

**DIVERSITE GENOTYPIQUE DE SOUCHES DE *CAMPYLOBACTER coli*
ISOLEES SUR DES PORCS EN ABATTOIRS : PREMIERS RESULTATS.**
LAROCHE M. ¹, DESMONTS M. H. ², LEBIGRE M. ¹, ROSSERO A. ¹, MINVIELLE B. ³, MAGRAS C. ¹
1- UMR ENVN / INRA 1014 SECALIM, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 3
2- AERIAL, BP 40443, 67412 Illkirch Cedex - 3- IFIP - BP 35 104, 35 651 Le Rheu Cedex
Introduction

Des notes de risque moyennes calculées pour la viande porcine (Fosse *et al.*, 2008) permettent de positionner de façon relative les dangers zoonotiques alimentaires en Europe et en Amérique du Nord. *Campylobacter* spp. thermotolérants occupent le troisième rang de cette hiérarchie, derrière les salmonelles et *Yersinia enterocolitica*. L'analyse des risques au long de la chaîne alimentaire doit conduire à mieux décrire le statut de contamination (prévalence, niveau de contamination, localisation) des viandes vis-à-vis de *Campylobacter* et à évaluer leur statut de dangerosité (profils génomiques, survie et virulence des souches) (Magras et Laroche 2006). La caractérisation du statut de contamination des viandes porcines a été conduite au stade de la première transformation (Minvielle *et al.*, 2007) confirmant un portage intestinal très élevé quasi exclusif à *C. coli* (Magras *et al.*, 2004, Alter *et al.*, 2005) des porcs charcutiers entrant à l'abattoir. Cependant si sur les carcasses et les produits carnés porcins, *C. coli* reste l'espèce majoritairement isolée (Laroche *et al.*, 2006, Minvielle *et al.*, 2007), *C. jejuni* est plus fréquemment rencontrée, voire même *C. lari* (Nesbakken *et al.*, 2003, Pezzotti *et al.*, 2003). Cette diversité des espèces bactériennes et des souches peut provenir de contaminations croisées de la viande à partir de sources multiples tout au long de la chaîne de production. Il est donc intéressant d'affiner la caractérisation des souches isolées sur les produits primaires porcins afin d'identifier les sources potentielles de la contamination par *Campylobacter*.

Pour *Campylobacter* sp. une forte variabilité génétique est décrite (On, 1998), aussi l'analyse des profils de macro restriction obtenus par la technique d'électrophorèse en champs pulsés apparaît-elle intéressante dans le cadre d'échantillonnages ciblés avec une unité épidémiologique. Les travaux présentés proposent une méthode d'analyse des profils des souches de *C. coli* afin d'apporter les éléments d'une première caractérisation du statut de dangerosité des carcasses de porcs charcutiers.

Matériel et Méthodes

Origine des isolats de C. coli : les souches identifiées par PCR-multiplex (Denis *et al.*, 1999) sont issues d'une campagne d'évaluation du statut de contamination ayant porté sur 250 porcs et leur carcasse prélevés à l'abattoir avant l'entrée en ressuyage (Laroche *et al.*, 2006). Les souches isolées (1 à 3 isolats / prélèvement positif) ont trois origines : le contenu digestif rectal (CD), un prélèvement calibré de surface de la carcasse en site interne (bavette B) et un prélèvement en site externe (gorge G). L'échantillonnage a été conduit dans 5 abattoirs, avec pour chaque abattoir 10 lots (L) de 5 porcs et leur carcasse, un lot correspond à un élevage. *Echantillonnage pour le pulstypage* : tous les isolats d'un lot parmi les 10 pour chacun des 5 abattoirs ont été retenus. L'ADN génomique a été digéré avec l'enzyme de restriction *Sma*I (Gibco). L'électrophorèse a été réalisée dans 1 gel d'agarose ultra pure avec un système CHEF DR II (Bio-Rad, Hercules, Calif) dans 1 tampon TBE 0,5 x ; les conditions sont de 6,6 V/cm à 14-18° C avec des pulses alternatifs de 120 ° de 15 à 45 s pendant 20 h puis de 2 à 8 s pendant 2h avec comme marqueur lambda DNA ladder (Sigma). *Paramètres de l'analyse des profils* : Les profils obtenus après révélation par BET ont été analysés avec le logiciel BioNumerics v 3.5 (Applied Maths Kortrijk, Belgique) avec une tolérance de 1,7 % et une optimisation de 1 % selon le coefficient de similarité de Dice et la méthode UPGMA – (Unweighter Pair Group Method with Arithmetic averages). Un "clone" (C) est défini comme 2 ou 3 isolats provenant du même prélèvement et présentant le même pulstypage. L'effectif « N » d'isolats différents dans la population de souches de *C. coli* étudiée et le nombre « P » de profils différents observés sont calculés (Laroche *et al.*, 2007, tab. I). L'indice de diversité D dans la population totale des souches de *C. coli* et dans les deux sous-populations - souches issues de contenu digestif (CD) et souches issues des prélèvements viande (V) - est calculé : $D = P/N$. La distribution des profils est ensuite décrite avec le nombre « Ri » - nombre de répétitions d'un profil dans la population totale de souches - et la distribution au sein des sous-populations CD et V en fonction des lots.

Résultats et discussion

Pour les 45 prélèvements positifs (Pp) dont sont issus les 80 isolats pulstypés (I), 65 isolats ont été déclarés différents (N) et 48 profils (P) sont observés, soit un indice de diversité global $D = 0,74$ (tab. I). La valeur de cet indice est comparable pour l'ensemble des souches de *C. coli* et pour celles issues des prélèvements de contenu digestif ou des prélèvements sur carcasse. 37 des 48 profils apparaissent une fois (R1), 6 apparaissent 2 fois (R2), 4 trois fois (R3) et 1 quatre fois (R4) (tab. II).

Bien que la diversité génétique des souches de *C. coli* observée soit particulièrement importante - 37 profils observés une fois (R1 tab. II) - de ces premiers résultats il ressort aux stades des produits primaires porcins (tab. II, fig. 1) :

- une contamination d'un même prélèvement ou même individu avec plusieurs profils – *ex.* : fig. 1 la gorge du porc 3 avec trois profils ; porc 1 avec deux profils sur CD.

- une stabilité de certains profils qui sont retrouvés dans des lieux géographiquement différents (ligne « lots différents ») ;
- une certaine communauté de profils entre des animaux d'un même élevage (ligne « même lot CD » ou fig. 1 animaux 2 et 3 avec même profil sur CD) même si cette communauté apparaît bien moins forte que celle observée dans les élevages de poulets (Hook *et al.*, 2005) ;
- une contamination de la surface de la carcasse à partir du contenu digestif des animaux - même individu ou inter-contamination - lignes « CD + V » du tableau II ; fig. 1 ex. animal 3 sur CD et sur G.

Tableau I : Répartition des effectifs d'isolats (I) de *C. coli* en fonction des prélèvements positifs (Pp) et valeurs des paramètres (C clones, N isolats différents, P profils et D indice de diversité) pour l'analyse des pulsotypes (CD = contenu digestif, V = viande gorge (G) ou bavette (B)).

	I	Pp	C	N	P	D=P/N
CD	49	24	10	39	31	0,79
V	31	21	5	26	21	0,81
Total	80	45	15	65	48	0,74

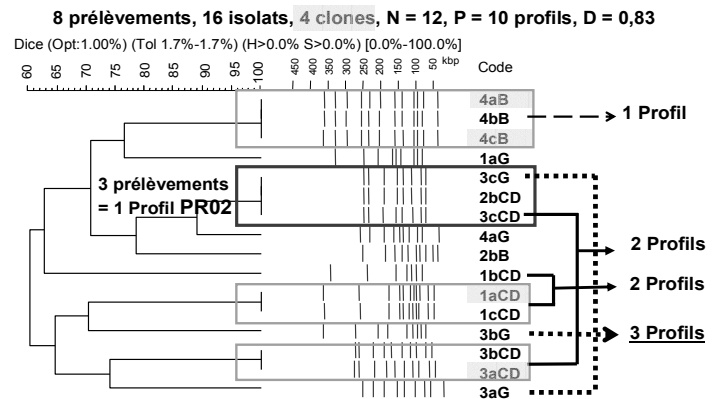


Figure 1 : Exemple d'analyse d'un dendrogramme obtenu après macrorestriction avec l'enzyme Sma 1 des souches de *C. coli* isolées à partir d'un lot. Code intra-lot = animal, isolat, nature du prélèvement (CD, B, G). Les 4 isolats considérés comme clones sont grisés.

Tableau II : Nombre de répétitions d'un profil (Ri) et distribution des profils de *C. coli* par animal en fonction de l'origine des souches (contenu digestif CD et/ou viande V - G gorge ou B bavette, lot).

P		R4 (1)				R3 (4)				R2 (6)						R1 (37)
		PR01	PR02	PR03	PR04	PR05	PR06	PR07	PR08	PR09	PR10	PR11	PRi			
Même lot	CD	2	1				2	2					24			
	V			3					2	1 (B+G)	1 (B+G)	13				
	CD + V	1	1													
Lots différents	CD			3	1			1								
	V							1								
	CD + V				1											

Légendes : Ri(j) avec i = nombre de répétitions observées = 1 à 4, (j) = (nombre de profils répétés i fois) ; V : observation du profil sur prélèvement viande si nécessaire précisée B+G ; CD + V = observation du profil sur prélèvement du CD et sur prélèvement(s) V du même individu.

Conclusions

La diversité génétique très importante de *Campylobacter coli* doit être prise en compte dans l'analyse du risque des infections par *Campylobacter* et du statut de dangerosité des viandes. Dans l'espèce porcine, une maîtrise du transfert de la contamination des carcasses peut être assurée par le strict respect des règles d'hygiène lors de la mise en œuvre des processus d'abattage. Au stade de l'élevage, l'identification des sources de la contamination des porcs en engraissement pourrait permettre d'envisager des moyens de maîtrise.

Références bibliographiques

- Alter T., Gaull F., *et al.* 2005. *Vet. Microbiol.* **108**: 251-261.
- Fosse J., Seegers H., Magras C. 2008. *Vet. Res.*, **39**:01.
- Höök H., Fattah M.A., *et al.* 2005. *Vet. Microbiol.*, **106**,109-117
- Laroche M., Minvielle B., *et al.* (2006). <http://www.office-elevage.fr/vpc/11jsmtv/11JSMTV-H-COM4.pdf>
- Laroche, M., Desmonts M.H., *et al.* (2007). CHRO 2007. Zoonoses and Public Health 54: 27-27.
- Magras C., Garrec N., *et al.* (2004). <http://www.isah-soc.org/documents/2004/Magras.pdf>
- Magras C., Laroche M. (2006) Journées Techniques Campylobacter, AFSSA Ploufragan, France.
- Minvielle, B., C. Magras, *et al.* (2007). Safe pork, Verona, (ISBN 978-88-6129-083-9): 145-148.
- Nesbakken T., Eckner K., *et al.* 2003. *Int. J. Food Microbiol.* **80**, 231-240.
- On S.L.W., 1998. *FEMS Microbiology Letters*, **165**, 341-346
- Pezzotti G., Serafin A., *et al.* 2003. *Int. J. Food Microbiol.* **82**: 281-287.

Remerciements

Aux industriels partenaires de l'étude ; à Florence Jugiau (ENVN), Christine Fassel (Aérial) pour leur aide technique ; au Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales, pour son soutien financier (AQS R02/06).