

Prévalence et polymorphisme génétique de *Campylobacter* thermotolérant chez les poulets villageois à l'abattage dans des marchés du District de Bamako

Mariam B DOUMBIA^{1,2}, Ibrahim KEITA², Lassana B TRAORE¹, Ousmane KOITA²

¹Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Environnemental, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Mali

²Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Mali.

RESUME : Les bactéries du genre *Campylobacter* constituent l'une des principales causes de gastro-entérites humaines. La source primaire de l'infection chez l'Homme serait due à la manipulation ou à la consommation de viandes contaminées, en particulier la viande de volaille. L'objectif de cette étude était d'estimer la prévalence en *Campylobacter sp.* chez les poulets villageois dans les 6 communes du District de Bamako. L'identification des *Campylobacter* a porté sur les tests biochimiques et les méthodes moléculaires (PCR-RFLP). Les résultats obtenus grâce aux tests biochimiques, indiquent une prévalence élevée en *Campylobacter* thermotolérants de 72,22% (26/36) dans le District de Bamako. Parmi les 26 souches de *Campylobacter* thermotolérants testées par les méthodes moléculaires, aucune souche de *C. coli*, *C. jejuni* et *C. lari* n'a été retrouvée. Cependant trois de ces isolats (CV.3, CVI.4 et CVI.6) étaient phylogénétiquement proche de *C. Coli*, *C. jejuni* et *C. lari* avec une similarité d'au moins 60, 70 et 80 % respectivement. Cette étude montre la nécessité d'une surveillance épidémiologique des campylobactérioses dans le District de Bamako.

Mots clés : *Campylobacter*, poulet villageois, District de Bamako, PCR-RFLP

INTRODUCTION

Les toxi-infections d'origine alimentaire constituent la cause la plus fréquente de maladies entériques chez l'homme (Thorns, 2000). Parmi les microorganismes impliqués, les bactéries du genre *Campylobacter* constituent l'une des 4 principales causes mondiales de maladies diarrhéiques. Le genre *Campylobacter* regroupe des bactéries à Gram négatif, asporulées, en forme de S ou de spirale, il possède un seul flagelle polaire à l'une ou aux 2 extrémités, leur donnant une mobilité caractéristique en vrille (Dabboussi et al., 2012). Certaines espèces de *Campylobacter* sont thermotolérantes et constitueraient la principale cause de maladies entériques zoonotiques dans la plupart des pays en développement (Friedmam et al. 2000). Les espèces *C. jejuni* et *C. coli* sont le plus souvent incriminées et seraient à la base des entérites aiguës et des douleurs abdominales chez l'Homme qui peuvent évoluer vers une

complication, le syndrome de Guillan-Barré (Skirrow et Blaser, 2000). Les symptômes cliniques les plus fréquents chez l'Homme sont des diarrhées (souvent sanglantes), des douleurs abdominales, fièvre, céphalées, nausées et/ou vomissements (Peterson, 1994). La source primaire de l'infection chez l'Homme serait due à la manipulation ou consommation de viandes (viande de volaille, produits lait) contaminés 85% des cas, ou de l'eau contaminées 15% des cas, ou liée à un contact avec un animal de compagnie ou de ferme 5% des cas (Taylor et al., 2013). Des *Campylobacter* ont été isolés de nombreux animaux d'élevage, incluant des porcelets, des agneaux et des veaux, avec entérite, mais aussi chez les animaux sains. Chez les oiseaux, en particulier les volailles, les symptômes de la maladie sont rares, sinon inexistantes, en dépit de hauts niveaux de colonisation par *C. jejuni* ou *C. coli*. Différentes études ont montré que le risque de contamination externe des carcasses

du poulet se situe principalement au moment de l'éviscération qui est considérée comme une source majeure d'infections alimentaires humaines (Bily et *al.*, 2010).

Au Mali, les activités avicoles occupent une place de choix sur le plan économique. Le cheptel aviaire était estimé en 2012 à 42 millions (FAO, 2013). Ces dernières années, des fermes avicoles se sont multipliées à la périphérie des centres urbains. Face à cette forte dynamique de production, l'examen de la qualité des poulets est une nécessité pour la protection des consommateurs et la survie des fermes contre les risques d'épidémie bactérienne, virale et fongique. En effet, dans la filière *Gallus gallus*, *Campylobacter* est présent à tous les stades de la chaîne avec une très forte prévalence de contamination (Hue et *al.*, 2010). Il existe un programme de prévention et de lutte contre les maladies aviaires mais la recherche de *Campylobacter* n'est encore pas un travail de routine au Mali.

La présente étude a pour but d'estimer la prévalence en *Campylobacter sp.* chez les poulets villageois abattus dans des marchés du District de Bamako et déterminer leur polymorphisme génétique.

MATERIEL ET METHODES

Echantillonnage

Des prospections ont été conduites dans les six (6) communes du District de Bamako, Mali (Figure 1). Sur la base de la disponibilité et de l'effectivité de la vente de poulets villageois (poulets locaux), deux (2) marchés ont été sélectionnés par communes. Dans chacun des marchés, des prélèvements ont été effectués de façon aléatoire au niveau du caecum des poulets villageois juste après l'éviscération auprès des vendeurs. Un total de trois échantillons par marché a été prélevé, étiqueté et acheminé sous régime du froid au laboratoire. Les 36 échantillons ainsi collectés ont été traités dans les 24 heures qui ont suivis le prélèvement.

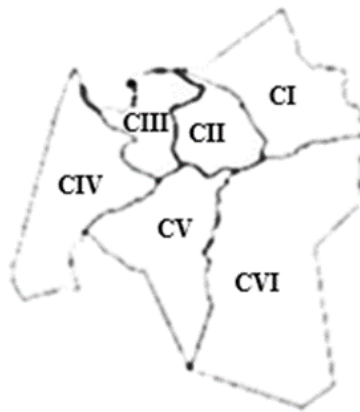


Figure 1 : Carte de Bamako présentant les 6 communes du District de Bamako

Isolement et purification de *Campylobacter* thermotolérant

Les cæcums ont été coupés du reste de l'intestin et ouverts avec des ciseaux stériles.

Un gramme de l'excrément caecal de chaque poulet a été suspendu dans 9 ml d'eau physiologique stérile et l'isolement a été réalisé sur le milieu Agar au charbon, à la céfopérazone et au Désoxycholate (CCDA) additionné du supplément sélectif

(Pronadisa, Madrid, Espagne). Les cultures ont été incubées à 42 °C pendant 48 heures dans une étuve à dioxyde de carbone (CHP-8), sous atmosphère micro aéroophile. Les colonies présentant les caractéristiques culturales de *Campylobacter spp.* ont été purifiées par repiquage sur le milieu CCDA et conservées à - 80°C dans du glycérol à 20%.

Test de confirmation

La mobilité des isolats a été déterminée par l'observation microscopique à l'état frais. Une coloration de Gram et des tests biochimiques rapides (recherche de catalase et d'oxydase) ont été réalisés sur chaque isolat pour confirmer le diagnostic.

Extraction de l'ADN

Une suspension bactérienne a été réalisée dans 100 µl d'eau stérile ultra pure (Ultra Pure Water, KD Medical, Oakland Mills Road, Coulumbia, MD, USA) et incubée au bain-marie à 100 °C pendant 10 minutes. Après centrifugation à 14000 rpm pendant 20 minutes, le surnageant a été récupéré pour la caractérisation moléculaire.

Polymerase chain reaction (PCR)

Pour amplifier le gène de l'ARNr 16S, le master mix MyFi™ de la compagnie Bioline (Meridian Life Science) a été utilisé. La paire d'amorces Univ-0008-a-S-19F:

GAGTTTGATCCTGGCTCAG et Univ-1528-a-A-17r: AAGGAGGTGATCCAGCC a été utilisée. Le mélange réactionnel a été constitué selon les instructions du fabricant (0,4 µM de chaque amorce ; 1X de Master mix MyFi et 200 ng d'extrait d'ADN). La PCR a été réalisée dans un thermocycleur (PTC 200 (MJ Research, MD, USA) et le programme d'amplification était constitué d'une étape de dénaturation initiale à 95 °C pendant

1 minute suivie de 35 cycles de dénaturation (95 °C, 15 s), d'appariement (60 °C, 15 s) et d'élongation (72 °C, 15 s).

Digestion enzymatique

Pour déterminer le polymorphisme des *Campylobacter* thermotolérants isolés, nous avons utilisé séparément 3 enzymes de restriction pour digérer les produits de la PCR. Les enzymes *EcoRI*, *AluI*, *HaeIII* (Promega, Woods Hollow Road, Madison, Wisconsin, USA) ont été utilisées. La restriction enzymatique a été réalisée à 37 °C pendant 4 heures selon les instructions du fabricant.

Electrophorèse

Les produits de la PCR et leurs fragments de restriction ont été séparés sur un gel d'agarose à 1,5 %. Les bandes rendues fluorescentes par le bromure d'éthidium (0,3µg/ml d'agarose) ont été photographiées sous la lumière Ultra-Violette du transilluminateur (UVP®) couplé à un ordinateur.

Analyse phylogénétique

Le profil de restriction de *C. coli*, *C. jejuni* et *C. lari* pour les enzymes *EcoRI*, *HaeIII* et *AluI* a été déterminé *in silico* grâce au logiciel Geneious 10.0.7. A partir des données de clivage enzymatique, une Classification Hiérarchique Ascendante (CAH) a été effectué sous XLSAT-PRO 7.5 à l'aide du matrix de proximité (indice de Jaccard).

RESULTATS

Caractères phénotypiques

L'isolement sur le milieu CCDA à partir des cæcums a permis d'obtenir 26 isolats de *Campylobacter* thermotolérants sur les 36 échantillons collectés dans 12 marchés du District de Bamako soit une prévalence de 72,22 %. Sur le milieu CCDA, les colonies caractéristiques étaient

grisâtres, plates et humides avec une tendance à l'étalement avec un reflet métallique. Les 26 isolats étaient de fins bacilles Gram négatif en forme incurvé, catalases positives (+), oxydases positives (+) et avaient une mobilité en vrille. Le Tableau I donne la répartition des échantillons positifs à la présence de *Campylobacter* thermotolérants.

Tableau I : Répartition des échantillons contenant des *Campylobacter* thermotolérants en fonction de leur commune d'origine

Communes	Nombre d'échantillons collectés	Nombre d'échantillons contenant des <i>Campylobacter</i> thermotolérants
Commune I	6	1
Commune II	6	1
Commune III	6	6
Commune IV	6	6
Commune V	6	6
Commune VI	6	6
Total	36	26

Profils moléculaires des souches de *Campylobacter thermotolérant*

L'ADN des 26 isolats de *Campylobacter thermotolérants* a été amplifié en utilisant une paire d'amorces universelles à toutes les bactéries. Des fragments d'environ 1600 pb ont été obtenus avec tous les 26 isolats et ont été digérés par trois enzymes de restriction pour déterminer le polymorphisme génétique.

Profil de restriction avec l'enzyme *EcoRI* des isolats de *Campylobacter thermotolérants*

La figure 2 montre l'image des fragments de restriction obtenue après digestion par l'enzyme *EcoRI*. Pour tous les isolats un même profil a été observé, caractérisé par deux fragments de restriction de taille respective 884pb et 686pb. Ces résultats montrent que les 26 isolats de *Campylobacter* ont en commun un site de restriction sur leur gène de l'ARNr 16S pour l'enzyme *EcoRI*.

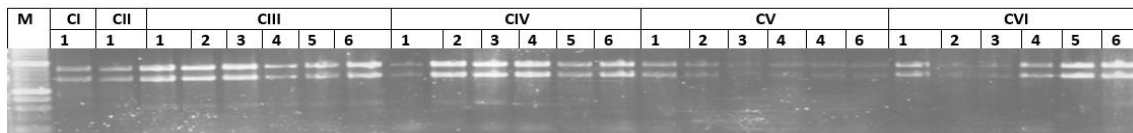


Figure 2 : Profil de restriction obtenu après digestion par l'enzyme *EcoRI* du gène de l'ARN 16S
M= marqueur ; 1-2-3-4-5 et 6 numéro d'ordre d'isolement de la souche de *Campylobacter thermotolérant* dans la commune.

Profil de restriction avec l'enzyme *HaeIII* et *AluI* des isolats de *Campylobacter thermotolérants*

La digestion par l'enzyme *HaeIII* et *AluI* du gène de l'ARNr 16S des souches de *Campylobacter thermotolérants* a permis d'obtenir 7 profils distincts de restriction représentés sur les figures

3 et 4. Le nombre et la taille des fragments de restriction pour chaque type de profil sont consignés dans le tableau II

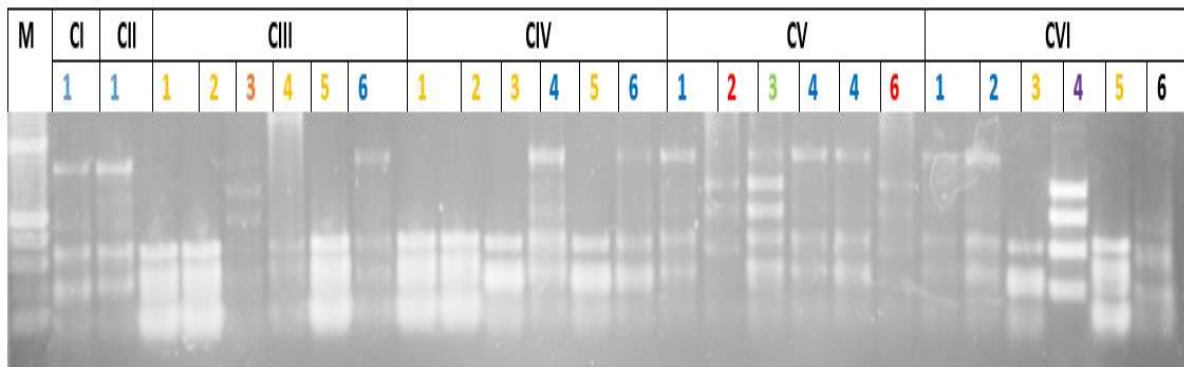


Figure 3 : Profil de restriction obtenu après digestion par l'enzyme *HaeIII* du gène de l'ARN 16S

Nb : Les chiffres de même couleur représentent des souches de profils identiques

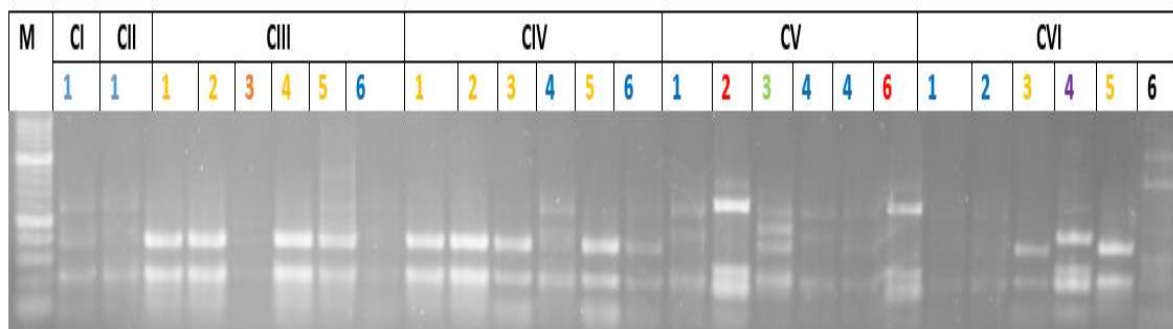


Figure 4 : Profil de restriction obtenu après digestion par l'enzyme *AluI* du gène de l'ARN 16S

Tableau II : Profil de restriction avec l'enzyme *HaeIII* et *AluI* des isolats

Enzyme	Taille/Nombre	Profil de restriction						
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
<i>HaeIII</i>	Taille (pb)	809	324	598	632	610	573	467
		340	251	446	468	458	429	339
		198	226	226	319	333	289	176
			176			224	146	
	Nombre de fragments	3	4	3	3	4	4	3
<i>AluI</i>	Taille (pb)	582	381	500	608	575	579	777
		365	226	376	241	460	400	427
		202		226	181	358	218	300
					194	183	189	
	Nombre de fragments	3	2	3	3	4	4	4
Nombre de souches (n=26)		10	10	1	2	1	1	1

P = Profil de restriction

Relation phylogénétique des données de clivage enzymatique

La figure 5 montre les résultats de la Classification Ascendante Hiérarchique des données de clivage enzymatique. L'arbre phylogénétique généré a

permis de regrouper les *Campylobacter* thermotolérants en 4 classes selon leur indice de similarité. L'indice de similarité la plus faible observée entre les classes était de 0,65 et la plus élevée 0,80.

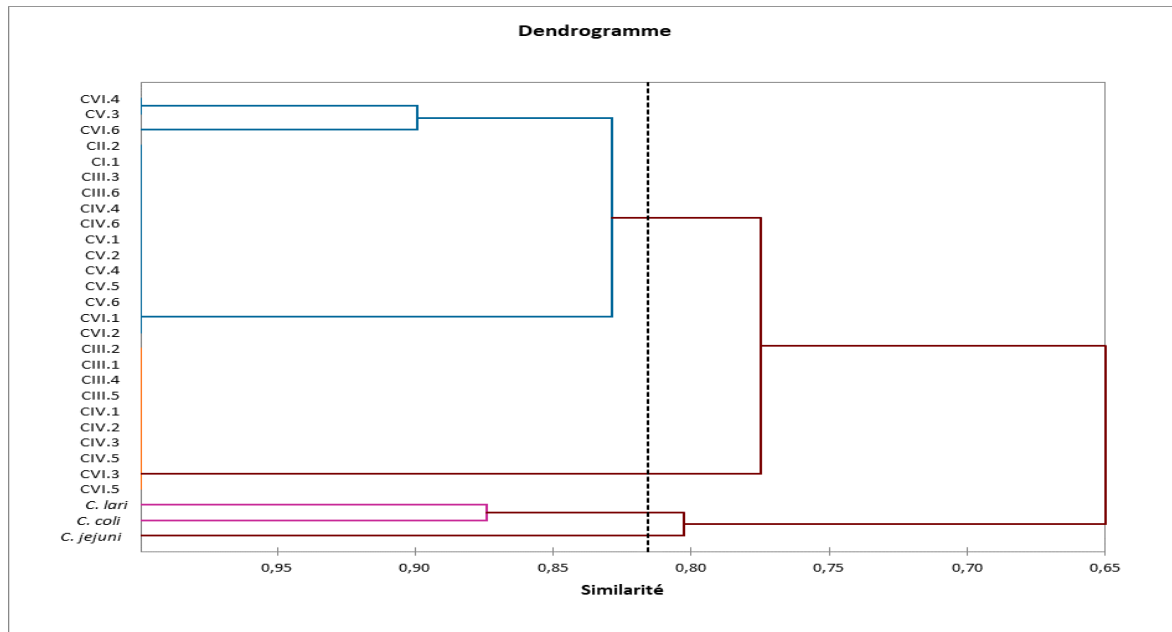


Figure 5 : Dendrogramme UPGMA réalisé à partir des données de clivage enzymatique

DISCUSSION

Notre étude a porté sur 36 échantillons collectés dans 12 marchés des 6 communes du District de Bamako. Cette étude que nous pouvons considérer comme pilote est une première étude sur le sujet au Mali. Le travail a été rendu difficile en absence des souches de *C. coli*, *C. jejuni* et *C. lari* qui devraient servir de contrôle pour les tests microbiologiques et moléculaires. Nous avons eu recours à la restriction *in silico* du gène de l'ARN 16S de *C. coli*, *C. jejuni* et *C. lari* afin de réaliser un arbre phylogénétique des *Campylobacter* thermotolérants obtenus.

Prévalence

Sur l'ensemble des 36 échantillons collectés dans les 6 communes du District de Bamako, le pourcentage d'isolement de *Campylobacter* thermotolérant au niveau du caecal était de 72,22 % ce qui suggère un risque de contamination élevé des carcasses au moment de l'éviscération comme l'indique les travaux de Bily *et al.* 2010 et Goualie *et al.* 2010. Ces résultats sont corroborés par des données précédemment publiées par Reich *et al.* 2008 qui ont trouvé une prévalence de 70% sur 40 groupes de poulet de chair, Bily *et al.* 2010, une prévalence d'au moins 73%.

Polymorphisme génétique

Les résultats obtenus montrent une grande diversité de nos 26 souches qui se répartissent entre 7 profils de restriction distincts (figure 3 et 4). Le plus grand polymorphisme a été observé pour les isolats de la commune VI (4 profils distincts) suivi de commune III et V (3 profils distincts).

Une analyse approfondie de l'arbre phylogénétique (Figure 5) montre que nos isolats de *Campylobacter* peuvent être regroupés en deux classes, une classe homogène de 10 isolats et une classe hétérogène de 16 isolats. Cette dernière classe est également subdivisée en deux sous-groupes de 13 et de 3 isolats. Aucune de nos souches de *Campylobacter* thermotolérant n'appartenait à la même classe que *C. coli* et *C. lari* ni celle de *C. jejuni*. Cependant en comparant les profils de chaque isolat aux espèces de *Campylobacter coli*, *lari* et *jejuni*, trois isolats CV.3, CVI.4 et CV.6 ont au moins 60 ; 70 et 80 % de similarité respectivement avec *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*. Selon Abbott *et al.*, 2005, il existe environ 13 autres espèces de *Campylobacter* thermotolérants qui pourront être identifiées par le séquençage des molécules d'ARN ribosomique 16S, qui semble être la méthode appropriée

(Gorkiewicz et al., 2003). Cette étude pilote montre la prévalence et le polymorphisme des *Campylobacter* chez les poulets villageois vendus dans 12 marchés du District de Bamako qui devrait être poursuivie par le séquençage des 26 isolats. Il semble évident que la viande de poulet puisse être contaminée. Ceci dénote la présomption des gastroentérites causée par *Campylobacter* et la nécessité d'une surveillance épidémiologique des campylobactérioses au Mali.

REFERENCES

- [1] ABBOTT, Sharon L., WADDINGTON, Michael, LINDQUIST, David, et al. Description of *Campylobacter curvus* and *C. curvus*-like strains associated with sporadic episodes of bloody gastroenteritis and Brainerd's diarrhea. *Journal of clinical microbiology*, 2005, vol. 43, no 2, p. 585-588.
- [2] BILY, Lise, PETTON, Julie, LALANDE, Françoise, et al. Quantitative and qualitative évaluation of *Campylobacter* spp. contamination of turkey cecal contents and carcasses during and following the slaughtering process. *Journal of food protection*, 2010, vol. 73, no 7, p. 1212-1218.
- [3] DABBOUSSI, F., ALAM, S., MALLAT, H., et al. Étude préliminaire sur la prévalence de *Campylobacter* dans les diarrhées infantiles au nord du Liban/Preliminary study on the prevalence of *Campylobacter* in childhood diarrhoea in north Lebanon. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 2012, vol. 18, no 12, p. 1225.
- [4] FAO. Secteur Avicole Mali. Revues nationales de l'élevage de la division de la production et de la santé animales de la FAO. Rome. 2013. No. 4.
- [5] Friedman CR, Neimann J, Wegener HC, Tauxe RV. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In Nachamkin, Blaser MJ (eds) *Campylobacter*, 2nd edition ASM press, Washington DC. 2000. pp 121-138.
- [6] GORKIEWICZ, Gregor, FEIERL, Gebhard, SCHOBER, Caroline, et al. Species-specific identification of campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. *Journal of clinical microbiology*, 2003, vol. 41, no 6, p. 2537-2546.
- [7] Goualie G.B., Karou G.T., Bakayoko S., Coulibaly K.J., Coulibaly K.E., Niamke S.L. et Dosso M. Prévalence de *Campylobacter* chez les poulets vendus dans les marchés d'Abidjan : Étude pilote réalisée dans la commune d'Adjamé en 2005, *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales 2010 E.I.S.M.V. de Dakar, RASPA*. 2010. Vol. 8, N°S, 2010, P30.
- [8] HUE, Olivier, LE BOUQUIN, Sophie, LAISNEY, Marie-José, et al. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. *Food Microbiology*, 2010, vol. 27, no 8, p. 992-999.
- [9] PETERSON, Michael C. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* infections in adults. *Western journal of medicine*, 1994, vol. 161, no 2, p. 148.
- [10] REICH, Felix, ATANASSOVA, Viktoria, HAUNHORST, Eberhard, et al. The effects of *Campylobacter* numbers in caeca on the contamination of broiler carcasses with *Campylobacter*. *International journal of food microbiology*, 2008, vol. 127, no 1-2, p. 116-120.
- [11] SKIRROW, Martin B. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. *Campylobacter*, 2000, p. 69-88.
- [12] TAYLOR, Ethel V., HERMAN, Karen M., AILES, E. C., et al. Common source outbreaks of *Campylobacter* infection in the USA, 1997–2008. *Epidemiology & Infection*, 2013, vol. 141, no 5, p. 987-996.
- [13] THORNS, C. J. Bacterial food-borne zoonoses. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 2000, vol. 19, no 1, p. 226-239.