

## Description générale des campylobacters

### 1.1 Taxonomie, phylogénie

Les campylobacters appartiennent à la superfamille VI des protéobactéries (anciennement groupe des bactéries à coloration de Gram négative). Cette superfamille comprend 4 genres : *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* et *Wolinella*. Les campylobacters et les arcobacters appartiennent à la famille des *Campylobacteriaceae* dont le genre *Campylobacter* est le genre type. Aujourd'hui, 16 espèces sont décrites, 6 sous-espèces et de nombreux biovars. La plupart d'entre elles présente une importance clinique et/ou économique. Au sein du genre *Campylobacter*, il est possible de classer les espèces en 3 groupes : le groupe thermotolérant, le groupe « fetus » et le groupe anaérobie. *C. jejuni* et *C. coli* appartiennent au groupe thermotolérant (On 2005). *C. jejuni* comprend 2 sous-espèces qui diffèrent substantiellement dans leur répartition et dans une moindre mesure dans leur écologie. *C. jejuni* subsp. *jejuni* est souvent noté *C. jejuni*. Il correspond au taxon qui avait été isolé par Jones et al. en 1931 (Jones, Orcutt et al. 1931). L'arbre phylogénique des campylobacters est présenté sur la figure 1.

### 1.2 Morphologie des campylobacters

Les *Campylobacteriaceae* sont des bactéries incurvées, spiralées ou en forme de S. Leur taille varie de 0,2 à 0,9 µm d'épaisseur et de 0,5 à 5 µm de long. Ces bactéries sont mobiles, munies d'un flagelle polaire unique à l'une ou à leurs deux extrémités (Federighi 1999; Megraud 2000; Snelling, Matsuda et al. 2005). L'observation au microscope montre un déplacement caractéristique souvent décrit comme un « vol de moucheron » ou « en tire-bouchon ».

Les cellules bactériennes au sein d'une colonie présentent une hétérogénéité d'âges et d'états physiologiques. Il est admis qu'à la périphérie de la colonie, les cellules sont très actives, en croissance alors qu'au centre et à la surface de la colonie, les nutriments sont moins disponibles et les cellules tendent à vieillir et à être moins actives. Dans une colonie de *C. jejuni* (cultivée sur un milieu gélosé), différentes formes prédominent dans les différentes zones de la colonie. Les formes spiralées sont majoritaires à la périphérie et les cellules coccoïdes sont plutôt au centre de la colonie. Cette observation suggère que les formes spiralées sont des bactéries en activité, alors que les formes coccoïdes sont des formes de vieillissement. Les différentes formes de *C. jejuni* sont visibles sur la photographie de la figure 2 (Ng, Sherburne et al. 1985).

### 1.3 Génome des campylobacters

Le génome de la souche *C. jejuni* NCTC 11168, a été publié en février 2000 (Parkhill, Wren et al. 2000). La bactérie possède un chromosome circulaire de 1,64 Mb. Le pourcentage G+C est parmi les plus bas chez les bactéries (30-38%). Le génome des campylobacters est de très petite taille (par exemple, le génome d'*Escherichia coli* est d'environ 5 Mb). Cette petite taille est sans doute à relier à

la nature délicate et aux exigences nutritionnelles de ce microorganisme. Ce handicap est compensé par les très grandes capacités de réarrangements génomiques (Federighi 1999). De plus, l'analyse du génome de campylobacter a révélé que ce micro-organisme est démuné de la plupart des mécanismes de réparation de l'ADN présent chez les autres genres bactériens (Parkhill, Wren et al. 2000). Ces observations pourraient expliquer les taux de mutation élevés observés chez cette bactérie.

## 2 Détection et isolement des campylobacters

Une des raisons qui explique la longue durée écoulée entre la première observation de campylobacter et sa culture au laboratoire est certainement liée aux nombreuses exigences que ces microorganismes arborent. Le développement d'un milieu sélectif de culture pour l'isolement des campylobacters dans les selles humaines par Martin Skirrow en 1977 (Skirrow 1977) a permis de confirmer le rôle de cette bactérie dans la maladie chez l'homme. Avant la mise au point de ce milieu sélectif, la détection des campylobacters se faisait par filtration sur membrane des selles de patients malades sur un milieu non sélectif, ce qui représentait un travail lourd et laborieux. Bien que le milieu de Skirrow soit efficace pour isoler les campylobacters des prélèvements fécaux humains, il était beaucoup plus difficile à appliquer aux prélèvements animaux et environnementaux, en raison des autres espèces bactériennes présentes dans ces prélèvements. Ceci a conduit à la mise au point en 1982 par Bolton du milieu sélectif de Preston, qui permettait l'isolement de campylobacter à partir de prélèvements d'aliments ou d'environnement (Bolton and Robertson 1982). Dans les années qui ont suivi ces publications, des milieux plus sensibles et plus sélectifs ont permis d'améliorer la détection des campylobacters (Moore, Corcoran et al. 2005).

### 2.1 Conditions générales de culture de campylobacter

#### 2.1.1 Atmosphère

- Microaérophilie : les campylobacters se cultivent en présence d'une atmosphère appauvrie en oxygène, comprise entre 3 et 15% (Federighi 1999; Megraud 2000; On 2005).
- Capnophilie : les campylobacters exigent une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> (10%) pour cultiver (Federighi 1999; Megraud 2000; On 2005).

Actuellement, ces conditions atmosphériques sont facilement obtenues soit dans des jarres avec des sachets générateurs en présence d'un catalyseur, soit dans une étuve par l'utilisation directe du mélange gazeux stocké dans des bouteilles, permettant de réguler les quantités de CO<sub>2</sub> (Federighi 1999).

#### 2.1.2 Température

Une température d'incubation de 37°C permet le développement de toutes les espèces de campylobacter connues. Mais la capacité de croissance à d'autres températures constitue un caractère différentiel d'espèces important, notamment à 25° et 42°C.

On observe des espèces se développant à 25°C et non à 42°C parmi lesquelles *Campylobacter fetus* et des espèces se développant à 42°C et non à 25°C, appelés campylobacters thermotolérants, dont les espèces d'intérêt en hygiène des aliments (Dromigny 2007).

**Tableau 1. Composition des principaux milieux solides et liquides pour les campylobacters thermotolérants d'après Corry, Post et al. (1995)**

	Base	Système antioxydant	Céfopérazone (mg/l)	Triméthoprime (mg/l)	Polymyxine B ou Colistine (C) (UI)	Vancomycine (mg/l)	Rifampicine (UI)	Antifongique (mg/l)
<b>Preston</b> (Bolton and Robertson 1982)	Bouillon nutritif	5% sang de cheval lysé	-	-	5000	-	10	Cycloheximide 50
<b>Skirrow</b> (Skirrow 1977)	Gélose au sang	7% sang de cheval lysé	-	5	2500	10	-	-
<b>Karmali</b> (Karmali, Simor et al. 1986)	Gélose Colombia	4 g de charbon, 0.32 g d'hématine ; 0.1 g de pyruvate de sodium	32	-	-	-	-	-
<b>Butzler (Virion)</b> (Goossens, De Boeck et al. 1983)	Bouillon nutritif	5-7% de sang de mouton	15	-	10 000 (C)	-	10	Amphotéricine B

On peut donc en conclure qu'une incubation à 37°C sur des milieux non sélectifs permettra la culture de toutes les espèces de campylobacter tandis que 42°C constituera la température optimale de recherche de *C. jejuni* et *C. coli*. Il semble que la température d'incubation de 42°C pour les campylobacters thermotolérants soit un avantage pour le faible compétiteur microbiologique qu'est campylobacter, car dans les prélèvements polymicrobiens (prélèvements fécaux et alimentaires par exemple), les germes de la flore compétitive ont souvent une croissance moins importante à 42°C. Cette température d'incubation va ainsi renforcer la sélectivité du milieu (Federighi 1999).

## 2.2 Méthodes de détection

### 2.2.1 Choix de la méthode en fonction de l'origine des prélèvements

L'origine des prélèvements influe sur :

- Le niveau de contamination par campylobacter : par exemple, les prélèvements de fientes de volailles contiennent environ  $10^6$  à  $10^8$  UFC/g, les prélèvements d'aliments ou d'eau en contiennent beaucoup moins (en relation avec leur niveau de contamination).
- L' « état » des campylobacter : dans les prélèvements environnementaux, les campylobacters sont souvent dit « stressés ». Ils ont été prélevés dans un milieu peu propice à leur croissance, souvent dépourvu en nutriments. Dans ce cas, les campylobacters vont nécessiter une phase de « récupération » de quelques heures dans un milieu non sélectif (Humphrey 1989).

Si la culture des campylobacters est réalisée directement à partir du prélèvement, on parlera d'isolement direct. Si elle est réalisée après une phase d'enrichissement, on parlera d'isolement indirect.

### 2.2.2 Enrichissement

Cette phase d'enrichissement permet d'augmenter le nombre de campylobacters dans le milieu. Elle favorise la détection des campylobacters dans les prélèvements où ces bactéries sont en faible nombre, ou stressées et/ou en présence d'une flore compétitive abondante. L'enrichissement est donc recommandé pour les prélèvements d'environnements (Newell, Shreeve et al. 2001).

L'enrichissement consiste à incuber les prélèvements dans des bouillons sélectifs (contenant des antibiotiques) pendant 24 à 48h à 37°C (Bolton and Robertson 1982). Ces bouillons sélectifs dérivent pour la plupart des milieux solides les plus connus (par exemple : Bouillon d'enrichissement de Preston).

### 2.2.3 Technique de culture sélective des campylobacters

Deux possibilités existent pour cultiver sélectivement les campylobacters : les milieux sélectifs et la filtration.

#### 2.2.3.1 La filtration

Dans les milieux polymicrobiens, il existe une alternative à l'utilisation des milieux sélectifs pour éliminer la flore compétitive de campylobacter : la technique de filtration. La suspension est déposée sur un filtre (pores de 0,65 µm de diamètre) posé sur une gélose au sang ou au chocolat. Le filtre est

**Tableau 2. Caractéristiques phénotypiques des espèces du genre *Campylobacter* (Megraud 2000)**

	Développement			Catalase	Inodoxyl acétate esterase	Uréase	Hippuricase	Acide nalidixique	Céfalotine	Nitrate réductase	H <sub>2</sub> S en milieu TSI
	Air	25°	42°								
Groupe thermotolérant											
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	-	+	+	+	-	+	S (quelques souches R)	R	+	-
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	-	-	-	+/-	variable	-	+	S	S	-	-
<i>C. coli</i>	-	-	+	+	+	-	-	S (quelques souches R)	R	+	+
<i>C. lari</i>	-	-	+	+	-	-	-	R	R	+	-
<i>C. lari</i> biovar UPTC	-	-	+	+/-	+	+	-	S	S	+	-
<i>C. upsaliensis</i>	-	-	+	+/-	+	-	-	S	S	+	-
Groupe « fetus »											
<i>C. fetus</i>	-	+	variable	+	-	-	-	R	S	+	-
<i>C. hyointestinalis</i>	-	variable	variable	+	-	-	-	R	S	+	+

S: sensible; R: résistant, UPTC: urease positive thermophilic campylobacter

retiré après un temps variable (30 minutes à 2 heures) et la gélose est incubée à 37°C. Seuls les campylobacters sont capables de traverser le filtre et se développent sur la gélose. Cette technique, longue et fastidieuse, permet d'isoler les espèces fragiles de campylobacter et nécessite que les prélèvements soient très riches en campylobacter (Federighi 1999).

### 2.2.3.2 Les milieux sélectifs

Les milieux sélectifs sont des géloses ou des bouillons au sang additionnées de plusieurs antibiotiques qui vont inhiber la flore saprophyte des prélèvements. Les campylobacters sont sensibles au stress oxydatif, donc la plupart de ces milieux contient des ingrédients qui protègent les campylobacters des effets toxiques des oxydants. Les plus utilisés sont le sang défibriné ou lysé, le charbon de bois, des combinaisons de sulfate de fer, de métrasulfite de sodium et de pyruvate de sodium (FPB) et l'hématine (Corry, Post et al. 1995).

Les 3 milieux les plus connus sont (Corry, Post et al. 1995):

- le milieu de Skirrow (Skirrow 1977)
- le milieu de Karmali (Karmali, Simor et al. 1986)
- le milieu de Butzler (Virion) (Goossens, De Boeck et al. 1983)

La composition du milieu d'enrichissement de Preston et de ces 3 milieux sélectifs est indiquée dans le tableau 1.

Les géloses sont ensuite incubées pendant 48 h à 37°C ou 42°C en fonction des espèces de campylobacter recherchées.

Après isolement, il est possible de cultiver les isolats de campylobacter sur des géloses non sélectives comme la gélose de Mueller-Hinton complétée de 5% de sang de mouton défibriné.

## 2.3 Identification des campylobacters

### 2.3.1 Aspect des cultures

En bouillon ou en bouillon semi-gélosé, la culture se manifeste par un trouble léger. En boîte de Petri, les colonies apparaissent généralement au bout de 48 h à 72 h, elles sont petites (1 à 2 mm de diamètre), arrondies, grisâtres ou translucides (Dromigny 2007).

### 2.3.2 Identification au microscope

L'examen microscopique peut avoir un intérêt à l'état frais, on observe un aspect en vol de moucheron. Un frottis coloré peut permettre à un observateur exercé de noter la présence de bactéries incurvées de petite taille (Megraud 2000).

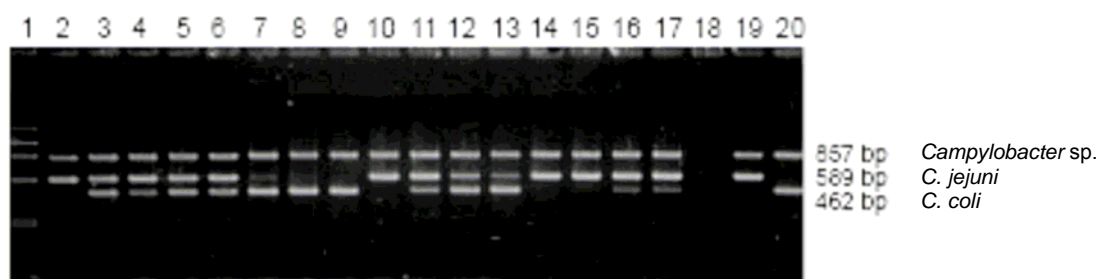
### 2.3.3 L'identification phénotypique

La détermination de l'espèce nécessite des tests complémentaires qui sont indiqués sur le tableau 2. Cependant, la sensibilité à l'acide nalidixique a perdu beaucoup de son intérêt du fait des résistances acquises, maintenant très fréquentes chez *C. jejuni* et encore plus chez *C. coli* (Megraud 2000).

**Tableau 3. Gènes, séquences et taille des produits d'amplification pour l'identification du genre *Campylobacter* sp. et des espèces *C. jejuni* et *C. coli* (Denis, Soumet et al. 1999)**

Gene	Primer sequence	Primer origin and modification	Amplification
<i>16S rRNA</i>	MD16S1 upper primer 5' ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC 3'	CCCJ609F from Linton <i>et al.</i> 1997 modified in this work	857 bp for <i>Campylobacter</i> genus
	MD16S2 lower primer 5' GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT T 3'	CCCJ1442R from Linton <i>et al.</i> 1997 modified in this work	
<i>mapA</i>	MDmapA1 upper primer 5' CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG 3'	Primers selected in this work from the <i>mapA</i> gene sequence published by Stucki <i>et al.</i> 1995	589 bp for <i>jejuni</i> species
	MDmapA2 lower primer 5' GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A 3'		
<i>ceuE</i>	COL3 upper primer 5' AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG 3'	Oligonucleotide used as probe by Gonzalez <i>et al.</i> 1997	462 bp for <i>coli</i> species
	MDCOL2 lower primer 5' TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG 3'	COL2 from Gonzalez <i>et al.</i> 1997 modified in this work	

**Figure 3. Séparation par électrophorèse en gel d'agarose des produits de la PCR multiplex pour la recherche et l'identification du genre *Campylobacter* sp. et des espèces *C. jejuni* et *C. coli* (Denis, Soumet et al. 1999)**



#### 2.3.4 Identification de l'espèce par des méthodes de biologie moléculaire

Il a été défini de nombreuses amorces spécifiques du genre *Campylobacter* et des espèces *C. jejuni* et *C. coli* (Gonzalez, Grant et al. 1997; Lawson, Linton et al. 1997; Linton, Lawson et al. 1997). La liste des amorces mis au point et la visualisation des produits obtenus par Denis et al. (1999) sont indiqués dans le tableau 3 et la figure 3 (Denis, Soumet et al. 1999).

#### 2.3.5 Milieux de conservation

Les souches peuvent être conservées pendant de nombreuses années stockées à – 80°C en ajoutant dans le milieu des agents cryoprotecteurs comme le glycérol à 25% (Federighi 1999).

### 2.4 Méthode de détection dans les aliments

En raison du grand nombre de milieux d'enrichissement et d'isolement existants pour campylobacter, de nombreuses combinaisons sont possibles. Il existe cependant une méthode de référence normalisée pour la détection des campylobacters dans les aliments : la norme NF-ISO 10272 :1995 (figure 4).

### 2.5 Difficultés de la détection des campylobacters

Les méthodes de détection des campylobacters sont lentes, il faut plus de 48 h avec un échantillon de selles humaines pour aboutir à un isolat qui nécessitera ensuite confirmation avec les tests phénotypiques. Dans le cas des échantillons d'aliments où le nombre de campylobacters est beaucoup plus faible et où ils sont présents au sein d'une abondante flore compétitive, l'isolement est précédé d'une phase d'enrichissement dans un milieu sélectif. La détection de campylobacter dans des échantillons d'aliments peut prendre jusqu'à 12 jours.

Les méthodes de culture ne sont pas très adaptées à l'isolement des espèces rares comme *C. upsaliensis* ou *C. lari*, ce qui peut entraîner un sous-diagnostic et une sous-estimation de la véritable prévalence de ces espèces chez l'homme. De plus, il a été démontré que certaines souches de *C. coli* étaient inhibées par les antibiotiques du milieu d'enrichissement de Preston, ce qui entraîne également un risque de sous-estimation de la prévalence des *C. coli* dans les prélèvements (Corry, Post et al. 1995).

## 3 Typage des campylobacters

### 3.1 Objectifs des méthodes de typage

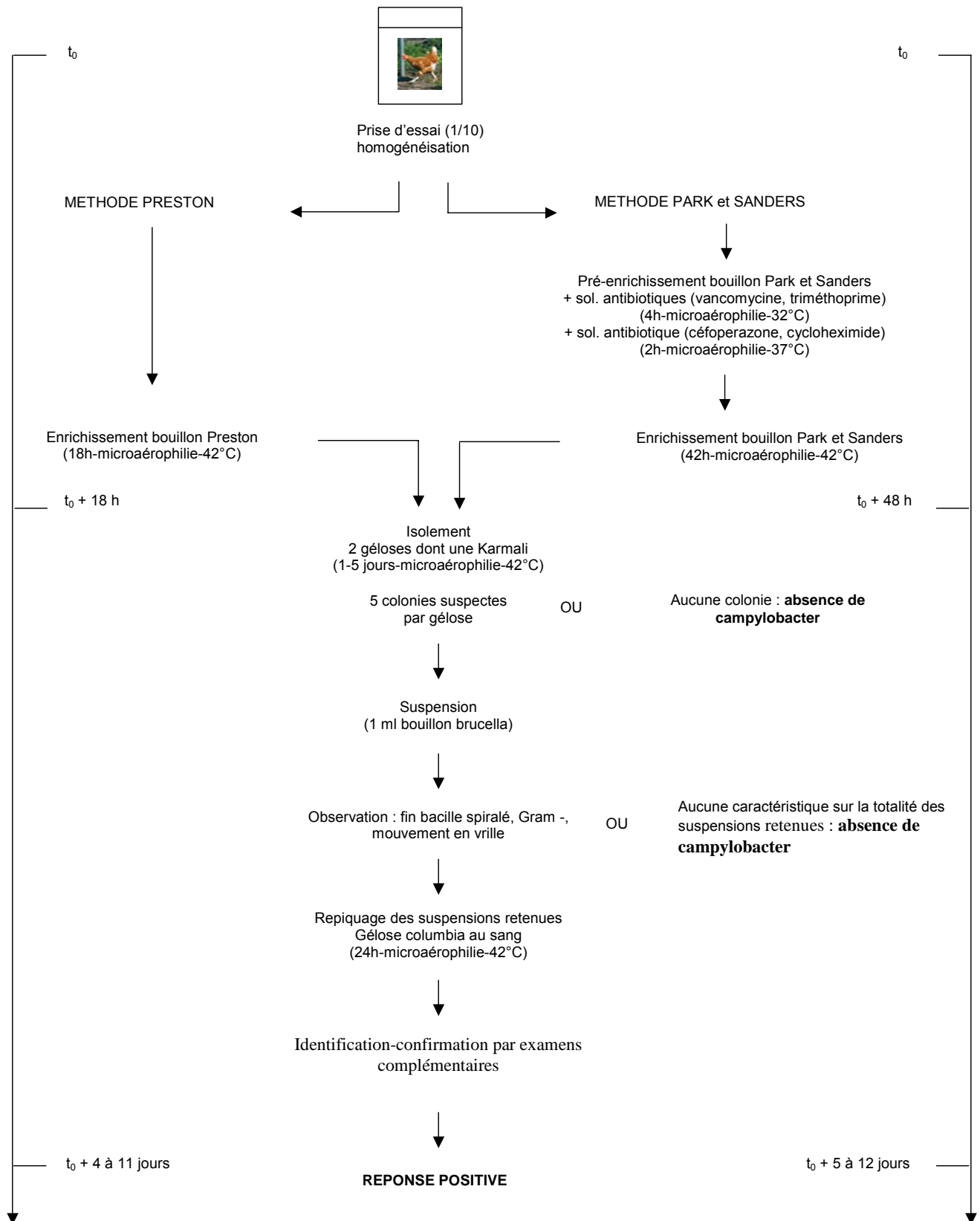
#### 3.1.1 Objectifs généraux

Les méthodes de typage visent à classer les bactéries en groupe en fonction du critère étudié. Dans le cas des campylobacters, la compréhension de la structure des populations bactériennes doit permettre d'apporter des connaissances sur l'épidémiologie de ces pathogènes.

L'objectif est de mettre en évidence des liens entre les phénotypes et les génotypes, ou des liens entre les espèces hôtes des pathogènes ou les syndromes observés cliniquement et certains



**Figure 4. Représentation schématique du mode opératoire de la méthode de référence de recherche des campylobacter dans les aliments (selon la norme NF-ISO 10272:1995)**



génotypes (Dingle and Maiden 2005). Ces informations participent à la compréhension de la pathogénèse, de la transmission et parfois de la prévention des maladies (Foxman, Zhang et al. 2005). En fonction des méthodes, différents marqueurs épidémiologiques peuvent être utilisés : marqueurs morphologiques (couleur, forme...), marqueurs moléculaires (ADN), marqueurs biochimiques (protéines, métabolites secondaires...).

### 3.1.2 Critères de sélection d'une méthode de typage

Il n'existe pas de technique de typage unique qui soit utilisable pour tous les types d'enquêtes épidémiologiques. La technique doit être choisie en fonction des objectifs : il peut s'agir de la mise en évidence d'un lien entre les souches lors d'une épidémie, ou la recherche de relations épidémiologiques entre des souches en l'absence de données épidémiologiques (analyse phylogénique par exemple) ou encore de décrire la distribution de groupes de souches et identifier les déterminants de ces groupes (Foxman, Zhang et al. 2005).

#### 3.1.2.1 Pouvoir discriminant ou sensibilité

Le pouvoir discriminant est l'aptitude d'une technique de typage à établir une distinction entre les différents individus d'une population bactérienne. Plus le pouvoir discriminant est élevé, plus le nombre de groupes observés est important. Plus une technique est discriminante plus la taille des clusters obtenus sera petite et réciproquement.

Le pouvoir discriminant peut également être défini comme la probabilité moyenne qu'un système de typage assigne le même type à des souches tirées au hasard d'un même groupe (Foxman, Zhang et al. 2005).

#### 3.1.2.2 Pourcentage de souches auquel peut s'appliquer la méthode de typage : la « typabilité »

Pour de nombreuses techniques, il a été observé des souches non-typables. Les motifs sont intrinsèquement liés à la technique utilisée. Par exemple, pour certaines techniques nécessitant une extraction de l'ADN bactérien, certaines souches produisent des nucléases. Ces enzymes lysent le chromosome avant que la réaction d'amplification n'ait lieu.

#### 3.1.2.3 Fidélité d'une technique : définitions

La fidélité d'une technique correspond à l'étroitesse d'accord entre des résultats d'essais indépendants obtenus sous des conditions stipulées.

##### ➤ Reproductibilité

Les conditions de reproductibilité sont les conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents (norme NF : ISO 5725-1 :1994). En d'autres termes, une technique est dite « reproductible » si le même résultat est obtenu (en prenant en compte l'intervalle de confiance du résultat observé) pour la même analyse sur le même échantillon dans des laboratoires différents.

##### ➤ Répétabilité de la technique de typage

Les conditions de répétabilité sont les conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps (norme NF : ISO 5725-1 :1994).

En d'autres termes, une technique est dite « répétable » si le même résultat est obtenu (en prenant en compte l'intervalle de confiance du résultat observé) pour la même analyse sur le même échantillon dans le même laboratoire.

Au sein des méthodes génotypiques, les méthodes basées sur le séquençage sont plus répétables et reproductibles que les méthodes basées sur des techniques de séparation par électrophorèse (Foxman, Zhang et al. 2005).

#### 3.1.2.4 Faisabilité de la méthode : disponibilité et coût

La méthode utilisée doit être disponible, c'est à dire que la mise en œuvre ne doit pas être trop complexe et les laboratoires doivent pouvoir se procurer facilement les réactifs ou l'équipement nécessaire, le tout pour un coût le plus faible possible. Pour les techniques de sérotypage, les sérums sont produits en faible quantité, donc difficilement disponibles pour les laboratoires en routine. Les techniques de séquençage sont onéreuses. Ces deux aspects doivent donc être pris en compte dans la faisabilité des techniques.

#### 3.1.2.5 Concordance du système de typage avec les autres méthodes

Plus les systèmes de typage mettront en évidence les même regroupements, meilleure sera la probabilité d'un lien entre les isolats (Moller Nielsen, Engberg et al. 2000).

### 3.2 Difficultés liées à l'étude des campylobacters

Les campylobacters présentent une grande diversité, aussi bien au niveau phénotypique qu'au niveau génotypique (Wassenaar and Newell 2000). Les méthodes de typage de campylobacter font l'objet de nombreuses recherches. Sur la banque de recherche d'information Scopus®, lorsqu'on tape les mots clés « campylobacter » et « typing », on obtient plus de 600 titres d'articles (requête faite le 24/05/2007).

#### 3.2.1 Grand nombre d'hôtes

Une des difficultés liée à l'étude des populations des campylobacters et en particulier de *C. jejuni* est que cette bactérie est présente chez un grand nombre d'espèces animales et qu'elle est ubiquitaire dans l'environnement (Wassenaar and Newell 2000; Dingle and Maiden 2005). Le grand nombre d'hôtes observés pour cette bactérie peut être relié à la diversité génétique de *C. jejuni* (Dingle and Maiden 2005).

**Tableau 4. Schéma de classification biotypique de Skirrow and Benjamin (1980)**

Test	<i>C. fetus</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
Croissance à 25°C	+	-	-	-
Croissance à 43°C	-	+	+	+
Acide nalidixique (30µg/disque)	R	S	S	R
Hydrolyse de l'hippurate	-	+	-	-
Production d'H <sub>2</sub> S en présence de fer	-	-	-	+

S : sensible ; R : résistant

**Tableau 5. Schéma de classification biochimique d'après Lior (1984)**

Test	Biotype	<i>C. jejuni</i>				<i>C. coli</i>		<i>C. lari</i>	
		I	II	III	IV	I	II	I	II
Hydrolyse de l'hippurate	+	+	+	+	-	-	-	-	
Test H <sub>2</sub> S rapide	-	-	+	+	-	-	+	+	
Hydrolyse de l'ADN	-	+	-	+	-	+	-	+	

### 3.2.2 Maladie sporadique

Les infections à campylobacter sont le plus souvent sporadiques et les épidémies sont rares, ce qui entraîne des difficultés pour caractériser l'épidémiologie de la maladie (Wassenaar and Newell 2000; Fitzgerald, Sails et al. 2005).

### 3.2.3 Diversité génétique et instabilité génétique

Les bactéries sont capables de réaliser des échanges horizontaux de matériel génétique qui n'incluent que certaines parties du chromosome bactérien. Ces échanges ont lieu au cours de procédés parasexuels variés comme la conjugaison, la transduction ou la transformation. La structure d'une population bactérienne dépend des taux relatifs des points de mutation et de recombinaison. La diversité génétique et phénotypique des campylobacters a été mise en évidence par de nombreuses études, par conséquent, l'analyse d'une seule caractéristique phénotypique ou génotypique a une faible valeur épidémiologique (Wassenaar and Newell 2000; Dingle and Maiden 2005).

Quatre processus d'évolution liés mais distincts influent sur la structure des populations bactériennes :

- Les points de mutation
- Les phénomènes de recombinaison
- La sélection par le milieu (positive ou négative)
- Les processus démographiques (par exemple la croissance bactérienne)

Les relations génétiques entre les individus de populations clonales peuvent être modélisées par des arbres phylogéniques ou les branches sont générées par des mutations.

Chez *C. jejuni*, il a été mis en évidence de nombreux réarrangements intrachromosomiques qui peuvent toucher l'ensemble du chromosome ou certains loci individuels comme les gènes de la flagelline. De plus, le chromosome de *C. jejuni* est fréquemment soumis à des échanges chromosomiques horizontaux (Schouls, Reulen et al. 2003; Dingle and Maiden 2005).

Une instabilité génétique liée à des échanges inter- et intrachromosomiques a été mise en évidence, même en l'absence de pression de sélection (Fitzgerald, Sails et al. 2005). Pour les méthodes génotypiques, en général, les cultures successives ainsi que la conservation n'ont pas d'effet sur le génotype mais peuvent avoir un effet pour les méthodes phénotypiques (sérotypes).

## 3.3 Méthodes phénotypiques utilisées pour le typage de campylobacter

### 3.3.1 Biotypage

Cette technique de typage consiste à déterminer les caractères biochimiques des isolats étudiés. La première grande distinction entre les différentes espèces de campylobacter est fondée sur la présence ou non d'une catalase. La grande majorité des campylobacters sont catalases positive, cependant, *C. upsaliensis*, qui fait partie des 4 espèces d'intérêt en hygiène des aliments, peut apparaître catalase négative pour certaines souches. Ces tests peuvent être complétés par l'étude de la croissance à différentes températures ou la résistance à certains antibiotiques. Skirrow et Benjamin en 1980 et Lior en 1984 proposent des schémas de classification biologiques qui sont présentés sur les tableaux 4 et 5 (Skirrow and Benjamin 1980; Lior 1984).

Il existe également une galerie API CAMPY® commercialisée par Biomerieux permettant l'identification en 24h des campylobacters à l'origine d'entérite chez l'homme dont le principe repose sur l'analyse du biotype.

### 3.3.2 Sérotypage

Le sérotypage est une technique de typage qui permet de distinguer les différents individus d'une population en groupes présentant un jeu commun d'antigènes. Pour campylobacter, 2 schémas de typage sont reconnus : le schéma de Penner (Penner, Hennessy et al. 1983) basé sur l'utilisation des antigènes thermostables et le schéma de Lior (Lior, Woodward et al. 1982) basé sur les antigènes protéiques thermolabiles.

### 3.3.3 Lysotypage : typage par les phages

La détermination du lysotype est une technique d'identification fondée sur la lyse sélective par des bactériophages. Différents schémas de lysotypage sont décrits pour *C. jejuni* et *C. fetus* (Federighi 1999).

### 3.3.4 Intérêts et inconvénients des méthodes de phénotypage

Les méthodes de typage phénotypique sont le plus souvent des méthodes rapides et faciles à mettre en œuvre. Ce sont les premières méthodes qui ont été développées et elles permettent une première approche de l'étude de la population bactérienne. Elles restent indispensables pour compléter les résultats obtenus avec d'autres méthodes plus discriminantes et les données épidémiologiques (Lukinmaa, Nakari et al. 2004).

Les méthodes phénotypiques sont développées pour une espèce bactérienne et ne sont donc pas utilisables pour les autres espèces (par exemple, les méthodes de sérotypage). De plus, ce sont des méthodes qui font parfois appel à des réactifs très onéreux et qui ne sont pas toujours disponibles (antisérums...) (Fitzgerald, Sails et al. 2005). En général, elles sont moins discriminantes, moins répétables et moins reproductibles que les méthodes de typage génétique.

## 3.4 Méthodes génotypiques utilisées pour le typage de campylobacter

Ces méthodes reposent sur une mesure des séquences génétiques. Cette mesure peut-être directe (ensemble des techniques utilisant le séquençage des nucléotides) ou indirecte (ensemble des techniques utilisant les séparations par électrophorèse). Les méthodes réalisant une mesure indirecte des séquences d'ADN peuvent porter sur l'ensemble du chromosome bactérien (par exemple l'électrophorèse en champ pulsé) ou sur quelques gènes ou des parties dispersées du chromosome bactérien (cas de toutes les techniques utilisant la PCR par exemple la PCR-RFLP, RAPD, AFLP<sup>1</sup>)

---

<sup>1</sup> PCR-RFLP: polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism

RAPD: random amplified polymorphism DNA

AFLP: amplified fragment length polymorphism

### 3.4.1 L'électrophorèse en champ pulsé (Pulse field gel electrophoresis PFGE)

#### 3.4.1.1 Principe

Cette technique repose sur une digestion de l'ensemble du chromosome bactérien par des enzymes de restriction sur des sites rares. L'électrophorèse en champs pulsés permet d'observer des fragments d'ADN dont la taille varie de quelques kilobases à plus de 10 000 kilobases. Les fragments d'ADN sont ensuite soumis à des champs électriques alternatifs dont l'orientation relative peut varier selon les systèmes de 90° à 180° (Tagu 1999).

#### 3.4.1.2 Avantages et inconvénients

L'électrophorèse en champ pulsé est une méthode dont le pouvoir discriminant est important parce que l'ensemble du génome est analysé. Cependant, le pouvoir discriminant est également lié aux enzymes de restriction qui sont utilisées. C'est une méthode coûteuse en temps, en travail et en équipement. De plus, un certain nombre de souches ne sont pas typables en raison de la production d'ADNase. L'absence de standardisation, en particulier pour les enzymes de restriction utilisées rend les comparaisons inter-laboratoires difficiles voire impossibles (Wassenaar and Newell 2000; Lukinmaa, Nakari et al. 2004). Cette technique de typage est cependant actuellement la plus utilisée pour campylobacter (Lukinmaa, Nakari et al. 2004).

### 3.4.2 Méthodes basées sur la technique de la PCR

Pour toutes ces techniques, seule une partie du chromosome bactérien est étudiée.

#### 3.4.2.1 Polymorphisme des longueurs de fragments de restriction du gène de la flagelline (PCR-RFLP Restriction fragment length polymorphism)

##### ➤ Principe

Le principe repose sur l'amplification d'un ou plusieurs gènes sélectionnés et la comparaison de profils de coupures de ces gènes par des enzymes de restriction suite à l'existence d'un polymorphisme dans la séquence des gènes. Des mutations apparaissant sur une séquence d'ADN reconnue par une enzyme de restriction vont provoquer des longueurs de fragments de restriction différentes. Une région spécifique de l'ADN est amplifiée ce qui permet de visualiser les fragments de restriction de cette région présents en grande quantité après électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction observé est utilisé comme critère d'identification (Tagu, 1999).

Chez *C. jejuni*, le gène de la flagelline est porté par 2 loci *flaA* et *flaB* séparés par environ 170 nucléotides. Ces loci présentent des régions conservées et des régions très variables. Ce qui est intéressant, c'est que les régions conservées chez *C. jejuni* sont également présentes dans les autres espèces de campylobacter, ce qui rend cette méthode applicable à *C. coli* par exemple (Wassenaar and Newell 2000). Il a été montré une forte conservation entre les loci *flaA* et *flaB* au sein d'une même souche et l'utilisation des 2 gènes dans la méthode apporte un faible gain de discrimination (estimé à moins de 10%) (Wassenaar and Newell 2000).

Au moins 7 procédures de typage du gène de la flagelline sont décrites avec de fortes variations dans les protocoles de PCR, les enzymes de restriction utilisées et les conditions de migration des fragments obtenus (Wassenaar and Newell 2000).

➤ PCR- multiplex RFLP

D'autres gènes peuvent être utilisés combinés au typage du gène *flaA*, ils doivent présenter un important polymorphisme pour être retenus comme gènes candidats. C'est le cas avec les gènes *pflaA/gyrA* et le niveau de discrimination obtenu avec cette méthode est similaire à celui de l'électrophorèse en champ pulsé (Ragimbeau, Salvat et al. 1998). Il y a toutefois un inconvénient au typage du gène *gyrA* car il est impliqué dans la résistance aux antibiotiques (rôle démontré pour *C. jejuni* et *C. coli* avec la famille des fluoroquinolones) et une pression de sélection peut entraîner une sur-représentation de certains génotypes (Wassenaar and Newell 2000). Le gène *flgE* qui est un gène codant pour la protéine de crochet du flagelle, ou les gènes codant pour les protéines de surfaces sont très polymorphes et permettent d'augmenter le niveau de discrimination du seul typage du gène de la flagelline (Lüneberg, Glenn-Calvo et al. 1998; Knudsen, Bang et al. 2005). Par contre, les gènes très conservés comme les gènes codant pour la toxine de distension du cytosquelette *cdt*, certains facteurs de virulence ou encore le gène codant pour l'hippuricase *hypO* ne sont pas utilisables car non discriminants (Wassenaar and Newell 2000).

➤ Avantages et inconvénients

Les génotypes *fla* sont stables au cours du stockage et au cours d'épidémies de courte durée (par exemple lors de l'infection d'un troupeau de poulets), mais des échanges de séquences de gènes *flaA* ont été mis en évidence dans les conditions naturelles. Cette méthode n'est donc pas à utiliser pour des études épidémiologiques globales sur un large territoire géographique ou sur une longue durée (Wassenaar and Newell 2000; Lukinmaa, Nakari et al. 2004). La majorité des auteurs s'accordent à reconnaître que le typage du gène *fla* reste un bon marqueur épidémiologique (Moller Nielsen, Engberg et al. 2000; Newell, Shreeve et al. 2001; Lukinmaa, Nakari et al. 2004). On ne peut pas savoir si une ou deux bandes de différences entre 2 profils *flaA* est due à une différence majeure ou mineure entre les deux gènes *flaA*. Il n'y a donc pas de sens à interpréter des similitudes entre les profils comme une forte relation entre les clones.

La PCR-RFLP est une méthode rapide et peu onéreuse, suffisamment discriminante pour des épidémies de courte durée. De plus, le nombre de souches non-typables est faible (Newell, Shreeve et al. 2001). Mais le manque de standardisation empêche la comparaison des résultats entre les laboratoires. La standardisation doit porter sur les amorces et les enzymes de restriction utilisées.

#### 3.4.2.2 Polymorphisme d'ADN par amplification aléatoire (Random amplified polymorphism DNA : RAPD)

Dans cette technique, l'ensemble du chromosome bactérien est analysé. Des amorces de petites tailles vont se fixer sur l'ADN cible au hasard et produire des produits d'amplification de différentes tailles. Après migration sur gel d'agarose, on obtient un profil de bandes que l'on peut comparer entre les différentes souches testées.



Les principaux inconvénients de cette méthode sont le nombre important de souches non-typables (liées à la production d'ADNase) et la faible reproductibilité. Ces inconvénients annulent les avantages d'une méthode rapide et de faible coût (Wassenaar, Geilhausen et al. 1998)

#### 3.4.2.3 Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (Amplified fragment length polymorphism AFLP)

Le principe de cette technique repose sur l'amplification sélective de fragments de restriction générés à partir d'un échantillon d'ADN génomique. Les fragments sont générés par deux enzymes de restriction coupant respectivement au niveau d'un site rare et d'un site fréquent. Les produits de digestion sont ensuite amplifiés. Enfin, les fragments sont séparés par électrophorèse sur un gel dénaturé de polyacrylamide (Tagu 1999). L'avantage majeur de cette technique repose sur l'analyse aléatoire de l'ensemble du génome, mais c'est une technique complexe.

#### 3.4.3 Le ribotypage

De nombreuses copies du gène de l'ARN ribosomique sont présentes sur le chromosome bactérien (ARN 5S, ARN 16S, ARN 23S). Des régions non-codantes ainsi que des régions très conservées sont présentes sur ce gène et cette stabilité en fait un bon candidat pour le typage (Wassenaar, Geilhausen et al. 1998). Après digestion de l'ADN génomique, une hybridation en Southern blot est réalisée avec des sondes spécifiques de gènes de l'ARNr. Cette méthode présente surtout un intérêt pour la détermination de l'espèce quand l'analyse phénotypique est difficile car le pouvoir discriminant est faible, ce qui est lié à la stabilité du gène étudié (Wassenaar and Newell 2000).

#### 3.4.4 Séquençage nucléotidique

Le séquençage nucléotidique direct (avec ou sans amplification par PCR) devient de plus en plus automatisé et par conséquent devient une méthode alternative raisonnable pour le typage des campylobacter. Le séquençage portant sur le locus de la flagelline a été utilisé dans différentes études (Meinersmann, Hesel et al. 1997).

Cette technique est très reproductible. Les données obtenues sont complexes et le pouvoir de discrimination est extrêmement élevé ce qui rend l'interprétation des données hautement dépendante des paramètres et des logiciels utilisés pour la comparaison.

#### 3.4.5 Technique de séquence des loci multiples (Multi locus sequence typing MLST)

Cette technique a été appliquée à campylobacter avec l'utilisation de 7 loci de gènes de ménage (housekeeping genes). Pour chaque isolat étudié, les 7 allèles sont séquencés. Le profil allélique obtenu se nomme « séquence type » ST. Les 7 loci choisis ne sont pas liés sur le chromosome bactérien. La diversité est suffisante pour obtenir une discrimination élevée. Cette technique a permis de confirmer que l'échange génétique horizontal a une influence majeure sur la structure et l'évolution des populations de campylobacter (Dingle, Colles et al. 2001; Dingle, Colles et al. 2002).

**Tableau 6. Comparaison, avantages et inconvénients des différentes méthodes de typage génétique (Wassenaar and Newell 2000; Foxman, Zhang et al. 2005)**

	Pouvoir discriminant	% de souches typables	Reproductibilité	Répétabilité	Part de génome analysée	Temps nécessaire	Coût	Disponibilité
<input type="checkbox"/> Séquençage total du chromosome	Très élevé	100	Elevée	Elevée	Génome entier	De plusieurs mois à plusieurs années	Très élevé	Très limitée
<input type="checkbox"/> Micro-puce à ADN	Très élevé	100	Moyenne à élevée	Moyenne à élevée	Gènes		Très élevé	Limitée
<input type="checkbox"/> Séquençage d'un ou plusieurs gènes	Moyen à très élevé (en fonction du (des) gène(s) choisi(s))	100	Elevée	Elevée	Gène(s)	2-3 jours	Elevé	Limitée
<input type="checkbox"/> Typage par séquençage sur plusieurs loci (MLST)	Très élevé	100	Elevée	Elevée	Gènes	> 3 jours	Elevé	Limitée
<input type="checkbox"/> Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)	Elevé	≈ 100	Moyenne à élevée	Moyenne à élevée	Génome entier	3-4 jours	Moyen	Bonne
<input type="checkbox"/> Polymorphisme des longueurs de fragments de restriction (PCR-RFLP)	Moyen à élevé (multiplex)	100	Moyenne	Moyenne à élevée	Gène(s)	< 1 jour	Raisonnable	Bonne
<input type="checkbox"/> Polymorphisme d'ADN par amplification aléatoire (RAPD)	Moyen	≈ 80	Faible	ND <sup>1</sup>	Parties dispersées du génome entier	< 1 jour	Faible	Bonne
<input type="checkbox"/> Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP)	Elevé	100	Moyenne à élevée	Elevée	Parties dispersées du génome entier	3-4 jours	Moyen	Méthode complexe
<input type="checkbox"/> Ribotypage	Faible	100	Elevée	Elevée	Gène(s)	3-4 jours	Moyen	Méthode complexe

<sup>1</sup> Non disponible

### 3.4.6 Puces à ADN

Le génome complet de la souche de *C. jejuni* NTCC 11168 a été séquencé en 2000 (Parkhill, Wren et al. 2000), ce qui a permis d'améliorer la compréhension de la biologie moléculaire de ce pathogène. Une puce à ADN contenant les 1654 gènes de la souche a été utilisée pour comparer des génomes complets de 11 souches différentes de *C. jejuni*. Mille trois cents gènes communs à toutes les souches et 354 gènes absents (ou très modifiés) dans les 11 autres souches ont été mis en évidence. Ces gènes ne sont donc probablement pas essentiels à campylobacter. L'analyse du génome complet doit permettre à terme d'identifier des gènes qui codent pour des facteurs à l'origine des différentes formes cliniques observées, des gènes responsables des séquelles post-infectieuses ou encore des gènes témoins de l'adaptation à certains hôtes (Fitzgerald, Sails et al. 2005).

## 3.5 Comparaison des méthodes de typage phénotypique et génétique

Ces méthodes peuvent être comparées sur des critères de sensibilité (c'est à dire de pouvoir discriminant), de reproductibilité, de répétabilité, de typabilité, de disponibilité, de facilité d'utilisation et de coût.

En général, les méthodes phénotypiques sont moins discriminantes que les méthodes génotypiques. Le pouvoir discriminant peut-être augmenté en combinant une méthode phénotypique avec une méthode génotypique ou deux méthodes génotypiques avec un pouvoir discriminant moyen. Les méthodes génotypiques utilisant une technique de séquençage sont plus discriminantes que les méthodes utilisant une technique de séparation par électrophorèse. Les méthodes reposant sur l'analyse de l'intégralité du génome (PFGE, RAPD) ont un fort pouvoir discriminant (Moller Nielsen, Engberg et al. 2000).

Le tableau 6 présente une comparaison des techniques de typage génotypique utilisées pour campylobacter ainsi que leurs avantages et inconvénients relatifs.

## 3.6 Perspectives des méthodes de typage de campylobacter

Il paraît nécessaire que les méthodes de typage soient standardisées et harmonisées, pour permettre les comparaisons entre laboratoires et valider la qualité des résultats obtenus. Ce travail est en cours avec CampyNet qui est un réseau de laboratoires dont l'objectif est de standardiser les principales méthodes de génotypage utilisées chez campylobacter. Un autre réseau CampyCheck a pour objectif d'améliorer les outils physiologiques, immunologiques et moléculaires utilisés pour la détection et l'identification des campylobacters. Pour pallier au manque de standardisation des techniques et pour accroître le pouvoir discriminant global de la méthode employée, l'utilisation de plusieurs techniques simultanément au cours d'une étude semble la meilleure approche (Wassenaar and Newell 2000).

La méthode de typage et son pouvoir discriminant doivent être adaptés aux objectifs fixés. Dans le cas idéal, elle doit avoir un pourcentage de souches non-typables le plus faible possible, être très reproductible et répétable, avoir un faible coût, être facile à réaliser (en terme de disponibilité des matières premières nécessaires et de travail) et les résultats obtenus doivent être faciles à interpréter (Lukinmaa, Nakari et al. 2004).

## 4 Infection des volailles et contamination des denrées alimentaires issues des volailles par campylobacter

### 4.1 Dans les élevages

#### 4.1.1 Infection des lots de volailles par campylobacter

##### 4.1.1.1 Dose infectante chez le poulet

Chez le poulet, *C. jejuni* colonise la muqueuse des cellules épithéliales du cæcum et de l'intestin grêle, mais la bactérie peut-être isolée dans d'autres portions du tube digestif et même dans le foie et la rate. La dose la plus faible, rapportée dans la littérature, nécessaire pour contaminer un poulet est très faible (40 unités formant colonie UFC) (Newell and Fearnley 2003).

##### 4.1.1.2 Colonisation du tube digestif des volailles par les campylobacters

Cependant la dose nécessaire et la vitesse de colonisation des poulets dépendent à la fois de la souche de campylobacter et de la race de poulet considérées. Une fois le tube digestif colonisé, la population de campylobacter dans le contenu cæcal peut rapidement atteindre  $10^9$  bactéries par gramme chez les poulets contaminés expérimentalement. Dans les conditions naturelles, la colonisation est un peu plus faible, mais les poulets excrètent de grandes quantités de campylobacter (plus de  $10^6$  bactéries par gramme de fiente) (Newell and Fearnley 2003; Wagenaar, Mevius et al. 2006). Les poulets étant coprophages, l'excrétion faecale est probablement un facteur important de la dissémination des microorganismes dans les troupeaux de volailles. La transmission au sein d'un lot de volaille est extrêmement rapide et la majorité des oiseaux (jusqu'à 100%) sont colonisés en quelques jours. Au Royaume-Uni, les volailles de chair sont colonisées dans 81 à 90 % des cas par *C. jejuni*, le reste étant représenté par *C. coli* et parfois par *C. lari* (Newell and Fearnley 2003).

##### 4.1.1.3 Influence de l'âge

La colonisation naturelle par campylobacter dépend de l'âge des volailles. Les poussins ne sont pas porteurs et en Europe, les poulets restent négatifs pour campylobacter jusqu'à l'âge de 10 jours et la plupart des lots ne deviennent positifs qu'à l'âge de 2 à 3 semaines. (Jacobs-Reitsma, van de Giessen et al. 1995). Les campylobacters n'entraînent pas de symptôme chez les volailles, et la colonisation persiste pendant toute la vie de la bande. Au fil du temps, le niveau d'excrétion diminue suggérant un rôle de l'immunité, cependant la durée de vie courte des poulets et des dindes ne permet au mieux qu'une réduction de 1 facteur 10 de l'excrétion (Wagenaar, Mevius et al. 2006). Chez les volailles expérimentalement infectées, des anticorps dirigés contre des antigènes de *C. jejuni* sont mis en évidence, l'efficacité de ces anticorps pour empêcher l'infection n'est pas connue. Cependant, chez les poules pondeuses âgées, les anticorps peuvent être détectés sans colonisation du tube digestif, ce qui suggère que la réponse anticorps puisse être associée à l'élimination de l'infection. La raison pour laquelle les poulets ne sont pas contaminés avant l'âge de 10 jours n'est pas connue, les raisons invoquées sont l'immaturation du tube digestif, la composition de l'alimentation ou encore la présence d'anticorps maternels. La compréhension et la nature de cette phase réfractaire à l'infection par

campylobacter permettraient peut-être de rendre les poulets insensibles à la colonisation par *C. jejuni* (Newell and Fearnley 2003).

#### 4.1.1.4 Saisonnalité

Des variations saisonnières de la prévalence de contamination des lots de volailles par campylobacter ont été mises en évidence, avec un taux d'infection plus élevé l'été que l'hiver (DANMAP 2000; Refregier-Petton, Rose et al. 2001). Les variations observées chez l'homme coïncident ou précèdent les pics saisonniers chez la volaille.

#### 4.1.1.5 Paramètres zootechniques

Il a également été démontré que la prévalence des lots positifs dépendait de la taille des lots (Berndtson, Danielsson-Tham et al. 1996) et du type de production (Heuer, Pedersen et al. 2001). Les lots de volailles élevés selon le cahier des charges « agriculture biologique » ou sur des parcours extérieurs ont des prévalences de contamination par campylobacter plus élevées que les lots de volailles élevés en hors-sol. Cette observation peut-être reliée à l'exposition environnementale ainsi qu'à l'âge des oiseaux.

#### 4.1.1.6 Nombre de souches de campylobacter isolées des lots de volailles

En fonction des études, les lots de volailles ont été trouvés infectés par un nombre limité ou au contraire par plusieurs souches différentes de *C. jejuni* ou *C. coli*. Des études réalisées au Royaume-Uni, en Suisse et aux Pays-Bas ont montré que les lots de volailles standard n'étaient colonisés que par un nombre limité (un ou deux) de sous-type de campylobacter (Jacobs-Reitsma, van de Giessen et al. 1995; Ayling, Woodward et al. 1996; Bull, Allen et al. 2006). La situation semble différente aux Etats-Unis où plusieurs souches de campylobacter ont été isolées par lot de volailles (Hiett, Stern et al. 2002).

### 4.1.2 Prévalence de la contamination des élevages

La proportion de lots de poulets contaminés par campylobacter varie entre les pays, ce qui peut être lié à des différences dans les méthodes d'échantillonnage et d'isolement. En Europe, la prévalence varie de 18 à plus de 90%. Les pays du Nord de l'Europe ont des prévalences plus faibles que les pays du sud. Les raisons de ces écarts ne sont pas connues, mais les paramètres zootechniques et les conditions climatiques peuvent être, au moins en partie, responsable de ces écarts.

En France, le plan de surveillance réalisé en 2004 chez le poulet a mis en évidence une prévalence de 85 % (121 prélèvements positifs sur 142 réalisés). La proportion de souches de *C. jejuni* isolée des prélèvements de caeca par isolement direct est de 30% et 70% pour les *C. coli* (Hellard and Kempf 2005).

#### 4.1.2.1 Transmission horizontale

- La présence résiduelle de campylobacters du lot précédent dans l'élevage peut-être une source de transmission. Cependant, dans les aliments et la litière, les conditions sèches sont considérées létales pour campylobacter. De plus, en Europe, la litière est changée entre les lots. Il a été mis en

évidence dans une étude réalisée au Royaume-Uni que seuls 15% des lots dans 100 élevages différents montraient une similitude génétique avec les campylobacters isolés des lots précédents dans l'élevage (Shreeve, Toszeghy et al. 2002). Il a également été montré que le statut d'un lot pour campylobacter ne dépendait pas du statut du lot précédemment élevé dans le même bâtiment (Evans and Sayers 2000).

- Les campylobacters peuvent être mis en évidence dans l'air des élevages et dans les flux d'air entrant dans les élevages. La transmission aérienne peut donc avoir un rôle dans la dissémination des campylobacters (Bull, Allen et al. 2006).
- Les campylobacters peuvent être amenés par l'eau de boisson. La survie de campylobacter dans l'eau a été démontrée (Pearson, Greenwood et al. 1993) ; La transmission entre les volailles peut également se faire par le système de distribution de l'eau.
- Les campylobacters peuvent pénétrer dans l'élevage par la faune sauvage (oiseaux, rongeurs), les autres animaux domestiques et les insectes. Des campylobacters ont pu être isolés de rongeurs (Hiett, Stern et al. 2002) et les mouches sont identifiées comme un facteur de risque pour campylobacter (Hald, Skovgard et al. 2004). Les autres animaux de rente ou domestiques de l'élevage peuvent être porteurs de campylobacter. Dans ce cas, leur présence augmente la charge environnementale en campylobacters de l'élevage et par conséquent le risque d'entrée des campylobacters par un vecteur non animé (bottes de l'éleveur, machines).
- Les campylobacters sont ubiquitaires et présents dans le sol autour des élevages (Rivoal, Ragimbeau et al. 2005). L'ensemble des activités humaines liées à l'élevage des animaux peut donc être responsable de l'entrée des campylobacters dans l'élevage : passages de l'éleveur, des techniciens, des vétérinaires qui font entrer les campylobacters par leurs bottes, leurs vêtements ou le matériel utilisé.
- Pour des raisons économiques, les bâtiments d'élevage sont remplis au maximum de leur capacité. Le détassage est une pratique qui consiste à retirer une partie des poulets ou des dindes avant la fin de la période d'élevage de l'ensemble de la bande et de les faire abattre 1 ou 2 semaines avant le reste. Ce détassage permet d'augmenter la production tout en respectant la réglementation sur le bien-être animal qui repose sur un chargement au poids de volaille par mètre carré dans le bâtiment. En général, cette pratique est considérée comme un facteur de risque pour l'introduction de campylobacter parce qu'il y a alors une rupture des barrières d'hygiène pendant l'enlèvement des animaux (Wagenaar, Mevius et al. 2006; Humphrey, O'Brien et al. 2007) .

#### 4.1.3 Mesures de contrôle des campylobacters en élevages

##### 4.1.3.1 Mesures de biosécurité

Les mesures d'hygiène classiques (nettoyage et désinfection des bâtiments d'élevage entre 2 lots, mise en place de pédiluves, de sas...) peuvent empêcher ou au moins limiter l'entrée des campylobacters ; Les campylobacters étant ubiquitaires dans l'environnement, ces mesures ne peuvent s'appliquer qu'aux élevages hors-sol. Pour ces animaux, il est possible de conserver les lots négatifs pour campylobacter en appliquant, des mesures de biosécurité drastiques. Dans les pays

scandinaves (Norvège et Suède) où ces mesures sont appliquées, la prévalence de campylobacter est de 7% (Humphrey, O'Brien et al. 2007).

#### 4.1.3.2 Mesures de contrôle additionnelles

##### ➤ Utilisation des flores de barrière

L'administration d'un cocktail de flore bactérienne digestive non pathogène aux poussins s'est avérée efficace pour lutter contre la contamination par les salmonelles. Mais les flores de barrière s'avèrent pour l'instant beaucoup moins efficaces pour lutter contre campylobacter (Schneitz 2005).

##### ➤ Vaccination des poulets contre campylobacter et rôle des anticorps maternels

La mise au point de ce vaccin nécessiterait l'identification des gènes de campylobacter qui sont importants dans la colonisation du tube digestif des volailles. Pour l'instant, la réponse immunitaire des volailles n'est pas comprise. De plus, des problèmes sont posés par la variabilité antigénique des souches de campylobacter, la méconnaissance des antigènes induisant une réponse protectrice et le fait que ce vaccin doit protéger les animaux très jeunes (Wagenaar, Mevius et al. 2006; Humphrey, O'Brien et al. 2007).

##### ➤ Utilisation de bactériophages

Des bactériophages, virus naturellement présents dans le tube digestif des poulets, peuvent être utilisés. L'utilisation de préparation de phages peut faire disparaître la plupart des *C. jejuni* du tube digestif des volailles dans les jours qui suivent le traitement. On pourrait donc envisager de traiter les lots positifs quelques jours avant leur départ pour l'abattoir. Cependant, il existe un risque de sélection des souches de campylobacter résistantes à ces phages. D'un point de vue social se pose le problème des consommateurs qui pourraient s'avérer réticents à consommer des poulets traités avec des virus (en dehors de toute considération scientifique) (Wagenaar, Mevius et al. 2006; Humphrey, O'Brien et al. 2007).

##### ➤ Résistance génétique des volailles

Des différences de sensibilité de lignées de volailles à la colonisation par campylobacter ont été suspectées, mais les données sont limitées (Wagenaar, Mevius et al. 2006).

## 4.2 Contamination des volailles pendant le transport

### 4.2.1 Etude de la contamination des lots de volailles par des souches de campylobacter présentes initialement dans les caisses de transport

Les volailles sont transportées de l'élevage à l'abattoir dans des caisses de transport. Ces caisses peuvent être en métal ou en plastique. Le sol des caisses peut être plein mais le plus souvent il est grillagé. Différentes études ont mis en évidence que les caisses de transport utilisées pour les volailles entre l'élevage et l'abattoir étaient très souvent contaminées par des souches de campylobacter (Berndtson, Danielsson-Tham et al. 1996; Newell, Shreeve et al. 2001; Corry, Allen et al. 2002; Slader, Domingue et al. 2002; Berrang, Northcutt et al. 2003; Hansson, Ederoth et al. 2005). Ces mêmes études ont également démontré que des lots de volailles initialement négatifs pour campylobacter pouvaient devenir positifs après l'abattage, et que les souches retrouvées sur les carcasses avaient été isolées dans les caisses de transport. Cependant, il semblerait qu'il ne s'agisse

pas d'une colonisation intestinale des volailles, mais d'une contamination extérieure du plumage (Rasschaert, Houf et al. 2007).

#### 4.2.2 Mesure de contrôle des campylobacters pendant le transport à l'abattoir

##### 4.2.2.1 Mise à jeun des animaux

La mise à jeun des oiseaux 8 à 12 heures avant le transport diminue le contenu intestinal. Cette mesure permet de réduire la contamination extérieure du plumage par des campylobacters pendant le transport. Cependant, la mise à jeun et le transport sont des stress pour les volailles qui peuvent entraîner une augmentation de l'excrétion fécale en campylobacter. Parallèlement, il a également été montré que l'augmentation du nombre de campylobacters dans le tube digestif des volailles n'induisait pas forcément une augmentation de la contamination des carcasses à la fin des opérations d'abattage (Corry and Atabay 2001).

##### 4.2.2.2 Nettoyage et désinfection des caisses de transport

En théorie, les caisses utilisées pour transporter les volailles de l'élevage à l'abattoir sont nettoyées et désinfectées entre chaque utilisation. Après l'accrochage des oiseaux sur la chaîne d'abattage, les caisses sont acheminées dans des tunnels de nettoyage et passent dans des bacs successifs remplis d'eau et de produits nettoyant et désinfectant. Certaines installations de nettoyage retournent les caisses, ce qui permet d'éliminer les plumes et les salissures (voire des pattes d'oiseaux). En raison de leur structure grillagée, il est très difficile de les nettoyer correctement et des fientes, des plumes ou de la terre sont souvent retrouvées après le nettoyage et la désinfection. Les caisses ne sont pas séchées et sont replacées sur les camions (également nettoyés) pour une utilisation ultérieure. En raison de la difficulté pour nettoyer les caisses, les produits désinfectants ne sont pas appliqués sur des surfaces propres et des études ont montré que le nettoyage et la désinfection des caisses de transport n'avaient que peu ou pas d'effet sur la présence de campylobacter dans ces caisses (Newell, Shreeve et al. 2001; Hansson, Ederoth et al. 2005).

### 4.3 Contamination des carcasses pendant les procédés d'abattage

#### 4.3.1 Description du procédé d'abattage des volailles (Lehuraux 1997)

##### ➤ Accrochage

L'arrivée des animaux dans les caisses de transport est plus ou moins automatisée. L'accrochage est réalisé manuellement. Les oiseaux sont accrochés par les pattes dans des étriers en métal, la tête en bas.

##### ➤ Electronarcose et saignée

L'anesthésie est réalisée par électionarcose. La tête des oiseaux est plongée dans un bac parcouru par un courant électrique. La saignée est automatisée et un opérateur peut intervenir manuellement si nécessaire.

##### ➤ Echaudage



Cette opération a pour but de faciliter la plumaison. Les volailles après avoir été saignées sont plongées dans le bac d'échaudage dans lequel la température de l'eau varie entre 50 et 60°C, en fonction de l'espèce de volaille et de la destination ultérieure des carcasses. Le plus souvent, la température du bac d'échaudage se situe entre 50 et 53°C. Dans certains cas, une température plus élevée (58 à 60°C) peut-être utilisée lorsque les carcasses sont destinées à être vendues congelées et l'apparence de la peau a moins d'importance. Il a été démontré que les campylobacters peuvent survivre dans l'eau d'échaudage jusqu'à une température de 53°C (Corry and Atabay 2001).

➤ Plumaison

Le principe des plumeuses est la rotation de doigts en caoutchouc venant frapper la carcasse et arracher les plumes. Une succession de plumeuses d'action de plus en plus douce permet d'obtenir une carcasse nette et non déchirée. Pendant la plumaison, les carcasses sont aspergées d'eau pour faciliter et améliorer l'action des doigts des plumeuses.

➤ Finition

L'enlèvement de la tête se fait mécaniquement par élongation, ce qui permet l'enlèvement d'une partie des viscères antérieurs (trachée, œsophage). Les pattes sont sectionnées automatiquement au niveau des tarses.

➤ Eviscération

A la différence des autres espèces animales de rente, les volailles sont éviscérées sans ouvrir entièrement la carcasse et la peau n'est en général pas retirée. L'éviscération consiste en une ouverture abdominale de la carcasse suivie de l'extraction manuelle ou mécanique des viscères. Lorsque l'éviscération est automatisée, différentes machines se succèdent : décloaqueuse, éviscèreuse (ouverture de la cavité abdominale et recueil de la grappe intestinale), époumoneuse... Ensuite, les carcasses sont calibrées puis elles peuvent être placées sur des chariots à épinettes ou suspendues sur une nouvelle chaîne et amenées dans le local de ressuage.

De l'eau, contenant parfois de fortes concentrations de chlore (en fonction des législations en vigueur dans les pays) peut être utilisée pour rincer les équipements et les carcasses, à des intervalles fréquents sur la ligne d'abattage.

➤ Ressuage

Le ressuage est l'étape de refroidissement des carcasses. La température des carcasses doit être amenée à 4°C le plus rapidement possible ( Règlement européen n°853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale).

Différents types de ressuage peuvent être rencontrés en abattoir de volailles :

- Statique : les carcasses sont placées dans une chambre froide
- Dynamique : les carcasses sont placées dans une chambre froide dans laquelle de gros ventilateurs soufflent de l'air froid
- Par spin-chiller : les carcasses sont plongées dans un courant d'eau froide. Dans ce cas, le plus souvent les carcasses sont ensuite surgelées.

#### 4.3.2 Contamination des carcasses pendant l'abattage et l'éviscération

##### 4.3.2.1 Origine de la contamination des carcasses

La contamination de la viande de volaille est surtout superficielle, et comme la peau n'est pas retirée, de nombreux microorganismes sont retrouvés sur ou dans la peau. Les campylobacters présents sur la peau proviennent soit directement du contenu intestinal soit indirectement de l'équipement de l'abattoir. Les lots initialement négatifs pour campylobacter deviennent fortement positifs lorsqu'ils sont abattus après des lots positifs, et la proportion de carcasses positives augmente pendant l'abattage (Rivoal, Denis et al. 1999). La nature des procédés d'abattage des volailles rend impossible la prévention d'une contamination croisée des lots négatifs par les lots positifs.

##### 4.3.2.2 Principaux sites de contamination croisée des volailles pendant les procédés d'abattage

Quand des lots de volailles contaminés par campylobacter sont abattus, un nombre élevé de campylobacters peuvent être retrouvés à toutes les étapes de l'abattage, ainsi que sur les machines et dans l'eau d'échaudage quand la température est inférieure à 53°C (Corry and Atabay 2001; Newell, Shreeve et al. 2001). Les zones hautement contaminées en abattoir de volailles sont le bac d'échaudage, les plumeuses et les machines de l'éviscération.

###### ➤ Dans le bac d'échaudage

En raison des conditions de transport des volailles, leur plumage est fréquemment souillé par des fientes. Après la saignée, les volailles sont trempées dans un bac d'échaudage. Les souillures présentes à la surface des volailles se retrouvent dans l'eau d'échaudage et peuvent se redéposer sur les carcasses suivantes.

###### ➤ Dans les plumeuses

Dans les plumeuses, les doigts en caoutchouc peuvent être salis par la contamination extérieure des volailles sortant du bac d'échaudage. De plus, lors de la plumaison, les doigts des plumeuses compriment la cavité intestinale et peuvent entraîner l'expulsion des matières fécales. Les doigts des plumeuses sont en caoutchouc et au fil de leur utilisation, ils s'abîment et présentent de nombreux interstices dans lesquelles les campylobacters pénètrent. Ces campylobacters et les autres bactéries provenant des matières fécales des oiseaux sont déposées sur les carcasses plumées (Berrang, Buhr et al. 2001).

###### ➤ Pendant l'éviscération

Au moment du retrait de la masse intestinale, les viscères peuvent se rompre. Ils contaminent alors l'intérieur et/ou l'extérieur de la carcasse, mais également la machine sur laquelle ils se sont rompus. Les carcasses contaminées vont ensuite « déposer » les campylobacters à la surface des machines successives. Les carcasses traitées ensuite seront en contact avec les souillures laissées par la carcasse précédente (Rivoal, Denis et al. 1999).

##### 4.3.2.3 Contamination de la peau des volailles par les campylobacters pendant l'abattage

Pendant la phase d'échaudage ou au cours des différents rinçages, la peau des volailles absorbe l'eau. Les campylobacters (initialement présents ou apportés par les fientes, le contenu intestinal ou les différentes machines) adhèrent à la peau d'abord par des mécanismes physico-chimiques puis par

des liaisons plus permanentes entraînant la formation d'un biofilm difficile à retirer si le rinçage de la peau n'est pas réalisé immédiatement après la contamination. En particulier, les micro-organismes seront retenus dans la fine couche d'eau présente à la surface de la carcasse après l'échaudage. Le rinçage des carcasses permet de retirer une partie de la contamination, mais la peau se gorge d'eau et les campylobacters (et les autres bactéries) sont retenus dans les plis et les brèches de la peau, en particulier les follicules plumeux (Corry and Atabay 2001).

En raison des modalités de l'abattage des volailles, la contamination croisée entre les lots est inévitable ce qui conduit à un nombre de carcasses contaminées en fin de chaîne important (jusqu'à 100%) et à des niveaux de contamination très élevés (de l'ordre de  $10^2$  à  $10^4$  UFC/g de peau).

#### 4.3.3 Mesures de contrôle des campylobacters dans les abattoirs de volailles

En présence d'un risque de contamination par les campylobacters aussi élevé, il est difficile de prévenir les contaminations croisées ou de diminuer l'importance de la contamination sur le produit final des lots infectés. Deux stratégies permettent de diminuer la contamination des produits de volailles, soit en produisant des lots de volailles initialement indemnes de campylobacter soit en mettant en place une décontamination du produit final par des moyens physiques ou chimiques.

##### 4.3.3.1 Nettoyage et désinfection en abattoir de volailles

###### ➤ Principaux composés désinfectants utilisés en abattoir de volailles

En France, il n'existe pas de données qualitatives ou quantitatives disponibles concernant la production et l'utilisation des désinfectants en industrie agroalimentaire. Une étude réalisée en industrie agroalimentaire au Royaume-Uni portant sur 40 sites de production et l'analyse de 77 questionnaires adressés à des élevages, des ateliers de découpe, des transporteurs et des revendeurs montre que les composés d'ammoniums quaternaires sont les désinfectants les plus utilisés (Holah, Taylor et al. 2002). Ce choix s'explique par la bonne efficacité de ces molécules en tant que désinfectant, mais également par leur non-toxicité et leur faible action corrosive. Les produits chlorés sont également largement utilisés et en particulier, l'hypochlorite de sodium.

En France, pour être commercialisés, tous les produits désinfectants utilisés en IAA doivent avoir obtenu une AMM (autorisation de mise sur le marché) qui est délivrée par le ministère de l'agriculture. La liste des produits autorisés en France est disponible sur le site e-phy du ministère de l'agriculture : <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/> (consulté le 26 juin 2007). L'analyse de cette base de données montre que les composés d'ammoniums quaternaires sont présents dans près de la moitié des formulations de désinfectants autorisés et les produits chlorés dans près d'un quart. Malgré l'absence de données quantitatives de production et d'utilisation de ces molécules, nous pouvons néanmoins supposer que ces molécules sont très largement utilisées dans les industries agroalimentaires et donc dans les abattoirs de volailles.

###### ➤ Réalisation du nettoyage et de la désinfection en abattoir de volailles (Lehuraux 1997)

Le nettoyage et la désinfection des locaux et du matériel sont réalisés quotidiennement dans les abattoirs de volailles, à la fin de la journée de travail. Le nettoyage et la désinfection peuvent être réalisés par du personnel de l'abattoir ou sous-traité à une société extérieure à l'abattoir.

- Nettoyage

La première étape est un nettoyage mécanique qui vise à éliminer les déchets visibles. Ce nettoyage peut consister en un raclage, un grattage ou un brossage. La force mécanique de l'eau sous pression peut également être utilisée. L'eau chaude (50°C) est utilisée sauf pour le poste de saignée qui exige une eau froide ou tiède. La pression est variable (4-5 à 20-30 bars) suivant l'équipement disponible et l'état des surfaces à traiter. Cette phase de nettoyage peut être réalisée plusieurs fois au cours de la journée de travail, elle consiste essentiellement en un raclage des sols et un rinçage des surfaces et elle est réalisée par les différents agents de l'abattoir.

L'opération de nettoyage permet d'éliminer les déchets faiblement accrochés aux surfaces et de réhydrater les souillures sèches. La graisse résiste aux actions mécaniques du nettoyage à l'eau. Pour retirer la graisse déposée sur les machines et les surfaces, un détergent est appliqué avec un canon à mousse. Périodiquement, afin de combattre les souillures minérales, une action complémentaire chimique acide est réalisée pour détartrer le matériel.

- Rinçage

Le rinçage consiste en une dissolution à l'eau claire de la solution de nettoyage. Il est réalisé à haute pression (60 bars) et à une température de 50 à 60°C. La pression utilisée est d'autant plus forte qu'il reste des souillures visibles. La propreté est visuelle mais également tactile (élimination des graisses et du sang).

Le nettoyage est une étape indispensable avant la désinfection. L'efficacité des désinfectants est liée entre autres à la présence de matières organiques. De plus, la présence persistante de matière organique masque et protège les micro-organismes de l'action du désinfectant.

- Désinfection

Industriellement et économiquement, il est impossible d'obtenir des surfaces stériles, l'objectif est donc de réduire le nombre de micro-organismes présents dans l'environnement jusqu'à l'obtention d'un niveau ne risquant pas de compromettre la sécurité ou la salubrité des aliments (AFNOR 1999).

Dans les abattoirs de volailles, le plus souvent, la solution désinfectante est pulvérisée sous forme de mousse sur les surfaces à traiter. La mousse permet un meilleur traitement des surfaces verticales et une bonne visualisation des surfaces traitées. Les produits sont laissés en contact en fonction des indications du fabricant (de 15 à 30 minutes en général).

- Rinçage final

Le rinçage final doit achever les opérations de nettoyage et de désinfection. En premier lieu, il élimine les complexes bactéries/désinfectant présents sur le matériel, les murs et les sols. Il permet ensuite d'éviter la persistance de substances actives ou de résidus sur les surfaces traitées, en particulier si le temps de contact a été long. Le rinçage doit se terminer par une vidange des équipements et le drainage des sols afin qu'ils ne restent pas humides et ne soient pas favorables à la survie ou à la croissance des micro-organismes.

➤ Survie des campylobacters aux opérations de nettoyage et de désinfection dans les abattoirs.

Les quelques études réalisées sur campylobacter semblent montrer une grande sensibilité de ce micro-organisme aux désinfectants (Wang, Powers et al. 1983; Blaser, Smith et al. 1986; Trachoo and Frank 2002; Avrain, Allain et al. 2003). La recherche de ce germe dans les industries agroalimentaires

après nettoyage et désinfection s'est toujours, à notre connaissance, révélée infructueuse (Miwa, Takegahara et al. 2003; Borck and Pedersen 2005; Cools, Uyttendaele et al. 2005; Malakauskas, Jorgensen et al. 2006). Les conclusions de ces études conduisent à penser que les campylobacters sont globalement sensibles à l'action du nettoyage et de la désinfection dans les abattoirs de volailles. Le nettoyage et la désinfection permettent de réduire (voire d'éliminer) les campylobacters présents sur les machines et sur les surfaces après l'abattage des lots. Cependant, la désinfection n'est pas réalisée entre chaque lot. En abattoir de volailles, la contrainte la plus importante est le nombre d'animaux abattus à l'heure (de 2000 à 10 000 en fonction des abattoirs et du type de volaille), et le nettoyage et la désinfection des machines entre chaque carcasse ne sont pas envisageables (Wagenaar, Mevius et al. 2006). L'opération de désinfection permet en théorie d'empêcher le passage des campylobacters de lots de volailles abattus la veille sur les lots de volailles suivants, mais ne permet pas de réduire les contaminations croisées entre les lots abattus le même jour.

#### 4.3.3.2 Ordre d'abattage des lots

En raison des modalités de l'abattage des volailles, la contamination croisée entre les lots est inévitable. Il a été démontré que les carcasses des lots initialement négatifs pour campylobacter étaient rapidement contaminés lorsqu'ils étaient abattus après des lots positifs (Rivoal, Denis et al. 1999; Newell, Shreeve et al. 2001; Stern and Robach 2003; Lindblad, Hansson et al. 2006). Dans une autre étude, le suivi des lots initialement négatifs et abattus après nettoyage et désinfection de l'abattoir a montré que ces lots restaient négatifs (Miwa, Takegahara et al. 2003). Une approche consiste donc à distinguer les lots positifs des lots négatifs et de réaliser une décontamination de la viande des lots positifs. Théoriquement, cette approche devrait fonctionner, mais en pratique, il est très compliqué de distinguer les lots positifs des lots négatifs. La connaissance du statut du lot vis à vis de campylobacter au moment où celui-ci quitte la ferme permet d'envoyer les lots positifs dans des abattoirs pour « lots positifs », et les lots négatifs dans des abattoirs pour « lots négatifs » seulement. S'il n'y a qu'un seul abattoir disponible, alors les lots négatifs sont abattus en premier, suivi par les lots positifs. Un lot négatif faussement classé positif aura peu de conséquences en dehors de conséquences économiques. Par contre, un lot positif faussement classé négatif sera considéré comme « sain » pendant tout l'abattage, pourra contaminer des lots réellement négatifs et sera vendu sans qu'il n'ait été appliqué de traitement pour réduire la contamination en campylobacter. Le problème principal est lié à la méthode de détection des campylobacters qui nécessite plusieurs jours (pour la méthode traditionnelle) et dont les faux négatifs sont fréquents. Dans cette approche, la fiabilité des résultats négatifs est cruciale sachant qu'elle dépend également de la durée entre le moment du test et celui de l'abattage des animaux (Wagenaar, Mevius et al. 2006).

#### 4.3.3.3 Diminution de la contamination des carcasses par campylobacter pendant l'abattage

- Une méthode intéressante est en cours de développement. Un équipement spécial sur la chaîne d'abattage presse l'abdomen des volailles, ce qui entraîne l'expulsion d'une petite quantité de fientes en dehors du cloaque, qui est immédiatement rincée à l'aide d'un jet d'eau. L'objectif est

de limiter l'excrétion des fientes pendant l'échaudage et la plumaison (Wagenaar, Mevius et al. 2006)

- L'utilisation d'une température d'échaudage élevée (> 53°C) diminue le nombre de campylobacter présents sur la peau immédiatement après, mais les étapes suivantes libèrent des campylobacters de l'intestin qui recontaminent l'extérieur de la carcasse. De plus, la peau est abîmée par la température d'échaudage et les tissus sous-jacents sont exposés à une contamination encore plus forte (Corry and Atabay 2001).

#### 4.3.3.4 Influence du ressuage

Les campylobacters sont très sensibles à la dessiccation. Le ressuage à l'air libre (statique ou dynamique) entraîne une diminution significative de la contamination de la surface des carcasses par les campylobacters (Alter, Gaull et al. 2005).

#### 4.3.3.5 Méthodes de décontamination du produit final

La décontamination de la viande de volaille est plus difficile que pour les autres espèces animales de rente à cause de la peau qui est en général conservée sur le produit final. Pendant la phase de découpe des produits de volaille, le retrait de la peau diminue le nombre de campylobacters (Uyttendaele, De Troy et al. 1999). Lorsque la peau est présente, le nombre de campylobacters présents par gramme de peau varie en fonction des études, mais il est très important, entre  $10^2$  et  $10^4$  CFU/g (Federighi 1999).

##### ➤ Méthodes chimiques de décontamination

Les traitements appliqués sur la viande de volailles doivent répondre aux critères suivants:

- Insertion facile dans les chaînes de fabrication existantes,
- Economique pour l'abattoir en terme de place et de coût
- Efficaces sur les microorganismes pathogènes visés et en particulier sur campylobacter
- Ne pas avoir de répercussion sur la santé du consommateur et sur les qualités organoleptiques du produit

En France, jusqu'à aujourd'hui, la réglementation française (et européenne) n'autorise pas le trempage des carcasses en fin de chaîne d'abattage dans des solutions contenant des molécules désinfectantes. Mais cette technique est déjà utilisée dans d'autres pays comme les Etats-Unis (Zhao and Doyle 2006). En Europe, un projet de règlement prévoit l'autorisation de l'utilisation de 4 molécules pour la décontamination des carcasses en fin de chaîne : le dioxyde de chlore, le chlorure de sodium acidifié, le phosphate trisodique et les peroxyacides (Anonymous 2007).

Ces quatre molécules ont montré une efficacité pour diminuer la charge des carcasses en campylobacter d'au moins un facteur 10 à 100, en fonction des conditions d'utilisation et d'étude (Corry and Atabay 2001; Zhao and Doyle 2006).

##### ➤ Méthodes physiques

- Irradiation

Les campylobacters sont plus sensibles aux radiations gamma que la plupart des bactéries à gram négatif (dont les salmonelles et les *Escherichia coli*) (Patterson 1995). L'intensité des radiations est de

**Figure 5. Sites et niveaux de contamination des carcasses à l'abattoir et stress subis par les campylobacters d'après Dromigny (2007)**

ETAPES DE LA TRANSFORMATION DES VOLAILLES	NIVEAU DE CONTAMINATION PAR CAMPYLOBACTER	ORIGINE DE LA CONTAMINATION	STRESS SUBIS PAR CAMPYLOBACTER	NATURE DU STRESS
Chargement des volailles dans les caisses de transport, attente	+	Contamination croisée des volailles vivantes par les souillures dans la caisse de transport		
Déchargement des volailles			Nettoyage et désinfection des caisses de transport	Stress chimique désinfectant
Accrochage Anesthésie Saignée et égouttage				
Echaudage	+++	Contaminations croisées superficielles par l'eau	Eau chaude T° < 53°C : survie des campylobacters T° > 53°C : réduction du nombre de campylobacter	Stress thermique Stress hypoosmotique
Plumaison	+++	Contaminations croisées superficielles par l'équipement		
Arrache tête et trachée, finition de la plumaison, saisies, coupe-pattes				
Chaine éviscération : - décroaqueuse - éviscéreuse - époumoneuse - égalisation des peaux de cou	+++	Contaminations croisées superficielles par l'équipement	Nettoyage et désinfection de l'abattoir	Stress chimique désinfectant
Rinçage des carcasses	-	Contaminations croisées superficielles par l'eau des spin-chiller		
Ressuage	+	Réduction par réfrigération ventilée		Stress thermique Stress hydrique (dessiccation)
Découpe	+ - si retrait de la peau	Contamination croisée superficielle et profonde		
Conservation	-- si congélation			Stress thermique

0,12 à 0,32 kGy sur de la viande ressuée, et doit être augmentée sur de la viande congelée. Cette méthode est très efficace et en particulier contre les micro-organismes présents dans la peau de la volaille. Elle peut être utilisée en fin de chaîne, sur des carcasses entières ou découpées, fraîches ou congelées. Cependant, cette méthode coûte très cher et elle est difficilement acceptée par les consommateurs (Corry and Atabay 2001).

- Congélation

La congélation est utilisée dans de nombreux pays nordiques (Norvège, Suède, Islande). Les carcasses ou les produits de découpe des carcasses issues de lots de volailles positifs pour campylobacter sont congelés pendant plusieurs semaines. Le nombre de campylobacters peut-être réduit d'un facteur 10 à 100. Les coûts sont élevés, mais cette méthode réduit considérablement la charge des campylobacters sur le produit final et donc le risque pour le consommateur (Wagenaar, Mevius et al. 2006).

- Utilisation des ultra-violets (UV)

Les campylobacters sont sensibles aux ultra-violets (Obiri-Danso, Paul et al. 2001), mais cette méthode est difficilement utilisable sur les carcasses car il est difficile de faire pénétrer les rayons UV dans la peau des volailles (Corry and Atabay 2001).

#### 4.4 Mécanismes de survie des campylobacters pendant les étapes d'abattage et dans les aliments

La figure 5 présente les sites de contaminations des carcasses à l'abattoir et les différents stress. En raison de leur cycle épidémiologique, les campylobacters doivent survivre entre les hôtes animaux et l'homme. Dans l'environnement, ils sont exposés à l'oxygène de l'air, à des températures inférieures à leur température minimale de croissance ou à des températures élevées, à la dessiccation, aux rayons UV et à d'autres facteurs de stress. A la différence des autres pathogènes alimentaires, les campylobacters sont incapables de croître en présence d'air, de se multiplier en dehors de leurs hôtes et sont très sensibles à de nombreuses conditions environnementales (Park 2002). Malgré ces contraintes, les campylobacters survivent de la volaille jusqu'à l'assiette du consommateur et sont aujourd'hui considérés comme la première cause bactérienne d'infection d'origine alimentaire chez l'homme.

##### 4.4.1 Les formes viables non cultivables (VNC)

###### 4.4.1.1 Définition

Au laboratoire, les formes viables non cultivables sont obtenues en microcosmes aqueux (privation nutritionnelle). Ce sont les cellules, au sein d'une suspension bactérienne, qui conservent une activité métabolique (ou respiratoire) résiduelle mais qui sont :

- Incapables de se reproduire dans ou sur un milieu normalement adapté à leur culture ;
- Non revivifiables par les techniques classiques de revivification ;

dans les conditions normalement considérées comme optimales et pendant le temps de l'expérimentation (Federighi 1999).



#### 4.4.1.2 Rôle des formes VNC dans la survie des campylobacters

La première description de forme VNC pour campylobacter a été rapportée en 1986 (Rollins and Colwell 1986). Les *Campylobacter* sp. sont capables de passer sous une forme VNC lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables et en particulier dans l'eau. Le rôle des formes VNC reste controversé. Les formes VNC seraient capables de coloniser des poulets par le biais de l'eau de boisson (Pearson, Greenwood et al. 1993), mais ces résultats ne sont pas toujours reproductibles. Ainsi, le rôle des formes VNC de *C. jejuni* au regard de la colonisation des animaux est incertaine et il est probablement variable en fonction des souches et des espèces animales (Park 2002). Cependant, et malgré la controverse, l'état VNC joue probablement un rôle important dans la survie de campylobacter dans l'environnement (Murphy, Carroll et al. 2006).

#### 4.4.2 La formation de biofilm

Les campylobacters sont capables de former des biofilms dans les environnements aquatiques (Buswell, Herlihy et al. 1998; Zimmer, Barnhart et al. 2003). L'environnement créé au sein du biofilm peut protéger campylobacter de l'oxygène de l'air. Dans les biofilms, campylobacter peut passer sous la forme VNC (Trachoo, Frank et al. 2002). Les biofilms jouent probablement un rôle important dans la survie des campylobacters dans les environnements agroalimentaires (Murphy, Carroll et al. 2006).

#### 4.4.3 Survie dans les protozoaires

Il a été démontré que des souches de *C. jejuni* étaient capables d'infecter le protozoaire *Acanthamoeba polyphaga*. Dans ces cellules, les campylobacters ont une survie plus longue que lorsqu'ils sont en culture planctonique (Axelsson-Olsson, Waldenstrom et al. 2005). Dans une autre étude réalisée sur des échantillons d'eau de boisson d'élevages intensifs de volailles, *C. jejuni* a pu être détecté dans une grande variété de protozoaires. Ces bactéries présentaient également une survie plus longue dans les protozoaires que dans les cultures planctoniques, mais en plus, elles étaient significativement plus résistantes à un désinfectant utilisé en élevage de volaille (Virudine®) (Snelling, McKenna et al. 2005).

#### 4.4.4 Les autres mécanismes de survie

##### 4.4.4.1 Survie à la chaleur

Les campylobacters sont sensibles à la chaleur et sont inactivés par la pasteurisation et la cuisson des aliments. Les traitements thermiques détruisent rapidement la presque totalité (sinon la totalité) d'une population même importante de *C. jejuni*, cette thermosensibilité varie en fonction de l'aliment dans lequel se trouve *C. jejuni* (Dromigny 2007). Quelques protéines chaperonnes ont été identifiées chez campylobacter (Parkhill, Wren et al. 2000). Ces protéines dégradent ou stabilisent les protéines anormales qui peuvent se former lors d'un stress chaud (Park 2002).

A l'abattoir, les procédés d'échaudage des volailles pourront donc être à l'origine d'une réduction du nombre de campylobacters en surface des carcasses. De même, une cuisson à cœur permet de réduire ou d'éliminer les campylobacters présents sur les aliments.

#### 4.4.4.2 Survie au froid

##### ➤ Survie au froid positif

Les campylobacters sont incapables de se multiplier en dessous de 30°C et par conséquent, on peut considérer que la multiplication des campylobacters est impossible pendant la préparation et la conservation des aliments. A la différence des autres microorganismes qui montrent une diminution graduelle de leur croissance avec la réduction de température, les campylobacters présentent un arrêt brutal de leur croissance aux alentours de leur température de croissance minimale (Hazeleger, Wouters et al. 1998). Dans l'eau, les campylobacters ont une survie plus longue à 4°C qu'à 25°C. Des différences de survie en fonction de l'origine des souches ont été montrées : les souches isolées chez l'homme ont une survie plus longue à 4°C que les souches isolées chez la volaille (Chan, Le Tran et al. 2001).

##### ➤ Survie à la congélation

La congélation entraîne une diminution rapide de la viabilité des campylobacters (les campylobacters peuvent être isolés après la congélation de viande et de produits de volailles).

Différents facteurs influent sur la sensibilité des campylobacters aux températures négatives :

- La composition du milieu dans lequel ils sont congelés
- Les conditions extérieures
- Le niveau initial de contamination
- La souche : la différence de tolérance à la congélation à -20°C est liée à la souche, mais ne semble pas liée à l'origine de la souche (Chan, Le Tran et al. 2001). Cependant, une étude récente n'a pas pu mettre en évidence de relation entre le génotype (déterminé par AFLP fluorescente) et la survie à la congélation (Wieland, Sandberg et al. 2006).

#### 4.4.4.3 Survie à la dessiccation

Les campylobacters sont très sensibles à la dessiccation, et la récupération des cellules de campylobacter est plus facile et plus fréquente sur les surfaces humides que sur les surfaces sèches (Corry and Atabay 2001).

Les phases de ressuage (à l'air) à l'abattoir qui combinent dessiccation et refroidissement entraînent une diminution du nombre de campylobacter présent à la surface de carcasses (Sanchez, Fluckey et al. 2002).

#### 4.4.4.4 Survie aux rayons UV

Les campylobacters sont sensibles aux rayons UV sous la forme des rayons du soleil. L'étude de la survie de *C. jejuni* dans la mer et dans les eaux de rivières a montré que les populations naturelles de campylobacter étaient plus résistantes aux UV que les populations issues de culture au laboratoire, sans que les différences mises en cause n'aient été identifiées (Obiri-Danso, Paul et al. 2001).

#### 4.4.4.5 Survie au stress oxydatif

L'exposition des campylobacters à l'oxygène entraîne la formation de composés intermédiaires comme les radicaux superoxydants. Si ces agents ne sont pas neutralisés, ils provoquent des lésions

fatales des acides nucléiques, des protéines et des composés membranaires. Les campylobacters possèdent quelques enzymes qui jouent un rôle dans le système de défense oxydatif (superoxyde dismutase, alkyl hydroperoxyde réductase, catalase). Mais les mécanismes clé de la défense contre le stress oxydatif, comme les enzymes SoxRS et OxyR présentes chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium*, sont absents chez campylobacter (Park 2002).

#### 4.4.5 Avantages conférés par la plasticité génomique des campylobacters

La diversité phénotypique et génotypique des campylobacters est facilement observable avec les méthodes de typage moléculaire (Wassenaar and Newell 2000; Meinersmann, Patton et al. 2002; Schouls, Reulen et al. 2003). Cette diversité suggère une forte plasticité génomique qui augmente le potentiel des campylobacters pour s'adapter et survivre dans des environnements hostiles (Newell, Shreeve et al. 2001; Murphy, Carroll et al. 2006). Dans une étude portant sur la diversité des profils du gène de la flagelline (typage *flaA*), il a été montré que de nombreux clones présents initialement au niveau de l'élevage se retrouvaient sur les carcasses après abattage sur lesquelles la diversité des clones observée était réduite (Hiett, Stern et al. 2002). Il a également été démontré, avec la même technique de typage, que certains sous-types isolés de volailles à l'élevage étaient capables de survivre à l'ensemble des transformations pendant les opérations d'abattage, que certains sous-types ne survivent qu'au ressuage et enfin, que certains sous-types ne sont jamais retrouvés sur les produits finis (Newell, Shreeve et al. 2001).

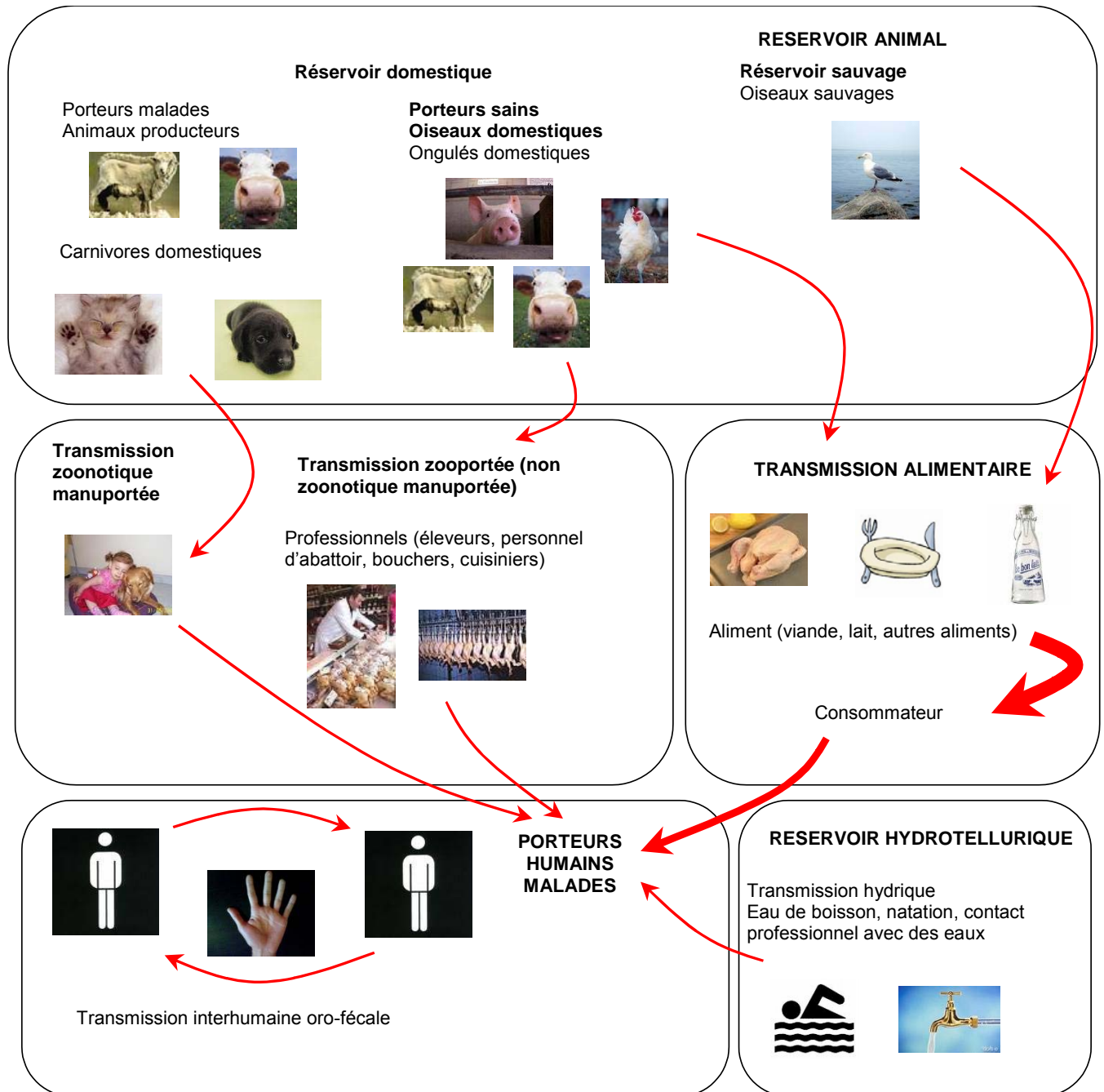
S'il était de la responsabilité des scientifiques au laboratoire de déterminer si campylobacter est susceptible de devenir un pathogène alimentaire, il serait certainement le dernier à être proposé. Pourtant, campylobacter est un grave problème de santé publique aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés. Les mécanismes de survie des campylobacters sont mystérieux, mais le séquençage du génome de cette bactérie, la compréhension de la variation génétique observée et l'utilisation de puces à ADN devraient permettre de mieux comprendre ces mécanismes (Murphy, Carroll et al. 2006).

Le contrôle des campylobacters le long de la chaîne de production de la viande de volailles sera d'autant plus efficace si la colonisation des animaux est empêchée. La réduction de la prévalence de l'infection à campylobacter dans la phase primaire diminue le nombre de campylobacters présents dans les phases suivantes ce qui permet de réduire la charge en campylobacters ou de protéger le produit final. En théorie, un niveau élevé de biosécurité à l'élevage devrait protéger contre campylobacter, cependant un niveau extrêmement élevé de biosécurité (mise en place des mesures d'hygiène) ne garantit pas forcément un lot négatif au moment de l'abattage. Pourtant actuellement, la seule intervention réalisable et (partiellement) efficace au niveau des élevages repose sur la biosécurité.

#### 4.4.6 Contribution de la viande de volaille aux infections humaines à campylobacter

- La mise en évidence de la viande de volaille comme principal aliment responsable des infections à campylobacter est indirecte, parce que la plupart des cas sont sporadiques et que l'identification de l'aliment contaminé n'est pas toujours faite. Les infections à campylobacter sont en relation avec une

Figure 6. Mode de transmission des campylobacters à l'homme d'après Dromigny (2007)



contamination alimentaire dans 80 % des cas, et parmi les aliments incriminés, le poulet apparaît le plus souvent en cause.

Le lien de causalité fort entre les cas sporadiques des infections humaines à campylobacter et la consommation de viande de poulets repose sur (critères de Hill) (Anonymous 2004):

- Une association mise en évidence dans les études cas-témoins
- Une plausibilité liée à la présence fréquente de campylobacters en grand nombre sur les carcasses de poulet
- L'effet d'intervention comme la congélation<sup>1</sup> (Islande 1998-2000) ou le retrait temporaire du poulet à la consommation<sup>2</sup> (Belgique 1999)

## 5 Epidémiologie des infections à campylobacter chez l'homme

### 5.1 Dose infectieuse pour l'homme

La dose minimale infectieuse (DMI) peut être déterminée par des études d'ingestion volontaire, par des études chez l'animal ou par des études épidémiologiques. Il ressort de l'ensemble des travaux qui ont été réalisés sur *C. jejuni* que la dose infectieuse est très variable. Les deux facteurs de variations les plus importants sont : la souche utilisée (effet souche) et le vecteur permettant l'absorption de la souche (effet protecteur vis-à-vis de la barrière gastrique). La plupart des expériences ont été réalisées avec le lait comme vecteur du germe ; cela ne permet pas de connaître les doses infectieuses ou les caractéristiques de la maladie après ingestion d'autres types d'aliments. Les expériences portent sur des volontaires qui ont ingéré de 500 à  $2 \cdot 10^9$  cellules. Le taux d'infection (culture de selles positives) s'accroît avec la dose reçue, mais les signes cliniques (fièvre, diarrhée) ne semble pas dose-dépendants. (Federighi 1999). Il ressort de ces expériences que la dose infectieuse peut-être très faible (500 cellules).

### 5.2 Sources de la contamination humaine par les campylobacters

#### 5.2.1 Modes de transmission des campylobacters à l'homme

Les campylobacters sont des bactéries ubiquitaires présentent dans trois réservoirs : le réservoir humain, le réservoir animal et le réservoir hydro-tellurique. La circulation des campylobacters entre ces trois réservoirs et les modes de transmission des campylobacters sont résumés dans la figure 6.

La transmission principale semble se faire par ingestion d'aliments contaminés insuffisamment cuits, principalement la volaille ou d'aliments (légumes) contaminés lors de leur préparation (contaminations croisées). L'eau et le lait cru sont également des sources de contamination identifiées lors de grandes

---

<sup>1</sup> De 1980 à 1996, seuls des poulets congelés étaient vendus en Islande et le taux d'infection à campylobacter était bas. Après l'autorisation de la vente de poulet frais dans ce pays, le taux d'infection à campylobacter a augmenté dans des proportions très importantes (la congélation diminuait d'une ou deux puissances de 10 la quantité de bactéries présentes sur les carcasses).

<sup>2</sup> En 1999 en Belgique, la production belge de poulets (60% du total) fut brutalement retirée du marché début juin à la suite de la crise de la dioxine et une diminution de 40% des cas d'infection à campylobacter ont été observés pendant cette période. La réintroduction de la volaille belge après 4 semaines a conduit à un retour à la situation antérieure.

**Tableau 7. Répartition des espèces de campylobacter isolées dans les entérites humaines. Résultats EPICOP (Weber, Laudrat et al. 2003)**

Espèce	Nombre de souches	%
<i>C. jejuni</i>	73	89.0
<i>C. coli</i>	8	9.8
<i>C. upsaliensis</i>	1	1.2

épidémies. On observe une variation saisonnière des entérites à campylobacter chez l'homme avec un pic pendant les mois les plus chauds (Anonymous 2004).

### 5.3 Symptômes cliniques

Les campylobacters sont des bactéries entériques, acquises par voie orale et adaptées à la vie dans le mucus du tractus digestif. Pour ces raisons, la maladie humaine la plus fréquemment associée aux campylobacters est une entérite aiguë causée par une infection intestinale, qui peut se compliquer d'une bactériémie, de localisations secondaires, et d'un syndrome post-infectieux (Anonymous 2004).

#### 5.3.1 Entérite à campylobacter

Les quatre principales espèces responsables d'infections digestives sont *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis*. Il est admis généralement que *C. jejuni* représente 95% des cas de gastro-entérites provoqués par campylobacter chez l'homme (Federighi 1999). Le tableau 7 indique la répartition des espèces de campylobacter isolées dans les entérites humaines en France (résultats d'une enquête EPICOP, réseau de laboratoire de biologie médicale, en 1999-2000)(Weber, Laudrat et al. 2003).

##### 5.3.1.1 Infections digestives dues à *C. jejuni*

D'un point de vue général, les signes cliniques et les symptômes d'infections à *C. jejuni* ne sont pas assez spécifiques pour être facilement distingués d'infections provoquées par d'autres entéropathogènes. On peut observer divers degrés d'intensité, d'un bref épisode de gastro-entérite à une entérocolite sévère durant plusieurs semaines, accompagnée de douleurs abdominales et d'une diarrhée sanglante. La durée d'incubation est importante, en moyenne de 1 à 7 jours, ce qui pose des problèmes lors de la recherche du repas ou des aliments à incriminer à la suite d'un épisode de toxoinfection alimentaire.

Les prodromes sont caractérisés par l'apparition de la fièvre qui peut rapidement atteindre 40°C ; on peut noter aussi des malaises, des maux de tête et des douleurs musculaires. Cette période peut durer jusqu'à deux jours.

Ensuite, le patient souffre de nausées et ressent des crampes abdominales typiquement localisées à la région péri-ombilicale. Commence alors la phase d'état ou de diarrhée, caractérisée par l'apparition d'une diarrhée qui peut être profuse (nombre de selles supérieures à six par jour). Les selles sont aqueuses ou muqueuses. Après deux ou trois jours, on peut y voir apparaître du sang en nature. Des vomissements peuvent être observés. La maladie dure rarement plus de huit jours, la diarrhée aiguë s'étendant sur trois jours au plus, à la suite desquels le malade se sent faible et épuisé. Au cours de la phase d'évolution, tous les signes régressent et la guérison survient sans séquelles. Cependant, environ 25% des patients ressentiront encore des douleurs abdominales, jusqu'à 6 semaines parfois.

Toutefois, les signes cliniques ne s'expriment pas avec la même fréquence ni la même intensité chez tous les patients ; de nombreux facteurs entrent en jeu, notamment l'âge, l'environnement, le milieu social. La bénignité habituelle de l'évolution clinique contraste avec l'impression très désagréable généralement ressentie par le patient lors d'une campylobactériose : prostration, douleur très importante, impression de « mort imminente ». L'excrétion du germe peut durer de 2 à 5 semaines, voire plusieurs mois (Federighi 1999; Dromigny 2007).

#### 5.3.1.2 Infections digestives dues aux autres campylobacters

*C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis* provoquent également des gastro-entérites chez l'homme. Ces entérites sont souvent difficiles à différencier de *C. jejuni* (cliniquement et microbiologiquement) (Federighi 1999).

#### 5.3.1.3 Traitement

Dans la plupart des cas, l'infection intestinale rétrocede spontanément en moins d'une semaine, mais les antibiotiques peuvent être indiqués pour les cas graves. Pour *C. jejuni*, le traitement antibiotique réduit la durée de la diarrhée et la durée d'excrétion des campylobacters dans les selles. Les antibiotiques de choix sont les macrolides avec l'érythromycine en tête de file et les fluoroquinolones (ciprofloxacine et norfloxacine) (Avrain and Kempf 2000; Aarestrup and Engberg 2001; Gibreel and Taylor 2006). Les aminoglycosides peuvent également être administrés par voie intraveineuse lors d'infection très sévère ou de septicémie (Aarestrup and Engberg 2001). Lorsqu'un traitement antibiotique est nécessaire, plus il est administré tôt dans le développement de la maladie, plus la durée de la maladie est réduite (Ternhag, Asikainen et al. 2007).

#### 5.3.2 Complications et séquelles

L'entérite aiguë peut se compliquer de bactériémie, de localisations secondaires et d'un syndrome post-infectieux. La déshydratation est parfois très marquée, ce qui justifie une hospitalisation.

##### 5.3.2.1 Infections systémiques

Les campylobacters sont des bactéries considérées comme invasives qui peuvent transloquer et se retrouver dans le torrent circulatoire. Néanmoins la fréquence des bactériémies et septicémies détectées en cas d'entérites à campylobacters thermotolérants reste très faible (0.1%) notamment par rapport à ce qui est observé pour les salmonelles (Anonymous 2004)..

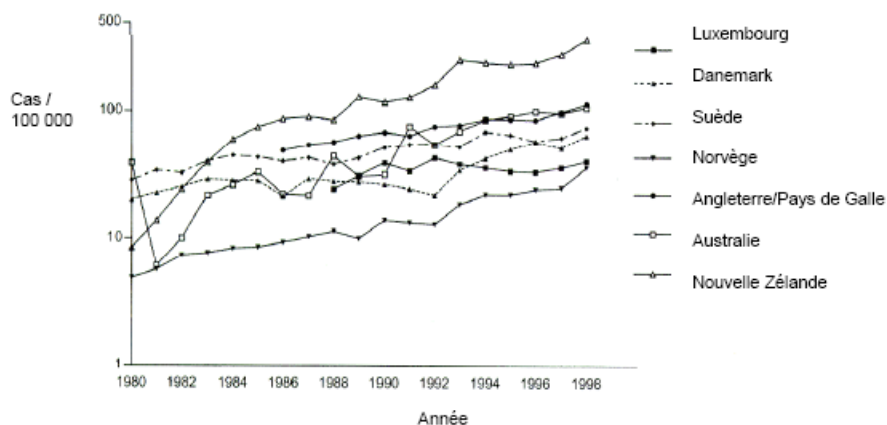
*C. fetus* est une espèce peu fréquente comme cause d'entérite mais souvent retrouvée dans les infections systémiques. Il est généralement admis que 90% des septicémies à campylobacter sont dues à *C. fetus*. De manière presque systématique, la dissémination sanguine fait suite à une porte d'entrée digestive. Des formes nerveuses peuvent être provoquées par cette bactérie (méningites purulentes), et des formes suppuratives dans d'autres localisations (pus pleural, liquide péricardique, abcès sous-cutané...). Quelle que soit la forme prise, *C. fetus* subsp. *fetus* est essentiellement un pathogène opportuniste ; il intervient sur des terrains fragilisés (alcoolisme, cirrhose, thérapie immunodépressive, SIDA, diabète) (Federighi 1999).

##### 5.3.2.2 Syndromes post-infectieux faisant suite à une infection à *C. jejuni*

Les complications sont rares (moins de 1% des cas). Trois syndromes au mécanisme incertain sont attribués à *C. jejuni* à l'exclusion des autres espèces du genre : le syndrome de Guillain-Barré (SGB), le syndrome de Miller-Fisher (SMF) et le syndrome hémolytique et urémique (SHU). Ils surviennent au cours ou à la suite d'une entérite aiguë ; le germe n'intervient pas par sa virulence mais comme indicateur de réactions complexes, probablement à médiation immunologique. Le SGB est une atteinte neurologique se caractérisant par une paralysie flasque, le plus souvent réversible. Ce



**Figure 7. Incidence des infections à campylobacter dans sept pays industrialisés de 1980 à 1998 (Anonymous 2004)**



**Tableau 8. Estimations les plus plausibles pour les campylobacters et les salmonelles non-typiques du nombre moyen annuel de cas (InVS 2004)**

Infections à	Nombre moyen annuel estimé toutes origines			% origine alimentaire
	Cas	Cas hospitalisés	Cas décédés	
<i>Campylobacter</i> spp.	15 995-21 652	3 247-4 395	16-22	80
<i>Salmonella</i> non Typhi	32 208-43 304	5 991-10 739	97-563	95

Infections à	Nombre moyen annuel estimé d'origine alimentaire		
	Cas	Cas hospitalisés	Cas décédés
<i>Campylobacter</i> spp.	12 796-17 322	2 598-3 516	13-18
<i>Salmonella</i> non Typhi	30 598-41 139	5 691-10 202	92-535

syndrome réputé réversible est en fait très sévère avec une mortalité de 2 à 3%, des séquelles neurologiques majeures dans 20% des cas et une récupération partielle ou totale après quelques semaines ou mois pour les autres cas. On estime que 20 à 50% des cas de SGB, les plus sévères, seraient dus à une infection par campylobacter. Le traitement consiste en une plasmaphérèse. Le SMF comporte ataxie et ophtalmoplégie, il constitue une variante peu fréquente du SGB (Anonymous 2004). Le SHU survient chez l'enfant et constitue une éventualité fréquente au cours d'un syndrome entérique (Federighi 1999).

#### 5.4 Incidence de la maladie

Campylobacter est peu présent dans les bilans de fréquence d'isolement dans les selles diarrhéiques à la fin des années 70. C'est au début des années 80 que l'on a pu commencer à apprécier l'importance réelle des infections à campylobacter grâce à l'amélioration des procédés de culture fécale. De nos jours, les campylobacters sont reconnus comme une des principales voire la première cause de gastro-entérites bactériennes d'origine alimentaire dans le monde (Altekruse, Stern et al. 1999; Anonymous 2003; Butzler 2004; Hariharan, Murphy et al. 2004; Schlundt, Toyofuku et al. 2004; Moore, Corcoran et al. 2005; Snelling, Matsuda et al. 2005; Wagenaar, Mevius et al. 2006).

L'incidence annuelle estimée des infections à campylobacter dans la population générale varie selon les pays (figure 7)

En France, les entérites à campylobacter ne sont pas inscrites sur la liste des maladies à déclaration obligatoire. Mais les TIAC (toxi-infection alimentaire collective) font l'objet d'une déclaration obligatoire. Entre 1997 et 2000, les campylobacters étaient identifiés dans 0.4% des TIAC. Un réseau d'épidémiosurveillance a été créé en 2002 incluant 250 laboratoires d'analyse médicale répartis sur le territoire métropolitain (Anonymous 2004). La surveillance au niveau national est réalisée par le CNR (centre national de référence) des campylobacters et hélicobacters au CHU de Bordeaux (<http://www.cnrch.u-bordeaux2.fr/cnrch.php>). L'InVS (Institut de veille sanitaire) a présenté en 2004 un rapport dont l'objectif était de fournir une estimation de la morbidité et de la mortalité liées aux agents infectieux transmis par l'alimentation pour les années 1990 en France métropolitaine. Pour les campylobacters et les salmonelles non-typhiques, les résultats de l'estimation de la morbidité et de la mortalité annuelle totales et d'origine alimentaire sont présentés dans le tableau 8. La recherche de campylobacter dans les coprocultures n'étant pas systématique en France et cette recherche étant relativement difficile (par rapport aux salmonelles), le nombre de cas confirmés estimé à partir du nombre de cas confirmés observé est une sous-estimation du nombre de cas qui auraient pu être confirmés. Cette sous-estimation doit être prise en compte pour juger du poids de ces infections par rapport à celles liées aux salmonelles (InVS 2004). Les facteurs suivants peuvent expliquer la sous-estimation des infections à campylobacter en France (Anonymous 2004) :

- Les campylobacters sont rarement impliqués dans les TIAC de grande ampleur car, à la différence des salmonelles, ils ne sont pas capables de se multiplier dans les aliments
- Il existe un défaut de diagnostic des campylobacters car :
  - Le diagnostic bactériologique des campylobacters est techniquement plus difficile que celui des salmonelles, chez l'homme et dans les aliments.

- Il n'y a pas de recherche systématique de campylobacter dans les coprocultures, contrairement aux salmonelles.
  - Les praticiens ne pensent pas à demander une recherche de campylobacter lors des prescriptions de coproculture.
- La durée d'incubation des infections à campylobacter est longue (1 à 10 jours) ce qui majore les difficultés diagnostiques en raison des délais prolongés entre le moment de la contamination, la maladie et les démarches d'investigation (Anonymous 2004).

## 5.5 Impact économique des infections à campylobacter chez l'homme

Les symptômes intestinaux des infections à campylobacter ne sont pas toujours un motif de consultation médicale, ni de déclaration. En outre, les coprocultures ne sont pas systématiquement effectuées, et quand elles le sont, la recherche de campylobacter, bactérie difficile à isoler, n'est pas toujours réalisée. Campylobacter est donc vraisemblablement à l'origine de pertes économiques importantes à cause des arrêts de travail, de la perte de productivité et de la consommation médicale induite (Avrain and Kempf 2000) (Gibreel and Taylor 2006).

## 5.6 Réglementation relative à campylobacter

### 5.6.1 Textes européens (Dromigny 2007)

- Parmi les règlements, il y a des textes généraux qui ne parlent pas de campylobacter mais qui s'y appliquent par voie de conséquences : ce sont les règlements du « paquet hygiène » R-852/2004, R-853/2004. Le Règlement 2160/2003 (règlement (CE) n° 2160/2003 du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003) sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques présents dans la chaîne alimentaire traite de campylobacter, et vise à réduire la prévalence de certaines zoonoses chez les populations animales.
- La directive 2003/99/CE (directive du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003 sur la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques, modifiant la décision 90/424/CEE du Conseil et abrogeant la directive 92/117/CEE du Conseil, *Journal officiel* n° L 325 du 12/12/2003) complète le règlement 2160/2006.
- Trois décisions traitent du programme de surveillance de campylobacter chez les poulets de chair tel qu'il a été prévu par la Suède (en 2000, 2001 et 2003) et une décision concerne un projet de règlement relatif à l'étiquetage de la viande de volaille.
- Une recommandation (recommandation de la Commission du 19 décembre 2003 relative à un programme coordonné de contrôle officiel des denrées alimentaires pour 2004, *Journal officiel* n° L 006 du 10/01/2004) indique : « À l'heure actuelle, les informations scientifiques disponibles ne sont pas suffisantes pour fixer dans la législation communautaire un critère applicable à campylobacter; des études complémentaires sont menées afin de mieux comprendre l'épidémiologie de cet agent pathogène ainsi que le rôle joué par les autres produits animaux et par les autres denrées alimentaires en général. Ce volet du programme vise à évaluer la sécurité microbiologique de la viande de volaille fraîche en ce qui concerne campylobacter, en vue de favoriser un niveau élevé de protection des consommateurs et de recueillir des informations sur la