

COMPARAISON DES NIVEAUX DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ET AUX DESINFECTANTS DE *C. JEJUNI* ET *C. COLI* AVANT ET APRES LES PROCEDES D'ABATTAGE DANS LES ABATTOIRS DE VOLAILLES

1 Introduction

Les campylobacters sont considérés comme la première cause bactérienne de diarrhée d'origine alimentaire dans le monde (Anonymous 2004). *C. jejuni* et *C. coli* sont des commensaux d'un grand nombre de mammifères et d'oiseaux. La contamination de l'homme se fait le plus souvent par le biais de l'alimentation (viande de volaille, lait) (Anonymous 2003). Les principaux symptômes sont digestifs. Les infections dues à *Campylobacter* sp. peuvent être responsables d'atteintes extra-digestives (septicémie) chez certains patients (jeunes enfants, patients immunodéprimés) et de complications post-infectieuses (syndrome de Guillain-Barré). Bien que les gastro-entérites dues à *Campylobacter* sp. rétrocedent le plus souvent spontanément, il est dans certains cas nécessaire de traiter les patients avec des antibiotiques. En France, les pourcentages de résistance aux antibiotiques des campylobacters des filières avicole et porcine font l'objet d'un plan de surveillance (Moore, Barton et al. 2006).

Si la sélection de bactéries résistantes chez l'animal traité pendant la période d'élevage par des antibiotiques a été démontrée, l'effet des différentes étapes de transformation en industrie agro-alimentaire, ainsi que de la désinfection des environnements comme source de re-contamination des denrées ou de modulation de la sélection des souches résistantes sont mal connus. Ces observations nous ont conduit à émettre l'hypothèse que les procédés d'abattage pouvaient avoir un impact sur la résistance aux antibiotiques des campylobacters. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé l'étude suivante : à partir de prélèvements réalisés en abattoirs de volailles au début et à la fin des opérations d'abattage (fientes et peaux de cou), nous avons mesuré la résistance aux antibiotiques et aux désinfectants des souches de campylobacter collectées et nous avons comparé les niveaux de résistance observés en fonction des sites de prélèvement. L'objectif de cette étude est donc de contribuer à améliorer les connaissances sur l'influence de la première étape de transformation dans les abattoirs de volailles sur la sélection de souches de campylobacter résistantes aux antimicrobiens.

2 Matériels et méthodes

2.1 Prélèvements et souches de campylobacters utilisés pour l'étude

Dans les 4 abattoirs visités, 43 lots de volailles ont été prélevés au niveau des caisses de transport (fientes) et au niveau de l'entrée en salle de ressuage des carcasses (peaux de cou). Le nombre de prélèvements réalisés en fonction des abattoirs, du type de volaille prélevé et de la saison sont indiqués dans le tableau 31.

2.2 Mesure de la résistance aux antibiotique et aux désinfectants

2.2.1 Dilution en milieu gélosé

Toutes les mesures de sensibilité aux antibiotiques et aux désinfectants ont été réalisées avec la méthode de dilution en milieu gélosé décrite dans le chapitre 2.

2.2.2 Mesure de la résistance

2.2.2.1 Choix de la population de référence

Les espèces *C. jejuni* et *C. coli* sont traitées séparément.

D'après sa définition, la résistance se mesure par rapport à une population de référence.

La résistance aux antibiotiques peut être mesurée par rapport à 2 populations de référence différentes :

- La première correspond à l'ensemble des campylobacters isolés dans les prélèvements de fientes et de peaux de cou et dont l'antibiogramme complet a été déterminé. Le dénominateur du pourcentage est la somme des isolats pour lesquels la résistance est mesurée.
- La deuxième correspond à une mesure de la résistance dans une population « hôte » des campylobacters, c'est à dire dans les types prélèvements de volaille. Le dénominateur des pourcentages est le nombre de prélèvements par type.

2.2.2.2 Méthodes utilisées pour mesurer la résistance en fonction de la population de référence

- Mesure de la résistance sur l'ensemble des prélèvements

Deux méthodes différentes peuvent être utilisées pour mesurer la résistance des campylobacters au niveau des volailles abattues:

- La première méthode consiste à noter, pour chaque prélèvement, la ou les résistances aux antibiotiques observées sur les isolats du prélèvement considéré. Pour chaque antibiotique, on note pour le prélèvement la valeur observée pour chaque isolat.

Les résultats obtenus avec cette méthode correspondent aux résultats « R observée » dans les tableaux 33 et 34.

- La deuxième méthode consiste à pondérer la résistance observée dans les prélèvements en prenant en compte le nombre d'isolats collectés par prélèvement. La formule utilisée est celle de (Davison, Low et al. 2000) :

$$P = \frac{1}{N} \left[\sum_{i=1}^N 1 - (1 - p_i)^{nR_i} \right]$$

avec N= nombre de prélèvement (par type de prélèvement, fientes ou peau de cou)

p_i =résistance calculée par prélèvement ($=nR_i/b_i$)

nR_i nombre de résistance observé

b_i =nombre d'isolats par prélèvement

Les résultats obtenus avec cette méthode correspondent aux résultats « R estimée » des tableaux 33 et 34 : pourcentage de résistance estimé. Le logiciel Matlab® a été utilisé pour faire les calculs.

Tableau 32. Isolement des campylobacters dans les prélèvements de fientes et de peaux de cou dans les 4 abattoirs

	Fientes	Peaux de cou	Total
Nombre de lots prélevés	43	43	43
Nombre de prélèvements	43	146	189
Nombre de prélèvements positifs	35	102	137
Nombre de prélèvements positifs pour <i>C. jejuni</i>	28	99	127
Nombre de prélèvements positifs pour <i>C. coli</i>	12	9	21
Nombre d'isolats <i>C. jejuni</i>	72	293	365
Nombre d'isolats <i>C. coli</i>	23	16	39

2.3 Analyse statistique

2.3.1 Analyse en correspondance multiple

Les données ont été analysées avec le logiciel SPAD®.

2.3.2 Tests de comparaisons

Les tests de comparaison ont été réalisés avec le logiciel Systat®. Le test du χ^2 ou le test exact de Fisher sont utilisés pour comparer les pourcentages de résistance observés. Le risque α est choisi à 5% ($p \leq 0.05$). Le coefficient de Spearman a été utilisé pour mesurer les corrélations entre les distributions de CMI des molécules antibiotiques et désinfectantes testées.

3 Résultats

3.1 Déséquilibre du plan de prélèvement

La répartition des lots de volailles prélevés en fonction des abattoirs, de l'espèce de volaille prélevée et de la saison sont indiqués dans le tableau 31.

➤ Abattoirs

Plus de 80% des lots prélevés proviennent des abattoirs 1 et 3 (36/43). Les abattoirs 2 et 4 n'ont été visités qu'une seule fois.

➤ Saisons

Les prélèvements sont principalement répartis sur trois saisons (printemps, été et hiver). Seuls 11,6% (5/43) des lots ont été prélevés en automne.

➤ Espèces de volailles prélevées

Presque la moitié (46.5%) des prélèvements a été réalisée sur des volailles de type poulet de chair standard. Les nombres de lots prélevés pour la dinde, les poulets de type fermier et autres espèces de volaille sont équilibrés (environ 17%). Dans la catégorie « autre » espèce de volailles se trouvent les lots de pintades, de poules pondeuses et de canards.

Les déséquilibres observés seront pris en compte lors de l'analyse des comparaisons entre les différents pourcentages de résistance.

3.2 Isolement des campylobacters dans les prélèvements

3.2.1 Espèces de campylobacter isolées

Au total, 43 lots de volailles ont été prélevés dans les 4 abattoirs, ce qui correspond à 43 pools de fientes et 146 peaux de cou.

Sur l'ensemble des prélèvements, 72,5% (137/189) étaient positifs pour campylobacter. Parmi les prélèvements positifs, 92,7% (127/137) étaient positifs pour *C. jejuni* et 15,3% (21/137) pour *C. coli*. Ces prélèvements ont permis l'isolement de 404 isolats dont 365 (90,3%) *C. jejuni* et 39 (9,7%) *C. coli*. L'isolement des campylobacters dans l'ensemble des lots prélevés sont présentés dans le tableau 32.

Tableau 33. Pourcentages de résistance aux antibiotiques mesurés pour *C. jejuni*

Prélèvements	Méthode de mesure		Ampicilline		Tétracycline		Erythromycine		Enrofloxacin		Streptomycine		Multirésistance	
			%	IC	%	IC	%	IC	%	IC	%	IC	%	IC
Fientes	R estimée	n=21	27.5		48.3		6.6		32.1		0.0		35.6	
	R observée	n=21	33.3	11.6-58.9	52.4	25.7-75.7	9.5	0.3-32.5	38.1	14.8-63.4	0.0	0.0-16.1	42.9	18.2-67.7
Peaux de cou	R estimée	n=40	43.6		64.5		4.1		32.5		6.7		45.9	
	R observée	n=40	47.5	28.8-65.3	70.0	50.2-84.3	5.0	0.2-18.3	37.5	20.3-55.8	7.5	0.8-21.8	52.5	33.2-69.8

IC : intervalle de confiance à 95% ; R : résistance, n= nombre de prélèvements

Tableau 34. Pourcentages de résistance aux antibiotiques observés pour *C. coli*

Prélèvements	Méthode de mesure		Ampicilline		Tétracycline		Erythromycine		Enrofloxacin		Streptomycine		Multirésistance	
			%	IC	%	IC	%	IC	%	IC	%	IC	%	IC
Fientes	R estimée	n=10	16.9		100.0		17.5		59.4		17.5		59.4	
	R observée	n=10	20.0	0.6-58.1	100.0	64.5-100	10.0	0.0-47.3	50.0	13.2-82.7	20.0	0.6-58.1	60.0	19.7-88.8
Peaux de cou	R estimée	n=6	33.3		83.3		16.7		50.0		0.0		66.7	
	R observée	n =6	33.3	1.0-79.6	83.3	24.5-99.8	16.7	0.0-66.8	50.0	5.8-89.3	0.0	0.0-45.9	66.7	13.7-96.2

IC : intervalle de confiance à 95% ; R : résistance, n= nombre de prélèvements

3.2.2 Analyse par lot de volaille

Au total, 43 lots de volailles ont été prélevés dans les 4 abattoirs, ce qui correspond à 43 pools de fientes et 146 peaux de cou.

- Dans les prélèvements de fientes, 35 étaient positifs pour campylobacter dont 28 pour *C. jejuni* et 12 pour *C. coli*. Dans 5 prélèvements, les deux espèces ont été isolées. Dans les prélèvements de fientes, 72 isolats de *C. jejuni* et 23 isolats de *C. coli* ont été collectés.
- Parmi les peaux de cou, 102 étaient positives pour campylobacter, dont 99 pour *C. jejuni* et 9 pour *C. coli*. Dans 6 peaux de cou, les deux espèces ont été isolées. Au total à partir des peaux de cou, 293 isolats de *C. jejuni* et 39 isolats de *C. coli* ont été collectés. Pour l'analyse et la comparaison des résistances observées, les prélèvements de peau de cou sont regroupés par lot de volaille dont ils sont issus.

3.3 Niveaux de résistance observés par molécule d'antibiotique testée

3.3.1 Pour l'espèce *C. jejuni*

Les 2 pourcentages de résistance mesurés (observé et estimé) sont indiqués dans le tableau 33.

Quel que soit le type de prélèvement, aucune résistance à la gentamicine n'a été observée.

- Dans les fientes, le pourcentage de résistance le plus élevé est observé pour la tétracycline (de 48,3% à 52,4%) et le pourcentage de résistance le plus faible est observé pour la streptomycine (0%).
- Dans les peaux de cou, le pourcentage de résistance le plus élevé est également observé pour la tétracycline (de 43,6% à 47,5%) et le plus faible est observé pour l'érythromycine (4,1% à 5,0%).

3.3.2 Pour l'espèce *C. coli*

Les pourcentages de résistance observés en fonction de la méthode de mesure sont indiqués dans le tableau 34.

Quel que soit le type de prélèvement ou la méthode d'échantillonnage, aucune résistance à la gentamicine n'a été observée.

- Dans les fientes, le pourcentage de résistance le plus élevé est observé pour la tétracycline (100%) et le pourcentage de résistance le plus faible est observé pour l'érythromycine (de 10% à 17.5%).

Tableau 35. Comparaison des pourcentages de résistance observés entre les prélèvements de fientes et de peaux de cou pour *C. jejuni* et *C. coli*. Valeurs de p (test du χ^2 ou test exact de Fisher)

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Ampicilline	0.707	0.604
Tétracycline	0.271	0.375
Erythromycine	0.444	1.000
Enrofloxacin	0.705	1.000
Streptomycine	0.171	0.500
Multirésistance	0.609	1.000

Tableau 36. Pourcentages de résistances observés pour *C. jejuni* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction de l'abattoir et valeur de p (test du χ^2 ou exact de Fisher)

	Abattoir				p
	1	2	3	4	
n prélèvements	29	7	24	1	
Ampicilline	31	0	7	100	0.003
Tétracycline	52	1	92	100	<10⁻³
Erythromycine	0	0	13	100	<10⁻³
Enrofloxacin	41	0	42	100	0.102
Streptomycine	7	0	0	100	<10⁻³
Multirésistance	0	0	71	100	0.005

Tableau 37. Pourcentages de résistances observés pour *C. jejuni* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction du type de volaille abattue et valeur de p (test du χ^2 ou exact de Fisher)

	Type de volaille				p
	Poulet standard	Poulet fermier	Dinde	Autre	
n prélèvements	31	13	11	6	
Ampicilline	26	69	27	100	0.001
Tétracycline	42	85	82	100	0.003
Erythromycine	0	0	18	33	0.006
Enrofloxacin	26	38	64	50	0.144
Streptomycine	6	0	9	0	0.671
Multirésistance	32	69	45	100	0.008

Tableau 38. Pourcentages de résistances observés pour *C. jejuni* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction de la saison et valeur de p (test du χ^2 ou exact de Fisher)

	Saison				p
	Printemps	Été	Automne	Hiver	
n prélèvements	18	24	6	13	
Ampicilline	39	33	100	38	0.028
Tétracycline	56	58	100	69	0.220
Erythromycine	0	4	0	23	0.053
Enrofloxacin	33	17	50	77	0.004
Streptomycine	0	8	0	8	0.561
Multirésistance	33	33	100	77	0.002

Tableau 39. Pourcentages de résistances observés pour *C. coli* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction de l'abattoir et valeur de p (test du χ^2 ou test exact de Fisher)

	Abattoir				p
	1	2	3	4	
n prélèvements	7	0	7	2	
Ampicilline	0		57	0	0.032
Tétracycline	100		86	100	0.504
Erythromycine	14		14	0	0.849
Enrofloxacin	29		57	100	0.180
Streptomycine	14		0	50	0.166
Multirésistance	43		71	100	0.274

Tableau 40. Pourcentages de résistances observés pour *C. coli* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction du type de volaille abattue et valeur de p (test du χ^2 ou test exact de Fisher)

	Type de volaille				p
	Poulet standard	Poulet fermier	Dinde	Autre	
n prélèvements	5	0	4	7	
Ampicilline	0		0	57	0.032
Tétracycline	100		100	86	0.504
Erythromycine	20		0	14	0.654
Enrofloxacin	20		75	57	0.230
Streptomycine	0		50	0	0.032
Multirésistance	40		75	71	0.453

Tableau 41. Pourcentages de résistances observés pour *C. coli* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction de la saison et valeur de p (test du χ^2 ou test exact de Fisher)

	Saison				p
	Printemps	Été	Automne	Hiver	
n prélèvements	3	6	4	3	
Ampicilline	67	17	25	0	0.261
Tétracycline	100	100	75	100	0.362
Erythromycine	0	17	25	0	0.677
Enrofloxacin	67	33	25	100	0.172
Streptomycine	0	0	0	67	0.019
Multirésistance	67	50	50	100	0.477

- Dans les peaux de cou, le pourcentage de résistance le plus élevé est également observé pour la tétracycline (de 83,3%) et le plus faible est observé pour la streptomycine (0,0%).

3.4 Comparaison des pourcentages de résistance aux antibiotiques observés

3.4.1 Comparaison des pourcentages de résistance avant « fientes » et après « peaux de cou » abattage des volailles

La comparaison des niveaux de résistance est faite entre les pourcentages de résistances observées entre les fientes et les peaux de cou, en notant pour chaque prélèvement les résistances observées sur les isolats. L'objectif est de déterminer si les procédés d'abattage ont un effet sur les pourcentages de résistance aux antibiotiques des campylobacters dans les prélèvements de volailles. La comparaison des résistances aux antibiotiques pour *C. jejuni* et *C. coli* (tableau 35) ne met en évidence aucune différence entre les fientes et les peaux de cou (test du χ^2 ou test exact de Fisher).

3.4.2 Comparaison des pourcentages de résistance en fonction des abattoirs, du type de volaille et de la saison

3.4.2.1 Pour l'espèce *C. jejuni*

➤ Influence de l'abattoir sur les pourcentages de résistance observés (tableau 36)

Les pourcentages de résistance aux antibiotiques sont significativement différents entre les abattoirs ($p < 0.05$), sauf pour l'enrofloxacin. On constate que dans tous les prélèvements collectés dans l'abattoir 4 une résistance à chacun des antibiotiques testés est observée. Au contraire, dans l'abattoir 2, la résistance observée sur les prélèvements est nulle sauf pour la tétracycline (1%).

➤ Espèce de volaille abattue (tableau 37)

Sauf pour l'enrofloxacin ($p = 0.144$) et la streptomycine ($p = 0.671$), on observe une différence significative des pourcentages de résistance aux différents antibiotiques testés en fonction de l'espèce de volaille abattue. Dans notre étude, le type « poulet standard » présente les pourcentages de résistance les plus faibles aux antibiotiques testés.

➤ Influence de la saison sur les pourcentages de résistance observés (tableau 38)

Pour 3 antibiotiques (l'ampicilline, l'enrofloxacin et le pourcentage de prélèvements présentant une multirésistance), on observe une différence significative entre les saisons. L'hiver et l'automne sont les saisons qui présentent les pourcentages de résistance les plus élevés par rapport aux saisons printemps et été.

3.4.2.2 Pour l'espèce *C. coli*

➤ Influence de l'abattoir sur les pourcentages de résistance observés (tableau 39)

Dans les prélèvements de fientes et de peaux de cou, seuls 16 prélèvements étaient positifs pour *C. coli*. Par conséquent, les différences sont plus difficiles à mettre en évidence. Une différence significative entre les pourcentages de résistance à l'ampicilline est observée entre les abattoirs, la résistance à l'ampicilline est nulle dans les abattoirs 1 et 4 et très élevée dans l'abattoir 3 (57%).

➤ Espèce de volaille abattue (tableau 40)

Tableau 42. Corrélations entre les CMI observées pour les antibiotiques et les désinfectants testés dans les prélèvements de fientes et de peaux de cou pour *C. jejuni* (n=61)

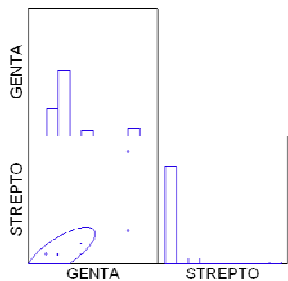
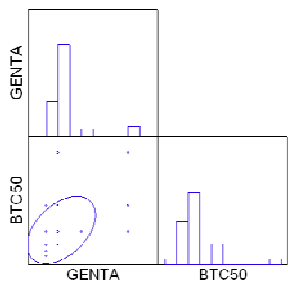
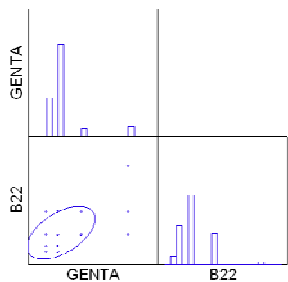
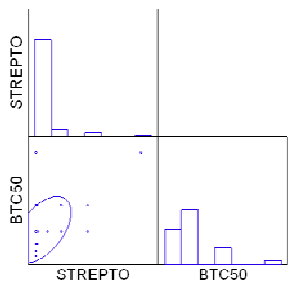
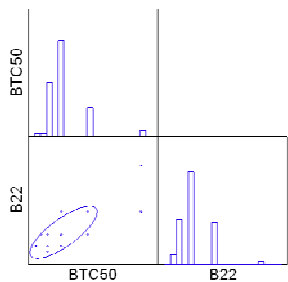
Corrélation	r	p	graphique
Scatter Plot Matrix			
gentamicine*streptomycine	0.51041	$<10^{-4}$	
Scatter Plot Matrix			
gentamicine*chlorure de benzalkonium	0.40872	0.0016	
Scatter Plot Matrix			
gentamicine*chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium	0.48741	10^{-4}	
Scatter Plot Matrix			
streptomycine*chlorure de benzalkonium	0.40240	0.0014	
Scatter Plot Matrix			
chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium* chlorure de benzalkonium	0.68197	10^{-4}	

Tableau 43. Corrélations entre les CMI observées pour les antibiotiques et les désinfectants testés dans les prélèvements de fientes et de peaux de cou pour *C. coli* (n=16)

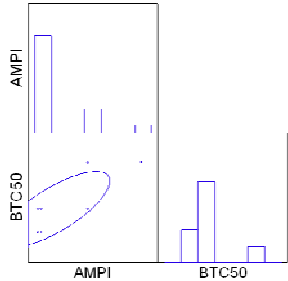
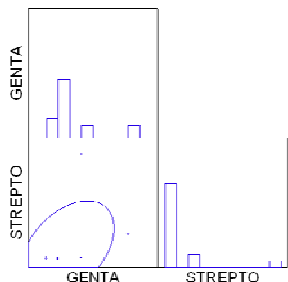
Corrélation		r	p	graphique
				Scatter Plot Matrix
ampicilline*chlorure de benzalkonium		0.63693	0.0080	
				Scatter Plot Matrix
gentamicine*streptomycine		0.78733	0.0003	

Tableau 44. Variations minimales des pourcentages de résistances détectables en fonction du nombre de prélèvement de fientes (puissance de l'étude fixée à 80%)

	<i>C. jejuni</i>				<i>C. coli</i>			
	p	n	Δ négatif	Δ positif	p	n	Δ négatif	Δ positif
ampicilline	0.333	21	-0.30	0.40	0.353	10	-	>0.50
tétracycline	0.524	21	-0.40	0.40	0.706	10	-0.35	-
érythromycine	0.095	21	-	0.40	0.059	10	-	>0.50
gentamicine	0.000	21	-	0.20	0.000	10	-	0.35
enrofloxacin	0.381	21	-0.35	0.40	0.559	10	-0.50	0.50
streptomycine	0.000	21	-	0.20	0.147	10	-	>0.50
multirésistance	0.429	21	-0.35	0.40	0.471	10	<-0.50	0.40

p: résistance observée

n : nombre de prélèvements

Δ : variation

On observe une différence des pourcentages de résistance à l'ampicilline ($p=0.032$) et à la streptomycine ($p=0.032$) des *C. coli* en fonction de l'espèce de volaille abattue. Le pourcentage de résistance à l'ampicilline est plus élevé dans le type « autre » ($R=57\%$) et le pourcentage de résistance à la streptomycine est plus élevée dans le type « dinde » ($R=50\%$)

➤ Influence de la saison sur les pourcentages de résistance observés (tableau 41)

On observe une différence des pourcentages de résistance pour la streptomycine en fonction de la saison.

3.5 Corrélations entre les différentes molécules testées.

3.5.1 Pour l'espèce *C. jejuni*

Une corrélation est observée (tableau 42) :

- Entre les deux molécules d'antibiotiques de la famille des aminoglycosides : gentamicine et streptomycine
- Entre les deux molécules d'ammoniums quaternaires
- Entre la gentamicine et les deux molécules d'ammoniums quaternaires
- Entre la streptomycine et le chlorure de benzalkonium

3.5.2 Pour l'espèce *C. coli*

Etant donné le faible nombre de prélèvements positifs pour *C. coli*, il est difficile de mettre en évidence des corrélations.

Une corrélation est observée entre (tableau 43) :

- L'ampicilline et le chlorure de benzalkonium
- La gentamicine et le chlorure de benzalkonium

3.6 Variations de résistance qu'il est possible de mettre en évidence avec le plan de prélèvement

En fixant la puissance des tests de comparaison utilisés à 80%, nous pouvons calculer la plus petite variation de résistance qu'il est possible de mettre en évidence en tenant compte du nombre d'isolats ou de prélèvements dont nous disposons dans notre étude. Ce calcul utilise les valeurs de résistance observée dans les prélèvements de fientes puisque l'objectif de l'étude est de déterminer l'influence de l'abattage sur la sensibilité aux antibiotiques des souches de *C. jejuni* et *C. coli*. Les variations minimales détectables sont présentées dans le tableau 44 pour *C. jejuni* et pour *C. coli*.

Pour *C. jejuni*, les variations minimales que nous pouvons mettre en évidence vont de 20 à 40 % en fonction des antibiotiques.

Pour *C. coli*, les écarts sont plus importants car les nombres de prélèvements positifs pour cette espèce sont faibles et pour certains antibiotiques, la variation minimale observable est supérieure à 50%.

Figure 32. Analyse de la résistance dans les prélèvements contenant des isolats de l'espèce *C. jejuni*

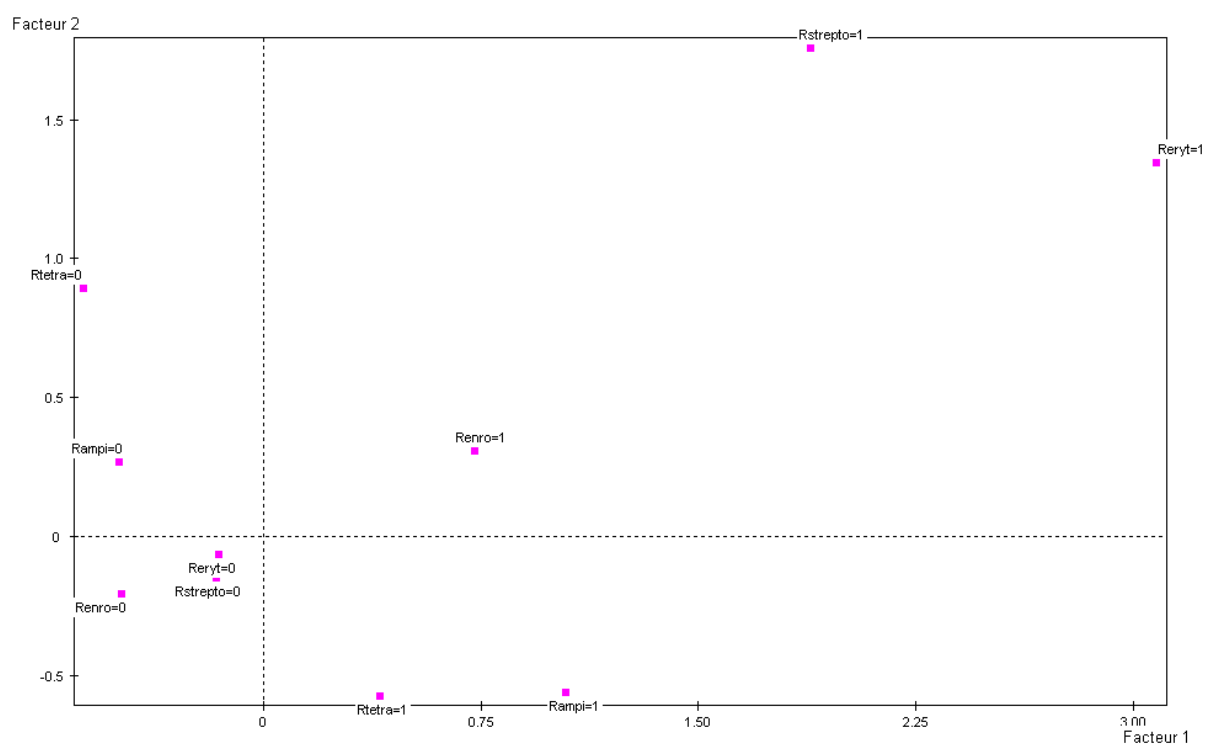


Figure 33. Analyse des variables « abattoir », « saison » et nature du prélèvement

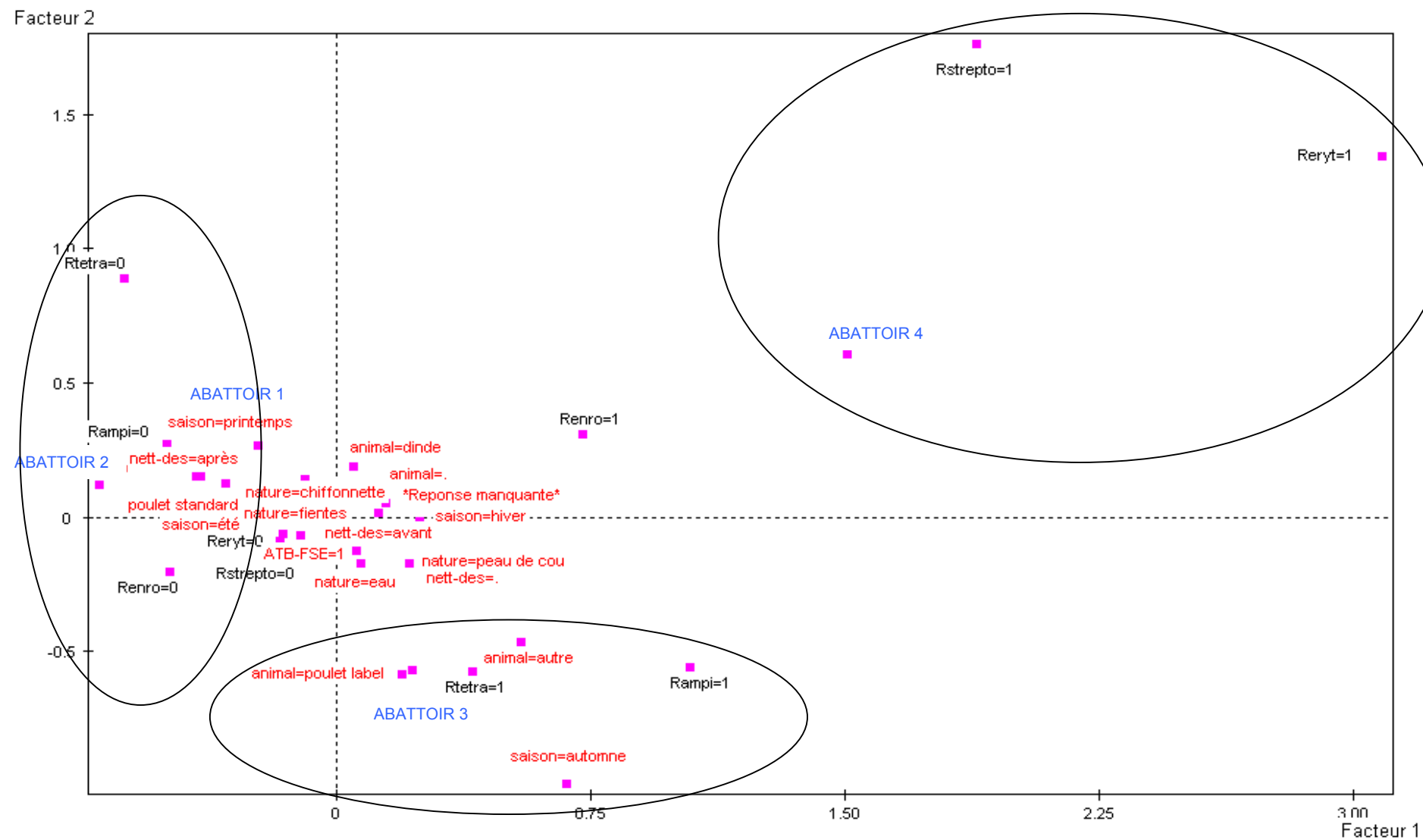
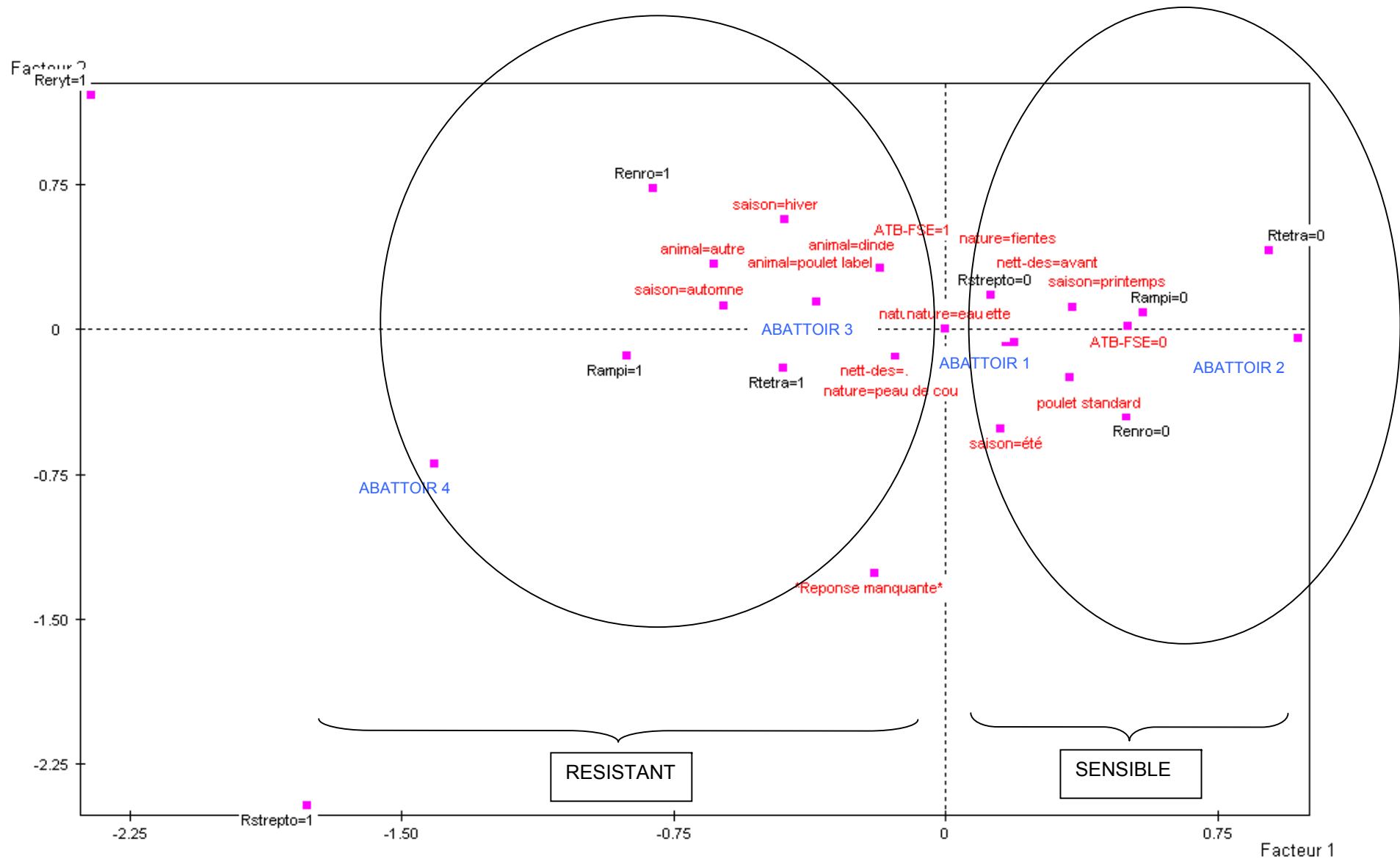


Figure 34. Analyse des prélèvements fientes et peaux de cou en fonction des variables « abattoirs » et « saisons »



3.7 Analyse multidimensionnelle descriptive : analyse des correspondances multiples

L'analyse des correspondances multiples a été limitée aux prélèvements contenant des isolats de *C. jejuni*. Pour chaque prélèvement il est noté, à partir des isolats collectés dans ce prélèvement, les résistances observées pour chaque antibiotique et la valeur de la CMI la plus élevée pour chacune des deux molécules désinfectantes testées.

3.7.1 Analyse des prélèvements positifs pour *C. jejuni*

Sur la figure 32, on observe que les prélèvements contenant une résistance à l'érythromycine et à la streptomycine s'opposent au reste des prélèvements. Pour *C. jejuni*, ces résistances sont très rares.

3.7.2 Analyse des variables abattoir, saison et nature du prélèvement

Sur la figure 33, on peut observer 3 groupes. Le premier groupe comprend l'abattoir 4 et les prélèvements qui contiennent une résistance à l'érythromycine et à la streptomycine. Le deuxième groupe comprend les prélèvements réalisés dans l'abattoir 3, pendant la saison automne, sur les poulets fermiers et présentant une résistance à l'ampicilline et à la tétracycline. Le troisième groupe comprend les prélèvements réalisés dans les abattoirs 1 et 2, réalisés pendant les saisons printemps et été et sur les volaille de type standard. La description des prélèvements indique un effet abattoir, avec l'abattoir 4 plutôt du côté des résistances rares aux antibiotiques. Les deux types de prélèvements (fientes et peau de cou) sont situés au centre de la figure avec les prélèvements de fientes plutôt du côté des « sensibles » et les prélèvements de peaux de cou plutôt du côté des « résistants ».

3.7.3 Analyse des prélèvements animaux « fientes et peaux de cou »

Sur la figure 34, on peut distinguer deux groupes :

- L'un « sensible », contenant les prélèvements des abattoirs 1 et 2, réalisés au printemps et en été, sur des volailles de type standard.
- L'autre « résistant » contenant les prélèvements des abattoirs 3 et 4, réalisés en automne et en hiver sur des volailles de type « fermier », « dinde » ou « autre ».

L'abattoir 4 se distingue nettement et dans une moindre mesure la saison automne.

3.7.4 Conclusion de l'analyse en composantes multiples

En conclusion, un effet abattoir très net est identifié avec l'analyse des correspondances multiples, avec l'abattoir 4 du côté des prélèvements résistants. Dans une moindre mesure un effet saison est également observé. Quelle que soit la méthode d'étude (comparaison des pourcentages ou description par l'analyse des correspondances multiples), nous ne pouvons pas mettre en évidence de différence de niveau de résistance entre les prélèvements de fientes et les prélèvements de peaux de cou.

4 Discussion

L'objectif de notre étude était de mettre en évidence des différences entre les pourcentages de résistance observés pour *C. jejuni* et *C. coli* avant et après les procédés d'abattage des volailles.

4.1 Représentativité des prélèvements

Pour des raisons pratiques, les abattoirs visités étaient situés à proximité du laboratoire. Ils n'ont pas été tirés au sort et ne sont donc pas représentatifs des abattoirs de volailles français. Cependant, la production et l'abattage des volailles en France sont très standardisés, et pour les poulets, les abattoirs visités font partie de la catégorie d'abattoirs qui abattent 88% des volumes contrôlés. Par conséquent, la diversité des abattoirs, des saisons des prélèvements et des espèces de volailles prélevées permettent de comparer les niveaux de résistance avant et après abattage. Le nombre de lots prélevés (43) permet de détecter une variation de l'ordre de 20 à 40% pour *C. jejuni* avec une puissance de 80%.

4.2 Comparaison de nos résultats avec le plan de surveillance des campylobacters d'origine aviaire en France

4.2.1 Niveau de contamination des prélèvements

Dans notre étude, les prélèvements de fientes sont contaminés à 81.4% (35/43) et les peaux de cou à 69.9% (102/146). Ces résultats sont cohérents avec les résultats du plan de surveillance des campylobacters en filière volaille de chair en France. En 2004, 85% des prélèvements de caeca et 66% des prélèvements de peaux de cou après enrichissement en abattoir de volailles étaient positifs pour campylobacter (Hellard and Kempf 2005).

4.2.2 Proportion des espèces *C. jejuni* et *C. coli* dans les prélèvements

Dans notre étude, 75.8% (72/95) des souches de campylobacters isolées à partir des fientes appartiennent à l'espèce *C. jejuni* et 24.2% (23/95) à l'espèce *C. coli*. Dans les peaux de cou, les souches de *C. jejuni* représentent 94.8% des souches collectées (293/309). Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux du plan de surveillance des campylobacters d'origine aviaire en France. En 2004, l'espèce *C. jejuni* représentait 30% des souches collectées par isolement direct à partir des caeca et 59.5 % des souches collectées après enrichissement à partir des peaux de cou (Hellard and Kempf 2005).

Au cours de notre étude, tous les échantillons de fientes et de peaux de cou ont été soumis à une phase d'enrichissement en bouillon de Preston. Il a été démontré que certaines souches de *C. coli* pouvaient être inhibées par les antibiotiques présents dans le bouillon de Preston (Corry, Post et al. 1995), ce qui pourrait expliquer en partie la différence observée pour les échantillons de fientes. Pour les prélèvements de peaux de cou, pour lesquels la même technique d'enrichissement (bouillon d'enrichissement de Preston) est utilisée, on observe également proportionnellement très peu de campylobacters de l'espèce *C. coli*. Les espèces de volailles prélevées dans notre étude sont majoritairement des poulets de type standard et des poulets fermiers. Dans le plan de surveillance en

2004, les trois types de volaille prélevés sont standard, export et label. A la différence du plan de surveillance national, notre étude ne comprend pas de poulet label. Toutefois, il ne semble pas que cette différence de recrutement permette d'expliquer la très forte proportion de *C. jejuni* dans nos prélèvements par rapport au plan de surveillance en France en 2004.

4.2.3 Pourcentages de résistance aux antibiotiques observés

Pour *C. coli*, les pourcentages de résistance observés dans les fientes et les peaux de cou sont comparables aux résultats du plan de surveillance de 2004 en France. Pour *C. jejuni*, les pourcentages de résistances observés sont comparables aux résultats du plan de surveillance de 2004 sauf pour les fluoroquinolones. Dans notre étude, la molécule testée est l'enrofloxacin et nous observons un pourcentage de résistance de 32.1 à 38.1% en fonction de la méthode de mesure, et dans le plan de surveillance en France, la molécule étudiée est la ciprofloxacine et seuls 9% des *C. jejuni* présentent une résistance.

4.3 Comparaison des pourcentages de résistance aux antibiotiques observés

4.3.1 Mesure de la résistance aux antibiotiques

La mesure de la résistance sur l'ensemble des isolats collectés ne tient pas compte du fait que certains isolats sont probablement des doublons. Par conséquent, la mesure de la résistance sur l'ensemble des isolats entraîne une pondération de la résistance observée par les prélèvements dans lesquels un grand nombre d'isolats ont été collectés. Une méthode utilisable pour limiter ce biais est de prendre en compte le nombre d'isolats collectés par prélèvement (Davison, Low et al. 2000) ce qui correspond aux résultats de pourcentage de résistance estimé dans notre étude.

Actuellement, les recommandations des plans de surveillance en Europe indiquent qu'il est souhaitable de pouvoir mesurer la prévalence de la résistance au sein des populations animales hôtes des bactéries résistantes. La mesure de cette prévalence nécessite que seul 1 isolat de chaque espèce de campylobacter soit analysé par lot prélevé (Anonymous 2007). Cette méthode de mesure est un compromis entre ce que l'on recherche (les campylobacters résistants aux antibiotiques) et l'applicabilité des plans de prélèvements dans les états membres. Dans notre étude, nos méthodes d'isolement nous permettaient de détecter jusqu'à 4 isolats par prélèvement. Afin de pouvoir exploiter l'ensemble des informations dont nous disposons sur les isolats collectés dans nos prélèvements, nous avons choisi de noter pour chaque prélèvement les résistances aux antibiotiques observés sur les isolats. Cette méthode augmente la probabilité de détecter la résistance aux antibiotiques, le problème est de déterminer combien de souches sont à analyser pour avoir une vision la plus complète possible de la résistance aux antibiotiques dans les prélèvements. Le nombre de souches à isoler pour détecter la résistance dépend du niveau de résistance attendu. Avec 365 isolats collectés, nous pouvions détecter une souche résistante avec une probabilité $p=0.95$ pour un niveau de résistance de 1% (Toma, Dufour et al. 2001).

4.3.2 Comparaison des pourcentages de résistance aux antibiotiques observés avant et après abattage des volailles

Contrairement à l'hypothèse initiale de notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de différence de pourcentage de résistance entre les prélèvements avant et après abattage des volailles (fientes et peaux de cou). Les procédés d'abattage et donc les stress environnementaux subit par campylobacter pendant l'abattage des volailles ne semble pas favoriser la sélection des campylobacters résistants aux antibiotiques.

4.3.3 Influence des paramètres zootechniques sur les pourcentages de résistance observés

Nos prélèvements ont permis la mise en évidence de différences significatives entre les pourcentages de résistances observés pour les deux espèces *C. jejuni* et *C. coli* en fonction des abattoirs, de la saison pendant laquelle les prélèvements ont été réalisés et de l'espèce de volaille abattue. Ces différences sont observées pour certains ou pour tous les antibiotiques. Il a déjà été observé que le type de production (standard, export, label) avait une influence sur le niveau de résistance à la tétracycline de l'espèce *C. coli*. Dans cette étude, les *C. coli* isolés de prélèvements de volaille de type « standard » et « export » présentaient un niveau de résistance à la tétracycline plus élevé que ceux isolés dans les prélèvements de volaille de type « label et bio » (90 vs 51% respectivement) (Avrain, Humbert et al. 2003). L'analyse descriptive des prélèvements par les correspondances multiples a permis, pour l'espèce *C. jejuni* d'observer des groupes qui s'opposaient en fonction des abattoirs, des saisons et de l'espèce de volaille abattue. Notre plan de prélèvements est déséquilibré pour ces trois variables. En effet, il ressort de cette description que les prélèvements réalisés dans l'abattoir 4 et pendant l'automne seraient « plus résistants », mais il n'y a que peu de prélèvements réalisés dans l'abattoir 4 et pendant l'automne, ce qui rend ces événements rares et peut entraîner un biais dans la description des données des prélèvements. De plus, il existe un lien entre les abattoirs, les espèces de volailles abattues et les pratiques d'élevage, en raison de l'organisation et du fonctionnement de la filière avicole en France.

Notre étude visait à déterminer si les opérations d'abattage pouvaient entraîner une sélection des souches résistantes aux antibiotiques. Les prélèvements réalisés permettent de répondre à cette question car, pour *C. jejuni*, des variations de pourcentages de 20 à 40% sont détectables. Pour *C. coli*, les différences que nous pouvions mettre en évidence sont souvent supérieures à 50%, ce qui est lié à la faible contamination des prélèvements réalisés par cette espèce. La question est de savoir quelle est la variation de résistance qu'il est intéressant de pouvoir détecter dans un but de santé publique. La réponse à cette question est laissée au gestionnaire du risque, mais il ressort de notre étude que les opérations d'abattage et les procédures de nettoyage et désinfection en abattoir de volaille ne semblent pas entraîner une augmentation de la résistance aux antibiotiques.

CONCLUSION

L'objectif de la thèse était d'analyser l'évolution de la résistance aux antibiotiques des campylobacters au cours des opérations de nettoyage et de désinfection et au cours de l'abattage dans les abattoirs de volailles.

La première partie de l'étude a permis de démontrer que *C. jejuni* et *C. coli* sont capables de survivre aux opérations de nettoyage et de désinfection dans les abattoirs de volailles. Dans les caisses de transport, nous avons observé que les procédures de nettoyage et de désinfection n'ont pas d'effet sur le pourcentage de caisses contaminées par campylobacter. Cette observation est en accord avec les résultats de nombreuses études portant sur l'efficacité du nettoyage et de la désinfection dans les caisses de transport des volailles de l'élevage à l'abattoir (Berndtson, Danielsson-Tham et al. 1996; Slader, Domingue et al. 2002; Berrang and Northcutt 2005; Hansson, Ederoth et al. 2005). Les campylobacters sont des bactéries très sensibles au stress et plusieurs études réalisées auparavant n'avaient pas permis de les détecter sur les surfaces des abattoirs après nettoyage et désinfection (Borck, Stryhn et al. 2002; Miwa, Takegahara et al. 2003; Cools, Uyttendaele et al. 2005; Malakauskas, Jorgensen et al. 2006). Au cours des prélèvements réalisés dans notre étude, nous avons isolé campylobacter sur les surfaces des abattoirs après les opérations de nettoyage et de désinfection au cours de 5 visites dans 3 des 4 abattoirs visités. La survie de campylobacter dans les abattoirs de volailles après nettoyage et désinfection a également été rapportée dans une étude récente (Johnsen, Kruse et al. 2007).

Il a été émis l'hypothèse que les désinfectants (Russell 1999; Russell, Suller et al. 1999; Sidhu, Heir et al. 2002; Aiello and Larson 2003) et les stress subis par les bactéries au cours des procédés d'abattage (DANMAP 1999; McMahon, Xu et al. 2007) pouvaient favoriser la sélection de gènes de résistance aux antibiotiques. Nous avons donc étudié d'une part si les procédures de nettoyage et de désinfection, et d'autre part, si les procédés d'abattage (des caisses de transport aux carcasses avant l'entrée en salle de ressuage) avaient une influence sur les niveaux de résistance aux antibiotiques des campylobacters. L'analyse a été réalisée avec des tests statistiques de comparaison (test du χ^2 ou test exact de Fisher) entre les pourcentages de résistance observés et des tests de corrélation (test des rangs de Spearman) entre les distributions des CMI des molécules antibiotiques et désinfectantes testées.

L'étude de l'impact des procédures de nettoyage et de désinfection sur les niveaux de résistance aux antibiotiques de campylobacter a été réalisée dans les caisses de transport des volailles et sur les surfaces de l'abattoir en contact avec les carcasses avant et après nettoyage et désinfection. Dans les caisses de transport, aucune différence, pour *C. jejuni* ou pour *C. coli*, n'a été mise en évidence. Dans l'environnement de l'abattoir, seulement 26 isolats de campylobacter ont pu être isolés après nettoyage et désinfection. Les tests de comparaison n'ont pas mis en évidence de différence entre les niveaux de résistance observés avant et après nettoyage et désinfection, sauf pour *C. jejuni* et

l'ampicilline. Pour cette molécule, une diminution statistiquement significative du niveau de résistance était observée après nettoyage et désinfection. Les différences pour les autres molécules d'antibiotiques testées n'étaient pas significatives, mais les histogrammes de distribution des CMI semblent également aller dans le sens d'une diminution de la résistance aux antibiotiques. Aucune corrélation entre les distributions de CMI des molécules antibiotiques et désinfectantes testées n'a été mise en évidence. Malgré tout, l'observation d'une corrélation entre les molécules d'ammoniums quaternaires d'une part, et les molécules d'antibiotiques de la famille des aminoglycosides, a permis de confirmer les CMI que nous avons mesurées.

L'analyse de l'influence des procédés d'abattage sur les niveaux de résistance aux antibiotiques de campylobacter a été réalisée sur 43 lots de volailles. Les tests de comparaison entre les pourcentages de résistance aux antibiotiques des campylobacters isolés dans les fientes (avant abattage) et dans les peaux de cou (après abattage) n'ont pas permis de mettre en évidence de différence statistiquement significative.

Contrairement à notre hypothèse de départ, les résultats de notre étude indiquent que les procédures de nettoyage et de désinfection, ainsi que les procédés d'abattage (avant l'entrée des carcasses en ressuage) dans les abattoirs de volailles ne semblent pas avoir d'influence sur les niveaux de résistance de *C. jejuni* et *C. coli*.

L'influence sur le niveau de résistance aux antibiotiques d'autres stress rencontrés par les campylobacters entre le ressuage et l'assiette du consommateur devrait maintenant être investiguée. Une étude récente (McMahon, Xu et al. 2007) a exploré l'hypothèse que les stress sublétaux engendrés par les procédés de conservation (haute et basse températures, stress osmotique et acide) pouvait conduire à des modifications dans la nature et le niveau de la résistance aux antibiotiques. L'étude portait sur 3 pathogènes alimentaires (*E. coli*, *S. enteritica* serovar Typhimurium et *S. aureus*). Les résultats de cette étude montrent que certains stress (une température d'incubation de 45°C, une incubation en présence d'un fort degré de salinité (>4.5%) ou en milieu acide (pH<5)) entraînent une augmentation du niveau de résistance aux antibiotiques (c'est à dire une augmentation de la CMI mesurée). De plus, l'augmentation de la résistance perdure malgré le retrait du stress, ce qui suggère que dans certains cas, les stress sublétaux appliqués aient entraîné une augmentation stable de la résistance aux antibiotiques. Par conséquent, il pourrait être pertinent d'étudier l'impact des différents procédés de ressuage (liés à des stress thermiques et osmotiques) et de conservation (liés à des stress thermiques et chimiques) des produits de volailles sur les niveaux de résistance aux antibiotiques de campylobacter.

Enfin, dans notre étude, nous avons associé un critère d'inhibition (mesure de la CMI) à la capacité de survie des souches de campylobacters. L'étude de la résistance aux désinfectants ne peut se limiter à des études *in vitro* en raison de l'importance des interactions à la fois des bactéries et des désinfectants avec le milieu dans lequel ils se trouvent. L'isolement des campylobacters dans l'environnement des abattoirs de volailles après nettoyage et désinfection est-il lié à une mauvaise

utilisation du désinfectant ou ces souches possèdent-elles intrinsèquement des capacités génétiques pour survivre sur les surfaces ?. L'étude de cette deuxième hypothèse pourrait s'envisager sous l'angle de la survie. La mise au point d'une technique d'évaluation de la sensibilité aux désinfectants, permettant de s'affranchir du milieu de croissance qui interagit avec la plupart des molécules désinfectantes devrait être explorée. Il a déjà été mis en évidence que, en dépit de conditions fastidieuses pour se multiplier, *C. jejuni* est capable de survivre dans des conditions qui ne lui permettent pas de croître. Dans un environnement aqueux, la survie est limitée à quelques jours à température ambiante, mais elle est notablement augmentée à 4°C (Thomas, Hill et al. 1999). L'étude de la cinétique de bactéricidie en milieu aqueux et en présence de concentrations croissantes de désinfectant pourrait être réalisée afin d'explorer des différences de survie des souches en fonction des conditions du milieu.