

Caractérisation métagénomique de l'écosystème microbien de la chaîne de valeur du porc

PASCAL LAFORGE^{1,3}, ANTONY T. VINCENT¹, CAROLINE DUCHAINE⁴,
ERIC POULIOT⁵, SYLVAIN FOURNAISE⁵, LINDA SAUCIER^{2,3}

¹ Département des sciences des aliments, Université Laval, Québec (Québec) Canada G1V 0A6;

² Département de sciences animales, Université Laval, Québec (Québec) Canada G1V 0A6;

³ Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels, Université Laval, Québec (Québec) Canada G1V 0A6;

⁴ Département de biochimie, microbiologie et bio-informatique, Université Laval, Québec (Québec);

⁵ Olymel S.E.C./L.P., Boucherville, QC, Canada, J4B 5Y1.

Pascal.laforge.1@ulaval.ca

Mot clés : viande, écologie microbienne, statut sanitaire, chaîne de valeur du porc, séquençage d'ARNr 16S

Introduction. La viande et les produits de viandes transformés ont été impliqués dans 35,6 % des déclarations de toxi-infections au Québec en 2014-2015 notamment en raison de leur contenu en nutriments favorable à la croissance microbienne (Gouvernement du Québec, 2017). Ce qui en fait le groupe d'aliments le plus à risques de causer une toxi-infection. Ce risque alimentaire important fut reconnu en 1990 et entraîna l'instauration obligatoire du PASA (*Programme d'amélioration de la salubrité des aliments*) et des programmes de contrôle préventif de type HACCP (*Hazard analysis of critical control points*). Ces programmes furent remaniés en 2018 lors de l'entrée en vigueur du Règlement sur la salubrité des aliments au Canada. Ils ont permis, depuis leur instauration, d'améliorer la gestion des risques alimentaires dans les usines de viandes canadiennes, mais sans les éliminer complètement. Ces programmes de gestion du risque ont atteint leur maturité et nécessitent de nouvelles approches et de connaissances plus fines de la microflore de la chaîne de valeur du porc afin d'obtenir une maîtrise plus assurée des risques microbiologiques.

L'avènement de nouvelles méthodes d'analyses génomiques pour l'étude des microorganismes par l'entremise du séquençage de taxons (16S, 18S, gyrB, etc.) et du génome entier (« *whole genome sequencing* ») a permis d'identifier des microorganismes non cultivables dans une panoplie d'environnements. Le microbiote porcin a été étudié dans des conditions variées et a permis d'en identifier le cœur (core microbiota ; microorganismes présents dans ≥ 90 % de toutes les sections du tractus gastro-intestinal des porcs ; Holman et al. 2017). Ces technologies ont même permis de produire des bases de références des gènes présents dans le microbiome porcin (Xiao et al. 2016). La variation de la microflore dans l'environnement des abattoirs porcins a aussi été étudiée tout récemment pour déterminer la diversité des microorganismes, de leurs gènes de résistances aux antibiotiques et de la présence de gènes de virulences (Zwirzitz et al. 2020, Campos Caleros et al. 2018, Bridier et al. 2019). Les connaissances fines des microflores de la chaîne de valeur se développent rapidement, mais elles sont sensibles à différents facteurs (localisation/climat, ration alimentaire, race porcine, âge de l'animal, etc.) selon l'étude. Elles sont donc difficiles à comparer entre elles. D'où l'intérêt scientifique de ce projet.

Le but du projet était de caractériser la microflore aux différentes étapes de la transformation du porc selon le statut sanitaire de la ferme d'origine. L'objectif étant de générer des connaissances approfondies des risques microbiologiques associés aux statuts sanitaires des élevages de porc et de déterminer spécifiquement leur impact sur la viande et les produits transformés afin de développer des stratégies pour mieux contrôler les risques microbiologie dans l'entièreté de la chaîne de valeur. L'étude a suivi des porcs sur toute la chaîne de transformation de la ferme à la table et a permis d'évaluer la contribution de la ferme et l'efficacité des processus en usine à réduire les risques microbiologiques.

Hypothèse : Le microbiote intestinal et les microorganismes environnementaux provenant de fermes ayant un statut sanitaire différent, influence l'écologie microbienne de la chaîne de valeur, la contamination des usines et la qualité microbiologique des viandes.

Objectif 1 : Déterminer les variations du microbiote pour des fermes ayant des statuts sanitaires différents.

Objectif 2 : Déterminer la contamination initiale de l'usine (à la fin des procédures préopératoires) pour évaluer comment elle évolue après le passage de porcs de différentes fermes.

Objectif 3 : Déterminer l'impact microbiologique de porcs provenant de fermes différentes sur les pièces de viande prêtes à la commercialisation.

Méthodologie. Deux fermes porcines attitrées au même abattoir sous inspection fédérale ont été sélectionnées selon le statut sanitaire de leur porc (plus élevé et plus faible). Des échantillons ont été collectés à la ferme dans l'air (3 sous échantillons de 10 m³ poolés), la moulée (8 trémies poolée), la bouche des porcs (16 porcs poolés) et les fèces fraîchement tombées au sol (16 porcs poolés). La collecte des échantillons à l'abattoir est divisée en deux sections soit l'abattage/éviscération et la découpe. À l'éviscération, les échantillons collectés provenaient des surfaces de travail (300 cm²), du liquide d'un drain (150 ml), des convoyeurs (300 cm²) et des carcasses à leur arrivée au réfrigérateur (25 carcasses poolées; 300 cm²). À la découpe, les échantillons ont été prélevés sur les carcasses après réfrigération de 24 h (25 carcasses poolées; 300 cm²), sur l'épaule de porc désossée (25 épaules poolées; 300 cm²), sur le convoyeur des épaules (300 cm²) et dans le liquide du drain au début de la chaîne de découpe (150 ml). En plus de ces échantillons, lors de l'abattage et de la découpe, des échantillons ont été pris avant le passage des porcs pour évaluer la contamination persistante de l'usine après le nettoyage (déterminer le baseline microbiologique de l'usine). En tout, 12 échantillons poolés ont été collectés tout au long de la chaîne pour chaque répétition. Ces échantillons permettent de cibler le statut de l'élevage plutôt que les variations individuelles.

Pour chaque visite d'échantillonnage, les porcs ont été sélectionnés aléatoirement dans le lot en fin d'engraissement (110-115 kg). Le lot est divisé en plus petite portion qui est expédiée à l'abattoir chaque semaine sur plus ou moins 5 semaines selon la taille des lots. Les semaines où les échantillons ont été prélevés sont la 2^e, 3^e et 4^e semaine pour éviter les porcs en dehors de la courbe normale de croissance. La sous-population de porc de la semaine a été suivie jusqu'à l'abattoir où elle a été abattue dans son entièreté. Le lendemain (18-24 heures plus tard), elle a été découpée selon les différentes coupes de viande distribuée normalement aux différents clients de l'abattoir. Pour mesurer la contamination de chacune des fermes sélectionnées sans influence d'autres lots, les porcs ont été abattus les premiers sur une chaîne propre. Ainsi, au total, 72 échantillons composites ont été prélevés. Les microorganismes viables ont été évalués par culture sur géloses (aérobies mésophiles totaux et entérobactéries). L'ADN des échantillons a été extrait et ensuite le gène rRNA 16S a été séquencé sur la plateforme de l'IBIS avec un séquenceur Miseq d'Illumina. Les données de séquençage ont ensuite été analysées par bio-informatique afin d'identifier tous les microorganismes, leur diversité (alpha et bêta) et à l'aide de l'algorithme LEfSe.

Ce projet est original, car un suivi direct des mêmes animaux de la ferme jusqu'à la pièce de viande a été réalisé, ce qui à notre connaissance n'a pas été fait auparavant dans la littérature. Par opposition, la plupart des études existantes se concentrent sur un environnement ou une partie de la chaîne de valeur spécifique en collectant des échantillons aléatoires sans liens directs entre la ferme et les pièces de viandes en découlant.

Résultats. Les dénombrements d'aérobies mésophiles totaux et d'entérobactéries obtenus des échantillons collectés à la fin des procédures préopératoires sont près ou sous le seuil de détection indiquant que les procédures de nettoyage sont efficaces. Les dénombrements obtenus des échantillons prélevés en abattoir ne varient pas significativement en fonction des fermes analysées selon un test de T de student ($p < 0,05$). Cependant, une analyse non paramétrique de rang révèle un risque de contamination plus important relié aux *Enterobacteriaceae* lorsque le statut sanitaire des animaux est inférieur. Le séquençage de l'ADN microbien de la chaîne de valeur du porc a révélé qu'*Acinetobacter*, *Clostridium* et *Rothia* étaient les genres les plus abondants dans cette chaîne de valeur (Figure 1). L'analyse de la diversité bêta (diversité inter échantillon) n'indique pas le statut sanitaire comme significatif, mais le type d'échantillons et la localisation (ferme, éviscération et découpe) le sont lors d'une analyse de PERMANOVA ($p < 0,05$). Cependant, l'analyse de la diversité alpha (diversité intra échantillon) indique que l'air et les aliments sont plus diversifiés lorsque le statut est faible. De plus, l'analyse des séquences d'ADN avec l'algorithme LEfSe ($p < 0,05$, LDA 2.0) a permis d'identifier plus de marqueurs microbiologiques associés à la ferme avec le statut sanitaire inférieur.

Deux genres d'intérêt pour l'industrie, *Macrocooccus* et *Campylobacter* ont une abondance relative significativement plus élevée dans les fermes à statut inférieur et supérieur, respectivement.

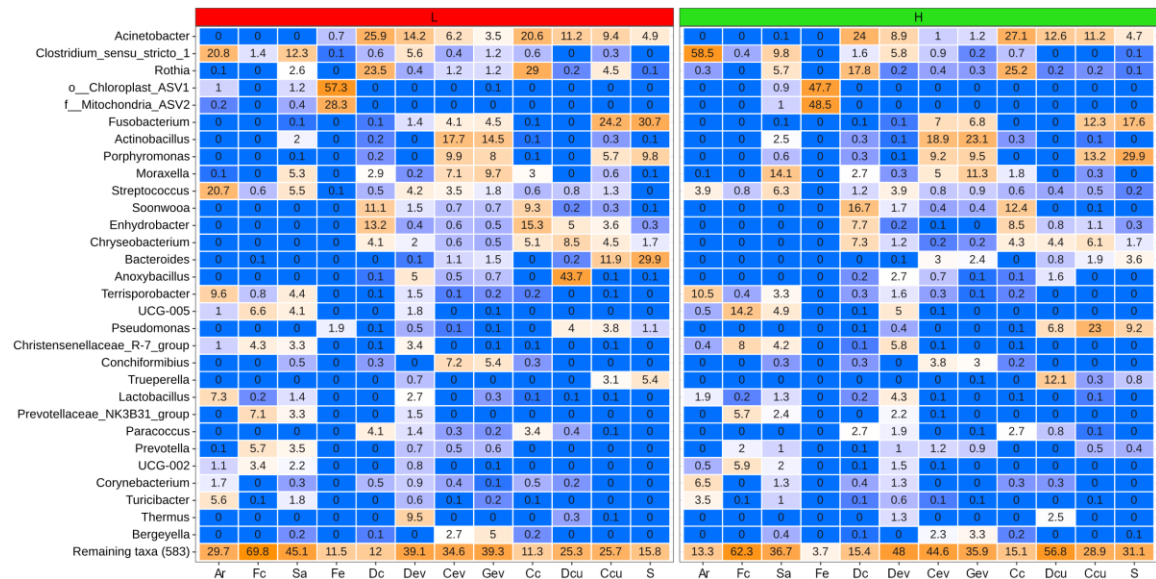


Figure 1. Top 30 des genres identifiés en abondance relative (%) dans chacun des différents types d'échantillons pour les deux fermes. Le dégradé de couleurs va du bleu = 0 % à l'orange = 100 %. Les échantillons ont été prélevés dans : Air=Ar, Feces=Fc, Saliva=Sa, Feed=Fe, Carcasses parées (après refroidissement par soufflerie d'air froid)=Dc, Drain à l'éviscération=Dev, Convoyeur à l'éviscération=Cev, Dalot collecteur à l'éviscération=Gev, Carcasses refroidie (après une nuit de réfrigération)=Cc, Drain à la découpe=Dcu, Convoyeur à la découpe=Ccu, Épaule=S. Statut sanitaire plus faible=L (rouge), Statut sanitaire plus élevé=H (vert).

Conclusion. En conclusion, les fermes de statut divergeant ont un microbiote différent, caractérisé par l'environnement plutôt que le microbiote de l'animal. Les résultats suggèrent qu'une amélioration de statut sanitaire réduit les risques de contamination en usine. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'écosystème microbien de la chaîne de valeur du porc varie selon le statut sanitaire de la ferme.

Références

Bridier, A., Le Grandois, P., Moreau, M.-H., Prénom, C., Le Roux, A., Feurer, C., et Soumet, C. 2019. Impact of cleaning and disinfection procedures on microbial ecology and Salmonella antimicrobial resistance in a pig slaughterhouse. *Scientific Reports* 9,12947.

Campos Calero, G., Caballero Gómez, N., Benomar, N., Pérez Montoro, B., Knapp, C.W., Gálvez, A., et Abriouel, H. 2018. Deciphering resistome and virulome diversity in a porcine slaughterhouse and pork products through its production chain. *Frontiers in Microbiology* 9, 2099.

Holman, D., Brunelle, B. W., Trachsel, J., et Allen, H. 2017. Meta-analysis to define a core microbiota in the wine gut. *mSystems* 2, 3, e00004-17.

Gouvernement du Québec. 2017. Bilan annuel 2014-2015 - Toxi-infections alimentaires. Québec. https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Bilan_Toxi-infection_2014-2015_Accessible.pdf.

Xiao, L., Estellé, J., Kiilerich, P., Ramayo-Caldas, Y., Xia, Z., Feng, Q., Liang, S., Pedersen, A.Ø., Kjeldsen, N.J., Liu, C., Maguin, E., Doré, J., Pons, N., Le Chatelier, E., Prifti, E., Li, J., Jia, H., Liu, X., Xu, X., Ehrlich, S.D., Madsen, L., Kristiansen, K., Rogel-Gaillard, C., et Wang, J. 2016. A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nature Microbiology* 1, 16161.

Zwirzitz, B., Wetzels, S.U., Dixon, E.D., Stessl, B., Zaiser, A., Rabanser, I., Thalgueter, S., Pinior, B., Roch, F.-F., Strachan, C., Zanghellini, J., Dzieciol, M., et Wagner, M., Selberherr, E. 2020. The sources and transmission routes of microbial populations throughout a meat processing facility. *npj Biofilms and Microbiomes* 6, 26.

Introduction

- La viande de porc de par sa teneur en nutriments et en eau est un produit alimentaire favorisant la croissance microbienne suite à une contamination lors du processus d'abattage et de transformation ;
- Les facteurs de risque de contamination se doivent d'être étudiés afin d'en favoriser la maîtrise ;
- Ce risque est influencé par un panoplie de facteurs dont le statut sanitaire des porcs ;
- Une compréhension approfondie de l'écologie microbienne de la chaîne de valeur du porc est essentielle afin d'élaborer de nouvelles stratégies pour optimiser la qualité microbiologique des produits ;
- Aucune étude à notre connaissance n'a suivis les mêmes animaux de la ferme à la pièce de viandes.



Fig. 1 Résumé de l'intérêt scientifique du projet

(Toutes les images proviennent de la banque d'image libre de droits Pixabay)

Matériel et méthode

Dispositif expérimental :

- Deux fermes de statuts sanitaires différents ont été sélectionnées par les vétérinaires associés au projet

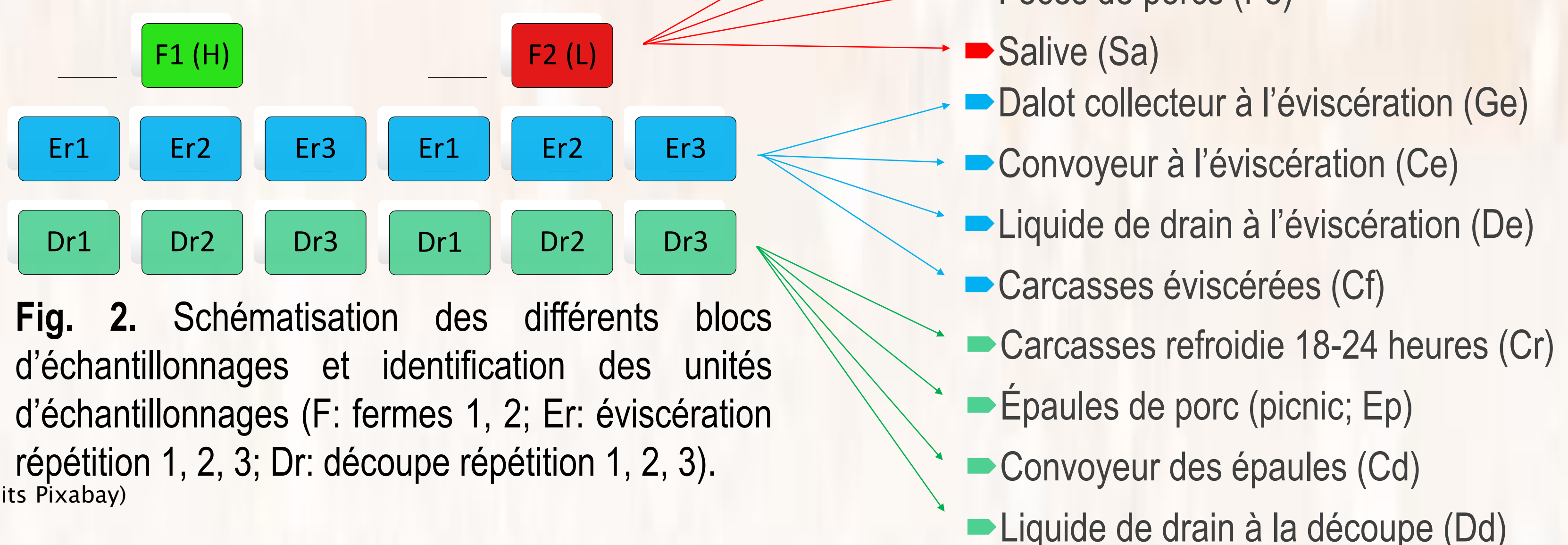


Fig. 2. Schématisation des différents blocs d'échantillonnage et identification des unités d'échantillonnage (F: fermes 1, 2; Er: éviscération répétition 1, 2, 3; Dr: découpe répétition 1, 2, 3).

- Ce sont les mêmes animaux qui ont été suivis à travers la chaîne de valeur ;
- Les échantillons environnementaux (dalot, convoyeur et drains) ont été collectés avant et après le passage des animaux sur la chaîne d'abattage et de découpe (t=0 et t=1) ;
- Les populations microbiennes ont été caractérisées par dénombrement des aérobies mésophiles totaux (AMT) et des entérobactéries (EB) à l'usine ainsi que par le séquençage du gène rRNA 16S de tous les échantillons ;
- C'est la région V3-V4 du gène 16S qui a été séquencée (Miseq Illumina, San Diego, États-Unis).

Hypothèse et objectif

Hypothèse : Le microbiote intestinal et les microorganismes environnementaux provenant de fermes ayant un statut sanitaire différent, influence l'écologie microbienne de la chaîne de valeur, la contamination des usines et la qualité microbiologique des viandes.

Objectif : Caractériser la microflore aux différentes étapes de la transformation du porc selon le statut sanitaire des fermes porcines.

Analyse bio-informatique et résultats

- Les dénombrements d'AMT et d'EB démontrent que les échantillons prélevés à l'usine avant le passage des animaux sont autour ou sous le seuil de détection suggérant que l'usine est propre ;
- La comparaison des dénombrements d'AMT et d'EB selon le statut sanitaire de l'élevage à l'aide d'un test de T de Student ($p < 0,05$) pour chacun des échantillons collectés avant et après le passage des animaux est non significatif.

Tableau 1. Dénombrements des aérobies mésophiles totaux et des entérobactéries indépendamment du type d'échantillons (\log_{10} UFC/300cm² or 300 ml \pm Erreur type).

	Procédures préopératoires ¹			Ferme ²		
	Été	Automne	p^3	L	H	p^3
Aérobies mésophiles totaux	2.89 \pm 0.378	2.15 \pm 0.199	0.134	4.44 \pm 0.284	4.23 \pm 0.264	0.606
Entérobactéries	2.29 \pm 0.415	1.95 \pm 0.478	0.350	2.76 \pm 0.273	2.20 \pm 0.266	0.025

¹ Échantillons prélevés à la fin des procédures préopératoires, juste avant le passage des animaux à l'usine.
² Échantillons prélevés dans deux élevages de statut sanitaire différent l'un par rapport à l'autre (L=inférieur ; H=supérieur) juste après le passage des animaux étudiés ; cela comprend les échantillons de carcasse/épaule.
³ Valeur p calculée par un test de la somme des rangs de Wilcoxon significatif à une valeur de 0,05.

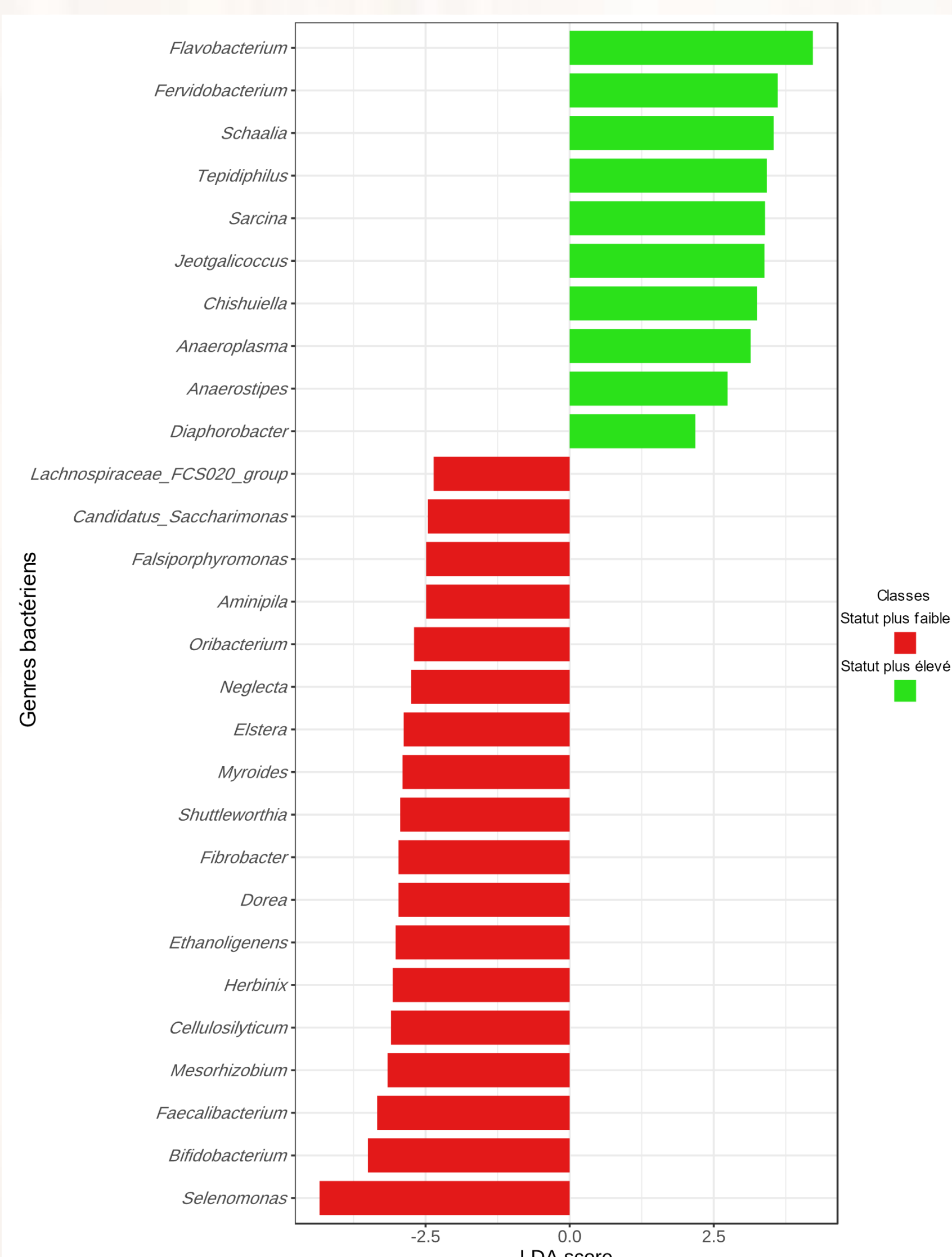


Fig. 3 Genres différenciellement abondants dans tous les échantillons pour deux fermes ayant un statut sanitaire inférieur = L (rouge) et supérieur = H (vert), respectivement, évalués à l'aide d'une analyse discriminante linéaire (LDA) avec des mesures de la taille de l'effet (LEfSe). Seuls les genres avec un score LDA (log10) de >2.0 sont affichés.

- Le séquençage de l'ADN microbien de la chaîne de valeur du porc a révélé qu'*Acinetobacter*, *Clostridium* et *Rothia* étaient les genres les plus abondants dans cette chaîne de valeur.
- Deux genres bactériens d'intérêt, *Macrococcus* et *Campylobacter* ont une abondance relative plus élevée dans les fermes à statut inférieur et supérieur, respectivement.
- Les indices de diversité alpha sont significativement plus élevés dans l'air et les aliments lorsque le statut est inférieur.

Tableau 2. Concentration moyenne en acides gras volatiles (ug/g \pm Erreur type) dans les fèces de porcs provenant de fermes de statuts sanitaire différents.

	Statut sanitaire plus faible	Statut sanitaire plus élevé	p^1
Acide acétique	3755.77 \pm 83.75	3889.18 \pm 130.82	0.3859
Acide propionique	2295.37 \pm 70.69	1923.44 \pm 78.84	0.0006
Acide isobutyrique	239.48 \pm 8.99	255.89 \pm 12.15	0.2738
Acide butyrique	2111.15 \pm 81.40	1205.69 \pm 64.37	<0.0001
Acide isovalérique	436.80 \pm 18.93	468.02 \pm 25.78	0.3252
Acide valérique	375.83 \pm 18.28	307.49 \pm 17.12	0.0071

¹ La valeur p calculée par un test de T de Student est significative à une valeur de 0,05.

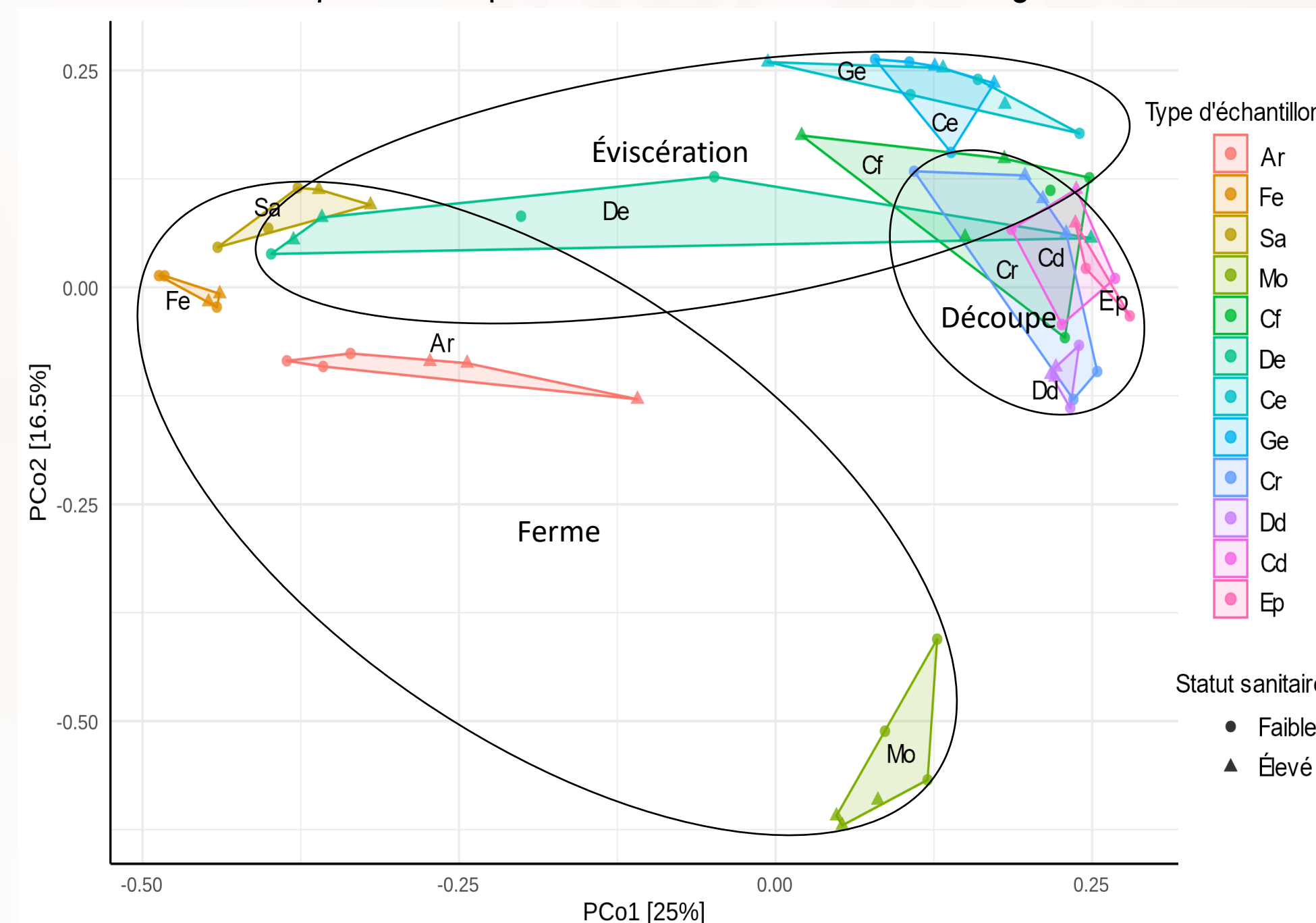


Fig. 4 Graphique de l'analyse en coordonnées principales des distances Unifrac non pondérées (diversité bêta). Chaque type d'échantillon collecté à une couleur différente, le statut sanitaire est indiqué par un point ou un triangle et un cercle (localisation) englobe chacun des endroits différents où ont été prélevés les échantillons.

- L'analyse de la diversité bêta indique que les facteurs; type d'échantillon et localisation (ferme, éviscération et découpe) ont un effet significatif sur le microbiome de la chaîne de valeur selon un test de PERMANOVA ($p < 0,05$).
- Plus on avance dans la chaîne de valeur, plus les échantillons sont normalisés, ce qui est caractérisé par un rapprochement des points sur le graphique.

Conclusion

En conclusion, l'hypothèse est confirmée, le statut sanitaire des animaux influence l'écologie microbienne de la chaîne de valeur du porc. Le microbiote diffère et il est caractérisé plutôt par l'environnement de la ferme (air et moulu) que le microbiote de l'animal (salive et fèces). L'influence du statut sanitaire est majeure à la ferme et s'estompe plus on progresse dans la chaîne de valeur. L'analyse non paramétrique de rang (test de la somme des rangs de Wilcoxon) suggère que les risques de contamination à l'usine par les EB sont plus élevés lorsque les animaux proviennent d'une ferme avec un statut inférieur. Ainsi, les résultats suggèrent qu'une amélioration du statut sanitaire des porcs réduit les risques de contamination d'origine microbiennes en usine.

Remerciements