylobacter* et d'en déduire la sensibilité aux antibiotiques. Une PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel a ainsi été développée par le CNR pour détecter les mutations de résistances aux macrolides [13] et d'autres auteurs ont décrits des méthodes ayant recours à la PCR RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) [63] ou encore au séquençage [61,64] pour mettre en évidence les mutations de résistances aux quinolones par exemple. Ces techniques de séquençage à la recherche de mutations du gène *gyrA* sont maintenant utilisées lors d'études épidémiologiques [65]. Récemment, des méthodes utilisant la PCR HRM (High Resolution Melt) sur *gyrA* ont été décrites pour d'autres genres bactériens, tels *Salmonella* [74] et *Mycobacterium* [75].

1.7.3 - Epidémiologie des résistances en pathologie humaine

1.7.3.1 - En France

Le CNR surveille en France la résistance aux antibiotiques des différentes espèces. Les taux de résistance observés en 2015 pour *C. jejuni* et *C. coli* sont rapportés en *Tableau 1.*

	C. jejuni		***C. coli***	
	Nb de souches	**% de résistance**	**Nb de souches**	**% de résistance**
Ampicilline	4407	37,8	837	33,2
Amox/Ac. Clav.	4626	0,5	861	0,6
Ciprofloxacine	4627	56,2	870	65,8
Erythromycine	4629	0,4	869	9,4
Gentamicine	4115	0,8	788	1,1
Tétracycline	4472	48,3	844	71,6

Tableau 1 : Résistance de C. jejuni et C. coli isolés chez l'Homme en France en 2015 (CNR 2016) [22]

De manière générale (toutes espèces confondues), des taux de résistance élevés aux fluoroquinolones (57 %), à la tétracycline (51 %) et à l'ampicilline (35 %) sont observés en France en 2015. Les résistances constatées pour la gentamicine (0,9 %) et pour l'amoxicilline/acide clavulanique (0,6 %) sont quasi-nulles et celle observée pour l'érythromycine est quasi-nulle pour *C. jejuni* (0,4 %) mais non négligeable pour *C. coli* (9,4 %). Enfin, vus par espèce, les taux de résistance constatés pour *C. coli* sont supérieurs à ceux observés pour *C. jejuni* (sauf pour l'ampicilline) *(Tableau 1)* [22].

D'un point de vue dynamique, le CNR suit l'évolution des résistances de *Campylobacter* depuis 30 ans. Il constate une baisse de la résistance à l'amoxicilline, amorcée au début des années 2000 *(Figure 9A),* un maintien de la résistance aux macrolides, quasi nulle pour l'espèce *C. jejuni* et avoisinant les 10 % pour *C. coli (Figure 9B)* et une augmentation de la résistance aux cyclines *(Figure 9C)* ainsi qu'aux quinolones *(Figure 9D).* Cette résistance aux quinolones est en constante augmentation depuis plus de 20 ans en France [22] mais aussi en Europe [7,76–78] et dans le monde [79–85].

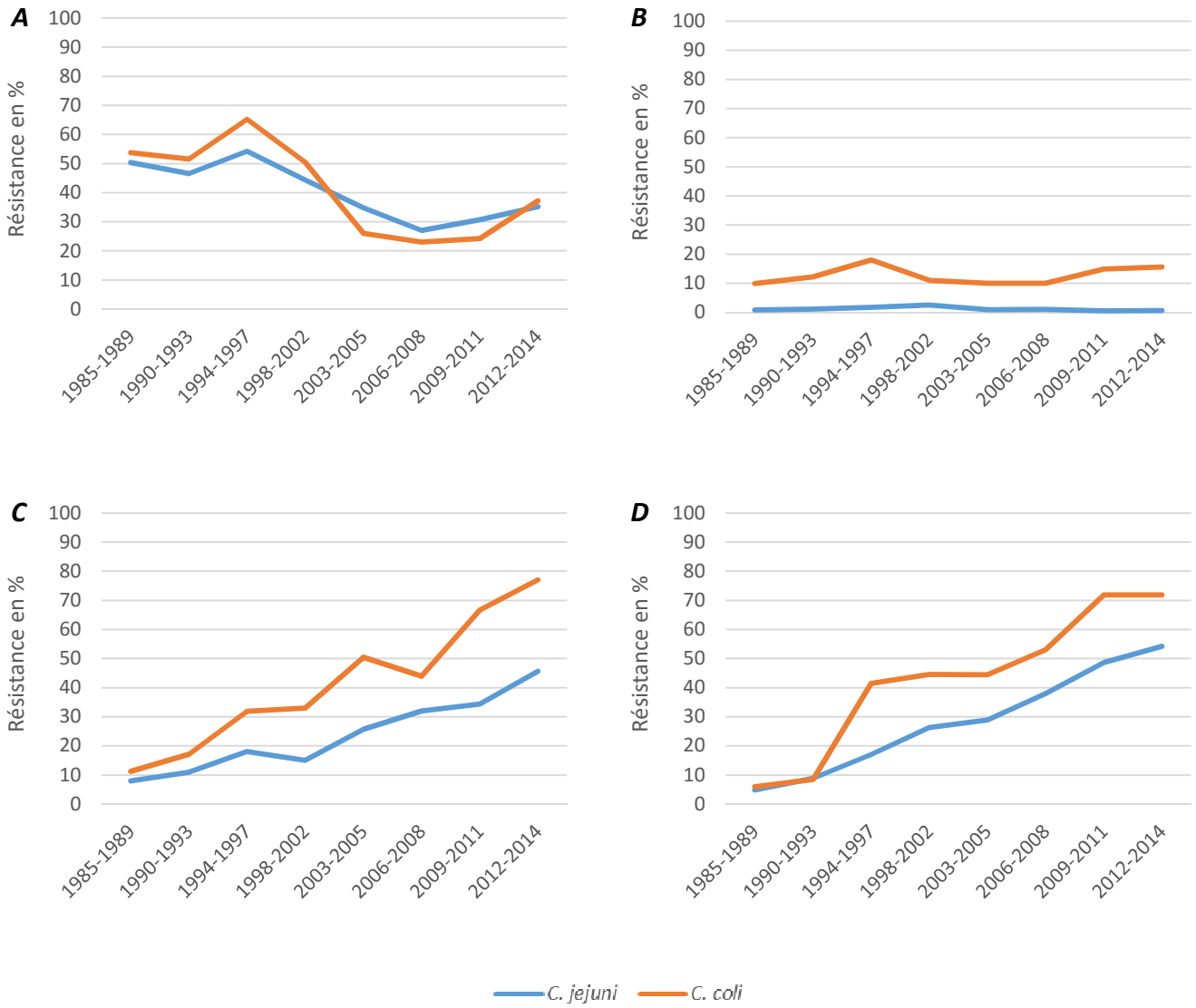


Figure 9 : Résistance aux antibiotiques des Campylobacter isolés en France entre 1986 et 2014 (CNR 2015) [86]

A : Amoxicilline B : Erythromycine C : Cyclines D : Quinolones

1.7.3.2 - En Europe

En Europe, les taux de résistance observés varient suivant les états. Ainsi, 30 % des *C. jejuni* sont retrouvés résistants à la ciprofloxacine en Norvège alors que presque 98 % le sont au Portugal. Les mêmes écarts sont constatés pour la résistance aux cyclines et *a minima* pour celle aux macrolides. Concernant *C. coli*, des variations similaires sont retrouvées mais il se dégage que l'espèce est globalement plus résistante. Enfin, on observe que les taux moyens de résistance au niveau européen sont comparables aux taux de résistance relevés en France [76]. Les données de résistances pour *C. jejuni* et *C. coli* dans différents pays d'Europe en 2014 sont rapportées en *Tableau 2.*

Pays	Résistance en %									
	Amox/Ac. Clav.		Ciprofloxacine		Erythromycine		Gentamicine		Tétracycline	
	C. jejuni	C. coli	C. jejuni	C. coli	C. jejuni	C. coli	C. jejuni	C. coli	C. jejuni	C. coli
Autriche	-	-	69,7	84,1	0	4,5	0,3	0	31,1	68,2
Espagne	-	-	87,4	97,0	3,3	44,8	2,0	13,4	81,3	92,5
Estonie	-	0,9	80,6	NA	0	NA	-	-	64,5	NA
Italie	-	-	81,2	NA	13,0	NA	-	-	69,6	NA
Lituanie	-	-	87,4	87,4	1,5	4,8	-	-	51,3	NA
Luxembourg	8,8	-	64,5	69,9	0,3	9,6	-	-	47,9	69,9
Malte	-	-	69,8	86,3	27,5	42,5	-	NA	-	NA
Norvège	-	-	29,7	NA	3,4	NA	2,8	NA	20,0	NA
Pays-Bas	-	-	59,8	65,5	1,9	17,4	-	-	43,2	62,0
Portugal	-	-	97,9	97,0	5,2	57,6	0	3,0	77,1	87,9
Roumanie	-	-	50,0	NA	0	NA	0	NA	43,8	NA
Slovaquie	1,5	3,6	50,6	61,4	1,1	5,9	39,1	-	25,6	31,3
Slovénie	-	-	69,5	80,5	1,5	4,6	-	-	36,2	46,0
Total	***1,5***	***1,6***	***60,2***	***68,9***	***1,5***	***14,6***	***0,4***	***1,7***	***46,4***	***53,8***
France	1,0	0,9	55,4	63,1	0,3	10,1	0,2	0,8	54,2	49,0

NB : « - » : Absence de donnée, « NA » : Non applicable

Tableau 2 : Résistances aux antibiotiques de C. jejuni et C. coli en Europe en 2014 (d'après EFSA 2016) [76]

1.7.3.3 - A La Réunion

La résistance de *Campylobacter* isolé chez l'Homme à La Réunion n'a pour l'heure fait l'objet d'aucune publication. Les données du laboratoire extraites sur les 3 dernières années (2013, 2014, 2015) portant sur 184 *C. jejuni* et 18 *C. coli* permettent d'estimer les taux de résistance de *Campylobacter* chez les patients infectés dans le Sud de l'île *(Tableau 3).*

Pour *C. jejuni*, une résistance importante et supérieure à 30 % est observée au CHU Sud Réunion pour l'ampicilline, la ciprofloxacine et la tétracycline. Concernant *C. coli*, l'échantillon faible ne permet pas de conclure sur une réelle différence de résistance entre les deux espèces mais il semblerait que cette bactérie soit davantage résistante à la tétracycline (60 % de résistance dans notre série).

	C. jejuni		*C. coli*	
	Nb de souches	**% de résistance**	**Nb de souches**	**% de résistance**
Ampicilline	184	30,9	18	38,9
Amox/Ac. Clav.	184	4,3	18	1,1
Ciprofloxacine	184	31,5	18	33,3
Erythromycine	184	1,1	18	5,6
Gentamicine	184	1,1	18	0
Tétracycline	139	30,2	15	60,0

Tableau 3 : Résistance de C. jejuni et C. coli identifiés au CHU Sud Réunion de 2013 à 2015

Les taux de résistance observés en France en 2015 par le CNR et au laboratoire sur les 3 dernières années pour *C. jejuni* diffèrent pour certains des antibiotiques testés. Ainsi, la résistance à l'amoxicilline/acide clavulanique est plus élevée au CHU Sud Réunion (4,3 %) qu'en France (0,5 %), celle à la tétracycline plus basse (30,2 % contre 48,3 %) et celle à la ciprofloxacine nettement plus basse (31,5 % contre 56,2 %).

Concernant *C. coli* et malgré la faible taille de notre échantillon, il semblerait que les résistances observées soient comparables entre la France et le CHU Sud Réunion, sauf pour la ciprofloxacine pour laquelle le taux de résistance est deux fois inférieur au CHU Sud Réunion qu'en France sur la même période (respectivement 33,3 % et 65,8 %).

Par ailleurs, nos données ne mettent pas en évidence d'augmentation continue de la résistance à la ciprofloxacine sur ces 3 années chez ces deux espèces. Cependant, ces résultats sont à interpréter avec prudence compte tenu de la taille relativement modeste des échantillons.

1.7.3.4 - Origine de la résistance en pathologie humaine

L'hypothèse principale avancée pour expliquer l'augmentation de la résistance aux quinolones chez *Campylobacter* depuis 20 ans [81] est l'utilisation accrue dans les filières de production animale d'antibiotiques, soit à visée préventive ou thérapeutique, soit comme facteurs de croissance. L'enrofloxacine, quinolone structurellement proche de la ciprofloxacine, est notamment incriminée [31,87]. Certains auteurs ont démontré que la résistance aux fluoroquinolones se développait rapidement chez les poulets traités [88,89], apparaissant parfois dans les 24 heures post-traitement [88]. La pression de sélection exercée est alors liée à l'émergence de souches résistantes transmissibles à l'Homme [90]. Afin de lutter contre l'émergence de résistances, l'Union Européenne a publié en 1999 des mesures visant à limiter l'utilisation de ces traitements [91] et a interdit l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance depuis le 1er janvier 2006.

1.7.4 - Epidémiologie des résistances dans la filière animale

1.7.4.1 - En France

Chez la volaille, en France et en 2010, la résistance aux macrolides était quasi nulle pour l'espèce *C. jejuni* et elle était inférieure à 20 % pour *C. coli*. La résistance aux quinolones était respectivement de 51 % et 70 % la même année. Chez le porc en 2009, la résistance de *C. coli* aux macrolides était de 45 % et la résistance aux quinolones était de 34 % la même année. Dans toutes les filières de production, la résistance constatée à la gentamicine était quasi nulle et celle observée pour la tétracycline était supérieure à 50 % en 2009 et en 2010 [92].

1.7.4.2 - En Europe

En 2014, les résistances à la tétracycline et à la ciprofloxacine de *C. jejuni* et de *C coli* retrouvés dans les élevages de poulets étaient très élevées en Europe. Concernant *C. jejuni*, les taux de résistance moyen observés étaient de 54,4 % pour la tétracycline et de 69,8 % pour la ciprofloxacine. Concernant *C. coli*, ces taux étaient respectivement de 59,6 % et de 74,3 %. Suivant les pays concernés, l'évolution de ces taux sur les dernières années est différente [76].

1.7.4.3 - A La Réunion

La résistance de *Campylobacter* isolé chez l'animal à La Réunion n'a pour l'heure fait l'objet d'aucune publication.

1.7.5 - Impact clinique de la résistance aux quinolones

Les données concernant l'impact clinique de la résistance sont contradictoires et il est difficile de déterminer si les souches résistantes sont plus ou moins virulentes que les souches sensibles. Certains auteurs ont en effet observé une durée moyenne de la diarrhée supérieure en cas d'isolement de souches résistantes, passant ainsi de 10 jours pour une souche sensible à 13 jours pour une souche résistante dans une étude danoise de 2004 [81] et de 7 jours à 9 jours pour une étude américaine du CDC (Centers for Deseases Control and prevention) d'Atlanta [93]. Par ailleurs, le risque de développer une complication dans les 30 jours suivant l'infection serait pour certains majoré par 6 en cas de souche résistante aux quinolones [94]. *A contrario*, d'autres auteurs ne retrouvent pas de différence significative dans la durée ou la présentation de la maladie selon le profil de sensibilité aux quinolones. Une étude réalisée en Angleterre et au Pays de Galles [95] ou encore une méta-analyse de Wassenarr *et al.* [96] concluent à l'absence de différence significative entre les effets des souches sensibles et des souches résistantes. Enfin, une étude finlandaise de 2009 menée chez 192 patients [97] constate étonnamment une tendance des souches sensibles à la ciprofloxacine d'être à l'origine de diarrhées sanglantes et d'hospitalisation plus fréquentes par rapport aux souches résistantes.

1.8 - Traitement des campylobactérioses

1.8.1 - Traitement des entérites à *Campylobacter*

Le traitement des gastro-entérites aiguës à *Campylobacter* est avant tout symptomatique. Il repose sur la réhydratation, généralement par voie orale, et sur la correction d'éventuels troubles hydro-électrolytiques.

Le traitement antibiotique n'est en règle pas nécessaire et l'infection est contrôlée par l'organisme en 7 à 10 jours [98]. Cependant, s'il est prescrit, un tel traitement peut raccourcir la durée du portage qui peut persister plusieurs semaines et peut réduire modestement la durée de la symptomatologie digestive (de 1,32 jours en moyenne selon la méta-analyse de Ternhag *et al.*) [99]. Ainsi, en raison du bénéfice clinique modeste et du risque d'apparition de résistance aux antibiotiques, les indications de l'antibiothérapie sont limitées aux patients présentant des symptômes sévères (fièvre élevée, diarrhée sanglante, etc.), aux patients à risque de développer une infection sévère (âges extrêmes de la vie, femmes enceintes, patients immunodéprimées, etc.) et en cas d'infection persistante ou récidivante. Les macrolides et notamment l'azithromycine en raison de sa longue demi-vie sont alors recommandés [100,101] et constituent actuellement l'antibiothérapie de choix pour les cas confirmés par culture. Les molécules alternatives sont les béta-lactamines telle l'amoxicilline avec ou sans association à l'acide clavulanique, les tétracyclines telle la doxycycline ou les fluoroquinolones. Compte tenu des résistances importantes, les quinolones ne sont plus utilisées en première intention et doivent être testées avant leur utilisation.

1.8.2 - Traitement des infections systémiques à *Campylobacter*

Dans les bactériémies ou dans les cas d'infections extra-intestinales, une bi-antibiothérapie est recommandée. Les aminosides comme la gentamicine par exemple sont utilisés en association par voie parentérale avec une aminopénicilline, un carbapénème ou une fluoroquinolone après détermination du profil de sensibilité [101].

1.9 - Typage de *Campylobacter*

1.9.1 - Généralités sur le typage bactérien

Un système de typage est une technique expérimentale ayant pour but de mettre en évidence des caractères discriminants permettant de distinguer au sein d'une espèce bactérienne des souches d'origine distincte et de les classer en types clonaux [102].

Sur un plan individuel, le typage peut notamment s'avérer utile en pathologie humaine afin de confirmer une infection, d'établir le foyer initial et l'extension d'une infection ou encore de déterminer si une même souche est bien en cause lors d'une rechute chez un patient ayant précédemment été infecté.

Sur un plan épidémiologique, le typage peut contribuer à confirmer une transmission endémique ou épidémique, à mettre en évidence une voie de transmission si la même souche est retrouvée chez deux espèces animales distinctes par exemple ou encore à suivre l'évolution du réservoir d'un pathogène.

1.9.2 - Méthodes de typage de *Campylobacter*

Le typage des espèces de *Campylobacter* peut se réaliser avec différentes techniques plus ou moins discriminantes, reproductibles, coûteuses et faciles à mettre en œuvre [103]. Les premières méthodes utilisées, basées sur les propriétés phénotypiques, comprennent notamment les techniques reposant sur l'expression de protéines de surface (sérotypage). Elles sont actuellement abandonnées au profit de techniques plus discriminantes, plus reproductibles et moins lourdes à réaliser, essentiellement basées sur l'analyse du génome et du polymorphisme de l'ADN, appelées méthodes génotypiques [103,104]. La *Figure 10* résume l'évolution des méthodes de typage de *C. jejuni* au cours des 30 dernières années. Le *Tableau 4* rappelle les caractéristiques de ces principales techniques.

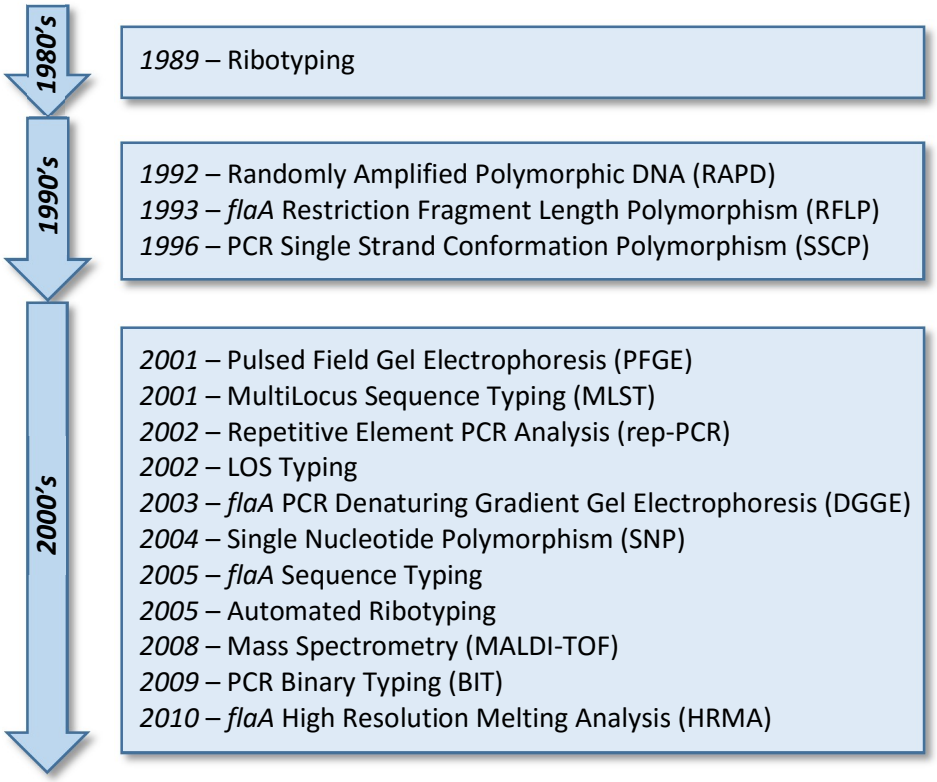


Figure 10 : Evolution des méthodes de typage de Campylobacter jejuni (d'après Ahmed et al.) [103]

Méthode	Critères de performance			Locus	Jours requis	Coût	
	D	T	R (%)			Initial	Par test
Ribotypage	Moyen	Elevé	100	Unique	1	Modéré	Bas
RAPD	Elevé	Mauvais	100	Génome	< 1	Modéré	Bas
flaA-RFLP	Moyen	Moyen	100	Unique	1	Modéré	Bas
flaA-PCR-SSCP	Elevé	Elevé	100	Unique	1	Modéré	Bas
PFGE	Elevé	Moyen	≤ 100	Génome	1-4	Modéré	Modéré
MLST	Elevé	Elevé	100	Multiple	3+	Elevé	Elevé
rep-PCR	Très élevé	Elevé	100	Multiple	1	Modéré	Bas
Séquençage LOS	Elevé	Elevé	100	Unique	1	Modéré	Modéré
flaA-DGGE	Elevé	Elevé	100	Unique	1	Modéré	Bas
SNP profiling	Modéré	Elevé	100	Multiple	1	Modéré	Bas
Séquençage flaA-SVR	Moyen	Elevé	100	Unique	1	Modéré	Modéré
Ribotypage automatisé	Bas	Elevé	< 100	Unique	1	Elevé	Modéré
MALDI-TOF	Elevé	Elevé	100	Multiple	2-3	Elevé	Elevé
PCR BIT	Elevé	Elevé	100	Multiple	1	Modéré	Modéré
flaA-HRM	Moyen	Elevé	100	Unique	1	Modéré	Bas

D : Pouvoir discriminant, T : Typabilité, R : Reproductibilité

Tableau 4 : Principales techniques de génotypage de Campylobacter jejuni (d'après Ahmed et al.) [103]

Des méthodes sur locus unique ont particulièrement été utilisées lors des deux dernières décennies. Parmi ces techniques, celles basées sur le typage du flagelle ont prouvé leur efficacité [105]. Le locus des gènes du flagelle de *C. jejuni* contient deux gènes, *flaA* et *flaB,* organisés en tandem *(Figure 11). flaA* apparaît être nécessaire à la mobilité, à la colonisation et à la pathogénicité alors que *flaB* semble être un large réservoir de variations génétiques permettant à *flaA* de se moduler génétiquement lors de recombinaisons [106]. Cette grande variabilité de *flaA* permet à la bactérie d'échapper plus facilement à la réponse immune de l'hôte infecté et rend par ailleurs ce gène très approprié pour le typage, conférant à *flaA* un large polymorphisme [105]. Ainsi, *flaA* est utilisé dans de nombreuses méthodes de typage moléculaire, telle la PCR-RFLP (basée sur des profils de digestion enzymatique) ou encore le séquençage de sa région SVR (« Short Variable Region », région courte de forte variabilité). Cependant, ces méthodes ont plusieurs inconvénients. La PCR-RFLP est une technique en plusieurs étapes qui ne permet pas de détecter les mutations n'impactant pas les sites de restriction alors que le séquençage de la région SVR ne concerne qu'une petite portion du gène *flaA* et s'avère long et coûteux.

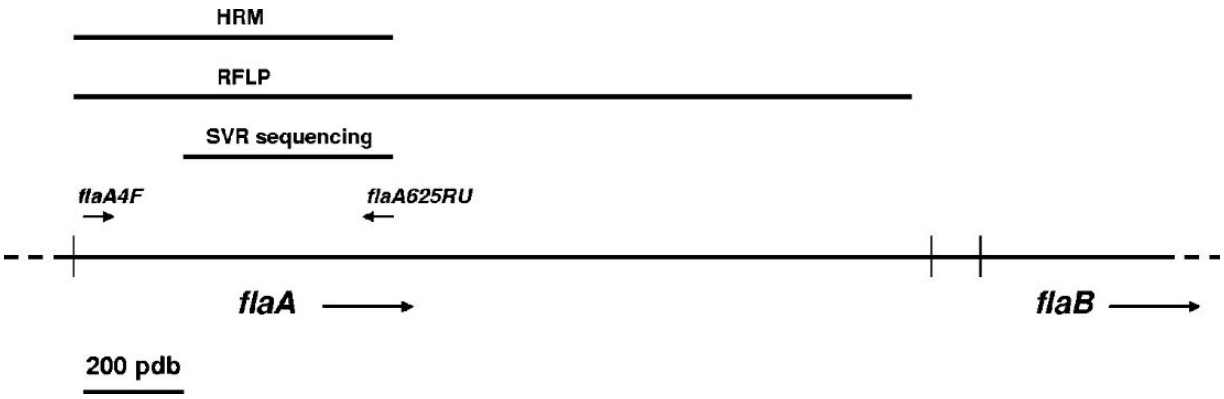


Figure 11 : Organisation des gènes fla et régions étudiées suivant les techniques de typage [107]

Par ailleurs, les méthodes s'intéressant au génome complet telle la PFGE ou celles multi-loci telle la MLST (ayant recours au séquençage de 7 gènes métaboliques) sont plus discriminantes que les techniques unilocus [108]. La technique de génotypage de *Campylobacter* par MLST est à l'heure actuelle la technique de référence en raison de sa grande discrimination, de sa reproductibilité et de la facilité de comparaison des résultats entre laboratoires qu'elle permet [108]. Cette méthode se base sur l'étude des séquences de 7 gènes métaboliques normalement relativement conservés : *aspA* (Aspartase), *glnA* (Glutamine Synthetase), *gltA* (Citrate Synthase), *glyA* (Serine HydroxyMéthylTransferase), *pgm* (Phospho Glucomutase), *tkt* (Transketolase) et *uncA* (Sous-unité α de l'ATP Synthase) [108]. Suite au séquençage des gènes, les séquences sont comparées sur une base de données internationale (*pubMLST :* http://pubmlst.org/campylobacter) afin de leur attribuer un numéro d'allèle. La combinaison des 7 numéros d'allèle (un pour chaque gène) forme le profil allélique ou Sequence Type (ST). Par la suite, les différents ST sont comparés entre eux et regroupés en complexes clonaux. Chaque complexe clonal est formé d'isolats partageant au moins 4 allèles avec le profil allélique du génotype central (ancêtre commun de qui toutes les autres souches du complexe sont issues). Ainsi, cette méthode permet une comparaison aisée entre laboratoires et une comparaison des génotypes dans l'espace et dans le temps. La technique MLST a notamment permis de montrer que *C. jejuni* était génétiquement très diversifié et qu'il avait une population faiblement clonale [108].

Au final, diverses méthodes de génotypage de *Campylobacter* existent et certaines peuvent être plus pertinentes que d'autres en fonction du but recherché.

1.9.3 - Génotypage par PCR HRM

1.9.3.1 - Principe de la PCR HRM

La PCR HRM est une PCR ayant l'avantage de pouvoir être utilisée à des fins de typage. C'est une méthode rapide, sensible, spécifique et peu coûteuse car permettant de s'affranchir de séquenceur [109]. Cette technique, réalisable en une seule manipulation, se décompose en deux étapes :

- Dans une première étape est réalisée une PCR en temps réel avec un agent intercalant particulier ayant pour spécificité d'être saturant (EvaGreen® du Kit Type-IT HRM pour la société Qiagen par exemple). Contrairement aux agents type SYBR Green® utilisés pour les déterminations de températures de fusion classiques (Tm), cet intercalant va se fixer sur la totalité de la séquence des doubles brins d'ADN [110] (mais pas sur les séquences simples brin) et ce même lorsqu'il est utilisé à des concentrations suffisamment faibles pour ne pas inhiber la PCR *(Figure 12).*

- Dans une seconde étape, des courbes de fusion haute résolution (HRM) sont réalisées après le dernier cycle de PCR. L'agent intercalant utilisé étant saturant, il n'y a pas de phénomène de relocalisation lors de la dénaturation des brins comme cela peut être le cas dans une PCR en temps réel classique *(Figure 12*). La mesure de la décroissance de la fluorescence observée lors de la dénaturation n'est donc pas biaisée par ces phénomènes et s'avère beaucoup plus précise. Lors de cette étape, la température est abaissée dans l'automate de manière à n'obtenir que de l'ADN bicaténaire puis celle-ci est très finement et très lentement augmentée (de l'ordre de 0,1°C toutes les 2 secondes). Les brins d'ADN vont alors se désapparier *(Figure 13A)* et ce à plus ou moins haute température en fonction de la séquence qui les compose (répartition et position des nucléotides, pourcentage de GC). L'acquisition de fluorescence continue au cours de ce processus permet alors la création de courbes de fusion très fines, permettant de mettre en évidence les SNP (Single Nucleotide Polymorphism), c'est-à-dire les variations du génome ne touchant qu'un unique nucléotide de la séquence amplifiée *(Figure 13B),* ce qui n'est pas possible avec une courbe de fusion classique (Tm). L'information apportée par la PCR HRM se situe alors dans la forme des courbes de fusion haute résolution obtenues et non pas dans la valeur des températures de fusion, comme cela est le cas lors de la détermination des Tm.

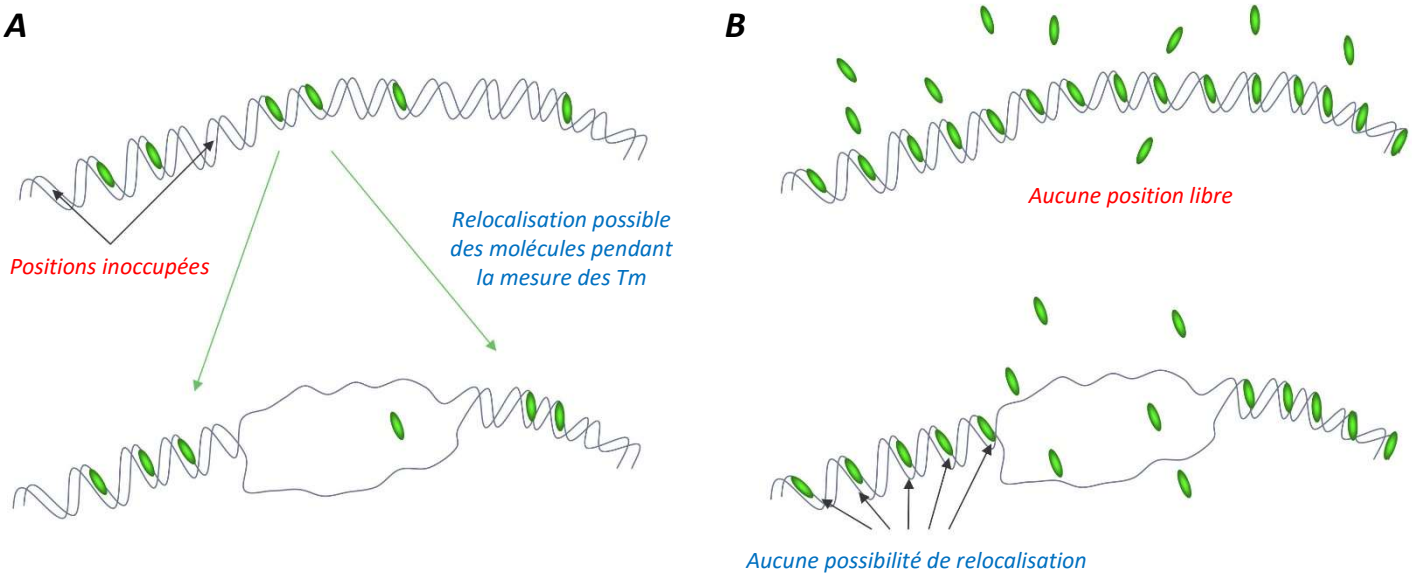


Figure 12 : Principe d'action des différents agents intercalants utilisés pour la PCR en temps réel [111]

A : Agent classique B : Agent saturant

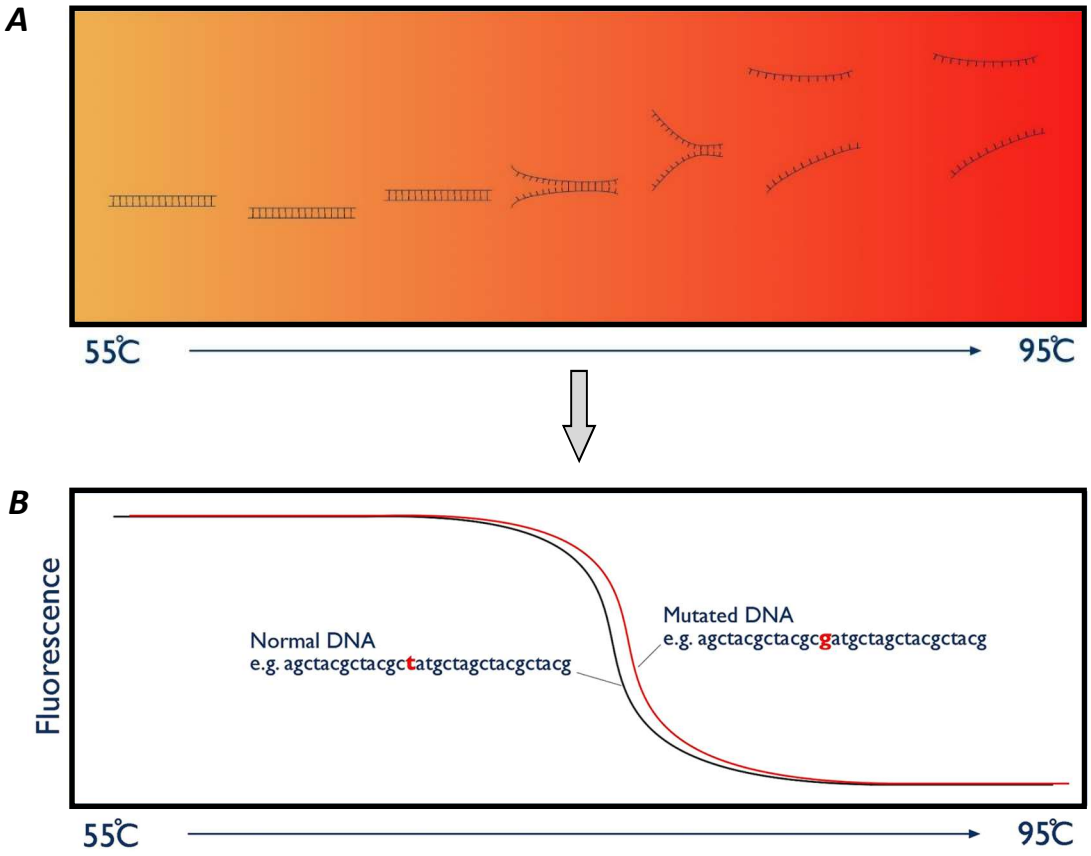


Figure 13 : Principe de la PCR HRM (http://fr.wikipedia.org/wiki/High_Resolution_Melt)

1.9.3.2 - Génotypage par PCR HRM de *flaA*

La technique de génotypage de *Campylobacter* par PCR HRM de *flaA* est une des dernières techniques développées à ce jour pour typer ce genre bactérien et ce en s'affranchissant du séquençage, long et coûteux [107]. Cette technique se base sur l'étude d'un unique locus, la région SVR du gène *flaA*. Au final, 620 paires de bases sont étudiées (région SVR + 238 paires de bases en amont) et ce grâce à la réalisation de courbes de fusion très fines permettant de détecter les SNP. La technique permet de discriminer les isolats en fonction des mutations existantes et de les classer en groupes différents à l'aide de logiciels informatiques. Cette méthode est relativement discriminante, notamment pour une méthode sur locus unique [107]. Elle ne nécessite en outre pas de séquenceur et est donc peu coûteuse et rapide à mettre en œuvre.

1.9.3.3 - Génotypage par MLST *via* PCR HRM

La technique MLST a normalement recours au séquençage des produits d'amplification obtenus par PCR mais l'équipe de Lévesque *et al.* a récemment mis au point une technique dérivée ayant recours à la PCR HRM et permettant de s'affranchir de séquenceur [112]. Ainsi, chacun des gènes d'intérêt est amplifié par PCR et une analyse HRM est réalisée en fin d'amplification. Les courbes de fusion haute résolution obtenues diffèrent selon la séquence du gène amplifié et elles permettent donc de comparer entre elles les souches typées suivant les profils de courbes obtenues.

2 - Matériels et méthodes

2.1 - Isolats bactériens, culture et extraction nucléique

2.1.1 - Isolats d'origine humaine

Les isolats bactériens de *C. jejuni* et de *C. coli* d'origine humaine inclus sont issus de prélèvements de selles ou d'hémocultures adressés au laboratoire de Bactériologie du CHU Sud Réunion du 01/01/12 au 31/12/14, soit par des services cliniques, soit par des laboratoires d'analyses privés. Conformément aux procédures en vigueur au laboratoire, ces isolats ont été conservés à -80°C en tubes cryo-billes après avoir été étudiés lors des analyses de routine. Compte tenu du coût de réalisation important des techniques de biologie moléculaire, seul un nombre restreint d'isolats conservés sur ces années ont été étudiés. Ces isolats ont été sélectionnés aléatoirement par tirage au sort et ont été décongelés et repiqués sur gélose Polyvitex (PVX, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Les milieux ont ensuite été incubés 48 heures à 37°C en atmosphère micro-aérobie (GENbox microaer, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Pour chaque prélèvement, une unique colonie a *in fine* été repiquée sur gélose PVX et incubée 24 heures à 37°C afin d'éviter l'éventuelle présence de plusieurs souches de *Campylobacter* au sein du prélèvement initial. Par ailleurs, les données concernant ces prélèvements ont été extraites à l'aide du SIL (Système Informatique du Laboratoire). Elles ont été anonymisées et seuls les paramètres suivants ont été conservés : date d'isolement, lieu de résidence, âge, sexe, données de l'antibiogramme si réalisé. Tous les doublons (même patient présentant la même espèce sur 1 an) ont été supprimés. Par ailleurs, il convient de préciser qu'aucune épidémie de campylobactérioses n'a été détectée sur la période.

Enfin, 3 souches de *C. jejuni* ainsi que 3 souches de *C. coli* isolées en métropole et fournies par le CNR *Campylobacter* ont été incluses. Elles ont été reprises et techniquées selon les mêmes modalités que les souches isolées au laboratoire du CHU Sud Réunion.

2.1.2 - Isolats d'origine animale

2.1.2.1 - Isolats d'origine aviaire

C. jejuni étant théoriquement l'espèce la plus présente chez le poulet, nous avons choisi d'étudier et de génotyper cette espèce chez cet animal. Les isolats issus de poulets ont été obtenus en s'appuyant sur un protocole déjà publié [11] à partir de prélèvements d'excréments réalisés au niveau d'élevages par le CIRAD Réunion. La première étape consiste à se rendre dans les élevages munis de pédichiffonnettes, surchaussures permettant de récolter les déjections animales en marchant dans les élevages. Les excréments de poulets ainsi récoltés sont ensuite immergés au laboratoire dans des pots stériles remplis d'eau peptonnée (CM0509, Oxoid, Hampshire, Royaume-Uni) et incubés à 40°C pendant 24 heures. Sont alors prélevés 10 µl afin d'ensemencer une gélose sélective pour *Campylobacter* contenant du Céfopérazome, de la Vancomycine et du Cycloheximide (Gélose Karmali, Oxoid, Hampshire, Royaume-Uni) incubée 48 heures à 40°C en atmosphère micro-aérobie. Une unique colonie est au final repiquée sur une gélose PVX et incubée 24 heures à 40°C avant d'être identifiée.

2.1.2.2 - Isolats d'origine porcine

C. coli étant quant à lui l'espèce la plus présente chez le porc, nous avons choisi d'étudier et de génotyper cette espèce chez cet animal. Les isolats issus de porcs ont été fournis congelés en tubes cryo-billes par le réseau AnimalRISK. Ce réseau, supervisé par le CIRAD Réunion, regroupe les acteurs de santé animale au sein de l'Océan Indien et est composé de chercheurs et de membres d'institutions répartis dans cinq pays (Réunion, Madagascar, Maurice, Comores, Seychelles). Il assure la surveillance des maladies animales déjà présentes et connues de ces territoires et identifie les voies d'introduction dans des régions indemnes. Au cours de ses projets, le réseau a constitué diverses collections de souches dont une de *C. coli* isolés chez le porc en 2012 et qui nous a été fournie. Ces isolats ont été techniqués selon un protocole commun aux isolats humains.

2.1.3 - Identification bactérienne

Tous les isolats ont été identifiés par spectrométrie de masse type MALDI-TOF (MALDI MicroFlex Biotyper, Bruker Daltonics, Brême, Allemagne). Comme recommandé par le fabricant, seuls les isolats dont le score d'identification rendu par l'automate est supérieur à 2 ont été conservés et inclus pour notre étude (identification formelle). Cette méthode d'identification est à l'heure actuelle la technique de référence dans les laboratoires de Bactériologie. Les espèces de *Campylobacter* sont ainsi identifiées avec de très bonnes performances [51].

2.1.4 - Extraction d'ADN

L'ADN des isolats a été extrait à partir des cultures à l'aide d'un automate NucliSens® easyMAG (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), conformément au manuel d'utilisation du constructeur. Les suspensions utilisées pour l'extraction ont été ajustées à 0,5 McFarland pour chaque isolat de manière à normaliser la concentration de matrice dans les mix de PCR (Suspension Medium 5 ml, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Puis, 400 µl de cette suspension ont été extraits pour obtenir 100 µl d'éluat. En cas de nécessité, 5 ml de suspension à 0,5 McFarland ont systématiquement été conservés à -80°C de manière à ce qu'une éventuelle extraction supplémentaire soit réalisée à partir du même matériel.

2.2 - Génotypage de *Campylobacter*

Nous avons choisi de typer les *Campylobacter* à l'aide de deux méthodes réalisables dans notre laboratoire, dépourvu de séquenceur : une méthode sur locus unique *via* PCR HRM du gène *flaA,* récemment publiée [107] et utilisable pour *C. jejuni* et *C coli*, ainsi qu'une méthode multi-loci dérivée de la MLST classique [108] et ayant aussi recours à la PCR HRM, valable pour *C. jejuni* seulement en raison des amorces spécifiques utilisées [112]. Ces techniques aboutissent en fin de PCR à l'obtention de courbes de fusion haute résolution. De manière à analyser ces courbes et à mettre en évidence les polymorphismes génétiques existants entre les différents isolats, nous avons choisi d'utiliser le logiciel ScreenClust® HRM Software (Qiagen, Courtabœuf, France) qui permet de grouper les isolats présentant un même profil génétique en clusters et ce grâce à une analyse statistique [113]. Ce logiciel n'a encore jamais été exploité à des fins de génotypage de *Campylobacter*.

2.2.1 - Génotypage par PCR HRM de *flaA*

La technique de génotypage uni-locus de *Campylobacter* par PCR HRM du gène *flaA* a été publiée en 2010 [107]. Elle consiste à mettre en évidence les variations de séquence de la région SVR de *flaA,* région relativement variable entre les souches de *Campylobacter.* Les amorces utilisées permettent l'amplification de 620 paires de bases de *flaA* chez *C. jejuni* et *C. coli* et sont celles préalablement publiées *(Tableau 5)* [107]. Le mix final pour une réaction en 10 µl contient : 5 µl de 2X HRM PCR Master Mix (Kit Type-IT HRM, Qiagen, Courtabœuf, France), 0,7 µl (soit 0,7 µM) de chaque amorce (TibMolBiol, Berlin, Allemagne), 1,6 µl d'eau et 2 µl d'éluat. Le protocole d'amplification réalisée sur RotorGene® Q (Qiagen, Courtabœuf, France) est le suivant : activation de la Taq Polymérase durant 5 minutes à 95°C puis 40 cycles comprenant une dénaturation à 95°C pendant 5 secondes, une hybridation à 55°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 30 secondes. A la fin de l'amplification, une courbe de fusion haute résolution est réalisée en augmentant la température de 65°C à 95°C par pallier de 0,1°C toutes les 2 secondes avec acquisition continue de fluorescence. Une analyse des courbes est ensuite réalisée *via* le logiciel ScreenClust®.

Gène	Taille (pdb)	Amorce Forward : *flaA4F*	Amorce Reverse : *flaA625RU*
flaA	620	GGATTTCGTATTAACACAAATGGTGC	CAAGACCTGTTCCAACTGAAG

Tableau 5 : Amorces utilisées pour la technique PCR HRM de flaA [107]

2.2.2 - Génotypage par MLST *via* PCR HRM

La technique de génotypage multi-loci de *Campylobacter* par MLST se base sur l'étude des variations de séquence de 7 gènes de ménage après séquençage : *aspA* (Aspartase), *glnA* (Glutamine Synthetase), *gltA* (Citrate Synthase), *glyA* (Serine HydroxyMéthylTransferase), *pgm* (Phospho Glucomutase), *tkt* (Transketolase) et *uncA* (Sous-unité α de l'ATP Synthase) [108]. Cette méthode permet notamment de pouvoir comparer entre laboratoires les résultats obtenus et ainsi de comparer les populations bactériennes retrouvées en différents lieux de la planète.

Une méthode dérivée utilisant la technologie HRM a été décrite par Lévesque *et al.* [112]. Elle nécessite d'amplifier chacun des 7 gènes en 2 ou 3 parties distinctes de manière à obtenir des amplicons de 300 paires de base au maximum, taille idéale pour qu'une analyse HRM soit correctement réalisable [114]. Nous avons utilisé cette méthode qui requiert un total de 17 couples d'amorces *(Tableau 6)* pour amplifier les 7 portions de gènes classiquement séquencées. Pour chaque fragment amplifié, le mix final est le même que celui réalisé pour l'amplification de *flaA.* Le protocole d'amplification est aussi identique à celui décrit pour *flaA* hormis le temps d'élongation qui est ici abaissé à 10 secondes, les régions à amplifier étant plus courtes. Des courbes de fusion HRM sont ensuite réalisées en fin de PCR pour chaque région amplifiée et seront analysées *via* le logiciel ScreenClust®. Les courbes obtenues sont différentes en fonction de la composition de la séquence amplifiée et leur comparaison permet donc de savoir quels isolats sont comparables d'un point de vue allélique. En revanche, contrairement à la technique MLST conventionnelle, nos résultats ne seront pas comparables à ceux d'un autre centre, les variations de séquences étant comparées entre elles sans être connues (pas de référence à pubMLST).

Gène	Fragment	Taille (pdb)	Amorce Forward	Amorce Reverse
aspA	***aspA1***	199	GTGAATTTAAAACTTTTGCCGTA	TCGATCAAATCCTCAGCCACAGTA
	aspA2	187	TAAGAGAAGTGACAGGTTTTGAAT	GGAAGATTAATCTCATTAAGACCACATT
	aspA3	247	GACTTAAGACTTTTAAGTAGTGGTCC	GCATTACAACAGAATTAAATAAGCTATATGC
glnA	***glnA1***	106	AACCTGATGCTCAAAGTGC	CATTTTTCATACATTTGTCCTTTG
	glnA2	318	CTATCATAGTATTTTGTGATGTGTATG	CTAAAGAATCAATTGGCTGAACTGG
	glnA3	231	CTGGACACAGGCCAAGAAACAAAGGTG	GAGCTACCATTTTTACAACATATTTATAAATTTG
gltA	***gltA1***	225	CGCGTCTTGAAGCATTTCGTTAT	CCACTATAGTAGGGATTTTAGCTAC
	gltA2	272	GAATATATGGAAATGGCAGCTAG	GCATGAGTTGAACCCACAGC
glyA	***glyA1***	288	GATAAAATTTTAGGAATGGATTTAAGTCATG	CACAACAAGACCTGCAATATG
	glyA2	317	GCCTATCTTTTTGCTGATATAGCA	AAAACATTAGCTAAAACTTGAGC
pgm	***pgm1***	275	GAAGTTATAGTAATGAGTGATAAACCTAATG	TTTAAAGCACCATTACTCATTATAGT
	pgm2	328	GGTAAATTACAATCAAGTGTTGTGGC	CTTTTTTTTCTGCAATTTTAAG
tkt	***tkt1***	261	CATGCAAGTGCTTTGCTTTATAGT	CCCATCTCCGCAAAGACAA
	tkt2	304	GCTAGGCAGTGATTTAATCGATCA	GATGATAAGACAAGGTTTTGTGGA
uncA	***uncA1***	176	GGTGCTATGGAATATACTATTGTTG	GACATTTCGCGATAAGCTACAGC
	uncA2	221	GTTTATGATGATTTGAGCAAGC	GTTGGAATATAAGCAGAAACATCTCC
	uncA3	265	GGTGCTGGTTCTTTGACGGCATTG	GTGCAAAAGCTTGAAGCTCTCTA

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la technique MLST via HRM (Lévesque et al., 2011) [112]

2.2.3 - Analyse des courbes HRM et clustering *via* le logiciel ScreenClust®

Les courbes HRM ont été analysées *via* le logiciel ScreenClust® HRM Software [113] (Qiagen, Courtabœuf, France), outil capable de grouper les échantillons en clusters (groupes) en fonction des différences observées au niveau de leurs courbes de fusion et donc en fonction des variations de séquences présentes dans le gène. Le polymorphisme génétique peut alors être détecté jusqu'à la variation d'une unique paire de base (SNP) et ce quelle que soit la mutation présente. ScreenClust®, *via* plusieurs étapes successives explicitées ci-dessous, compare les courbes HRM entre elles et détermine quelles sont les courbes à considérer comme identiques et donc, quels sont les échantillons présentant une séquence amplifiée identique.

Dans une première étape *(Figure 14)*, les courbes HRM des échantillons qui peuvent avoir des intensités de fluorescence différentes sont normalisées afin d'être rapportées à une échelle commune. Pour cela, une zone « pré-melt » et une zone « post-melt » sont choisies par l'utilisateur de manière à obtenir les meilleurs résultats. La valeur moyenne de fluorescence de la zone « pré-melt » est rapportée à 100 et la valeur moyenne de fluorescence de la zone « post-melt » est rapportée à 0. Au final, toutes les courbes ont une intensité comparable.

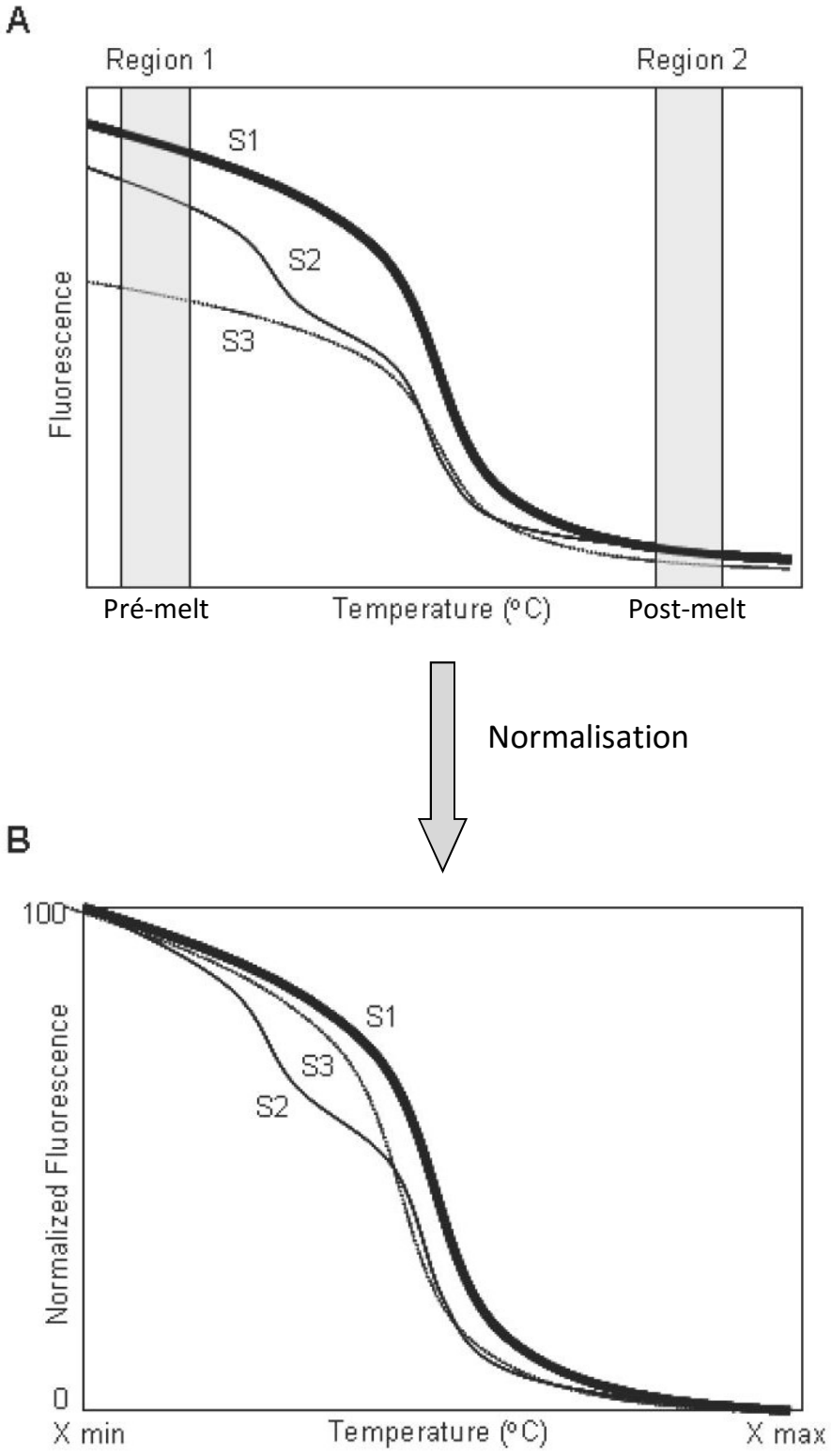


Figure 14 : Normalisation des courbes HRM par ScreenClust® (Manuel ScreenClust®) [115]

A : Courbes brutes B : Courbes normalisées

Dans une seconde étape *(Figure 15),* les courbes normalisées sont comparées à une courbe dite « Médiane » créée en reportant pour chaque point la fluorescence médiane obtenue à la même température pour toutes les courbes normalisées. La courbe obtenue par soustraction de la courbe « Médiane » et d'une courbe normalisée est dite « résiduelle » et est utilisée pour l'analyse.

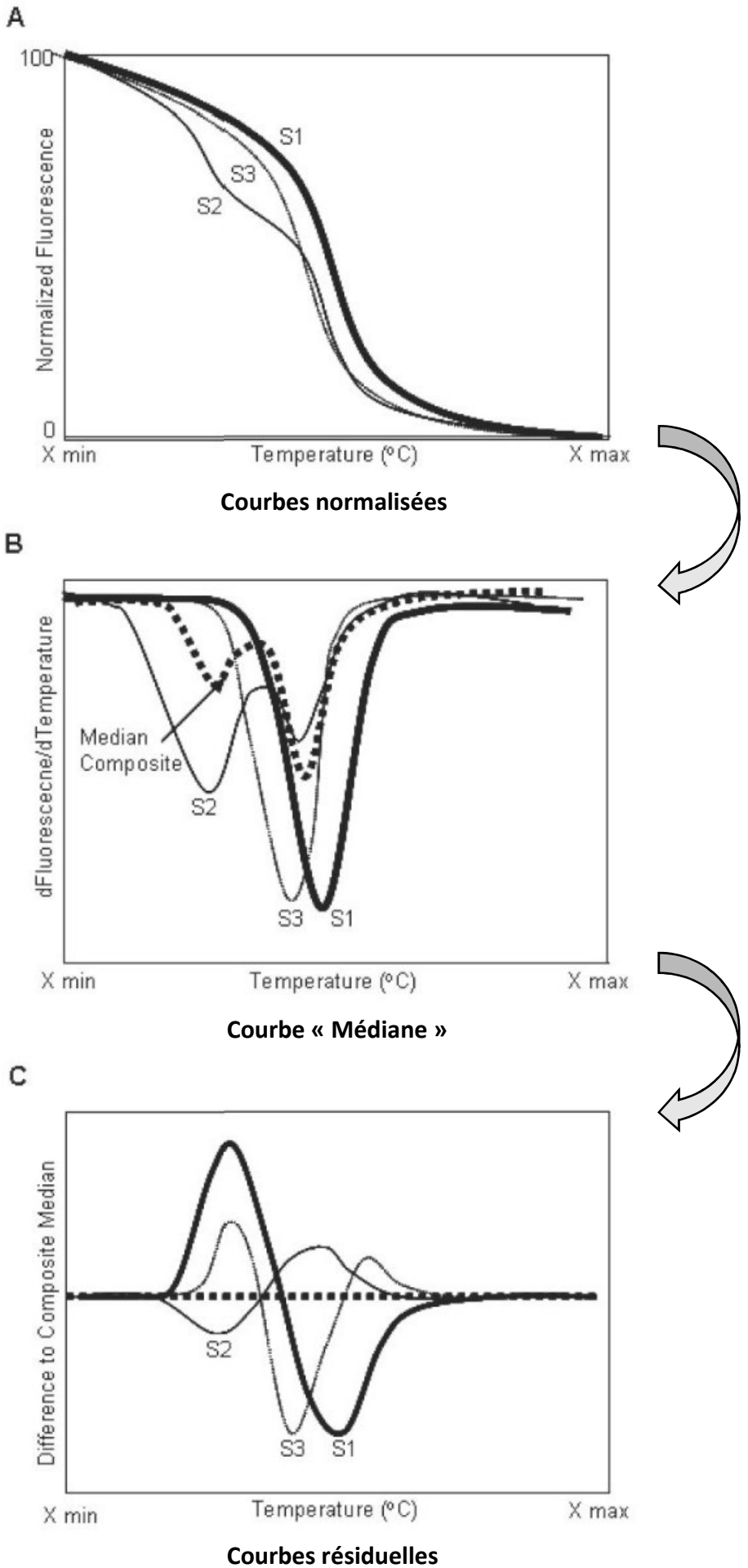


Figure 15 : Création des courbes résiduelles par ScreenClust® (Manuel ScreenClust®, Qiagen) [115]

Dans une troisième étape, une analyse statistique permettant de comparer les courbes résiduelles est réalisée. Cette étape est basée sur une analyse en composantes principales (PC). Cette analyse statistique est en fait réalisée en tâche de fond par le logiciel libre R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, http://www.R-project.org). ScreenClust® peut réaliser *via* R des analyses en 2 ou en 3 PC, soit au choix de l'utilisateur, soit de manière automatisée en choisissant une analyse en 2 PC par défaut puis en réalisant une analyse en 3 PC si les résultats obtenus par la première analyse en 2 PC ne sont pas satisfaisants.

Enfin, dans une dernière étape dite de « clustering », les échantillons sont classés en groupes (clusters) à partir des résultats de l'analyse statistique en composantes principales et à l'aide de deux paramètres calculés par le logiciel : une probabilité et une typicalité.

La ***probabilité*** pour chaque échantillon d'appartenir à un cluster est calculée pour chaque cluster déterminé. Elle est comprise entre 0 et 1 et la somme des probabilités d'un échantillon d'appartenir aux clusters déterminés est égale à 1. Par exemple, si trois clusters existent, un échantillon peut avoir une probabilité de 0,9 d'appartenir au cluster 1, une probabilité de 0,05 d'appartenir au cluster 2 et une probabilité de 0,05 d'appartenir au cluster 3. Les échantillons avec une probabilité d'attribution inférieure à 0,7 doivent être considérés avec précaution [113] et seront rendus non typables.

La ***typicalité*** évalue dans quelle mesure un échantillon peut intégrer le cluster pour lequel sa probabilité d'attribution est la plus forte. Les échantillons avec une typicalité inférieure à 0,05 doivent être considérés avec précaution [113] et seront rendus non typables.

Par ailleurs, le nombre de clusters présents au sein de la population étudiée peut être soit défini par l'utilisateur, dans le cas d'une analyse dite « supervisée », soit déterminé par le logiciel lui-même dans le cas d'une analyse dite « non supervisée ». En cas d'analyse supervisée, au minimum 3 souches contrôles connues pour chaque profil allélique recherché sont utilisées afin de créer les clusters. ScreenClust® distribue alors les souches testées dans un des clusters définis. Si les clusters attendus ne sont pas connus à l'avance, ScreenClust® permet *via* l'analyse non supervisée de déterminer le nombre de clusters présents au sein de l'échantillon.

Dans le cadre de notre projet, nous avons utilisé ScreenClust® de manière à comparer les courbes HRM obtenues par les deux techniques de génotypage utilisées. Pour ces méthodes de typage sur *flaA* ou MLST, ScreenClust® a été utilisé en analyse non supervisée, le nombre de variations génétiques pour chacun des gènes au sein de notre population d'étude nous étant inconnu.

2.3 - Détection des mutations de *gyrA* par PCR HRM

Dans le cadre de l'étude de la résistance aux quinolones, nous avons souhaité mettre au point une technique de biologie moléculaire en PCR HRM basée sur *gyrA* nous permettant de détecter rapidement, sans séquenceur et à moindre coût, les mutations responsables de résistance. A cette fin, nous avons réalisé nos travaux sur l'échantillon de souches constitué aléatoirement et déjà utilisé pour le typage moléculaire de nos isolats humains de *Campylobacter*.

Dans un premier temps, nous avons souhaité confirmer le profil de sensibilité des isolats rendus résistants dans l'activité de routine et utilisés pour nos travaux. Pour cela, nous avons réalisé une détermination de la CMI à la ciprofloxacine en milieu gélosé pour chacun de ces isolats.

2.3.1 - Profils de résistance phénotypiques des isolats testés

Les CMI ont été réalisées comme suit : une suspension en milieu salé ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre à 0,5 McFarland (Solution NaCl 0,85% Medium 2 ml, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) a été réalisée à partir des colonies obtenues après repiquage. Conformément aux recommandations établies par le CA-SFM 2015, les CMI ont été réalisées sur gélose MHF (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) avec un ensemencement à l'écouvillon en 3 directions. Une bandelette Etest® de Ciprofloxacine (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) a été déposée dans les 15 minutes suivant l'ensemencement et les géloses ont été incubées 24 heures à 37°C en micro-aérobiose avant d'être lues. Chaque isolat pour lequel la CMI était strictement supérieure à 0,5 mg/L a été classé résistant.

2.3.2 - Profils de résistance génotypiques des isolats testés

Nous avons donc tenté de mettre au point une technique de biologie moléculaire en PCR HRM à la recherche de la mutation C257T (Thr86Ile) du gène *gyrA*, responsable dans la quasi-totalité des cas du profil de haute résistance aux quinolones de *Campylobacter* [65]. Nous avons choisi des amorces préalablement publiées [61] et largement utilisées, notamment pour les techniques basées sur le séquençage *(Tableau 7)*. La région amplifiée fait 220 paires de bases et couvre la région QRDR du gène *gyrA* [61]. Le mix final pour une réaction en 10 µl contient : 5 µl de 2X HRM PCR Master Mix (Kit Type-IT HRM, Qiagen, Courtabœuf, France), 0,7 µl (soit 0,7 µM) de chaque amorce (TibMolBiol, Berlin, Allemagne), 1,6 µl d'eau et 2 µl d'éluat. Le protocole d'amplification réalisée sur automate RotorGene® Q (Qiagen, Courtabœuf, France) est le suivant : activation de la Taq polymérase 5 minutes à 95°C puis 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 95°C pendant 5 secondes, une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 secondes et une étape d'élongation à 72°C pendant 10 secondes. A la fin de l'amplification, une courbe de fusion haute résolution est réalisée en augmentant la température de 65°C à 95°C par pallier de 0,1°C toutes les 2 secondes avec acquisition de fluorescence continue. Une analyse des courbes (et donc du polymorphisme génétique) est ensuite réalisée *via* ScreenClust®.

Gène	Taille (pdb)	Amorce Forward	Amorce Reverse
gyrA	220	GCTATGCAAAATGATGAGGC	CAGTATAACGCATCGCAGCG

Tableau 7 : Amorces utilisées pour la technique PCR HRM de gyrA [61]

Les courbes obtenues ont été analysées de manière supervisée, avec 2 clusters témoins : un dit « Sauvage », composé de 5 souches sensibles à la Ciprofloxacine en CMI, et un dit « Muté », composé de 5 souches résistantes en CMI. Les souches ont été classées dans l'un des deux clusters et les résultats ont été comparés avec ceux obtenus par mesure de la CMI. De plus, ces résultats ont été confirmés en analyse non supervisée (sans souches témoins) où ScreenClust® détermine alors seul le nombre de clusters présents au sein de l'échantillon.

2.3.3 - Validation de la détection des mutations *gyrA* par séquençage

Afin de vérifier les résultats obtenus avec notre technique de détection des mutations de *gyrA* en PCR HRM avec analyse ScreenClust®, nous avons choisi de faire séquencer les amplicons *gyrA* de certaines souches de notre population d'étude. Afin d'avoir un échantillon représentatif, nous avons choisi de faire séquencer 3 souches classées « sauvages », 3 souches classées « mutées » ainsi que les éventuelles souches non typables ou non attribuées à un des deux clusters prédéfinis.

Les gènes *gyrA* des isolats soumis au séquençage ont été préalablement amplifiés au laboratoire par PCR en point final. Le mix final pour une réaction en 25 µl contient : 2,5 µl de Tampon 10X (10X PCR Buffer II, Applied Biosystems, Waltham, USA), 2,5 µl de $MgCl_2$ à 25 mM (Applied Biosystems Waltham, USA), 1 µl de dNTPs à 10 mM (PCR Nucleotide Mix, Roche, Bâle, Suisse), 1 µl (soit 1 µM) de chaque amorce (TibMolBiol, Berlin, Allemagne), 0,15 µl de Taq Polymérase à 5 U/µl (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems Waltham, USA), 14,85 µl d'eau et 2 µl d'éluat. Le protocole d'amplification réalisée sur GeneAmp® 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, USA) est le suivant : activation de la Taq Polymérase durant 9 minutes à 94°C puis 40 cycles comprenant une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 55°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 1 minute.

Le séquençage de type Sanger a ensuite été réalisé par la société Themis Biofidal (Vaulx-en-Velin, France) qui a au préalable effectué une purification enzymatique de nos produits de PCR. Les amorces utilisées sont celles déjà employées pour notre PCR HRM *gyrA (Tableau 7).* La séquence amplifiée étant relativement courte (220 pdb), nous avons choisi de faire réaliser un séquençage double brin afin de ne pas perdre d'information en amputant les séquences des amorces. La séquence finalement obtenue fait 220 pdb et est identique à celle amplifiée.

2.4 - Rendu des résultats finaux *via* le logiciel Phyloviz

De manière à pouvoir croiser nos données et à faire apparaître le lien de parenté existant entre les souches typées, nous avons réalisé des arbres couvrants minimums (MST : Minimum Spanning Trees) [116] à l'aide du logiciel libre et gratuit Phyloviz [117] et de l'algorithme goeBURST [117]. L'utilisation d'un outil similaire a déjà été publiée pour l'étude de *Campylobacter* aux Etats-Unis [118]. Cela permet notamment de faire apparaître d'éventuels complexes clonaux au sein de la population étudiée et de visualiser le lien entre des souches dont les caractéristiques varient (lieu, hôte, …) [116]. Phyloviz relie les isolats entre eux en fonction des similitudes observées au niveau des ST (Sequence Type) attribués pour chacun des gènes typés. Notre technique MLST nécessitant un « découpage » des gènes en 2 ou 3 parties pour être réalisée, nous avons dû associer pour chaque gène les résultats obtenus pour les parties le constituant afin d'attribuer un ST à chaque allèle. Par exemple, pour le gène *tkt*, une souche dont le fragment *tkt1* a été typé comme présentant un profil associé au cluster 3 et dont le fragment *tkt2* a été typé comme présentant un profil associé au cluster 1 présente le ST « 31 » pour ce gène. Cette numérotation des ST n'est donc pas comparable à celle des bases pubMLST et nos résultats ne seront donc pas comparables à ceux d'un autre centre.

2.5 - Validation des méthodes de biologie moléculaire

Bien que déjà publiées, nous avons choisi d'évaluer nos techniques de typage notamment en raison de l'étape originale de « clustering » que nous avons effectuée. Pour cela, nous nous sommes basés sur les critères définis par l'ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) [102] : Reproductibilité, typabilité et pouvoir discriminant.

- La ***reproductibilité*** (R) définit la capacité de la méthode à typer un isolat de manière identique lors de manipulations répétées. Pour chaque couple d'amorces, une série de 10 runs de PCR a été effectuée sur plusieurs semaines sur l'un ou l'autre des deux automates à notre disposition, avec pour chaque run 3 isolats témoins déposés en triplicate. Les résultats obtenus par ScreenClust® ont été comparés et la reproductibilité a été calculée comme suit : R = X/Xt x 100 où X est le nombre d'isolats typés de la même manière dans les 10 essais et Xt le nombre total d'isolats typés. Nous espérons une reproductibilité > 95 % [102]. Ces travaux ont été menés pour *flaA*, pour les 17 fragments de gènes de la méthode MLST et pour *gyrA*.

- La ***typabilité*** (T) correspond à la proportion d'isolats capables d'être typés par une méthode de typage. Elle a été calculée pour nos techniques comme suit : T = Y/Yt x 100 où Y est le nombre de souches typées par la méthode et Yt le nombre total de souches soumises au typage.

- Le ***pouvoir discriminant*** (D) est la probabilité que la méthode soit capable de distinguer deux souches différentes choisies dans une population de l'espèce à typer. Cette probabilité, comme décrit par Hunter [119], peut être exprimée à l'aide de l'index de diversité de Simpson :

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{S} n_j(n_j-1)$$

où : N = nombre de souches testées
S = nombre total de ST décrits
n_j = nombre de souches présentant le profil j

Si D = 1, cela signifie que la méthode utilisée est capable de distinguer chacune des souches d'une population. Si D = 0, cela signifie que les souches sont identiques pour la méthode. Si D > 0,95, la méthode est considérée comme très discriminante [102].

Pour la technique de détection de résistance aux fluoroquinolones par mutation de *gyrA*, nous proposons de calculer la ***Typabilité***, la ***Sensibilité*** et la ***Spécificité*** de la méthode comme suit :

- ***Typabilité*** (T) = Y/Yt x 100 où Y est le nombre de souches typées par la méthode et Yt le nombre total de souches soumises au typage.

- ***Sensibilité*** (Se) = $R_M/(R_M+R_{WT})$ x 100 où R_M est le nombre de souches résistantes présentant un profil muté et R_{WT} le nombre de souches résistantes présentant un profil sauvage.

- ***Spécificité*** (Sp) = $S_{WT}/(S_{WT}+S_M)$ x 100 où S_{WT} est le nombre de souches sensibles présentant un profil sauvage et S_M le nombre de souches sensibles présentant un profil muté.

3 - Résultats

3.1 - Génotypage de *Campylobacter*

3.1.1 - Isolats inclus pour les techniques de génotypage

Au total, 73 *C. jejuni* issus de prélèvements adressés au laboratoire du CHU Sud Réunion entre le 01/01/12 et le 31/12/14 ont été inclus. Tous les *C. coli* identifiés sur la même période et pour lesquels une remise en culture a été possible ont été inclus (11 isolats). Par ailleurs, les 3 *C. jejuni* ainsi que les 3 *C. coli* fournis par le CNR ont été inclus.

Contrairement à nos attentes, nous ne sommes pas parvenus à isoler de *Campylobacter* chez le poulet et ce malgré plusieurs séries de 30 prélèvements réalisées en avril 2015 et en mars 2016 au niveau de 6 élevages de poulets de chair. Nos essais se sont en effet révélés non contributifs, que ce soit avec la méthode initialement choisie (culture trop riche) ou avec une méthode alternative proposée par l'équipe du CNR et s'affranchissant de l'étape d'enrichissement qui nous a permis d'isoler seulement quelques souches de *C. coli.*

Par ailleurs, 38 *C. coli* isolés chez le porc dans des élevages de l'île en 2012 et conservés en tube cryo-billes nous ont été fournis par le réseau AnimalRISK.

3.1.2 - Détermination des zones de pré-melt et post-melt

Pour chacun des amplicons utilisés dans nos techniques de typage, les zones de « pré-melt » et de « post-melt » permettant la normalisation des courbes HRM en vue de leur analyse par ScreenClust® ont été déterminés après plusieurs essais. Les zones permettant d'obtenir les meilleurs résultats de clustering en termes de probabilité et de typicalité ont été appliquées à chaque nouveau run pour un amplicon donné *(Tableau 8)*.

Fragment de gène amplifié	Température de début de zone « pré-melt »	Température de fin de zone « pré-melt »	Température de début de zone « post-melt »	Température de fin de zone « post-melt »
FlaA (C. jejuni)	76	77	82,5	83
FlaA (C. coli)	71,5	74	83	83,5
aspA1	65	75	80	95
aspA2	65	76,5	83	83,4
aspA3	65	76,5	81	81,5
glnA1	65	70,2	81,5	81,9
glnA2	76	77	80	80,5
glnA3	65	77	82	82,5
gltA1	65	76	82	82,5
gltA2	75	77	82	82,5
glyA1	76	77	80	80,5
glyA2	65	76	84	84,5
pgm1	79	80	84	84,5
pgm2	65	75,5	84	84,5
tkt1	65	80	85	85,5
tkt2	70	76,5	81	81,5
uncA1	65	74	83	83,5
uncA2	65	78	86	95
uncA3	76,5	78	85	85,5

Tableau 8 : Limites des zones « pré-melt » et « post-melt » retenues pour l'analyse HRM de chaque amplicon

3.1.3 - Génotypage des isolats de *Campylobacter jejuni*

Dans un premier temps, nous avons typé les 76 isolats de *C. jejuni* à notre disposition (exclusivement humains) *via* la méthode PCR HRM sur *flaA.* La *Figure 16* illustre les étapes nécessaires à l'obtention de clusters à l'aide de ScreenClust® pour 40 isolats de *C. jejuni* typés en *flaA*. Les résultats finaux pour la totalité des isolats typables sont présentés en *Figure 17*.

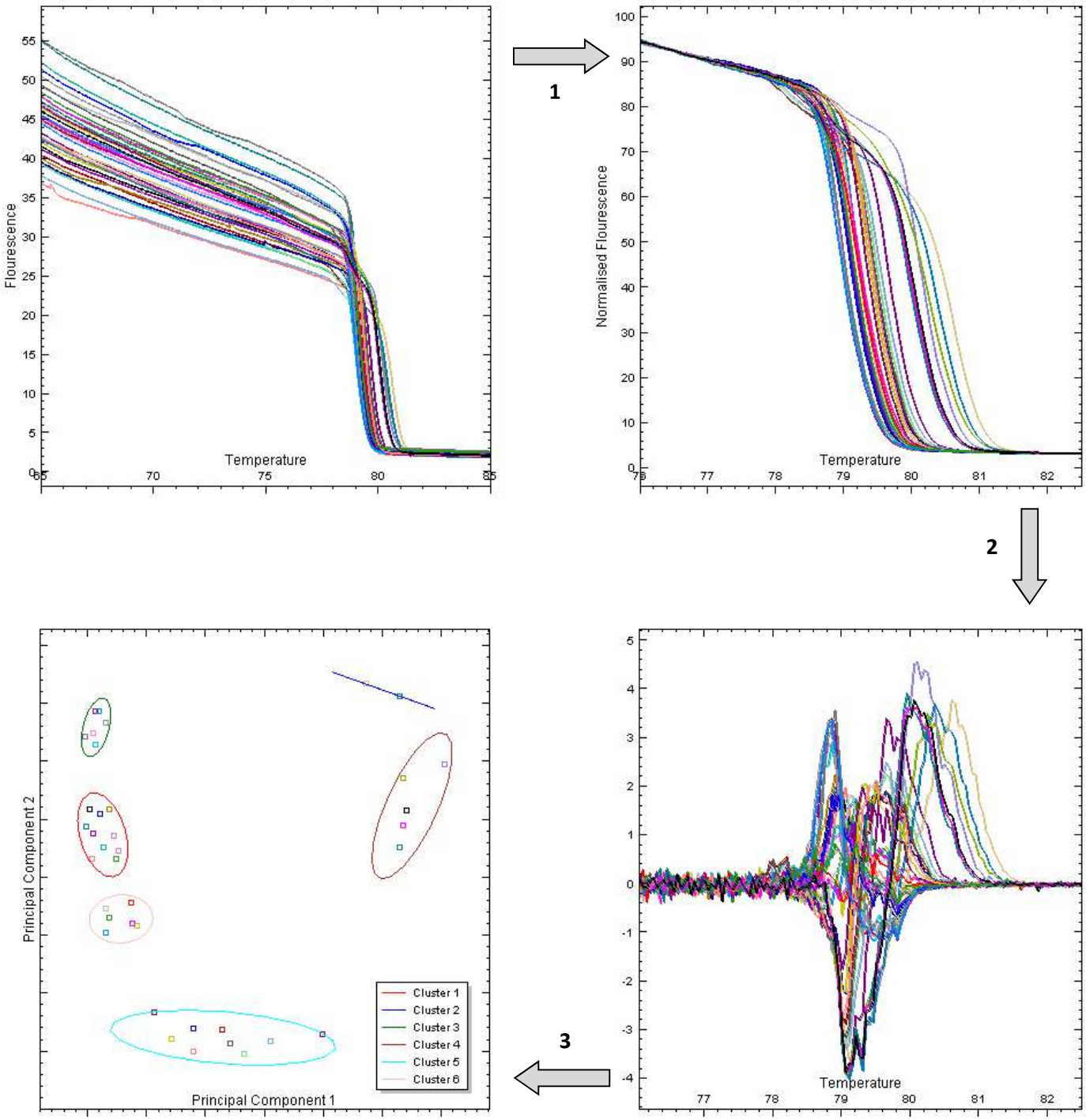


Figure 16 : Résultats rendus par ScreenClust® pour le typage de 40 C. jejuni via PCR HRM flaA

Les courbes HRM obtenues sont normalisées (1) puis une courbe résiduelle est calculée pour chaque courbe normalisée (2). Une analyse en composantes principales des courbes résiduelles permet au final une répartition en clusters des différents isolats (3) et ce en fonction de leurs courbes HRM.



Figure 17 : Répartition des 74 isolats de C. jejuni typables au sein des clusters définis par ScreenClust®

Sur les 76 *C. jejuni* d'origine humaine, 2 isolats n'ont pas pu être typés à l'aide de ScreenClust® par cette méthode (Probabilité < 0,7 ou Typicalité < 0,05). La typabilité est donc ici de 97,3 %. Parmi les 74 isolats typables, 6 clusters sont identifiés mais 2 semblent majoritaires au sein de la population. En effet, 60 % des isolats sont classés dans le cluster 2 ou le cluster 5 et les 3 isolats métropolitains se classent aussi au sein de ces clusters. Pour cette technique et cette espèce, l'index de pouvoir discriminant calculé est de 0,80.

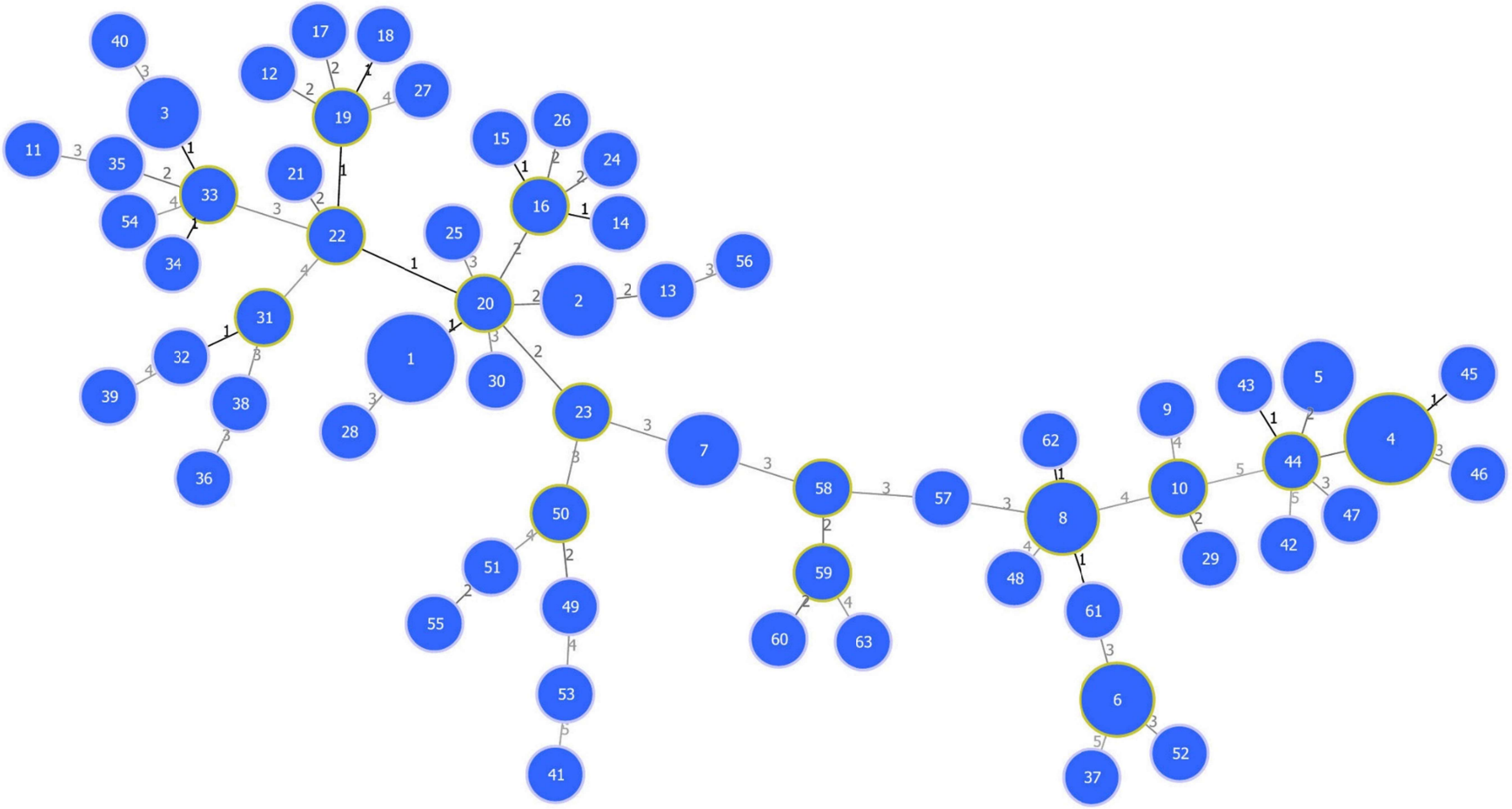
Dans un second temps, nous avons typé les isolats *via* notre méthode MLST. Trois isolats se sont avérés non typables et la typabilité pour cette technique est donc de 96,1 %. Nous retrouvons 63 ST différents parmi les 73 isolats typables et l'index de pouvoir discriminant est ici de 0,99. Un même ST est partagé par 3 isolats dans 2 cas et par 2 isolats dans 6 cas. Le *Tableau 9* présente les caractéristiques et les résultats de typage pour *C. jejuni.* L'arbre couvrant minimum des ST déterminés est présenté en *Figure 18* et les résultats de typage en fonction de l'année d'isolement *(Figure 19)*, du lieu d'isolement *(Figure 20)* ou du typage *flaA (Figure 21)* sont aussi disponibles sous cette forme. Chaque « rond » sur l'arbre correspond à un ST identifié dont le numéro apparaît au centre. De plus, la taille de ce rond est proportionnelle au nombre d'isolats présentant ce ST au sein de notre population. Par ailleurs, la « distance génétique » séparant chaque ST de ceux auxquels il est apparenté est présentée en *Figure 18.* Le chiffre au-dessus des lignes reliant deux ST correspond sur cette figure au nombre d'allèles différents entre ces 2 ST.

Il ne semble pas y avoir de lien dans notre population entre l'année d'isolement et le ST *(Figure 19)* ni entre le lieu d'isolement sur l'île de la Réunion et le ST *(Figure 20).* Cependant, les isolats issus de Métropole semblent assez éloignés de ceux issus de la Réunion *(Figure 20)*. Par ailleurs, il semble exister un lien entre certains clusters déterminés pour *flaA* et certains ST *(Figure 21)*. En effet, les souches appartenant aux clusters *flaA* 1, 3 et 4 ne sont pas réparties de manière homogène au sein de l'arbre couvrant minimum mais se retrouvent plutôt sous forme groupée et isolée (souches aux ST proches).

Isolat	Année d'isolement	Ville de résidence	MLST*							ST*	flaA	gyrA
			aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkt	uncA			
Métro 1	2014	Métropole	112	312	35	42	14	22	122	25	2	Muté
Métro 2	2014	Métropole	112	322	11	12	14	22	122	28	5	WT
Métro 3	2014	Métropole	112	123	31	33	31	22	122	11	5	Muté
J12S1	2012	Saint-Louis	112	322	32	11	41	24	112	29	6	WT
J12S2	2012	Ravine des cabris	241	322	32	12	24	21	113	52	3	WT
J12S3	2012	Saint-Louis	112	312	33	12	24	25	122	19	5	WT
J12S4	2012	Saint-Louis	112	312	32	12	24	25	122	18	2	WT
J12S5	2012	L'étang salé	112	312	33	22	24	24	122	23	2	WT
J12S6	2012	Ravine des cabris	132	322	33	24	24	32	112	38	5	WT
J12S7	2012	Saint-Louis	112	312	13	12	14	25	122	2	5	WT
J12S8	2012	Saint-Pierre	232	326	36	21	31	33	113	42	2	WT
J12S9	2012	La rivière	142	113	13	33	14	55	122	40	2	WT
J12S10	2012	L'étang salé	112	312	45	12	14	53	NT	NT	5	WT
J12S11	2012	Saint-Pierre	313	312	33	43	33	54	112	63	2	WT
J12S12	2012	*Non connu*	132	345	33	14	54	33	112	39	5	WT
J12S13	2012	Saint-Pierre	132	313	36	11	34	54	113	37	4	WT
J12R1	2012	La rivière	241	NT	NT	12	NT	21	112	NT	2	Muté
J12R2	2012	L'entre-deux	242	342	32	33	24	24	112	8	3	Muté
J12R3	2012	Ravine des cabris	122	113	33	33	24	25	122	33	1	Muté
J12R4	2012	Saint-Pierre	112	113	32	21	41	24	112	10	6	Muté
J12R5	2012	Saint-Pierre	112	312	13	12	14	25	122	2	5	Muté
J13S1	2013	La plaine des Cafres	242	312	33	33	34	41	112	58	6	WT
J13S2	2013	Le piton Saint-Leu	241	342	34	43	11	11	112	55	4	WT
J13S3	2013	L'étang salé	242	312	33	22	31	24	111	7	2	WT
J13S4	2013	Saint-Pierre	242	312	33	22	31	24	111	7	2	WT
J13S5	2013	Cilaos	242	322	33	33	34	45	112	60	6	WT
J13S6	2013	La rivière	233	221	23	21	41	32	212	43	2	WT
J13S7	2013	Saint-Pierre	233	221	23	21	43	33	212	44	4	NT
J13S8	2013	Les avirons	113	332	33	22	24	32	112	31	2	WT
J13S9	2013	Saint-Pierre	233	244	55	21	43	33	312	46	4	NT
J13S10	2013	Le tampon	112	312	41	12	14	55	122	26	5	WT
J13S11	2013	La rivière	111	352	33	21	41	54	112	9	6	WT
J13S12	2013	Ravine des cabris	233	241	25	21	41	33	212	5	2	WT
J13S13	2013	La rivière	233	241	25	21	41	33	212	5	2	WT
J13S14	2013	Saint-Pierre	232	322	31	21	32	11	123	41	4	WT
J13S15	2013	Saint-Pierre	112	312	11	12	24	55	122	12	5	WT
J13S16	2013	Saint-Pierre	112	312	33	22	54	25	122	20	2	WT
J13S17	2013	Saint-Louis	112	312	15	22	14	24	122	15	5	WT
J13S18	2013	La rivière	112	312	11	22	14	25	122	1	5	WT
J13S19	2013	L'étang salé	112	312	35	22	54	55	122	24	5	WT
J13S20	2013	Le piton Saint-Leu	242	312	33	33	31	44	112	59	6	WT
J13S21	2013	Saint-Pierre	112	312	15	22	14	55	122	16	5	WT
J13S22	2013	Ravine des cabris	112	322	35	22	31	25	122	30	6	WT
J13R1	2013	Les avirons	122	123	33	33	24	22	122	35	1	Muté
J13R2	2013	La rivière	112	312	21	12	24	22	122	17	6	Muté
J13R3	2013	Le tampon	242	312	31	12	14	22	212	56	2	Muté
J13R4	2013	Saint-Pierre	242	342	32	33	24	24	112	8	3	Muté
J13R5	2013	Le tampon	132	312	33	24	24	33	113	36	2	Muté
J13R6	2013	L'étang salé	241	133	32	33	22	45	112	48	5	NT
J13R7	2013	La rivière	122	113	35	33	24	25	122	34	1	Muté
J13R8	2013	L'étang salé	242	352	32	33	24	24	112	62	3	Muté
J14S1	2014	La plaine des Cafres	233	221	23	21	41	33	213	45	3	WT
J14S2	2014	Saint-Pierre	112	312	33	22	24	22	123	21	3	WT
J14S3	2014	Saint-Pierre	241	322	32	33	12	11	116	53	6	WT
J14S4	2014	Saint-Louis	242	312	32	33	31	24	135	57	5	WT
J14S5	2014	Saint-Joseph	112	321	33	12	31	23	126	27	6	WT
J14S6	2014	Ravine des cabris	113	332	33	22	24	33	112	32	2	WT
J14S7	2014	La rivière	241	322	33	33	24	24	215	54	5	WT
J14S8	2014	Saint-Louis	112	312	11	22	14	25	122	1	5	WT
J14S9	2014	L'entre-deux	241	342	32	22	24	54	113	6	3	WT
J14S10	2014	Saint-Pierre	241	342	32	22	24	54	113	6	3	WT
J14S11	2014	Les avirons	241	312	34	23	11	11	112	51	4	WT
J14S12	2014	L'étang salé	234	221	25	11	41	33	212	47	2	WT
J14S13	2014	L'étang salé	112	312	15	22	14	23	122	14	5	WT
J14R1	2014	Saint-Louis	112	312	13	12	14	22	125	13	5	Muté
J14R2	2014	Saint-Pierre	242	342	32	33	24	24	113	61	3	Muté
J14R3	2014	La rivière	233	221	23	21	43	33	214	4	4	Muté
J14R4	2014	La rivière	241	312	32	22	32	24	116	49	6	Muté
J14R5	2014	L'étang salé	241	312	33	22	32	24	112	50	2	Muté
J14R6	2014	Saint-Louis	233	221	23	21	43	33	214	4	4	Muté
J14R7	2014	L'étang salé	233	221	23	21	43	33	214	4	4	Muté
J14R8	2014	Saint-Louis	112	312	11	22	14	25	122	1	5	Muté
J14R9	2014	Saint-Pierre	122	113	33	33	14	25	122	3	5	Muté
J14R10	2014	La rivière	122	113	33	33	14	25	122	3	1	Muté
J14R11	2014	La rivière	112	312	33	22	14	25	122	22	2	Muté
J14R12	2014	Ravine des cabris	113	312	32	22	14	24	NT	NT	5	Muté

<u>Tableau 9 :</u> Caractéristiques des 76 C. jejuni génotypés chez l'Homme (NT : Non Typable, WT : Wild Type)

** : Les numéros attribués aux séquences MLST et aux ST finaux sont non comparables aux ST pubMLST*



<u>Figure 18 :</u> Arbre couvrant minimum des ST des C. jejuni typés

<u>NB :</u> Le chiffre au niveau d'une ligne reliant 2 ST indique le nombre d'allèles qui diffèrent entre les deux souches

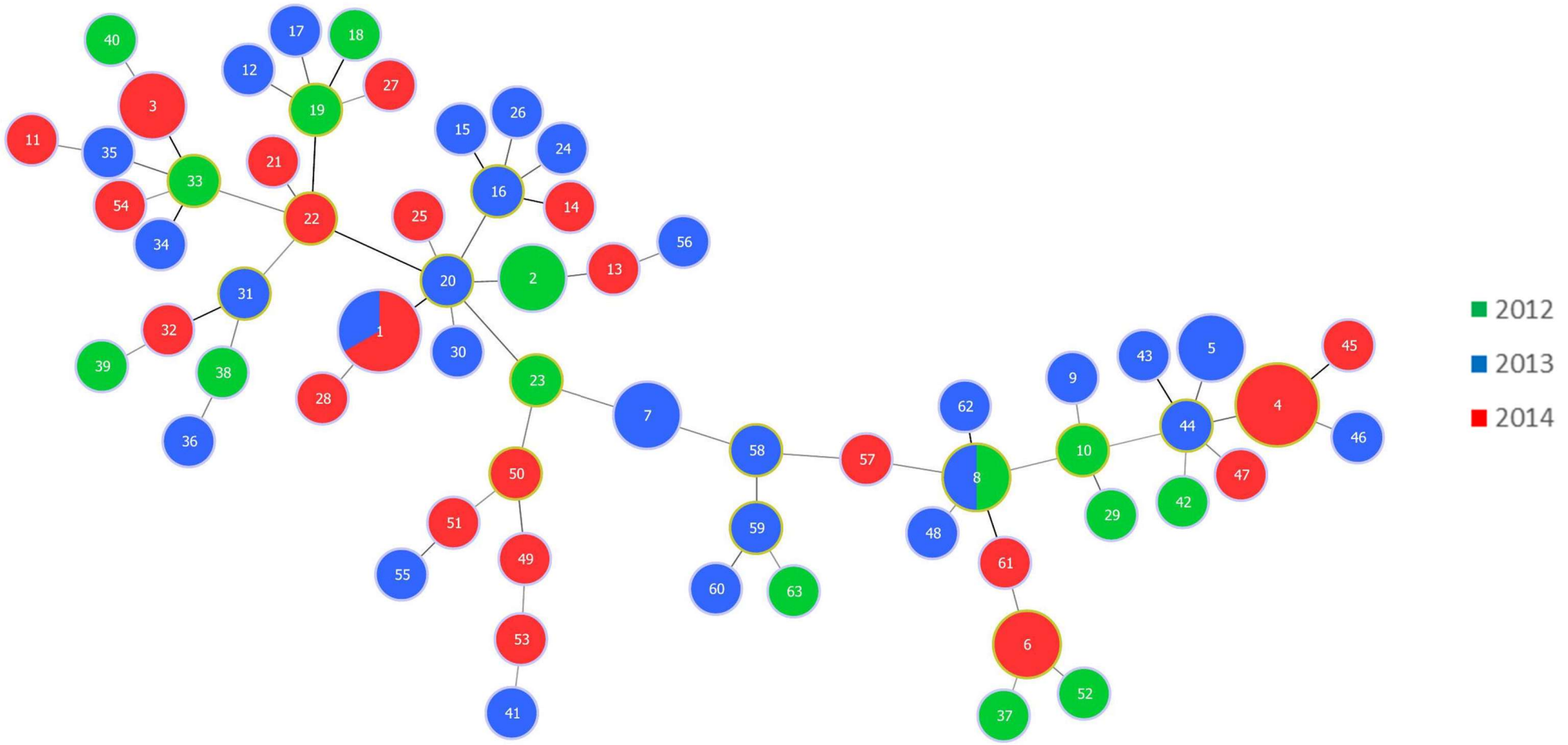


Figure 19 : Arbre couvrant minimum des ST des C. jejuni typés en fonction de l'année d'isolement

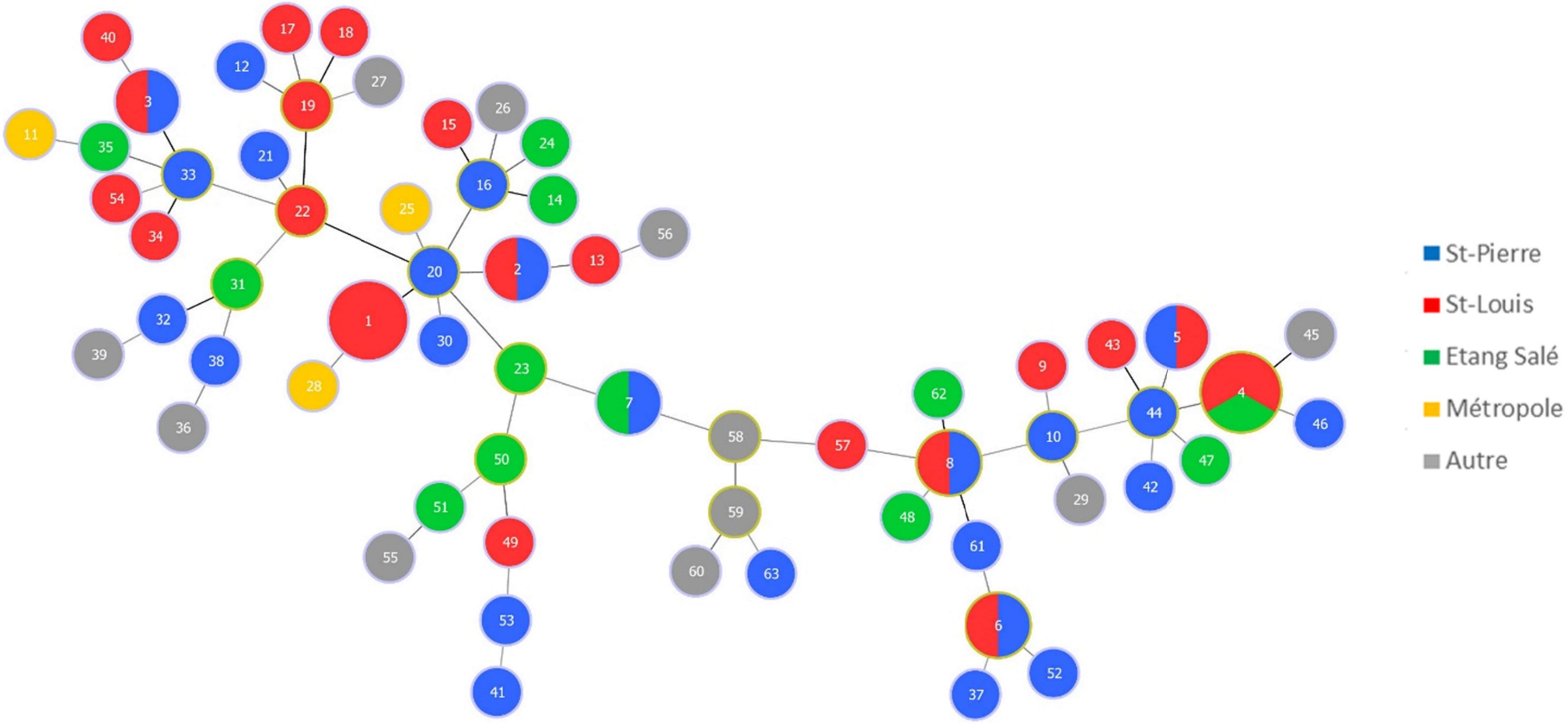


Figure 20 : Arbre couvrant minimum des ST des C. jejuni typés en fonction du lieu d'isolement

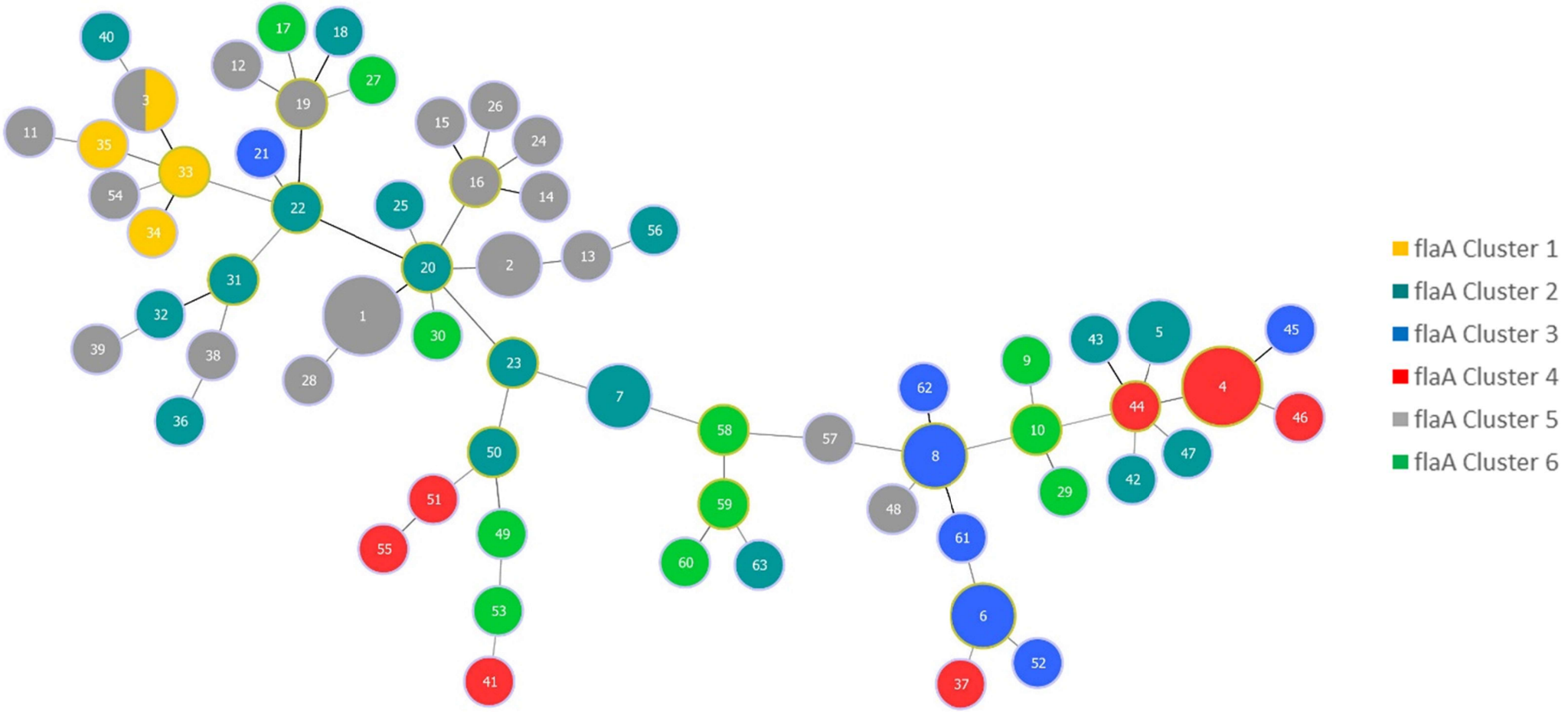


Figure 21 : Arbre couvrant minimum des ST des C. jejuni typés en fonction du typage flaA

3.1.4 - Génotypage des isolats de *Campylobacter coli*

La technique de typage uni-locus sur *flaA* est la seule technique à notre disposition permettant de typer nos 52 isolats de *C. coli* (14 isolats d'origine humaine et 38 d'origine porcine). Un isolat issu du porc a été exclu car non typable et la typabilité de cette méthode pour cette espèce est donc de 98,1 %. Les 51 isolats typables se répartissent au sein de 6 clusters et des isolats porcins se retrouvent au sein de tous les clusters. *A contrario*, les 14 isolats d'origine humaine ne se répartissent que dans 2 de ces clusters seulement : les clusters 2 (12 isolats) et 5 (2 isolats) tel que l'illustre la *Figure 22*. Pour cette technique et cette espèce, l'index de pouvoir discriminant calculé est donc de 0,77.

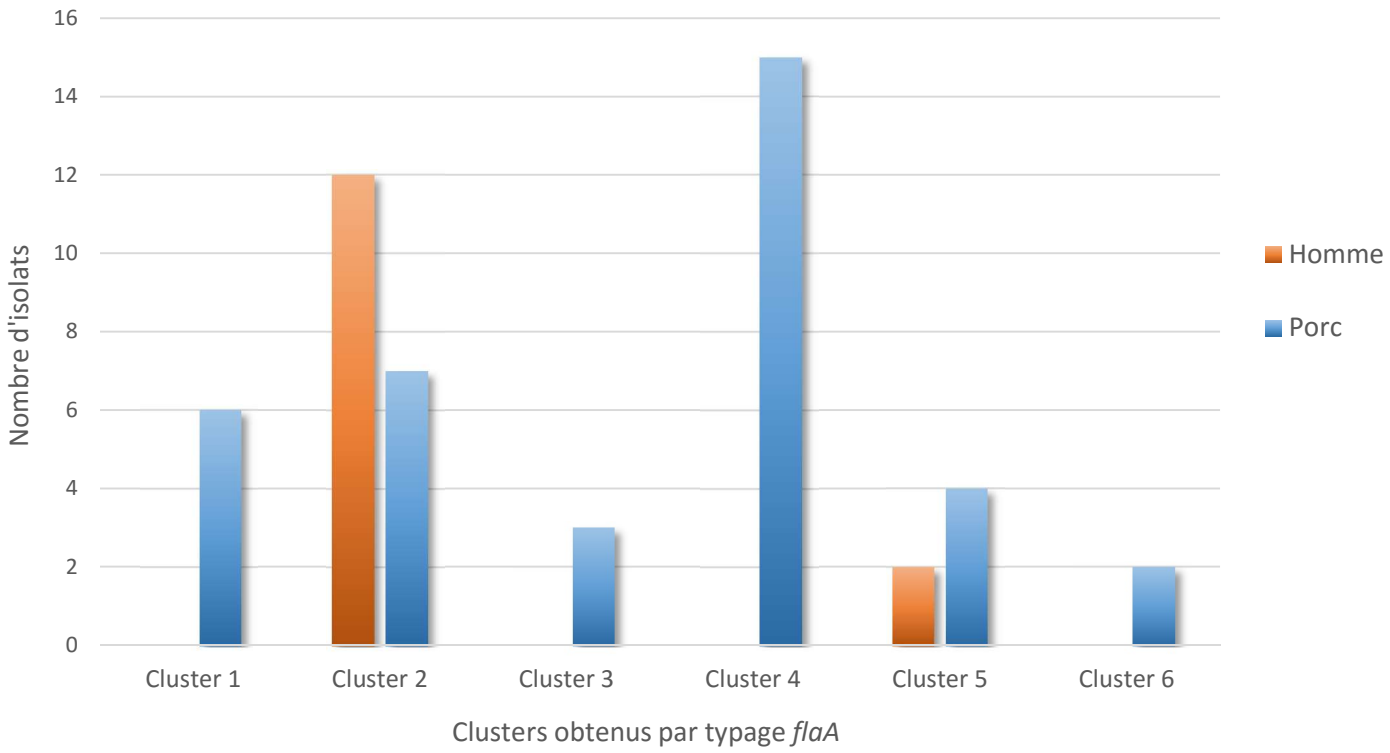


Figure 22 : Répartition des 51 isolats de C. coli typables au sein des clusters définis par ScreenClust®

3.1.5 - Validation des méthodes de typage

Les méthodes utilisées ont toutes une reproductibilité de 100 %. Les typabilités et les index de pouvoir discriminant obtenus pour nos méthodes sont rappelés en *Tableau 10*.

Méthode	Reproductibilité	Typabilité	Index de pouvoir discriminant
Typage *flaA* (*C. jejuni*)	100 %	97,3 %	0,80
Typage *flaA* (*C. coli*)	100 %	98,1 %	0,77
Typage MLST (*C. jejuni*)	100 %	96,1 %	0,99

Tableau 10 : Reproductibilité, typabilité et index de pouvoir discriminant des techniques de typage

3.2 - Détection des mutations de *gyrA* par PCR HRM

3.2.1 - Profils de résistance phénotypiques des isolats testés

La technique que nous avons mise en place pour mettre en évidence les mutations de *gyrA* ayant recours à des amorces spécifiques de *C. jejuni*, seuls les 76 isolats de cette espèce retenus pour le génotypage moléculaire *flaA* et MLST *via* HRM ont été ici utilisés. Les caractéristiques de leurs profils de sensibilité aux quinolones sont indiquées en *Tableau 11* (diamètre autour du disque d'acide nalidixique relevé lors de la lecture de l'antibiogramme et CMI de la ciprofloxacine).

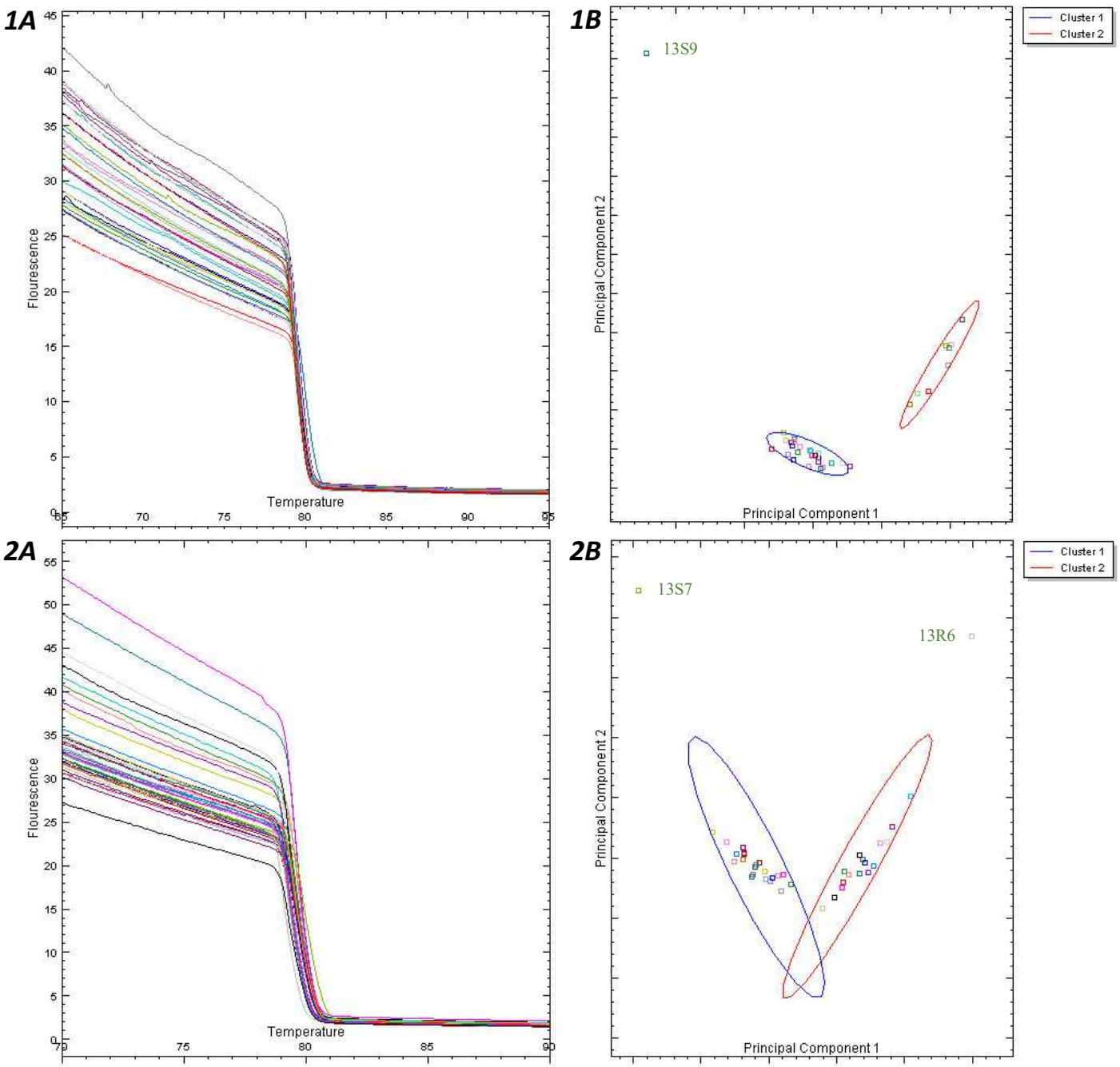
Isolat	Diamètre Ac. Nal. (mm)	CMI (µg/L) Ciprofloxacine	Isolat	Diamètre Ac. Nal. (mm)	CMI (µg/L) Ciprofloxacine
Métro 1	Contact	>32	J13S18	30	0,032
Métro 2	40	0,064	J13S19	30	0,008
Métro 3	Contact	>32	J13S20	36	0,002
J12S1	31	0,032	J13S21	32	0,002
J12S2	34	0,016	J13S22	33	0,016
J12S3	33	0,008	J13R1	Contact	>32
J12S4	30	0,002	J13R2	Contact	>32
J12S5	26	0,012	J13R3	Contact	>32
J12S6	32	0,064	J13R4	Contact	>32
J12S7	29	0,047	J13R5	Contact	>32
J12S8	34	0,032	J13R6	Contact	>32
J12S9	26	0,125	J13R7	Contact	>32
J12S10	33	0,004	J13R8	Contact	>32
J12S11	31	0,012	J14S1	37	0,012
J12S12	34	0,008	J14S2	30	0,016
J12S13	33	0,002	J14S3	31	0,032
J12R1	Contact	>32	J14S4	30	0,008
J12R2	Contact	>32	J14S5	30	0,016
J12R3	Contact	>32	J14S6	32	0,008
J12R4	Contact	>32	J14S7	33	0,012
J12R5	Contact	>32	J14S8	33	0,002
J13S1	27	0,064	J14S9	28	0,047
J13S2	29	0,008	J14S10	36	0,032
J13S3	25	0,094	J14S11	32	0,004
J13S4	40	0,032	J14S12	36	0,016
J13S5	28	0,064	J14S13	40	0,016
J13S6	32	0,002	J14R1	Contact	>32
J13S7	30	0,016	J14R2	Contact	>32
J13S8	37	0,004	J14R3	Contact	>32
J13S9	37	0,004	J14R4	Contact	>32
J13S10	31	0,016	J14R5	Contact	>32
J13S11	29	0,012	J14R6	Contact	>32
J13S12	32	0,008	J14R7	Contact	>32
J13S13	28	0,002	J14R8	Contact	>32
J13S14	30	0,094	J14R9	Contact	>32
J13S15	35	0,002	J14R10	Contact	>32
J13S16	28	0,012	J14R11	Contact	>32
J13S17	33	0,012	J14R12	Contact	>32

Tableau 11 : Sensibilité vis-à-vis des quinolones des 76 isolats de C. jejuni typés en gyrA

En vert : Souches déjà connues Sensibles à l'acide nalidixique / En rouge : Souches déjà connues Résistantes

3.2.2 - Profils de résistance génotypiques des isolats testés

La méthode de référence par diffusion en milieu gélosé retrouve 27 isolats de *C. jejuni* résistants sur 76 *(Tableau 11).* Notre technique en PCR HRM permet de définir le profil de tous les isolats (Typabilité de 100 %) et retrouve 2 clusters principaux au sein de cette population (*Tableau 9* et *Figure 23*) : un cluster comprenant 47 des 49 isolats sensibles en CMI et un cluster comprenant 26 des 27 isolats résistants en CMI. Trois isolats sont repartis hors de ces clusters : 2 sensibles en CMI (souches 13S7 et 13S9) et 1 résistant en CMI (13R6). Pour cette population, la typabilité de notre technique est de 96 %, sa sensibilité de 100 % et sa spécificité de 100 %. Par ailleurs, les souches résistantes ne semblent pas liées à des ST particuliers et sont réparties de façon homogène au sein de la population *(Figure 24).*



<u>Figure 23 :</u> Résultats rendus par ScreenClust® pour l'étude du profil de gyrA pour 33 (1) et 43 (2) C. jejuni

<u>A :</u> Courbes HRM brutes. <u>B :</u> Clusters obtenus via ScreenClust®

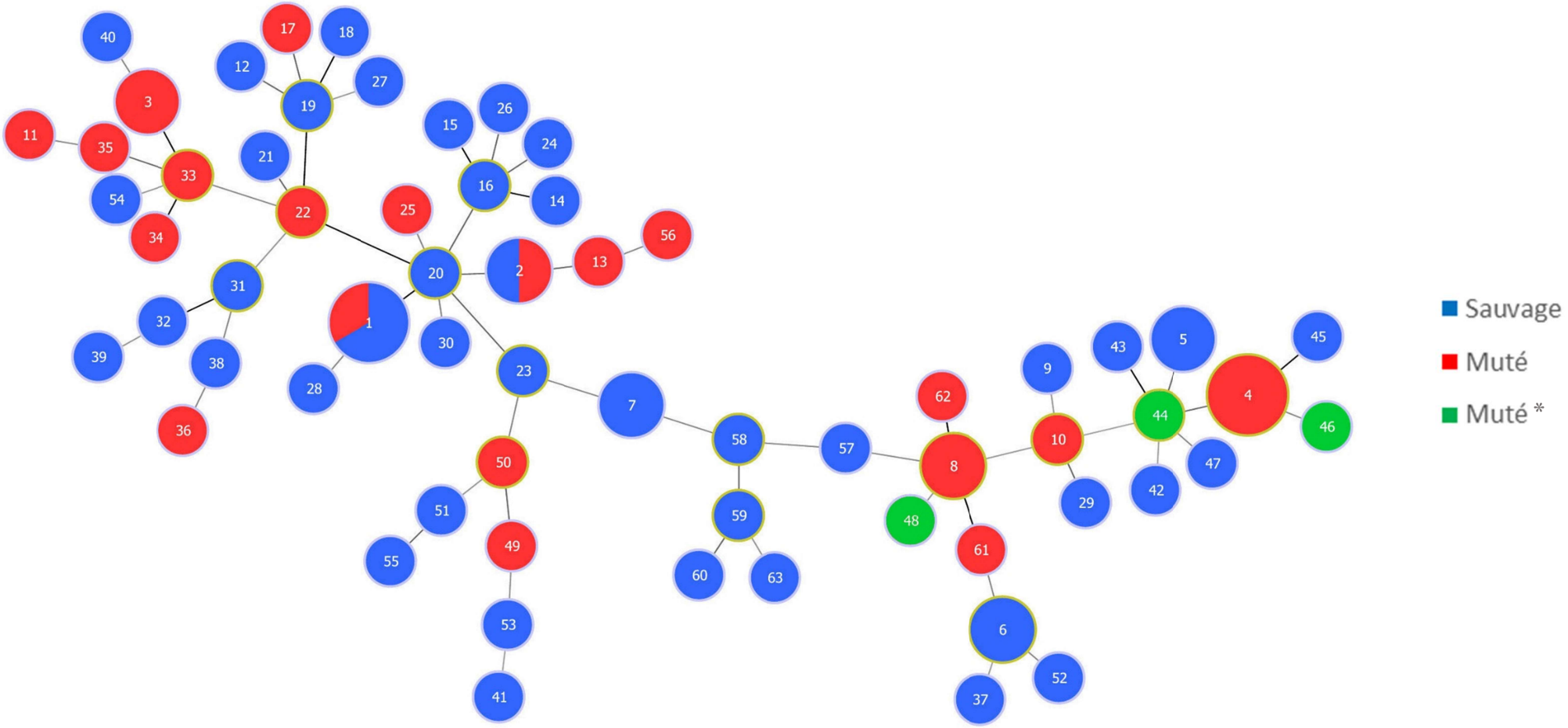


Figure 24 : Arbre couvrant minimum des ST des C. jejuni typés en fonction du profil gyrA.

** : Profil muté différent du profil muté majoritairement retrouvé*

3.2.3 - Validation de la détection des mutations *gyrA* par séquençage

Afin de valider notre méthode de détection des mutations de résistance sur *gyrA*, nous avons choisi de faire séquencer certains de nos amplicons. Trois isolats classés dans le cluster des souches « sauvages » et sensibles par mesure de la CMI ainsi que 3 isolats classés dans le cluster des souches « mutées » et résistantes par mesure de la CMI ont été séquencés. Nos isolats provenant de prélèvements réalisés entre 2012 et 2014, nous avons choisi d'envoyer 1 isolat classé dans le cluster des « souches sauvages » et 1 isolat classé dans le cluster des « souches mutées » par année étudiée. Ainsi, ont été soumis au séquençage les amplicons des isolats 12S1, 13S2 et 14S6 pour le cluster « souches sauvages » et les isolats 12R5, 13R2 et 14R4 pour le cluster « souches mutées ». Par ailleurs, les amplicons *gyrA* des 3 isolats n'étant pas affectés à un de ces 2 clusters par ScreenClust® ont aussi été séquencés. Il s'agit des isolats 13S7, 13S9 et 13R6.

Le séquençage ayant été sous-traité, nous avons reçu directement les séquences de nos amplicons que nous avons alors alignées à l'aide de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [120]. Les 3 isolats classés dans le cluster des « souches sauvages » ont tous une séquence *gyrA* identique et non mutée, comme attendu. Par ailleurs, les 3 isolats classés dans le cluster des « souches mutées » présentent aussi une séquence identique mais avec la mutation C257T (Thr86Ile) conférant une résistance aux fluoroquinolones. Enfin, les 3 isolats non affectés à un cluster présentent des profils *gyrA* mutés expliquant l'impossibilité pour ScreenClust® de les classer dans l'un des 2 clusters prédéfinis. Ainsi, les isolats 13S7 et 13S9, sensibles par mesure de la CMI, présentent tous les deux le même profil allélique *gyrA* contenant 2 mutations silencieuses : une mutation T234C au niveau du codon 78 et une mutation T243C au niveau du codon 81. Dans les deux cas, l'acide aminé codé est identique en l'absence ou en présence de la mutation. Ainsi, le codon 78 GGT muté en GGC code toujours une glycine et le codon 81 CAT muté en CAC code toujours une histidine. La séquence en acides aminés ne diffère pas (mutation silencieuse) et la bactérie n'est pas résistance aux fluoroquinolones. Cependant, il est normal compte tenu de la modification de séquence que les courbes HRM diffèrent et que les isolats ne puissent pas être classés par la technique dans le cluster constitué des souches sauvages ou dans celui constitué des souches résistantes. Par ailleurs, l'isolat 13R6 présente lui aussi 2 mutations de *gyrA* : la mutation C257T conférant la résistance aux fluoroquinolones et une mutation silencieuse C330T, au niveau du codon 110 et expliquant là aussi que cet isolat ne puisse pas être classé par ScreenClust®. La *Figure 25* montre les mutations observées pour cet isolat au niveau de *gyrA* après alignement des séquences avec la souche sensible 14S6 présentant un profil allélique sauvage.

```
14S6    9    TTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGAT   68
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
13R6    14   TTTGTCAAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGAT   73

14S6    69   ACAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGATTTTTCTATGAGATATCCAAGT   128
             | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
13R6    74   ATAGCAGTTTATGATGCTTTGGTTAGAATGGCTCAAGATTTTTCTATGAGATATCCAAGT   133

14S6    129  ATTACAGGACAAGGCAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGCGCCGCTGCGATGCGTTAT   188
             |||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
13R6    134  ATTACAGGACAAGGTAACTTTGGATCTATAGATGGTGATAGCGCCGCTGCGATGCGTTAT   193

14S6    189  ACTGA  193
             |||||
13R6    194  ACTGA  198
```

Figure 25 : Alignement de la séquence gyrA de l'isolat 13R6 avec celle de l'isolat 14S6

En rouge : Mutation C257T (Codon 86) En bleu : Mutation C330T (Codon 110)

4 - Discussion

4.1 - Génotypage de *Campylobacter*

Dans la première partie de notre travail, nous avons génotypé 76 souches d'origine humaine de *C. jejuni* (dont 73 ont été isolées au CHU Sud Réunion entre 2012 et 1014) ainsi que 14 souches de *C. coli* d'origine humaine (dont 11 isolées au CHU Sud Réunion entre 2012 et 1014) et 38 souches de *C. coli* isolées chez le porc d'élevage en 2012 à La Réunion.

4.1.1 - Méthodes de génotypage

Plusieurs facteurs entrent en jeu lors du choix d'une méthode de génotypage. L'objectif fixé, le nombre d'isolats à génotyper, le coût de la méthode, son pouvoir discriminant, sa reproductibilité, sa rapidité et sa capacité à permettre une comparaison des résultats entre laboratoires sont des paramètres importants à prendre en compte pour choisir la technique la plus appropriée. Aucune méthode de typage n'est parfaite et chaque technique possède ses avantages et ses inconvénients. Il convenait donc, avant de réaliser des travaux d'épidémiologie moléculaire tels que nous souhaitons le faire, de choisir la méthode de typage la plus appropriée dans le contexte de l'étude.

N'ayant pas de séquenceur à notre disposition et nos moyens financiers étant relativement modestes, nous nous sommes tournés vers les techniques de génotypage abordables d'un point de vue financier, développables au sein du laboratoire sans séquençage et peu chronophages. Nous avons alors retenu 2 méthodes : une technique uni-locus s'intéressant au gène *flaA* par PCR HRM et une technique multi-loci par MLST *via* PCR HRM. Ces méthodes ont recours à l'analyse de courbes de fusion haute résolution pour « remplacer » le séquençage et sont de fait moins onéreuses et plus rapides à mettre en œuvre que des méthodes telles la PCR RFLP de *flaA* ou la MLST conventionnelle. Nous les avons de plus perfectionnées en réalisant au laboratoire une analyse des courbes HRM à l'aide du logiciel ScreenClust®. Ces techniques se sont révélées performantes suite à nos premiers travaux, avec une reproductibilité de 100 % (supérieure aux 95 % nécessaires [121]) ainsi qu'une typabilité élevée comprise entre 96,1 % et 98,1 % selon la technique utilisée et l'espèce.

Nous avons de plus souhaité comparer les performances obtenues avec ces deux méthodes de typage et déterminer leur applicabilité à l'étude de la diversité des populations bactériennes de *Campylobacter* à La Réunion.

4.1.2 - Résultats des travaux de génotypage

Les résultats de nos travaux sur *C. jejuni* avec la méthode de typage MLST *via* PCR HRM indiquent que cette espèce présente à la Réunion une grande variabilité génétique. Nous obtenons en effet 66 ST différents pour 76 isolats testés. Cette importante variabilité est observée dans de nombreuses études à travers le monde [122,123] et elle est aussi constatée sur des territoires comparables à la Réunion en termes d'insularité comme l'Islande par exemple [122]. Cet important polymorphisme pourrait refléter selon certains auteurs la diversité des réservoirs responsables des infections chez l'Homme [124]. L'index de pouvoir discriminant calculé à 0,99 pour cette technique MLST *via* PCR HRM pour l'espèce *C. jejuni* en fait une méthode de typage très discriminante (Index supérieur à 0,95) [119,121]. Cette technique, sous sa forme conventionnelle avec séquençage, est déjà reconnue comme très discriminante [103,104,108] et comme étant l'une des seules à pouvoir attribuer des souches à une niche écologique et à permettre d'identifier les voies de transmissions de *Campylobacter* [103,104].

Par ailleurs, les gènes métaboliques choisis pour la MLST ne sont pas soumis à une pression sélective importante et subissent une évolution relativement lente. Cela permet alors le suivi des populations bactériennes sur de longues périodes, chez différents hôtes et en différents lieux. Il s'agit probablement d'une technique de choix à adapter pour nos travaux de génotypages de *Campylobacter* chez l'Homme et l'animal à La Réunion. Cependant, notre technique ayant recours à la PCR HRM, nous sommes obligés de scinder les gènes en plusieurs fragments pour pouvoir les étudier. Cela rend la technique légèrement chronophage mais le temps gagné par rapport au séquençage reste important.

Nos résultats obtenus pour les mêmes isolats avec la méthode de typage par PCR HRM de *flaA* sont moins satisfaisants. Nous n'obtenons que 6 clusters différents et la diversité mise en évidence par cette technique est moindre que pour la MLST. L'index de pouvoir discriminant pour l'espèce *C. jejuni* est ici de 0,80, inférieur à celui d'une méthode de typage discriminante (> 0,95) [102,119]. Nous pouvons dès lors nous demander si cette technique est bien adaptée à l'étude d'une large population et sur une longue période. En effet, la région étudiée est la région hypervariable de *flaA*, soumise à de nombreuses variations dues au fait que les flagelles bactériens sont immunogènes et qu'ils sont donc sujets à une grande pression de sélection. Cette variabilité est encore plus présente chez *Campylobacter* qui subit des recombinaisons au sein de la bactérie (sur *flaA* par exemple) mais qui est aussi capable d'intégrer du génome exogène [125]. Ce genre bactérien est alors difficile à typer de manière discriminante avec des techniques uni-locus. Cette méthode de PCR HRM sur *flaA* est rapide, simple et peu onéreuse mais est probablement davantage réservée à une utilisation en contexte épidémique, pour différencier des souches isolées à un même instant, comme le suggèrent certaines études [126,127]. Par ailleurs, un seul gène étant ici utilisé, il n'est pas possible de déterminer d'éventuels complexes clonaux.

En outre, nos résultats en typage MLST *via* PCR HRM pour *C. jejuni* révèlent que le profil ST des souches n'est pas lié au lieu d'isolement dans l'île et qu'un même ST peut être observé en deux sites distincts de l'île. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la viande soit classiquement la principale source de contamination. Plusieurs individus pourraient alors être contaminés par un même clone provenant d'un élevage fournissant plusieurs distributeurs différents. Il semble par ailleurs ne pas exister de lien entre ST et date d'isolement et donc pas de variations génétiques franches dans le temps sur les 3 années étudiées. Ceci est aussi observé pour *C. jejuni* par Kittl *et al*. [123]. Les gènes choisis pour la technique de typage MLST étant des gènes métaboliques, ceux-ci sont relativement conservés au cours du temps car leur dysfonctionnement serait trop délétère pour la bactérie. Il est alors cohérent que ces gènes soient stables dans le temps. D'autre part, nous ne constatons pas de lien entre ST et résistance aux fluoroquinolones dans notre population, contrairement à ce que retrouvent quelques auteurs pour qui certains clones ST pourraient être plus ou moins résistants en fonction de leur niche écologique [123,128]. Ainsi, un clone « environnemental » plus fréquemment rencontré dans l'eau que chez le poulet par exemple serait plus sensible aux quinolones, étant moins soumis à la pression de sélection antibiotique que les clones ST rencontrés en élevage. Ne nous étant intéressés qu'à des souches d'origine humaine, il est possible que nous n'observions pas de lien entre ST et résistance faute de diversité d'hôtes et d'origines de nos souches.

D'autre part, il semble exister un lien entre les résultats obtenus par typage *flaA* et par technique MLST. Les isolats présentant certains profils *flaA* (clusters 1, 3 et 4) sont en règle générale relativement proches en termes de ST et diffèrent seulement de quelques variations alléliques. Cependant, ces données sont contraires à ce que d'autres auteurs retrouvent [122,123]. Il n'existerait pas selon ces équipes de relations simples entre typage *fla* (*A* ou *B* suivant les travaux) et MLST. Certaines études concluent par ailleurs à l'intérêt d'intégrer *flaA* lors du typage MLST afin d'être plus discriminant [122].

Concernant notre souhait de tester ces techniques de typage avec des souches d'origine animale, nous avons été confrontés à un problème d'isolement de *C. jejuni* dans les élevages de poulets. Nous ne sommes pas parvenus à isoler de *C. jejuni* dans les excréments de ces volailles malgré plusieurs tentatives. Après un premier échec et suivant les conseils du CNR, nous avons décidé de ne plus réaliser d'étape d'enrichissement en eau peptonnée et d'ensemencer directement les milieux de culture. Cela nous a bien permis de diminuer la flore en compétition avec *Campylobacter* et qui semblait prendre le dessus lors de l'enrichissement mais nous n'avons alors isolé que des *C. coli*. Plusieurs hypothèses peuvent se poser pour expliquer ces échecs d'isolement. Premièrement, notre procédure technique pourrait être inappropriée malgré nos ajustements. Par ailleurs, l'étape pré-analytique de cette procédure pourrait être en cause. En effet, plusieurs élevages ont été prélevés successivement et les pédichiffonnettes étaient acheminées au laboratoire une fois le dernier élevage prélevé. *Campylobacter* étant une bactérie fragile, peut-être avons-nous minimisé nos chances d'isolement en laissant trop de temps s'écouler entre le prélèvement et l'ensemencement, comme cela a déjà été constaté dans d'autres travaux [129]. Nous pouvons ensuite nous interroger sur la présence de *C. jejuni* au sein des élevages prélevés. Une étude du CIRAD Réunion retrouvait en effet majoritairement du *C. coli* dans les élevages réunionnais [11] ce qui pourrait expliquer en partie nos difficultés d'isolement. Il serait donc intéressant de nous assurer que *C. jejuni* est bien présent dans les élevages, via un screening par biologie moléculaire par exemple, et de tenter à nouveau d'isoler cette espèce dans les élevages en optimisant notre technique (réduction du délai d'acheminement notamment). En effet, jusqu'à 70 % des infections humaines à *C. jejuni* étant attribuées au poulet [123], il nous semble intéressant de persévérer et d'inclure de telles souches dans un futur proche afin de pouvoir les comparer aux isolats humains.

Concernant les souches de *C. coli* isolées chez le porc, notre typage de 52 souches réalisé en PCR HRM de *flaA* retrouve 6 clusters différents. L'index de pouvoir discriminant pour l'espèce *C. coli* avec cette technique est de 0,77 et est inférieur à ce qui doit être obtenu pour une méthode de typage discriminante (> 0,95) [119,121]. Deux des 6 clusters déterminés sont partagés avec les souches isolées chez l'Homme qui ne sont attribuées qu'à l'un ou l'autre de ces 2 clusters. Cela soulève l'hypothèse que plusieurs clones de *C. coli* seraient capables de coloniser le porc mais que seulement certains d'entre eux seraient capables d'infecter l'Homme, laissant supposer une spécificité d'hôte « clonale » en plus de celle liée à l'espèce. Cela est déjà retrouvé par certains auteurs qui constatent des profils ST de *C. coli* différents chez l'Homme, le porc et le poulet [130]. Cependant, notre échantillon de souches humaines de *C. coli* étant de petite taille et notre échantillon de *C. coli* d'origine porcine n'étant pas représentatif de tous les élevages réunionnais, nous ne pouvons qu'émettre cette hypothèse. Par ailleurs et comme nous l'avons vu, notre technique *flaA* manque de discrimination et une technique plus performante telle la MLST pourrait peut-être nous donner des résultats contradictoires. Il convient alors d'étoffer sur quelques années encore notre échantillon et peut-être aussi d'utiliser une technique plus discriminante afin de pouvoir conclure que seuls certains profils *flaA* sont présents chez les deux hôtes.

4.1.3 - Perspectives sur le génotypage de *Campylobacter* à La Réunion

Nous avons donc validé deux techniques de typage adaptées à notre laboratoire et il semble que la technique MLST *via* PCR HRM soit la seule méthode à notre disposition permettant de mettre clairement en évidence le polymorphisme génétique de *Campylobacter* à La Réunion. A la vue des résultats obtenus avec cette technique, nous aimerions pouvoir poursuivre nos travaux et comparer dans un premier temps les ST obtenus pour les souches de *C. jejuni* isolées chez l'Homme à ceux de souches isolées chez le poulet. Dans un second temps et selon nos résultats, il pourrait être intéressant

de pouvoir typer des souches issues d'autres niches écologiques (bovins par exemple) voire des souches environnementales. Par ailleurs, les souches d'origine humaine utilisées dans notre étude ayant été isolées essentiellement dans la moitié Sud de La Réunion (au CHU Sud Réunion et en laboratoires d'analyses de biologie médicale), il nous semble important de collecter des souches dans la partie Nord de l'île (au CHU Nord et en laboratoires privés) afin de rendre notre échantillon plus représentatif de la diversité génétique de *Campylobacter* sur l'île. La variation génétique de *C. jejuni* observée par MLST étant faible dans le temps [123], nous pourrons typer ces souches nouvellement incluses et les comparer aux souches humaines déjà typées sans introduire de biais.

Comparer les génotypes obtenus chez plusieurs hôtes ou niches différentes pourrait permettre de formuler des hypothèses sur les voies de transmission de la bactérie à La Réunion comme cela a déjà pu être réalisé dans d'autres régions [123,131]. Ceci permettrait de mettre en place des études permettant de confirmer ces hypothèses et, le cas échéant, de pouvoir adapter localement la prévention afin de diminuer l'incidence de l'infection à *Campylobacter* à La Réunion et donc d'en diminuer sa morbidité et le coût imputable.

Concernant la technique de typage par PCR HRM de *flaA*, les résultats obtenus laissent penser que cette méthode ne nous sera pas utile pour atteindre nos objectifs. Cependant, il s'agit là de la seule méthode à notre disposition nous permettant de typer *C. coli*. Il pourrait alors être intéressant de développer une technique de typage MLST *via* PCR HRM applicable à cette espèce. Enfin, cette méthode de typage sur *flaA* étant validée au laboratoire, il pourrait être intéressant de la conserver en vue de s'en servir en cas d'épidémie d'infection à *Campylobacter*, situation dans laquelle elle serait plus adaptée [105,126,132].

4.2 - Détection des mutations de *gyrA* par PCR HRM

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons souhaité déterminer par biologie moléculaire le profil allélique du gène *gyrA* des 76 souches d'origine humaine de *C. jejuni* précédemment typées.

4.2.1 - Méthode de détection des mutations *gyrA*

Nous avons tenté de développer notre propre technique de détection des résistances aux quinolones par mutations de *gyrA* et, pour les raisons précédemment citées concernant le choix des techniques de typage, nous avons choisi de nous appuyer sur la technologie HRM pour la mettre au point. La méthode que nous proposons fonctionne pour *C. jejuni* et semble très prometteuse. Nous obtenons en effet sur notre échantillon une typabilité de 96 %, une sensibilité de 100 % et une spécificité de 100 %. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues par d'autres équipes ayant développé des techniques similaires pour d'autres espèces telles *Mycobacterium tuberculosis* [75,133] ou *Salmonella enterica* [74,134]. Cependant, une autre équipe ayant travaillé sur *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* et *Francisella tularensis* retrouve des performances un peu moins bonnes, sans doute en raison du kit HRM utilisé dans leurs travaux, considéré comme non optimal sur l'automate utilisé [135].

4.2.2 - Résultats des travaux de détection des mutations *gyrA*

Dans notre travail, cette méthode originale nous permet de classer nos isolats sensibles et résistants par mesure de la CMI en 2 clusters basés sur l'analyse des courbes de fusion HRM de *gyrA*.

Un des clusters obtenus est constitué des souches sauvages et l'autre des souches mutées. Les résultats sont comparables à la méthode de référence par diffusion en milieu gélosé et seul 3 isolats sur 76 sont classés en dehors de ces deux clusters principaux. Le séquençage de ces 3 isolats retrouve plusieurs mutations au niveau de *gyrA.* Les isolats 13S7 et 13S9, sensibles par mesure de la CMI, présentent tous les deux le même profil allélique *gyrA* contenant 2 mutations silencieuses : une mutation T234C (codon 78) et une mutation T243C (codon 81). Ces mutations n'ont par définition par d'impact sur l'acide aminé codé mais sont détectées par l'analyse HRM qui ne les classe dans aucun des deux clusters prédéfinis. L'isolat 13R6 présente lui aussi 2 mutations de *gyrA* : la mutation C257T conférant la résistance aux fluoroquinolones et une mutation silencieuse C330T (Codon 110), expliquant que cet isolat ne puisse pas être classé par ScreenClust®. Nos résultats sont donc concordants avec le séquençage et les souches non typables en sauvages ou mutées *via* notre technique présentent bien des mutations empêchant ScreenClust® de les distribuer dans un cluster. Les bons résultats que nous obtenons s'expliquent en partie par la taille de 220 pdb du fragment de *gyrA* étudié. Cette taille est en effet la taille idéale (150 à 300 pdb) pour la réalisation d'une analyse HRM la plus fiable possible [113,114]. Par ailleurs, l'utilisation du logiciel ScreenClust® et de son analyse statistique pour comparer les courbes nous permet aussi d'optimiser notre technique. Ainsi, dans les précédents travaux similaires, les différents auteurs comparaient les profils des courbes HRM résiduelles sans logiciel d'analyse dédié et probablement avec moins de précision. Enfin, le fait que *C. jejuni* ne possède pas les gènes *parC* et *parE* [67] et que la résistance soit quasi-systématiquement liée à la présence de mutations de *gyrA* [65] nous permet de détecter la quasi-totalité des souches résistantes à l'aide de notre méthode et d'obtenir de très bonnes performances.

Outre ses très bonnes typabilité, spécificité et sensibilité, cette technique présente plusieurs avantages intéressants. Elle est premièrement très facile à mettre en œuvre puisque cela revient à réaliser les manipulations d'une PCR classique. Contrairement à certaines techniques de PCR en temps réel telles la PCR FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) ou TaqMan, il n'y a pas besoin lors de la PCR HRM de sondes. C'est en effet l'agent intercalant particulier qui permet de réaliser les courbes de fusion et seul l'automate doit être compatible avec la technique HRM. Cependant, beaucoup d'automates d'amplification en temps réel actuels sont capables de réaliser des courbes HRM en fin de PCR (RotorGene® Q pour Qiagen, LightCycler® 480 pour Roche, etc.). Par ailleurs, cette méthode est rapide à réaliser puisqu'il nous faut approximativement 2 heures et 30 minutes pour accomplir 40 cycles de PCR ainsi que la réalisation des courbes de fusion haute résolution pour 72 isolats. Il est même envisageable de réduire nettement cette durée en diminuant le nombre de cycles et en ciblant les températures de fusion lors de la réalisation des courbes de fusion, étape la plus longue de la technique si la plage de températures est large. Ainsi, avec 25 cycles de PCR (qui suffisent si l'extraction est correctement réalisée) et avec une acquisition de fluorescence entre 78°C et 80°C lors de la création des courbes HRM, la durée de la méthode peut diminuer significativement pour se rapprocher d'une heure. Par ailleurs, aucune étape préalable ou post-PCR n'est nécessaire. Ainsi, contrairement à des techniques ayant recours au séquençage, il n'y a pas nécessité de purifier les produits de PCR puis de les séquencer. Enfin, la PCR HRM est peu coûteuse une fois l'extraction réalisée et nous estimons le coût pour la recherche d'une mutation à environ 1 Euro. Ce coût est donc très inférieur à celui du séquençage qui offre des performances proches.

Les limites de notre technique reposent essentiellement sur l'impossibilité de détecter les résistances causées par d'éventuelles mutations présentes en amont ou en aval de la région étudiée ou les résistances causées par des mécanismes différents (efflux notamment). Compte tenu de l'origine de la résistance chez *Campylobacter* quasi-exclusivement liée à une même mutation de *gyrA* et de la région ciblée, ces limites sont relatives lors de l'application de notre technique pour cette espèce.

4.2.3 - Perspectives sur la détection des mutations de *gyrA* par PCR HRM

Notre technique de détection du profil allélique *gyrA* pourrait tout particulièrement s'avérer intéressante à des fins de « screening » dans le cadre d'études épidémiologiques sur des souches humaines, animales ou environnementales. En cas de nombres importants de souches à tester, le coût faible de la technique ainsi que sa rapidité d'exécution sont des atouts majeurs rendant possibles une recherche de la résistance non réalisable à budget équivalent par séquençage. Nous espérons pouvoir l'utiliser en pratique lors de prochains travaux en collaboration avec le CIRAD Réunion. Notre méthode pourrait permettre de déterminer facilement et à bas coût les taux de résistance aux quinolones chez l'animal à La Réunion, ce qui n'a à ce jour jamais été réalisé.

Par ailleurs, cette technique pourrait aussi trouver un intérêt dans la prise en charge thérapeutique en Médecine humaine. En effet, les patients nécessitant un traitement dans le cadre d'une campylobactériose étant des patients avec un terrain à risque de complication, une antibiothérapie précoce et adaptée est souhaitable. Cette antibiothérapie pourrait être optimisée plus rapidement avec notre technique. Celle-ci permet d'obtenir un résultat en quelques heures alors que les méthodes de détection des résistances phénotypiques sont soumises au délai de culture de la bactérie, au moins égal à 24 heures pour *Campylobacter* [72]. Enfin, à plus long terme et compte tenu de la diminution du coût des méthodes de biologie moléculaire et du taux d'équipement de plus en plus important des laboratoires de diagnostic biologique, notre technique pourrait s'intégrer dans une démarche plus globale de détection des résistances par biologie moléculaire. Il semble en effet aujourd'hui concevable de pouvoir développer des méthodes alternatives à l'antibiogramme classique qui pourront peut-être à terme remplacer au moins partiellement les techniques de diffusion en milieu gélosé. Notre technique, fiable et peu onéreuse, pourrait alors être un candidat intéressant pour la détection de la résistance aux fluoroquinolones dans ce contexte.

5 - Références bibliographiques

1. Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, Collectif. Précis de bactériologie clinique. 2e édition. Paris: Editions Eska; 2007.

2. Danis K, Di Renzi M, O'Neill W, Smyth B, McKeown P, Foley B, et al. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection: an all-Ireland case-control study. Euro Surveill 2009;14(7).

3. Friedman CR, Hoekstra RM, Samuel M, Marcus R, Bender J, Shiferaw B, et al. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. Clin Infect Dis 2004;38 Suppl 3:S285-296.

4. Lindmark H, Boqvist S, Ljungström M, Agren P, Björkholm B, Engstrand L. Risk factors for campylobacteriosis: an epidemiological surveillance study of patients and retail poultry. J Clin Microbiol 2009;47(8):2616-9.

5. Studahl A, Andersson Y. Risk factors for indigenous *Campylobacter* infection: a Swedish case-control study. Epidemiol Infect 2000;125(2):269-75.

6. Humphrey T, O'Brien S, Madsen M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. Int J Food Microbiol 2007;117(3):237-57.

7. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014: EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2014. EFSA Journal 2015;13(12):4329.

8. Van Cauteren D, De Valk H, Sommen C, King LA, Jourdan-Da Silva N, Weill F-X, et al. Community incidence of campylobacteriosis and nontyphoidal salmonellosis, France, 2008-2013. Foodborne Pathog Dis 2015;12(8):664-9.

9. Roberts JA, Cumberland P, Sockett PN, Wheeler J, Rodrigues LC, Sethi D, et al. The study of infectious intestinal disease in England: socio-economic impact. Epidemiol Infect 2003;130(1):1-11.

10. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain: *Campylobacter* in broiler meat. EFSA Journal 2011;9(4):2105.

11. Henry I, Reichardt J, Denis M, Cardinale E. Prevalence and risk factors for *Campylobacter spp.* in chicken broiler flocks in Reunion Island (Indian Ocean). Prev Vet Med 2011;100(1):64-70.

12. Tessier C, Parama Atiana L, Mathis J-L, Bernard C, Zemali N, Michault A, et al. Risk factors associated with high prevalence of *Salmonella spp.* and *Campylobacter spp.* in fatening pigs on Reunion Island. En cours de publication

13. Vacher S, Menard A, Bernard E, Santos A, Megraud F. Detection of mutations associated with macrolide resistance in thermophilic *Campylobacter spp.* by real-time PCR. Microb Drug Resist 2005;11(1):40-7.

14. Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. Epsilonproteobacteria class. nov. [Internet]. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Ltd; 2015 [cité 2016 août 27]. Available from: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.cbm00044/abstract

15. Diker KS, Esendal OM, Akan M. Epidemiology of ovine *Campylobacter* infection determined by numerical analysis of electrophoretic protein profiles. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2000;47(10):739-43.

16. King LA, Mégraud F. Surveillance des infections à *Campylobacter* chez l'Homme en France de 2003 à 2010. BEH 2012;(HS):11-3.

17. SFM. Rémic 2015 : Référentiel en microbiologie médicale Tomes 1 et 2. 5e édition. Société Française de Microbiologie - SFM; 2015.

18. Friedman CR, Neimann J, Wegener HC, Tauxe RV. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: Campylobacter. ASM International; 2000. page 121-38.

19. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. Clin Microbiol Rev 2015;28(3):687-720.

20. Helms M, Vastrup P, Gerner-Smidt P, Mølbak K. Short and long term mortality associated with foodborne bacterial gastrointestinal infections: registry based study. BMJ 2003;326(7385):357.

21. Prasad KN, Dixit AK, Ayyagari A. *Campylobacter* species associated with diarrhoea in patients from a tertiary care centre of north India. Indian J Med Res 2001;114:12-7.

22. Van Cauteren D, Lehours P, Bessede E, De Valk H, Mégraud F. Bilan de la surveillance des infections à *Campylobacter* chez l'Homme en France en 2015. Publication de l'Institut de Veille Sanitaire 2015;1-5.

23. Bessède E, Lehours P, Labadi L, Bakiri S, Mégraud F. Comparison of characteristics of patients infected by *Campylobacter jejuni, Campylobacter coli*, and *Campylobacter fetus*. J Clin Microbiol 2014;52(1):328-30.

24. Havelaar AH, Ivarsson S, Löfdahl M, Nauta MJ. Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. Epidemiol Infect 2013;141(2):293-302.

25. Gillespie IA, O'Brien SJ, Frost JA, Adak GK, Horby P, Swan AV, et al. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses. Emerging Infect Dis 2002;8(9):937-42.

26. European Food Safety Authority. Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. The EFSA Journal 2009;(223):109-35.

27. Guzman-Herrador B, Vold L, Nygard K. Surveillance of travel-associated gastrointestinal infections in Norway, 2009-2010: are they all actually imported? Euro Surveill 2012;17(41):20294.

28. Strachan NJC, Rotariu O, Smith-Palmer A, Cowden J, Sheppard SK, O'Brien SJ, et al. Identifying the seasonal origins of human campylobacteriosis. Epidemiol Infect 2013;141(6):1267-75.

29. Lawes JR, Vidal A, Clifton-Hadley FA, Sayers R, Rodgers J, Snow L, et al. Investigation of prevalence and risk factors for *Campylobacter* in broiler flocks at slaughter: results from a UK survey. Epidemiol Infect 2012;140(10):1725-37.

30. Platts-Mills JA, Babji S, Bodhidatta L, Gratz J, Haque R, Havt A, et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). Lancet Glob Health 2015;3(9):e564-575.

31. Chemaly M, Magras C, Madec J-Y, Santolini J, Denis M. *Campylobacter* dans les filières de production animale. BEH 2012;(HS):17-9.

32. Jacobs-Reitsma WF. Aspects of epidemiology of *Campylobacter* in poultry. Vet Q 1997;19(3):113-7.

33. Payot S, Dridi S, Laroche M, Federighi M, Magras C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. Vet Microbiol 2004;101(2):91-9.

34. Trimoulinard A, Tessier C, Beral M, Atiana L, Henry I, Cardinale E. Prevalence and risk factors susceptibility of *Salmonella spp., Campylobacter spp.* and *Listeria spp.* isolated from pork and poultry sausages, in Reunion Island, France. International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork [Internet] 2013;Available from: http://lib.dr.iastate.edu/safepork/2013/allpapers/33

35. Bolton DJ. *Campylobacter* virulence and survival factors. Food Microbiol 2015;48:99-108.

36. Blaser MJ, Smith PF, Repine JE, Joiner KA. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. Failure of encapsulated *Campylobacter fetus* to bind C3b explains serum and phagocytosis resistance. J Clin Invest 1988;81(5):1434-44.

37. Newell DG, Elvers KT, Dopfer D, Hansson I, Jones P, James S, et al. Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter spp.* on poultry farms. Appl Environ Microbiol 2011;77(24):8605-14.

38. Riedel CT, Brøndsted L, Rosenquist H, Haxgart SN, Christensen BB. Chemical decontamination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin and meat. J Food Prot 2009;72(6):1173-80.

39. Spier R, Saxena M, John B, Mu M, Van TTH, Taki A, et al. Strategies to reduce *Campylobacter* colonisation in chickens. Procedia in Vaccinology 2013;7:40-3.

40. Youssef M, Corthier G, Goossens H, Tancrede C, Henry-Amar M, Andremont A. Comparative translocation of enteropathogenic *Campylobacter spp.* and *Escherichia coli* from the intestinal tract of gnotobiotic mice. Infect Immun 1987;55(4):1019-21.

41. Nachamkin I, Allos BM, Ho T. *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. Clin Microbiol Rev 1998;11(3):555-67.

42. Lindsay JA. Chronic sequelae of foodborne disease. Emerging Infect Dis 1997;3(4):443-52.

43. Jacobs BC, Belkum A van, Endtz HP. Guillain-Barré Syndrome and *Campylobacter* Infection. 2008;245-61.

44. Briscoe DM, McMenamin JB, O'Donohoe NV. Prognosis in Guillain-Barré syndrome. Arch Dis Child 1987;62(7):733-5.

45. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. J Exp Med 1993;178(5):1771-5.

46. 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;47(6):804-11.

47. Futagami S, Itoh T, Sakamoto C. Systematic review with meta-analysis: post-infectious functional dyspepsia. Aliment Pharmacol Ther 2015;41(2):177-88.

48. Kamata K, Tokuda Y. Rapid diagnosis of *Campylobacter jejuni* by stool Gram stain examination. BMJ Case Rep [Internet] 2014 [cité 2016 sept 10];2014. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3912396/

49. Skirrow MB. *Campylobacter* enteritis: a « new » disease. Br Med J 1977;2(6078):9-11.

50. Karmali MA, Simor AE, Roscoe M, Fleming PC, Smith SS, Lane J. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. J Clin Microbiol 1986;23(3):456-9.

51. Bessède E, Solecki O, Sifré E, Labadi L, Mégraud F. Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. Clin Microbiol Infect 2011;17(11):1735-9.

52. McAuliffe GN, Anderson TP, Stevens M, Adams J, Coleman R, Mahagamasekera P, et al. Systematic application of multiplex PCR enhances the detection of bacteria, parasites, and viruses in stool samples. J Infect 2013;67(2):122-9.

53. Ménard A, Dachet 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;11(4):281-7.

54. Floch P, Goret J, Bessède E, Lehours P, Mégraud F. Evaluation of the positive predictive value of a rapid Immunochromatographic test to detect *Campylobacter in stools*. Gut Pathog 2012;4:17.

55. Rautelin H, Kosunen TU. An acid extract as a common antigen in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* strains. J Clin Microbiol 1983;17(4):700-1.

56. Wieczorek K, Osek J. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. Biomed Res Int 2013;2013:340605.

57. Mérens A, Servonnet A. Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. Revue Francophone des Laboratoires 2010;2010(422):33-41.

58. 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;49(8):3347-54.

59. 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;47(1):390-4.

60. Han J, Sahin O, Barton Y-W, Zhang Q. Key role of Mfd in the development of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*. PLoS Pathog 2008;4(6):e1000083.

61. 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;37(3):457-63.

62. Hänninen M-L, Hannula M. Spontaneous mutation frequency and emergence of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Antimicrob Chemother 2007;60(6):1251-7.

63. Alonso R, Mateo E, Girbau C, Churruca E, Martinez I, Fernandez-Astorga A. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism assay for detection of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2004;48(12):4886-8.

64. Beckmann L, Müller M, Luber P, Schrader C, Bartelt E, Klein G. Analysis of *gyrA* mutations in quinolone-resistant and -susceptible *Campylobacter jejuni* isolates from retail poultry and human clinical isolates by non-radioactive single-strand conformation polymorphism analysis and DNA sequencing. J Appl Microbiol 2004;96(5):1040-7.

65. Piddock LJV, Ricci V, Pumbwe L, Everett MJ, Griggs DJ. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. J Antimicrob Chemother 2003;51(1):19-26.

66. Jesse TW, Englen MD, Pittenger-Alley LG, Fedorka-Cray PJ. Two distinct mutations in *gyrA* lead to ciprofloxacin and nalidixic acid resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from chickens and beef cattle. J Appl Microbiol 2006;100(4):682-8.

67. 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):665-8.

68. Lin J, Michel LO, Zhang Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(7):2124-31.

69. Pumbwe L, Piddock LJV. Identification and molecular characterisation of cmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. FEMS Microbiol Lett 2002;206(2):185-9.

70. Yan M, Sahin O, Lin J, Zhang Q. Role of the CmeABC efflux pump in the emergence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* under selection pressure. J Antimicrob Chemother 2006;58(6):1154-9.

71. Wretlind B, Strömberg A, Ostlund L, Sjögren E, Kaijser B. Rapid emergence of quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* in patients treated with norfloxacin. Scand J Infect Dis 1992;24(5):685-6.

72. Société Française de Microbiologie, EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Recommandations 2016 - V 1.0 - CASFM - EUCAST - Février 2016.

73. 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;119:206-13.

74. Slinger R, Bellfoy D, Desjardins M, Chan F. High-resolution melting assay for the detection of *gyrA* mutations causing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars *Typhi* and *Paratyphi*. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;57(4):455-8.

75. Lee ASG, Ong DCT, Wong JCL, Siu GKH, Yam W-C. High-resolution melting analysis for the rapid detection of fluoroquinolone and streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS ONE 2012;7(2):e31934.

76. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014: EUSR on AMR in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food 2014. EFSA Journal 2016;14(2):4380.

77. Luber P, Wagner J, Hahn H, Bartelt E. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated in 1991 and 2001-2002 from poultry and Humans in Berlin, Germany. Antimicrob Agents Chemother 2003;47(12):3825-30.

78. Mevius DJ, Wit B, Pelt W van, Puister-Jansen LF, Bondt N, Bergevoet RHM, et al. MARAN 2007: Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2006/2007. 2009 [cité 2016 juill 19];Available from: http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=NL2012010795

79. Boonmar S, Morita Y, Fujita M, Sangsuk L, Suthivarakom K, Padungtod P, et al. Serotypes, antimicrobial susceptibility, and *gyr A* gene mutation of *Campylobacter jejuni* isolates from Humans and chickens in Thailand. Microbiology and Immunology 2007;51(5):531-7.

80. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) : Human Isolates - 2006 Final Report [Internet]. CDC; 2009 [cité 2016 juill 18]. Available from: http://www.cdc.gov/narms/annual/2006/narmsannualreport2006.pdf

81. Engberg J, Neimann J, Nielsen EM, Aarestrup FM, Fussing V. Quinolone-resistant *Campylobacter* infections: risk factors and clinical consequences. Emerg Infect Dis 2004;10(6):1056-63.

82. Gupta A, Nelson JM, Barrett TJ, Tauxe RV, Rossiter SP, Friedman CR, et al. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997-2001. Emerging Infect Dis 2004;10(6):1102-9.

83. Isenbarger DW, Hoge CW, Srijan A, Pitarangsi C, Vithayasai N, Bodhidatta L, et al. Comparative antibiotic resistance of diarrheal pathogens from Vietnam and Thailand, 1996-1999. Emerging Infect Dis 2002;8(2):175-80.

84. Smith KE, Besser JM, Hedberg CW, Leano FT, Bender JB, Wicklund JH, et al. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. Investigation Team. N Engl J Med 1999;340(20):1525-32.

85. Nachamkin I, Ung H, Li M. Increasing fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA,1982-2001. Emerging Infect Dis 2002;8(12):1501-3.

86. Mégraud F, Bessède E, Lehours P. Infections à *Campylobacters*. En cours de publication 2016;

87. Endtz HP, Ruijs GJ, van Klingeren B, Jansen WH, van der Reyden T, Mouton RP. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. J Antimicrob Chemother 1991;27(2):199-208.

88. McDermott PF, Bodeis SM, English LL, White DG, Walker RD, Zhao S, et al. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* evolves rapidly in chickens treated with fluoroquinolones. J Infect Dis 2002;185(6):837-40.

89. Van Boven M, Veldman KT, de Jong MCM, Mevius DJ. Rapid selection of quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* but not in *Escherichia coli* in individually housed broilers. J Antimicrob Chemother 2003;52(4):719-23.

90. FDA (Food and Drug Administration). National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) : 2012 Retail Meat Report [Internet]. 2015 [cité 2016 juill 19]. Available from: http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM442212.pdf

91. European Commission. Opinion of the scientific steering committee on antimicrobial resistance. [Internet]. 1999 [cité 2016 juill 20]. Available from: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out50_en.pdf

92. Kempf I, Mourand G, Châtre P, Haenni M, Santolini J, Madec J-Y. Antibiorésistance de *Campylobacter* dans différentes filières animales en France : pincipales tendances. BEH 2012;(HS):15-6.

93. Nelson JM, Smith KE, Vugia DJ, Rabatsky-Ehr T, Segler SD, Kassenborg HD, et al. Prolonged diarrhea due to ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* infection. J Infect Dis 2004;190(6):1150-7.

94. Helms M, Simonsen J, Olsen KEP, Mølbak K. Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study. J Infect Dis 2005;191(7):1050-5.

95. Campylobacter Sentinel Surveillance Scheme Collaborators. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni*: case-case analysis as a tool for elucidating risks at home and abroad. J Antimicrob Chemother 2002;50(4):561-8.

96. Wassenaar TM, Kist M, de Jong A. Re-analysis of the risks attributed to ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* infections. Int J Antimicrob Agents 2007;30(3):195-201.

97. Feodoroff FBL, Lauhio AR, Sarna SJ, Hänninen M-L, Rautelin HIK. Severe diarrhoea caused by highly ciprofloxacin-susceptible *Campylobacter* isolates. Clin Microbiol Infect 2009;15(2):188-92.

98. Salazar-Lindo E, Sack RB, Chea-Woo E, Kay BA, Piscoya ZA, Leon-Barua R, et al. Early treatment with erythromycin of *Campylobacter jejuni*-associated dysentery in children. J Pediatr 1986;109(2):355-60.

99. Ternhag A, Asikainen T, Giesecke J, Ekdahl K. A meta-analysis on the effects of antibiotic treatment on duration of symptoms caused by infection with *Campylobacter* species. Clin Infect Dis 2007;44(5):696-700.

100. CMIT, Rapp C, Pulcini C, Tattevin P. E. Pilly 2016 : Maladies infectieuses et tropicales. 25e édition. Paris: Alinéa Plus; 2015.

101. Ed DNG. The Sanford guide to antimicrobial therapy 2016. 46 Poc. Antimicrobial Therapy; 2016.

102. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microbiol Infect 2007;13 Suppl 3:1-46.

103. Ahmed MU, Dunn L, Ivanova EP. Evaluation of current molecular approaches for genotyping of *Campylobacter jejuni* strains. Foodborne Pathog Dis 2012;9(5):375-85.

104. Taboada EN, Clark CG, Sproston EL, Carrillo CD. Current methods for molecular typing of *Campylobacter* species. J Microbiol Methods 2013;95(1):24-31.

105. Meinersmann RJ, Helsel LO, Fields PI, Hiett KL. Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *fla* gene sequencing. J Clin Microbiol 1997;35(11):2810-4.

106. Alm RA, Guerry P, Trust TJ. Significance of duplicated flagellin genes in *Campylobacter*. J Mol Biol 1993;230(2):359-63.

107. Merchant-Patel S, Blackall PJ, Templeton J, Price EP, Tong SYC, Huygens F, et al. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genotyping by high-resolution melting analysis of a *flaA* fragment. Appl Environ Microbiol 2010;76(2):493-9.

108. Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, et al. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol 2001;39(1):14-23.

109. Tong SYC, Giffard PM. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. J Clin Microbiol 2012;50(11):3418-21.

110. Mao F, Leung W-Y, Xin X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. BMC Biotechnol 2007;7:76.

111. Fang N. High Resolution Melting - From assay to analysis. Qiagen Données commerciales

112. Lévesque S, Michaud S, Arbeit RD, Frost EH. High-resolution melting system to perform multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni*. PLoS ONE 2011;6(1):e16167.

113. Reja V, Kwok A, Stone G, Yang L, Missel A, Menzel C, et al. ScreenClust: Advanced statistical software for supervised and unsupervised high resolution melting (HRM) analysis. Methods 2010;50(4):S10-14.

114. Qiagen. Rotor-Gene ScreenClust HRM Software User Guide [Internet]. 2009 [cité 2016 juill 11]. Available from: https://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=af33be05-14c6-4ac3-ace2-d85aa7ad0434&lang=en

115. Qiagen. Manuel utilisateur ScreenClust. 2009;

116. Yu M, Hillebrand A, Tewarie P, Meier J, van Dijk B, Van Mieghem P, et al. Hierarchical clustering in minimum spanning trees. Chaos 2015;25(2):23107.

117. Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carriço JA. PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. BMC Bioinformatics 2012;13:87.

118. Thakur S, Morrow WEM, Funk JA, Bahnson PB, Gebreyes WA. Molecular epidemiologic investigation of *Campylobacter coli* in swine production systems, using multilocus sequence typing. Appl Environ Microbiol 2006;72(8):5666-9.

119. Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. J Clin Microbiol 1990;28(9):1903-5.

120. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990;215(3):403-10.

121. Struelens MJ. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin Microbiol Infect 1996;2(1):2-11.

122. Magnússon SH, Guðmundsdóttir S, Reynisson E, Rúnarsson AR, Harðardóttir H, Gunnarson E, et al. Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates from human, food, veterinary and environmental sources in Iceland using PFGE, MLST and *fla*-SVR sequencing. J Appl Microbiol 2011;111(4):971-81.

123. Kittl S, Heckel G, Korczak BM, Kuhnert P. Source attribution of human *Campylobacter* isolates by MLST and *fla*-typing and association of genotypes with quinolone resistance. PLoS ONE 2013;8(11):e81796.

124. Lévesque S, Frost E, Arbeit RD, Michaud S. Multilocus Sequence Typing of *Campylobacter jejuni* Isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. J Clin Microbiol 2008;46(10):3404-11.

125. Wang Y, Taylor DE. Natural transformation in *Campylobacter* species. J Bacteriol 1990;172(2):949-55.

126. Clark CG, Taboada E, Grant CCR, Blakeston C, Pollari F, Marshall B, et al. Comparison of molecular typing methods useful for detecting clusters of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates through routine surveillance. J Clin Microbiol 2012;50(3):798-809.

127. Dingle KE, Colles FM, Falush D, Maiden MCJ. Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol 2005;43(1):340-7.

128. Kinana AD, Cardinale E, Tall F, Bahsoun I, Sire J-M, Garin B, et al. Genetic diversity and quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from poultry in Senegal. Appl Environ Microbiol 2006;72(5):3309-13.

129. Denis M, Henrique E, Chidaine B, Tircot A, Bougeard S, Fravalo P. *Campylobacter* from sows in farrow-to-finish pig farms: risk indicators and genetic diversity. Vet Microbiol 2011;154(1-2):163-70.

130. Colles FM, Maiden MCJ. *Campylobacter* sequence typing databases: applications and future prospects. Microbiology (Reading, Engl) 2012;158(Pt 11):2695-709.

131. Cody AJ, McCarthy ND, Bray JE, Wimalarathna HML, Colles FM, Jansen van Rensburg MJ, et al. Wild bird-associated *Campylobacter jejuni* isolates are a consistent source of human disease, in Oxfordshire, United Kingdom. Environ Microbiol Rep 2015;7(5):782-8.

132. Wassenaar TM, Fernández-Astorga A, Alonso R, Marteinsson VT, Magnússon SH, Kristoffersen AB, et al. Comparison of *Campylobacter fla*-SVR genotypes isolated from humans and poultry in three European regions. Lett Appl Microbiol 2009;49(3):388-95.

133. Chen X, Kong F, Wang Q, Li C, Zhang J, Gilbert GL. Rapid detection of isoniazid, rifampin, and ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using high-resolution melting analysis. J Clin Microbiol 2011;49(10):3450-7.

134. Ngoi ST, Thong KL. High resolution melting analysis for rapid mutation screening in gyrase and Topoisomerase IV genes in quinolone-resistant *Salmonella enterica*. Biomed Res Int 2014;2014:718084.

135. Loveless BM, Yermakova A, Christensen DR, Kondig JP, Heine HS, Wasieloski LP, et al. Identification of ciprofloxacin resistance by SimpleProbe, High Resolution Melt and Pyrosequencing nucleic acid analysis in biothreat agents: *Bacillus anthracis, Yersinia pestis* and *Francisella tularensis*. Mol Cell Probes 2010;24(3):154-60.

Doctorant : **Naël ZEMALI** ***Directeur de Thèse :*** **Dr J. JAUBERT**

Titre : **Génotypage et détection des mutations de *gyrA* par PCR HRM de *Campylobacter* isolé chez l'Homme et l'animal à La Réunion**

Introduction : *Campylobacter* est la première étiologie d'entérites aiguës bactériennes en France. Sa transmission à l'Homme repose principalement sur la consommation d'aliments contaminés (viandes de poulet, de porc, …). Les voies de transmission de cette zoonose n'ont jamais été étudiées à La Réunion et leurs connaissances passent par le génotypage de la bactérie. Deux techniques de typage ont été adaptées et testées au laboratoire du CHU Sud Réunion. En complément, une technique de détection moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones a été développée.
Méthodes : Une méthode de typage uni-locus en PCR HRM du gène *flaA* ainsi qu'une méthode multi-loci dérivée de la MLST ont été utilisées pour typer des souches de *Campylobacter* isolées à La Réunion chez l'Homme, le poulet et le porc. Les mutations de résistance de *gyrA* ont été recherchées par PCR HRM.
Résultats : 76 *C. jejuni* d'origine humaine ont été typés. Parmi les 73 isolats typables par MLST, 63 ST différents ont été déterminés alors que seuls 6 clusters ont été retrouvés en PCR HRM *flaA* (avec respectivement pour les deux techniques une typabilité de 96,1 % et 97,3 % et un index de pouvoir discriminant de 0,99 et 0,80). 52 *C. coli* d'origine humaine et porcine ont été typés en PCR HRM *flaA* et 6 clusters ont été retrouvés (typabilité de 98,1 % et index de pouvoir discriminant de 0,77). La technique de recherche des mutations de *gyrA* a permis de déterminer la sensibilité aux fluoroquinolones de 73 *C. jejuni* sur 76 (typabilité de 96 %, sensibilité et spécificité de 100 %).
Discussion : La technique de génotypage dérivée de la MLST montre une diversité génétique importante de *C. jejuni* chez l'Homme à La Réunion. Elle s'est avérée plus discriminante que la PCR HRM *flaA* pour typer cette espèce et semble être une technique de choix pour comparer les génotypes retrouvés dans diverses niches écologiques. D'autre part, la détection de la résistance aux fluoroquinolones par PCR HRM sur *gyrA* s'est avérée sensible, spécifique, rapide et peu coûteuse.

Mots-clés : *Campylobacter*, La Réunion, HRM, *flaA*, MLST, *gyrA*, résistance aux fluoroquinolones

Title: **HRM PCR assay for genotyping and detection of *gyrA* mutations of *Campylobacter* isolated from humans and animals in Reunion Island**

Introduction: *Campylobacter* is the first etiology of acute bacterial enteritis in France. Its transmission to humans is mainly based on the consumption of contaminated food (chickens, pigs, ...). Routes of transmission of this zoonotic disease have not been studied yet in Reunion Island and genotyping of the bacteria is necessary for this knowledge. Two typing techniques have been adapted and tested at the University Hospital of Saint-Pierre (Reunion Island). Moreover, molecular detection of fluoroquinolone resistance was developed.
Methods: A single-locus typing method based on HRM PCR of *flaA* and a multi-loci method derived from MLST were used for typing *Campylobacter* strains isolated in Reunion Island from humans, chickens and pigs. *gyrA* resistance mutations were investigated by HRM PCR.
Results: 76 *C. jejuni* isolated from humans were typed. Among 73 MLST typeable isolates, 63 different ST were determined but only 6 clusters were found with the HRM PCR method (respectively for both techniques a typeability of 96.1% and 97.3% and a discriminating power index of 0.99 and 0.80). 52 *C. coli* isolated from humans and pigs were typed with *flaA* HRM PCR and 6 clusters were found (typeability: 98.1% and discriminating power index: 0.77). *gyrA* mutations detection method was able to determine fluoroquinolone susceptibility in 73 *C. jejuni* of 76 (typeability: 96%, sensitivity and specificity: 100%).
Discussion: Genotyping method derived from MLST shows a significant *C. jejuni* genetic diversity in humans in Reunion Island. It proved to be more discriminating than *flaA* HRM PCR to type this species and appears to be an appropriate technique for comparing genotypes found in various ecological niches. Furthermore, detection of fluoroquinolone resistance by *gyrA* HRM PCR was sensitive, specific, rapid and cost effective.

Keywords: *Campylobacter*, Reunion Island, HRM, *flaA*, MLST, *gyrA*, fluoroquinolone resistance

Université de Bordeaux - U.F.R. des Sciences Médicales
146 rue Léo Saignat - 33076 Bordeaux Cedex