

SURVIE DE *CAMPYLOBACTER* DANS L'EAU : SOUCHES SPÉCIALISÉES, RÉSISTANCE AUX DÉSINFECTANTS ET ENROBAGE PAR LES CILIÉS

Hana Trigui, Valérie Paquet, Alexandre Thibodeau, Philippe Fravallo, Ann Letellier,
Steve Charrette et Sébastien Faucher

Projet : IA113123

Durée : 03/2014 – 12/2016

FAITS SAILLANTS

La bactérie *Campylobacter* est la première cause d'infections alimentaires d'origine bactérienne dans les pays industrialisés, et la majorité des cas sont dus à *C. jejuni*. La transmission à l'humain peut se faire par la consommation de viandes contaminées et insuffisamment cuites, de lait cru et par contamination croisée de produits consommés crus à partir de produits contaminés d'origine animale. La contamination des carcasses de poulet est une source très importante de transmission à l'humain. Bien que la volaille soit colonisée par *C. jejuni* pendant l'élevage, la contamination des carcasses à l'abattoir est l'étape critique. La grande quantité d'eau utilisée à l'abattoir contribue à la survie de *C. jejuni* et à sa transmission à travers les étapes de production et, conséquemment, à la contamination du produit fini. Ce projet avait pour but d'étudier la survie de la bactérie *C. jejuni* dans l'eau. Nous avons démontré que des souches de *C. jejuni* isolées de poulet et des souches modèles ont des capacités variables à survivre dans l'eau. De plus, nous avons comparé le profil transcriptionnel de deux souches modèles, l'une qui survit bien dans l'eau (81116) et l'autre qui survit mal (81-176). Cette analyse nous a permis de déterminer que la survie dans l'eau est probablement un trait complexe dû à plusieurs gènes et systèmes métaboliques. La souche 81116 semble exprimer dans l'eau plusieurs systèmes de réponse aux stress, ce qui lui permet de résister mieux au stress oxydatif, au choleate de sodium et aux antibiotiques dans l'eau que 81-176. Notre projet montre que certaines souches pourraient être plus problématiques que d'autres pour l'industrie, puisqu'elles survivent mieux dans l'eau et aux désinfectants. Ces souches sont donc plus aptes à coloniser le produit fini. De plus, nous avons déterminé que *C. jejuni* peut être enrobé par le cilié *Tetrahymena* dans des corps multilamellaires (CML, un sac formé de plusieurs couches de membranes) qui augmente la survie de *C. jejuni*. La présence de tels ciliés pourrait augmenter la colonisation des produits finis par *C. jejuni*.

OBJECTIF ET MÉTHODOLOGIE

Les objectifs principaux de ce projet sont : 1) identifier des déterminants génétiques associés à la survie de *C. jejuni* dans l'eau, et 2) identifier les conditions qui augmentent la survie de *C. jejuni* et sa dispersion dans l'eau. Les objectifs spécifiques que nous souhaitons réaliser durant la période de financement selon le calendrier de réalisation, étaient : 1) Phénotypage des souches de notre banque pour leur capacité à survivre dans l'eau et identification de souche modèle pour l'objectif 2; 2) comparer le transcriptome d'une souche modèle qui survit bien dans l'eau et d'une souche modèle qui survit mal, identification de phénotypes possibles et identification de gènes uniques exprimés dans l'eau et; 3) évaluer et caractériser l'enrobage de *C. jejuni* par les amibes et les ciliés. Les souches ont été exposées à l'eau et leur survie a été analysée par décompte d'UFC. La technologie des biopuces a été utilisée pour comparer le transcriptome des souches modèles 81116 et 81-176. Finalement, l'enrobage a été caractérisé par microscopie.

RETOMBÉES SIGNIFICATIVES POUR L'INDUSTRIE

Nous avons exposé 11 souches (3 souches contrôles et 8 souches isolées d'abattoirs au Québec) à une eau artificielle appelée Fraquil. La composition du Fraquil (0,004 % CaCl_2 , 0,004 % MgSO_4 , 0,001 % NaHCO_3 , 0,0002 % K_2HPO_4 , 0,004 % NaNO_3 , 10 nM FeCl_3 , 1 nM CuSO_4 , 0,22 nM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 2,5 nM CoCl_2 , 23 nM MnCl_2 et 4 nM ZnSO_4) se rapproche de la composition de l'eau douce. Le suivi de la survie dans l'eau nous a permis de montrer que les différentes souches ont des capacités de survie très variables les unes par rapport aux autres (Fig. 1). Ceci indique que certaines souches sont mieux adaptées pour la survie dans l'eau, ce qui peut influencer positivement leur capacité à être transmises par l'eau. La colonisation d'un système par de telles souches pourrait expliquer les difficultés à réduire la contamination des carcasses de poulet suite au passage dans le refroidisseur à eau.

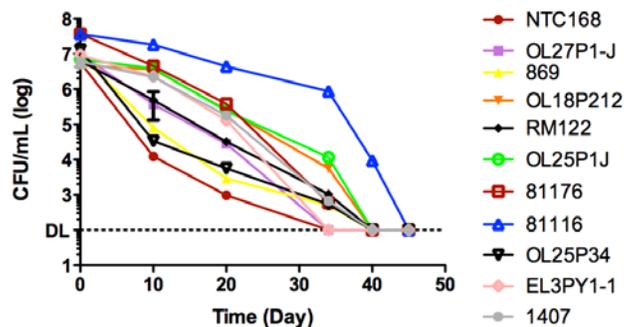


Figure 1 : Survie de *C. jejuni* à 4 °C. Les différentes souches ont été cultivées sur milieux TSA-sang, suspendues dans le milieu Fraquil et incubées à 4 °C. Le nombre de cellules a été évalué par la méthode CFU. DL, limite technique de dénombrement.

Puisque les souches 81116 et 81-176 montrent une capacité de survie dans l'eau opposée, nous avons par la suite étudié leur réponse génétique à l'exposition à l'eau. Plusieurs gènes importants pour la résistance au stress et l'acquisition de fer sont induits seulement chez 81116. Certains de ces gènes sont impliqués dans la réponse aux stress comme la pompe à efflux *cmeB* et le cytochrome peroxidase *ccpA-2*. Le gène *cmeB* est impliqué dans la résistance aux sels biliaires alors que le gène *ccpA-2* est impliqué dans la résistance au stress oxydatif. Nous avons donc émis l'hypothèse que 81116 est plus résistante aux stress oxydatifs dans l'eau que 81-176. Nous avons donc placé ces deux souches dans le « Brucella broth » et dans le Fraquil, puis nous les avons exposées à 500 mM de peroxyde d'hydrogène et à un gradient de concentration d'hypochlorite de sodium. Le niveau de survie a été déterminé par la méthode d'unités formant des colonies (UFC).

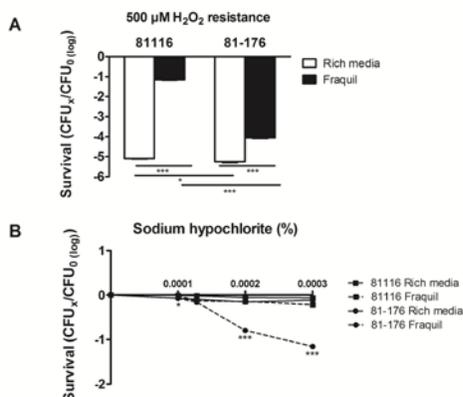


Figure 2 : Résistance au stress oxydatif. Les souches ont été placées dans le « Brucella broth » ou dans le Fraquil pour 4 h, puis exposées à (A) 500 µM de peroxyde d'hydrogène et à (B) différentes concentrations d'hypochlorite de sodium. Un décompte par UFC a été effectué avant l'exposition aux stress et 1 h après. Les ratios entre les UFCs après et avant exposition sont montrés.

APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE ET SUIVI À DONNER

Comme montré dans la Fig. 2, la souche 81116 est plus résistante à ces stress que 81-176 lorsque placée dans l'eau, ce qui valide nos résultats de biopuces. L'hypochlorite de sodium est couramment employé comme désinfectant à l'abattoir et son utilisation pourrait sélectionner les souches les plus résistantes et, conséquemment, celles qui survivent le mieux dans l'eau. De plus, la colonisation du système par de telles souches pourrait requérir un traitement-choc pour s'en débarrasser.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la possibilité que *C. jejuni* puisse être enrobé dans des CMLs. Nous savons que cet enrobage augmente la résistance aux désinfectants chez d'autres bactéries pathogènes, comme *Salmonella*. Après avoir testé plusieurs protistes et conditions, nous avons pu déterminer que *Tetrahymena pyriformis* semble exocyster dans l'environnement extracellulaire des vésicules remplies de bactéries (Fig. 10A, B). Chaque vésicule correspond à plusieurs dizaines de bactéries enrobées dans une même structure. Afin de confirmer nos observations de la microscopie à épifluorescence et déterminer aussi, plus en détail, la structure morphologique des vésicules bactériennes secrétées, les cocultures de *C. jejuni* et *T. pyriformis* ont été observées en microscopie électronique à transmission (MET). Les vésicules exocytées sont bel et bien remplies de *C. jejuni* (Fig. 10C). *T. pyriformis* est donc capable d'enrober *C. jejuni* dans des CMLs. Nous avons aussi démontré que cet enrobage augmente la capacité de survie de *C. jejuni*.

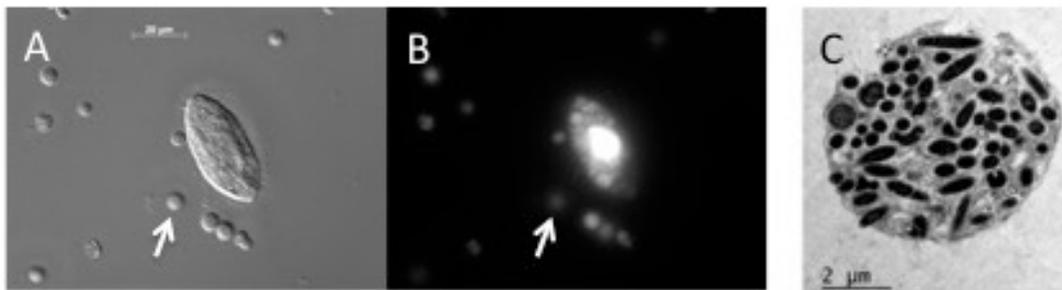


Figure 10 : Interaction entre *C. jejuni* et le cilié *T. pyriformis*. *C. jejuni* 81116 a été ajoutée à une culture de *T. pyriformis* à une dose de 1000 :1. A) image en contraste de phase, B) le même champ coloré au DAPI (qui se lie à l'ADN). Une vésicule exocytée est indiquée par une flèche. C) Une vésicule exocytée, observée en microscopie électronique à transmission, est remplie de *C. jejuni*.

La présence de ciliés dans des conduites d'eau et des procédés liés à la fabrication de nourriture pourrait augmenter la présence de *C. jejuni* dans le produit fini. D'autres études devront être menées pour déterminer si des ciliés sont présents dans de tels systèmes.

POINT DE CONTACT

Nom du responsable du projet : Sébastien Faucher

Téléphone : 514 398-7886

Télécopieur : 514 398-7990

Courriel : sebastien.faucher2@mcgill.ca

REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

Ces travaux ont été réalisés grâce à une aide financière du Programme Innov'Action agroalimentaire, un programme issu de l'accord du cadre Cultivons l'avenir 2 conclu entre le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, et Agriculture et Agroalimentaire Canada. Ce projet repose sur des données préliminaires obtenues grâce à un support du Centre de recherche en infectiologie porcine et aviaire (CRIPA), un regroupement stratégique financé par le FRQ_NT.