ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUT OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture Agriculture Alimentation Food Biologie Biology Environnement Environment Santé Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Présentée et soutenue publiquement par

Djim-adjim TABO

Le 18 octobre 2013

Etude de la contribution des salmonelles aviaires aux salmonelloses humaines au Tchad : Cas de la ville capitale, N'Djamena

Directeur de thèse : **Pr. MILLEMANN Yves**

Co-encadrement de la thèse : **Dr. Colette D. DIGUIMBAYE**

Jury

M. Henri-Jean BOULOUIS, Professeur, Unité BIPAR, ABIES	Président
M. Pierre COLIN, Professeur, Université de BREST	Rapporteur
Mme Barbara DUFOUR, Professeur, Unité EPIMAI, ENVA	Rapporteur
Mme Sophie A. GRANIER, IC1, Unité CEB, ANSES	Examinateur
M. Yves MILLEMANN, Professeur, Unité MASQ, ENVA	Examinateur
M. Simon LE HELLO, Pharmacien-Biologiste, CNR-Salm, Institut Pasteur	Membre

DEDICACE
&
REMERCIEMENTS

Djim-adjim TABO

A la mémoire de mon défunt Père : TABO NGUESSINDA

A ma Mère : NAGA IDRISS

A mes filles : Hermione, Gloriale et Ludivine TABO

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'un accord de coopération inter-état entre la France et le Tchad à travers la bourse du Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de l'ambassade de France au Tchad. Elle a été rendue possible grâce à une convention de co-encadrement entre le laboratoire de Microbiologie des Aliments, Sécurité et Qualité (MASQ) de L'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA) de Maisons Alfort et le Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha (LRVZ / F) à N'Djamena au Tchad. Ce manuscrit concrétise donc, quatre années et demie de thèse passées au sein du Laboratoire de L'USC - MASQ de l'ENVA.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé à ce travail et m'ont soutenu pour la réalisation de ce manuscrit.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse Yves MILLEMANN grâce à qui cette thèse a pu se dérouler dans de parfaites conditions. Je tiens à le remercier sincèrement et du fond du cœur pour la confiance qu'il a témoignée à mon égard.

Je remercie Jean Christophe AUGUSTIN de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir mis à ma disposition les moyens techniques nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je remercie Sophie GRANIER pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en acceptant de suivre et de co-encadrer certaines de mes manipulations au sein de l'unité CEB de l'ANSES. Ce manuscrit est le résultat de sa disponibilité et de ses pertinentes et fructueuses remarques. Qu'elle trouve ici ma profonde gratitude.

Je remercie infiniment A. BRISABOIS, M. MARAULT, S. FREMY, Frédérique MOURY, Joël GROUT et tout le staff technique de l'unité de Caractérisation et Epidémiologie Bactérienne de l'ANSES, Maisons Alfort pour leur entière disponibilité.

Je remercie également les techniciens : G. BLONDIN, S. OPICCI et N. CHERGUI de l'unité MASQ (Microbiologie Alimentaire, Sécurité et Qualité) de l'école vétérinaire d'Alfort, pour la précieuse aide qu'ils m'ont apportée toutes ces années passées sur Alfort.

Je remercie Colette Djaïbé DIGUIMBAYE, Directrice adjointe du Laboratoire de Recherches Vétérinaire et Zootechniques de N'Djamena pour avoir accepté de suivre ce travail depuis le Tchad. Je voudrai lui exprimer mes meilleurs remerciements pour avoir facilité l'accès à tous les dispositifs techniques et matériels au sein dudit laboratoire.

Je tiens à remercier Baizina MAMA, responsable de l'unité de bactériologie générale et tous ses stagiaires, pour l'aide précieuse apportée pendant les sorties d'échantillonnages dans les différents élevages et hôpitaux de N'Djamena et surtout lors des interminables analyses microbiologiques réalisées au Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha à N'Djamena.

J'adresse mes sincères remerciements à l'ensemble des membres de jury , qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir participer à ma soutenance en tant que rapporteurs, examinateurs et

président de jury et aussi d'avoir accepter de contribuer à l'évaluation scientifique de ce travail.

Cette étude a été réalisée grâce à une bource du Gouvernement Français. Je tiens à remercier très sincèrement les Responsables du Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de l'Ambassade de France au Tchad pour cette opportunité.

J'adresse mes remerciements à l'Université de N'Djamena, mon institution de tutelle pour m'avoir permis d'entreprendre ce travail. Ma reconnaissance s'adresse également à tous les collègues enseignants de la Faculté des Sciences Exactes et Appliquées (FSEA) de l'Université de N'Djamena pour leur incessant encouragement.

Que mes parents, frères, sœurs, oncles, tantes, cousins et cousines trouvent ici mon chaleureux témoignage d'affection. Je tiens à remercier du fond du cœur, mes frangins Loubatan TABO Augustin et Ramadjita TABO pour toutes leurs contributions et disponibilités.

A ma femme, pour sa patience et sa compréhension pendant tous ces moments de solitude avec nos trois filles. Trouves ici, l'expression de toute ma gratitude et de tout mon amour.

A ces eternels absents qui me t´témoignent une présence discrète.

A ce bout de terre lointain, qui m'a vu naitre

Merci à toi…que j'ai pu oublier.

«Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries.» Marcel Proust.

INDEX DES MATIERES, TABLEAUX, FIGURES ET ABREVIATIONS

Table des matières

Introduction générale **1**
1. Généralités sur le Tchad **4**
1.1. Géographie 4
1.2. Situation politique et administrative 4
1.3. Situation économique…. 6
1.4. Situation démographique 7
1.5. Situation socioculturelle 7
1.6. Situation sanitaire 8
1.7. L'aviculture au Tchad 9
2. Généralités sur les salmonelles **10**
2.1. Les salmonelles 10
2.1.1. Historique 10
2.1.2. Taxonomie et nomenclature 10
2.1.3. Schéma de Kauffmann-White-Le Minor 11
2.1.4. Caractères morphologiques 13
2.1.5. Caractères culturaux 14
2.1.6. Caractères biochimiques 15
2.1.7. Caractères antigéniques 15
2.1.7.1. Les antigènes somatiques (paroi ou AgO) 16
2.1.7.2. Les antigènes flagellaires (AgH) 16
2.1.7.3. Les antigènes d'enveloppes Vi (capsulaires ou antigènes K) 16
2.1.7.4. Les antigènes M et R 16
2.1.8. L'habitat et la pathogénicité 17
2.1.8.1. L'habitat 17
2.1.8.2. Spécificité d'hôte 17
2.1.8.3. La pathogénicité 18
2.1.8.3.1. Le pouvoir pathogène 18
2.1.8.3.2. Le pouvoir invasif 19
2.1.8.3.3. Le pouvoir toxique 19
2.1.8.3.4. Les facteurs de virulence 20
a. Pili ou fimbriae 20
b. Invasion et colonisation de l'organisme 20
c. Survie dans les phagocytes 20
d. Le complexe lipopolysaccharidique 20
e. Synthèse de toxines et systèmes de captation du fer 21
2.1.9. Le diagnostic 21
2.1.9.1. Les milieux 21
2.1.9.2. Méthodes bactériologiques 23
2.1.9.2.1. Dans les élevages et environnements 23
2.1.9.2.2. Méthode horizontale de référence ISO 6579, AFNOR 2002 23
2.1.9.2.3. Dans les denrées alimentaires 24
2.1.9.2.4. Méthode utilisée en santé animale 24
2.1.9.3. Les méthodes immunologiques 24

2.1.9.3.1. Les techniques d'immunofluorescence 24
2.1.9.3.2. Les techniques immunoenzymatiques 24
2.1.9.4. Les méthodes sérologiques 25
2.1.10. Les marqueurs épidémiologiques 25
2.1.10.1. Les marqueurs phénotypiques 26
2.1.10.1.1. La sérotypie 26
2.1.10.1.2. La biotypie 26
2.1.10.1.3. La lysotypie 26
2.1.10.1.4. La bactériocinotypie 27
2.1.10.1.5. L'antibiotypie 27
2.1.10.2. Les marqueurs génotypiques 27
2.1.10.2.1. Marqueurs liés à l'ADN plasmidique 27
2.1.10.2.2. Marqueurs liés à l'ADN chromosomique 28
2.1.10.2.2.1. La RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism.) 28
2.1.10.2.2.2. Electrophorèse en champ pulsé ou pulsotypage 28
2.1.10.2.2.3. IS-typage 28
2.1.10.2.2.4. La ribotypie 29
2.1.10.2.2.5. RAPD (Random Amplified polymorphic DNA) 29
2.1.10.2.2.6. ERIC-PCR et REP-PCR 30
3. Epidémiologie des infections à salmonelles 31
3.1. Les salmonelloses aviaires 31
3.1.1. Généralités 31
3.1.2. La pathogénie 31
3.1.2.1. Les étapes de l'infection 31
3.1.2.2. Symptômes et lésions 32
3.1.2.3. La contamination de l'œuf 33
3.1.2.3.1. Surface des œufs 33
3.1.2.3.2. Contamination interne des œufs 33
3.1.3. Epidémiologie analytique 34
3.1.3.1. Habitat 34
3.1.3.2. Facteurs de contamination 36
3.1.3.3. Sources de l'infection 37
3.1.3.4. Modes de transmission 37
3.2. Les salmonelloses chez les autres espèces animales 38
3.2.1. Généralités 38
3.2.2. Les Bovins 38
3.2.3. Les porcins 38
3.2.4. Les équidés 38
3.2.5. Les chiens et les chats 38
3.3. Moyens de lutte 39
3.3.1. Lutte thérapeutique 39
3.3.2. Prophylaxie 39
3.3.2.1. Prophylaxie sanitaire 39
3.3.2.2. Mesures générales d'hygiène 39
3.3.2.2.1 Approvisionnements 40

3.3.2.2.2. Nettoyage et désinfection 40
3.3.2.3. Mesures spécifiques 40
3.3.2.4. Prophylaxie médicale 41
3.3.2.4.1. Additifs Alimentaires anti-*Salmonella* 41
3.3.2.4.1.1. Acidification de l'eau de boisson 41
3.3.2.4.1.2. Les prébiotiques 41
3.3.2.4.1.3. Les probiotiques 41
3.3.2.4.1.4. Concept de NURMI et RANTALA et les flores de barrière 41
3.3.3. La vaccination 42
3.4. Les salmonelloses humaines 43
3.4.1. Généralités 43
3.4.2. Tendances épidémiologiques 43
3.4.2.1. Epidémiologie descriptive 43
a - En Europe 46
b - Aux USA et Canada 47
c - En Afrique 48
d - Au Tchad 49
3.4.2.2. Épidémiologie analytique 53
3.4.2.2.1 Réservoir animal de la bactérie 53
3.4.2.2.2. Signes cliniques et traitements 53
3.4.2.2.3. Prévention 54
4. La résistance aux antimicrobiens 55
4.1. Généralités 55
4.2. Mécanismes de résistance aux antimicrobiens 55
4.3. Modalités d'acquisition de gènes de résistance 57
4.3.1. La transformation 57
4.3.2. La transduction 57
4.3.3. La conjugaison 57
4.3.4. La mutation 58
4.4. La mesure de la résistance aux antimicrobiens 58
4.5. *Salmonella* et résistances aux antimicrobiens 58
Partie expérimentale (Travaux de recherche) 60
Introduction…….. 61
5. Isolement et identification des salmonelles 62
5.1. Matériel et méthodes 62
5.1.1. Matériel 62
5.1.1.1. Échantillonnages 62
5.1.1.2. Questionnaires 62
5.1.1.3. Localisation des sites d'échantillonnages dans N'Djamena 63
5.1.2. Méthodes 64
5.1.2.1. Echantillonnages 64
5.1.2.1.1. Elevages. 64
5.1.2.1.2. Hôpitaux 64
5.1.2.2. Analyse bactériologique 66
5.1.2.2.1. Méthode de recherche de *Salmonella* 66

5.1.2.2.2. Schéma d'analyse 66
5.1.2.3. Le sérotypage 67
5.1.2.4. La méthode PTS 68
5.2. Résultats. 68
5.2.1. Etude des questionnaires issus les fermes 68
5.2.2. Caractéristiques des fermes avicoles 68
5.2.3. Enquêtes dans les hôpitaux 70
5.2.4. Prévalence de contamination des élevages 70
5.2.5. Prévalence de contamination dans les hôpitaux 71
5.2.6. Distribution de sérotypes de *Salmonella* dans les élevages 71
5.2.7. Distribution de sérotypes de *Salmonella* dans les hôpitaux 74
5.3. Discussion 76
5.3.1. Prévalence de *Salmonella* des fermes avicoles 76
5.3.2. Prévalence de *Salmonella* dans les hôpitaux 78
5.3.3. Distributions des salmonelles dans les fermes avicoles 80
5.3.4. Distributions des salmonelles dans les hôpitaux 81
5.3.5. Analyse statistique des facteurs de risques de contamination 82
6. **Détermination de l'antibiorésistance des salmonelles** 83
6.1. Matériel et méthodes 83
6.1.1. Matériel 83
6.1.2. Méthode 83
6.2. Résultats…. 83
6.2.1. Antibio-résistance des isolats de salmonelle 83
6.2.2. Séquençage du gène codant la MR observée chez *S.* Minnesota 84
6.3. Discussion 85
7. Caractérisation moléculaire des isolats de salmonelles 86
7.1. Généralités 86
7.2. Matériels et méthodes 86
7.2.1. Matériel 86
7.2.2. Méthodes 86
7.2.2.1. La PCR 86
7.2.2.1.1. Extraction de l'ADN par la méthode d'ébullition 86
7.2.2.1.2. Principe de la PCR 86
7.2.2.1.3.. ERIC-PCR et IS - PCR 87
7.2.2.1.3.1. ERIC – PCR 87
7.2.2.1.3.2. IS – PCR 88
7.2.2.2. L'électrophorèse en champ pulsé (pulsotypage) 89
7.2.2.2.1. Principe du pulsotypage 89
7.2.2.2.2. Extraction de l'ADN 89
7.2.2.2.3. Digestion enzymatique 89
7.2.2.2.4. Séparation électrophorétique 90
7.3. Résultats 91
7.3.1. ERIC PCR et IS PCR 91
7.3.2. Comparaison des profils ERIC-types et IS-types 97
7.3.3. L'électrophorèse en champ pulsé ou pulsotypage 100

7.3.3.1. Révélation des profils de macrorestriction 100
7.3.3.2. Comparaison des profils de pulsotypage 102
7.4. Discussion 106
7.4.1. Analyse comparative des Profils IS, ERIC et d'antibiorésistance 106
7.4.1.1. Profils homogènes 106
7.4.1.2. Profils hétérogènes 107
7.4.2. Analyse comparative des profils IS, ERIC, pulsotypes et antibiotypes 108
7.4.2.1. Profils homogènes 109
7.4.2.2. Profils hétérogènes 109
8. Conclusion générale et perspectives 111
Références bibliographiques 113
Annexes ……. 133

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Espèces et sous-espèces de *Salmonella* 10
Tableau 2 : Sérovars de *Salmonella* extraits du tableau de Kauffmann – White - Le Minor .. 12
Tableau 3 : Principaux caractères biochimiques des salmonelles 15
Tableau 4 : Milieux d'enrichissement liquides 21
Tableau 5 : Milieux sélectifs solides 22
Tableau 6 : Principaux sérovars classés selon l'origine des souches en France en 2009..... 35
Tableau 7 : Epidémies d'origine alimentaire dues à *Salmonella.* CNR-Salm, 2002-2010 44
Tableau 8 : 15 principaux sérotypes enregistrés au CNRS entre 2002-2011 45
Tableau 9 : Salmonelloses par serovars chez les humains, 2008-09..... 46
Tableau 10 : Serovars de *Salmonella* isolés lors des TIA confirmés dans l'UE, 2009…….46
Tableau 11 : Cas de TIA confirmés et possibles causés par *Salmonella* dans l'UE en 2009 .. 47
Tableau 12 : Vingt *Salmonella* humaines les plus isolées en Amérique du Nord, 2001-07 48
Tableau 13 : Vingt *Salmonella* humaines les plus fréquentes en Afrique, 2001-07 49
Tableau 14 : Sérotypes de *Salmonella* isolés au Tchad entre 1960 et 70..... 50
Tableau 15 : Sérotypes de *Salmonella* isolés au Tchad entre 1960-70 (suite)..... 51
Tableau 16 : Vingt *Salmonella* humaines les plus isolées en Amérique latine, 2001-07 52
Tableau 17 : Vingt *Salmonella* humaines les plus isolées en Asie, 2001-2007 52
Tableau 18 : Vingt *Salmonella* humaines les plus isolées en Océanie, 2001-2007 53
Tableau 19 : Mécanismes de résistance des bactéries aux β-lactamines..... 56
Tableau 20 : Principaux mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques..... 56
Tableau 21 : Mécanismes d'efflux dans l'antibio-résistance bactérienne..... 57
Tableau 22 : Organisations des échantillonnages dans les fermes avicoles..... 65
Tableau 23 : Organisations des échantillonnages dans les hôpitaux..... 65
Tableau 24 : Typologie des élevages de volailles de N'Djamena, Tchad..... 69
Tableau 25 : Prévalence de *Salmonella* par type d'échantillons et bande de volailles 70
Tableau 26 : Prévalence de *Salmonella* par hôpital enquêté 71
Tableau 27 : Distribution des différents échantillons (+) par ferme avicole..... 72
Tableau 28 : Distribution des sérotypes de *Salmonella* isolés des 16 fermes avicoles 73
Tableau 29 : Distribution des sérotypes de *Salmonella* isolés des 5 hôpitaux 74
Tableau 30 : Tableau récapitulatifs des isolats et sérotypes de *Salmonella* issus des 2 campagnes dans les 5 hopitaux et dans les 16 fermes avicoles de N'Djamena 75
Tableau 31 : Analyse statistique des facteurs de risques 82
Tableau 32 : Profils d'antibiorésistance des *Salmonella* isolés des fermes avicoles et des hôpitaux…….. 84
Tableau 33 : Récapitulatif des différents profils de sérotypes de *Salmonella* 92
Tableau 34 : Récapitulatif des profils ERIC, IS-PCR, PFGE et d'antibiorésistance de sérotypes de *Salmonella* d'origine humaine et aviaire..... 105

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Carte du Tchad et ses différentes régions administratives..... 5
Figure 2 : Carte de la ville de N'Djamena avec ses différents découpages administratifs 6
Figure 3 : Schéma structural d'une *Salmonella* 14
Figure 4 : Structure de la paroi d'une bactérie Gram$^-$ 14
Figure 5 : Structure du peptidoglycane 14
Figure 6 : Structure du lipopolysaccharide 14
Figure 7 : Mécanisme de la pathogénicité de *Salmonella* 19
Figure 8 : Cycle de transmission des salmonelles dans la filière avicole 36
Figure 9 : localisation des fermes avicoles et hôpitaux sur la carte de N'Djamena..... 63
Figure 10 : Diagramme schématique d'une partie de l'intégron de classe 1 84
Figure 11 : Photo du système d'électrophorèse en champ pulsé CHEF DR III..... 90
Figure 12 : Profils ERIC-PCR de quelques salmonelles issus des élevages de volailles..... 93
Figure 13 : Profils IS-PCR de quelques salmonelles issus des élevages de volailles 94
Figure 14 : Profils ERIC-PCR de quelques salmonelles d'origine humaine 95
Figure 15 : Profils IS-PCR de quelques salmonelles d'origine humaine..... 96
Figure 16 : Profils ERIC-PCR comparatifs de salmonelles d'origine aviaire et humaine..... 97
Figure 17 : Profils ERIC-PCR comparatifs de salmonelles d'origine aviaire et humaine..... 98
Figure 18 : Profils IS-PCR comparatifs de salmonelles d'origine aviaire et humaine 98
Figure 19 : Dendrogramme de l'ensemble de souches étudiées fondé sur l'analyse de pulsotypes avec l'enzyme *Xba*I..... 101
Figure 20 : Dendrogramme des souches de *S.* Colindale..... 102
Figure 21 : Dendrogramme des souches de *S.* Enteritidis..... 102
Figure 22 : Dendrogramme des souches de *S.* Havana 102
Figure 23 : Dendrogramme des souches de *S.* Hull 103
Figure 24 : Dendrogramme des souches de *S.* Idikan 103
Figure 25 : Dendrogramme des souches de *S.* Kottbus..... 104
Figure 26 : Dendrogramme des souches de *S.* Muenchen..... 104

LISTE DES ABREVIATIONS

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et de du Travail
BASC: British Society of Antimicrobial Chemotherapy
BEH : Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire
BET : Bromure d'Ethidium
CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CDC: Centers for Disease Control
CEB : Caractérisation et Epidémiologie Bactérienne
CHEF-DR III: Clamped Homogeneous Electric Fields – Dynamic Regulation
CHU : Centre Hospitalier Univesitaire
CLSI : Clinical Laboratory Standards Institute
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CNR-Salm : Centre National de Référence des salmonelles
CODA-CERVA : Centres d'Etudes et de Récherches Vétérinaires et Agrochimiques
COFRAC : Comité Français d'Accréditation
CPDE : Coopérative des Professionnels pour le Développement de l'Elevage
CSB : Cell Suspension Buffer
DIN : Deutsches Institut fur Normung
DRS : Délégation Régionale Sanitaire
ECOSIT II : Enquête sur la Consommation et le Secteur Informel au Tchad, phase II
EDST II : Enquête Démographique et de Santé au Tchad, phase II
EFSA: European Food Safety Authority
ELISA: Enzyme Linked ImmuoSorbent Assay
ENVA : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
ERIC-PCR : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerisation Chain Reaction
FAO: Food and Agriculture Organization
FER : Fonds d'Entretien Routier
FMI : Fonds Monétaire International
FSEA : Faculté des Sciences Exactes et Appliquées
IDH : Indice de développement humain
INSEED : Institut National de la Statistique, des Etudes Economiques et Démographiques
InVS : Institut National de Veille Sanitaire
ISF : Indice Synthétique de Fécondité
IS-PCR : Insertion Sequence-Polymerisation Chain Reaction
L.P.S : LipoPolySaccharide
LERQAP : Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et des Procédés agroalimentaires
LRVZ : Laboratoire de Recherches Vétérinaire et Zootechniques
MASQ : Microbiologie des Aliments, Sécurité et Qualité
MDR : Multi-Drug Resistance
MEDP : Ministère de l'Elevage et du Développement Pastoral
MEN : Ministère de l'Education Nationale
MKTTn : Muller-Kauffman TétraThionate/ novobiocine
MSP : Ministère de la santé publique
MUCAP : 4-MéthylUmbelliféryl-Caprylate
NCCLS: National Commitee of Clinical Laboratory Standards
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis
PIB : Produit Intérieur Brut
PNSA : Programme National pour la Sécurité Alimentaire

PNUD : Programme des Nations Unies pour le Développement
PTS: Premi® Test *Salmonella* system
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
REP-PCR : Repetitive Extragenic Palindromic-Polymerisation Chain Reaction
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RGPH2 : 2^{e} Recensement Général de la Population et de l'Habitat
RVS : Rappaport Vassiliadis Soja
SCAC : Service de Coopération et d'Action Culturelle
SDS: Sodium Dodécyl Sulfate
SGI1: *Salmonella* Genomic Island 1
SIDA : Syndrome de l'Immuno-Déficience Acquise
SIG : Système d'Information Géographique
STEE: Société Tchadienne d'eaux et d'électricité
TESSy: The European Surveillance System
TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collective
UE : Union Européenne
UGAPRO/ T : Union des Groupements d'Aviculteurs Professionnels du Tchad
UPGMA: Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages
VIH : Virus de l'Immuno - déficience Humaine
WHO: World Health Organization
XLD : Xylose-Lysine-Desoxycholate

Titre de la thèse :

"Étude de la contribution des salmonelles aviaires aux salmonelloses humaines au Tchad : cas de la ville capitale, N'Djamena"

Résumé de la thèse

Les salmonelles sont liées à de nombreuses maladies infectieuses d'origine alimentaire dans le monde. Elles sont aussi considérées comme l'un des principaux agents pathogènes responsables de gastro-entérite humaine. L'objectif principal de notre étude était de mettre à jour la prévalence de contamination et l'état de l'antibio-résistance des souches de *Salmonella* isolées chez les humains et chez les volailles dans la ville de N'Djamena, capitale du Tchad. Les résultats obtenus au terme de cette étude, offrent les premières données de prévalence de contamination par les salmonelles chez les humains et dans les élevages de poules pondeuses et de poulets de chair à N'Djamena. Tous les échantillons étaient collectés au sein de 5 hôpitaux et de 16 fermes avicoles, sur deux périodes de six mois chacune: de Août 2010 à Janvier 2011 et de Septembre 2011 à Février 2012.

L'ensemble des méthodes et techniques de diagnostics réalisées a permis d'isoler chez les humains et chez les volailles, cent trente neuf souches de salmonelles, appartenant à quarante deux sérotypes différents. *Salmonella* Colindale était le sérotype majoritaire (13,6 %), suivi par *S*. Minnesota (10,8 %), *S*. Stanleyville (5,8 %), *S*. Havana, Kottbus (5 %), *S*. Idikan (4,3 %), *S*. Riggil, Anatum (3,6 %). Les autres sérotypes étaient très peu représentés. La majorité de ces sérotypes était sensible à la gamme d'antibiotiques testée (Normes CLSI), sauf quelques isolats aviaires de *S*. Colindale qui avaient présenté une sensibilité diminuée à l'acide nalidixique, à l'ofloxacine et à l'enrofloxacine, 1 isolat aviaire de *Salmonella* Limete résistant à trois antimicrobiens, deux isolats humains de *Salmonella* Enteritidis résistants à l'acide nalidixique, à l'ofloxacine et à la ciprofloxacine et 15 isolats aviaires de *Salmonella* Minnesota résistants à au moins cinq classes différentes d'antimicrobiens.

Dans le but d'évaluer les relations phylogénétiques et de trouver des liens épidémiologiques entre les souches humaines et aviaires isolées au cours de la même période et dans la même ville, 139 isolats de *Salmonella* trouvés chez les humains et chez les volailles dans cette étude ont été caractérisés par ERIC-PCR et IS*200*-PCR. L'analyse PCR a été suivie par l'analyse de macrorestriction (PFGE) de l'ADN génomique issu de 22 isolats communs de sérovars de *Salmonella* rencontrés à la fois chez les humains et chez les volailles avec l'enzyme *Xba*I. Les résultats de la PCR ont montré que, dans le cadre de cette étude épidémiologique, les méthodes Eric- et IS*200*-PCR peuvent être utilisées efficacement pour limiter le nombre d'isolats qui doivent être sérotypés. La comparaison des profils d'Eric-types, d'IS-types, de pulsotypes et de susceptibilité aux antimicrobiens des isolats d'origines humaines et aviaires a mis en évidence, d'une part, la preuve indirecte des sources de contamination humaine par les sérovars de *Salmonella* à partir des fermes de volailles et d'autre part, la diversité des sources et réservoirs potentiels des souches de *Salmonella* dans la ville de N'Djamena.

Mots clés: *Salmonella*, prévalence, épidémiologie, ERIC-PCR, IS*200*-PCR, PFGE, antibio-résistance, humain, hôpital, volailles, fermes de volailles, N'Djamena (Tchad).

Title of the thesis:

"Study of the avian *Salmonella* contribution to human salmonellosis in Chad: example of the capital, N'Djamena"

Abstract of the thesis

Salmonella are linked to many food-borne diseases worldwide. They are also considered to be one of the main pathogens causing human gastroenteritis. The main objective of this study was to update the prevalence and antimicrobial resistance characteristics of *Salmonella* isolated from poultry and from humans experiencing gastroenteritis in N'Djamena, Chad. The results collected during this study provide the first baseline data on the prevalence of contamination by *Salmonella* in humans suffering from diarrhoea, as well as in laying hens and broiler chicken farms in N'Djamena. Samples were collected on one hand from five hospitals and on another hand from sixteen poultry farms, both over two periods of six months each: from August 2010 to January 2011 and from September 2011 to February 2012.

Diagnostic methods carried out during this study led to the isolation of one hundred and thirty nine *Salmonella* strains, belonging to forty two different serotypes. *Salmonella* Colindale was the most prevalent serovar (13.6 % of the isolates belonged to this serovar), followed by *Salmonella* Minnesota (10.8 %), *Salmonella* Stanleyville (5.8 %), *Salmonella* Havana and Kottbus (5 % each), *Salmonella* Idikan (4.3 %), *Salmonella* Riggil and Anatum (3.6 % each). Other serotypes were under-represented. The majority of these isolates were susceptible to all antibiotics tested (CLSI Standards), except some *Salmonella* Colindale avian isolates that exhibited a decreased susceptibility to nalidixic acid, ofloxacin and enrofloxacin, two *S.* Enteritidis human isolates resistant to nalidixic acid, ofloxacin and ciprofloxacin, a *S.* Limete avian isolate resistant to three antibiotics and 15 *S.* Minnesota avian isolates resistant to five different antimicrobial classes.

In order to evaluate the phylogenetic relationships and to find epidemiological links between human and avian strains isolated in the same period of time and in the same region, a total of 139 *Salmonella* isolates found in humans and poultry in this study were characterised by ERIC-PCR and IS*200*-PCR. The PCR analysis was followed by macrorestriction analysis (PFGE) of genomic DNA from 22 common isolates of *Salmonella* serotypes encountered in both humans and poultry with *Xba*I enzyme. PCR results demonstrated that, in the context of this epidemiological study, ERIC- and IS*200*-PCR methods can be used effectively to limit the number of isolates that have to be serotyped. The comparison of ERIC-PCR, IS*200*-PCR, PFGE and antimicrobial susceptibility profiles among isolates from human and avian origins has highlighted, on one hand, the indirect evidence of human contamination sources by *Salmonella* serovars from poultry farms, and on the other hand the diversity of sources and potential reservoirs of *Salmonella* strains in the N'Djamena city.

Keys words: *Salmonella*, prevalence, epidemiology, ERIC-PCR, IS*200*-PCR, PFGE, antimicrobial susceptibility, humans, hospitals, poultry, poultry farms, N'Djamena (Chad).

Introduction générale

Les salmonelles sont des bactéries mises en cause dans des infections variées et souvent sévères chez de nombreux vertébrés. Elles sont très répandues en milieu tropical et sont responsables de zoonoses diverses et de salmonelloses spécifiques chez les humains à travers le monde (Anderson et Ziprin, 2001 ; Cardinale *et al.*, 2004). Depuis ses premières observations vers la fin des années 1800 jusqu'à nos jours, le genre *Salmonella* n'a jamais cessé d'avoir une importance considérable dans les domaines vétérinaire et médical, tant par les pertes économiques dues à la maladie animale, que par la forte incidence chez l'homme des fièvres typhoïdes et des toxi-infections alimentaires à salmonelles (Grimont et Weill, 2005 ; Humbert, 1992 ; O'Brien et De Valk, 2003).

Le réservoir naturel de *Salmonella* est principalement le tractus digestif des vertébrés. De très nombreuses espèces animales hébergent cet agent pathogène (volailles, bovins, porcs, poissons, reptiles,…). La sous-espèce *Salmonella enterica* subsp. *enterica* est plutôt adaptée aux animaux à sang chaud et à l'homme. Parmi les sérotypes de cette sous-espèce, certains sont qualifiés de « spécifiques », qui sont strictement humains (Typhi, Paratyphi A, Paratyphi C, Sendai, et certains clones de Paratyphi B), ou inféodés à une espèce animale (Abortusovis chez les ovins et Gallinarum-Pullorum chez la volaille). D'autres sérotypes, qualifiés d'« adaptés » ont une prédilection pour une espèce ou un groupe d'espèces: Enteritidis, Hadar, Heidelberg, Saint Paul, Virchow, Senftenberg, Infantis, Kottbus contaminent principalement les volailles (dinde, poule, canard); Dublin et Bovismorbificans infectent surtout les bovins alors que Derby, Panama, Choleraesuis et Brandenburg sont isolés plus fréquemment chez les porcs. Mais, la grande majorité des sérotypes rencontrés est dite « ubiquiste ». L'exemple type est Typhimurium qu'il est possible de trouver chez la totalité des animaux d'élevage et la plupart des animaux sauvages (mammifères, oiseaux, reptiles…). A ce jour, plus de 2600 sérotypes de *Salmonella* sont décrits et classés à travers le monde (Baümler, 1997 ; Guibourdenche *et al.*, 2010 ; Korsak *et al.*, 2004).

Les infections dues aux salmonelles non-typhiques, regroupant divers signes cliniques, sont responsables aujourd'hui de plus de 600 000 morts chaque année dans le monde, avec un taux important de mortalité infantile dans les pays émergents (Anderson et Ziprin, 2001, Moury *et al.*, 2006). La contamination des infections à *Salmonella* non typhiques chez l'homme s'effectue en majorité par le biais d'aliments contaminés consommés crus ou insuffisamment cuits : œufs, produits à base d'œufs de volailles et viandes d'autres espèces animales. En raison des différents modes de transformation et des risques élevés de contamination croisée, les produits alimentaires issus de la filière avicole sont les plus impliqués dans les toxi-infections alimentaires collectives à salmonelles (Gransart, 1998). Les salmonelloses d'origine alimentaire peuvent donner lieu à des foyers très importants qui peuvent atteindre une échelle nationale, (et même internationale), si un aliment commercialisé à large diffusion se trouve être contaminé (Cardinale *et al.* 2003 ; Jones *et al.*, 2008).

Chaque année, aux Etats-Unis, on estime à 1,4 million le nombre de personnes infectées par les sérotypes de *Salmonella* non typhique, entraînant 1,500 hospitalisations et 400 décès par an (CDC, 2006 ; Mead *et al.*, 1999, Olsen *et al.*, 2000 ; Voestch *et al.*, 2004). En France, entre 2001 et 2003, 1656 toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) affectant 22,113 patients ont été déclarées, et 70% de ces TIAC étaient dues aux bactéries du genre *Salmonella.* Le CNRS de l'Institut Pasteur a répertorié 10,154 isolats de *Salmonella* chez l'homme en 2006 et 8124 en 2007. Le sérotype majoritaire était Typhimurium, suivi par le sérotype Enteritidis. Ces deux sérotypes représentaient 70% des salmonelles isolées (Delmas *et al.*, 2006). On estime entre 30 000 et 43 000, les cas annuels de salmonelloses confirmés, entraînant 6 000 à

10 700 hospitalisations et 100 à 560 décès (Chauvin *et al.*, 2006 ; Vaillant *et al.*, 2004). Au Danemark, les coûts économiques liés aux salmonelloses sont estimés entre 10,4 et 25,5 millions de dollars US en 2001 (Hendriksen *et al.*, 2011).

A ce problème majeur, s'est ajouté au cours de ces dernières décennies, le phénomène de résistance aux antibiotiques, devenu assez fréquent dans le genre *Salmonella* (Li *et al.*, 2007 ; Poppe *et al.*, 1998). C'est à partir de 1997, que l'OMS signalait l'augmentation alarmante de l'incidence de souches de *Salmonella* non typhiques résistantes aux antibiotiques (WHO, 1997). Cette multi-résistance était due à la présence d'un clone particulier, individualisé grâce à son lysotype, DT104, qui a intégré dans son chromosome un îlot génomique de 43 kb, appelé *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1), responsable de la penta-résistance (ASCSuT) (Schwarz et Chaslus-Dancla, 2001 ; Mulvey *et al.*, 2006). Il a émergé d'abord au Royaume-Uni dès 1989 au sein du bétail, puis chez les volailles, moutons, porcs et chevaux et enfin chez l'homme (Hollinger *et al.*, 1998 ; Mc Dowell et Spence, 1997 ; Winokur *et al.*, 2001). Ce clone s'est ensuite disséminé en Amérique du Nord et dans plusieurs pays européens (Glynn *et al.*, 1998)

Dans les pays en voie de développement et sous développés, l'infection causée par les sérotypes de *Salmonella* est fréquemment associée à des maladies sévères. Elle est souvent bénigne et peut devenir grave chez les individus vulnérables (enfants, personnes âgées…) et immunodéprimés (paludisme, VIH/SIDA…) (Weill, 2009). En Afrique, peu de données existent sur l'épidémiologie et l'antibiorésistance des salmonelles (Vlieghe *et al.*, 2009). Toutefois, dans certains pays comme le Sénégal, la Tunisie, le Nigeria et l'Éthiopie, plusieurs travaux réalisés sur divers types d'échantillons d'origine environnementale, animale et/ou humaine, ont permis de révéler un taux de contamination assez important dus aux souches de *Salmonella* (Aissa *et al.*, 2007 ; Cardinale *et al.*, 2005b ; Uche Orji *et al.*, 2005).

Au Tchad, les premières études sur *Salmonella* datent des travaux de Perpezat *et al.*, (1964), de Le Minor *et al.*, (1969) et de Guard *et al.*, (1973) et ont permis de démontrer l'importance épidémiologique de salmonelloses humaines et animales, ainsi que la diversité des sérotypes rencontrés. Tous ces travaux ont permis d'isoler, chez les humains et diverses espèces animales, une centaine de souches de salmonelles appartenant à une cinquantaine de sérotypes différents. Depuis ces derniers travaux, il n'y a plus de données épidémiologiques récentes disponibles sur les infections à *Salmonella* et sur leur résistance aux antimicrobiens. Rappelons que le Tchad ne dispose d'aucun mécanisme de régulation et de contrôle de l'utilisation des antibiotiques tant dans le domaine vétérinaire qu'en santé humaine. Les antibiotiques de toutes catégories se vendent à tous les coins des rues des grandes villes du Tchad, sans aucun contrôle et dans de très mauvaises conditions de conservation.

Dans la ville capitale, le secteur de l'aviculture est devenu, depuis quelques années, le pourvoyeur majeur de volailles et d'œufs de volailles dans les ménages, comme deuxième source de protéines d'origine animale après les abats bovins. Le but principal de notre étude était donc d'estimer, dans un premier temps, la prévalence de contamination des élevages de volailles et des humains par *Salmonella* dans la ville de N'Djamena et d'identifier les sérotypes dominants, dans un second lieu de déterminer leur antibiorésistance et, en troisième lieu, d'évaluer la contribution des sérotypes aviaires isolés aux salmonelloses humaines et les facteurs de risques associés. Après une brève présentation générale du Tchad, cette synthèse de la littérature fera le point sur quelques rappels bactériologiques des salmonelles, leurs résistances connues aux antibiotiques et les principales méthodes moléculaires utilisées pour la traçabilité des infections à salmonelles.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur le Tchad

1.1. Géographie

Le Tchad est un pays enclavé, situé au cœur de l'Afrique centrale avec une superficie de 1.284.000 km^2. Le port maritime le plus proche se trouve à 1700 km à Port Harcourt au Nigeria. L'immensité du territoire et l'absence de côtes maritimes posent de sérieux problèmes de logistique au niveau de tous les secteurs. Il y a dix ans, sur toute l'étendue du territoire, seulement 583 km de routes interurbaines sont revêtues. Au cours des 8 dernières années, le réseau des routes bitumées – très modeste si on le compare à celui des autres pays africains – a presque triplé (de 346 km en 2000 à 1106 km en octobre 2008). Le réseau des pistes rurales mises en service est passé de 343 km en 2006 à 1244 km en 2008. Le réseau de routes en terre circulable en toute saison est passé de 2800 km en 2002 à 3675 km en 2008, même si ce résultat reste modeste par rapport à l'objectif de 6200 km visé par la Stratégie Nationale des Transports (INSEED, 2009).

La mise en place d'un Fonds d'Entretien Routier (FER) de deuxième génération a permis de sécuriser les ressources destinées à l'entretien routier : ces ressources sont passées de 4 milliards de FCFA avant la création du FER à 10 milliards en 2008. En dépit des progrès réalisés, le réseau routier reste sous-développé par rapport à la superficie et aux besoins du pays, particulièrement en ce qui concerne le réseau de pistes rurales et des routes d'interface en terre dont l'état et le taux de couverture sont critiques pour faciliter l'accès des produits vivriers aux marchés régionaux et à celui de N'Djamena. Ces routes dites non prioritaires sont pour la plupart praticables pendant 6 à 8 mois de l'année, et insuffisamment ou jamais entretenues.

Le pays est divisé en 3 zones climatiques :

- Au Nord, une zone saharienne au climat désertique (- de 200 mm de pluie par an.)
- Au Sud, une zone soudanienne assez fortement pluvieuse (entre 800 et 1200 mm de pluies par an) rendant certaines zones inaccessibles pendant la saison des pluies.
- Entre les deux premières une zone sahélienne avec une pluviométrie comprise entre 200 et 800 mm par an ; c'est dans cette zone que se trouve N'Djamena, la capitale.

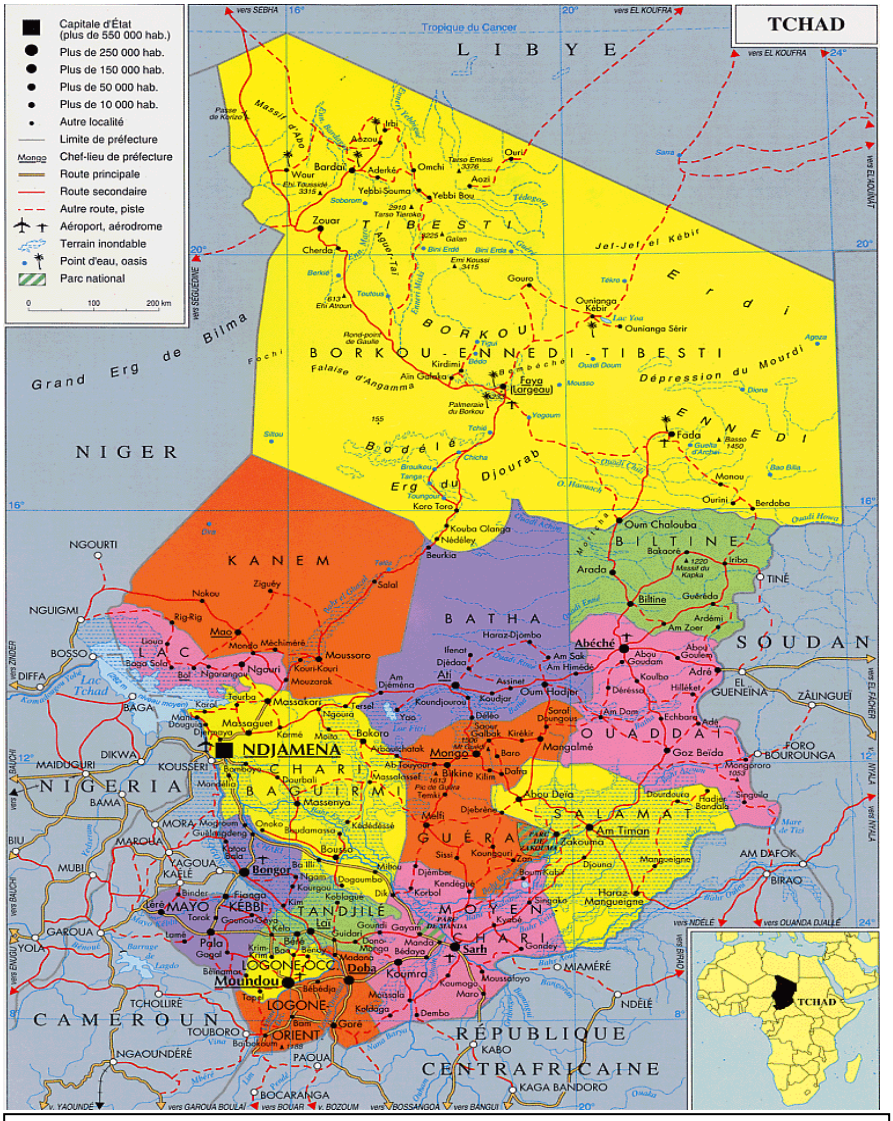
Il faut noter qu'au moins 64 % du pays sont désertiques ou semi désertiques. La désertification avance de 2 à 3 km par an selon la direction des forêts. Comme dans d'autres pays du Sahel, cette diversité de zones climatiques est fortement liée à certains aléas climatiques, faisant baisser la production agricole et partant, l'économie nationale fortement dépendante du secteur primaire. Les déficits alimentaires ainsi occasionnés entraînent des problèmes nutritionnels et sanitaires importants notamment pour certains groupes vulnérables de la population comme les personnes âgées, les femmes enceintes et les enfants.

1.2. Situation politique et administrative

Le Tchad vit en ce moment une période politique relativement calme sous un régime dit républicain. Sur le plan administratif, le Tchad est divisé en 23 régions, 64 départements et 232 sous-préfectures (INSEED, 2011). Le Français est utilisé en partage comme la langue officielle à coté de la langue Arabe. La laïcité est inscrite dans la constitution de la république et demeure le véritable socle de la paix et de l'unité nationale.

D'une superficie de 1 284 000 km², le Tchad s'étend sur 1 700 km du Nord au Sud et sur 1 000 km d'Est en Ouest. C'est le 5e plus grand pays d'Afrique après l'Algérie, la République démocratique du Congo, le Soudan et la Libye. Il est limité au Sud par la République Centrafricaine, à l'Est par le Soudan, à l'Ouest par le Cameroun, le Nigéria et le Niger. L'immensité du pays et l'absence de cotes maritimes posent des problèmes de transport, de communication et d'accessibilités à l'extérieur.

Le pays est situé entre les 7e et 24e degrés de latitude Nord d'une part, et les 13e et 24e degrés de longitude Est d'autre part. La majorité de la population, estimée à 11 175 915 habitants, vit au sud (figure n° 1). La densité va de 70 habitants au km² dans le bassin du Logone à 0,1 habitant au km² dans le nord désertique (INSEED, 2011).


TCHAD
Capitale d'État (plus de 550 000 hab.)
Plus de 250 000 hab.
Plus de 150 000 hab.
Plus de 50 000 hab.
Plus de 10 000 hab.
Autre localité
Limite de préfecture
Chef-lieu de préfecture
Route principale
Route secondaire
Autre route, piste
Aéroport, aérodrome
Terrain inondable
Point d'eau, oasis
Parc national
LIBYE
NIGER
NIGERIA
CAMEROUN
RÉPUBLIQUE CENTRAFRICAINE
SOUDAN
Tropique du Cancer
BORKOU
BORKOU-ENNEDI-TIBESTI
ENNEDI
TIBESTI
Grand Erg de Bilma
Erg du Djourab
Dépression du Mourdi
Falaise d'Angamma
Jef-Jef el Kebir
Massif d'Abo
Bodélé
KANEM
BILTINE
BATHA
LAC
CHARI BAGUIRMI
GUÉRA
OUADDAÏ
SALAMAT
MOYEN CHARI
TANDJILÉ
MAYO KEBBI
LOGONE OCCIDENTAL
LOGONE ORIENTAL
NDJAMENA
Faya (largeau)
Fada
Abéché
Moussoro
Mao
Bongor
Doba
Koumra
Sarh
Am Timan
Mangalmé
Goz Beïda
Biltine
Oum Chalouba
Arada
Iriba
TINÉ
Berdoba
Ounianga Kébir
Ounianga Sérir
Kouba Olanga
Koro Toro
Zouar
Bardaï
Aozou
Yebbi Bou
Ouri
Omchi
Aderkér
Waur
Jbil
Gouro
Faya
Largeau
Ziguey
Nokou
Rig-Rig
Ngouri
Kouri-Kouri
Massakori
Massaguet
Karol
Terbeta
Bokoro
Ati
Am Dyemena
Assinet
Koundjourou
Oum Hadjer
Am Dam
Echbara
Adé
Hilléker
Koulbo
Dérissa
Adré
El Geneina
ZÂLINGUEÏ
FORO BORONGA
Mongoro
Singeta
Haraz-Djombo
Abou Goudam
Am Himédé
Am Zoer
Ardémi
Guéréda
Iriba
Bakaoré
Massif du Kapka
Ounianga Kébir
Lac Yoa
Lac Fitri
Lac Iro
Lac Tchad
Mare de Tiss
Ouadi Rimé
Ouadi Achim
Ouadi Hawach
Ouadi Howar
Ouadi Azoum
Ouadi Doum
Ouadi Kadja
Ouadi Kadja
Ouadi Kadja

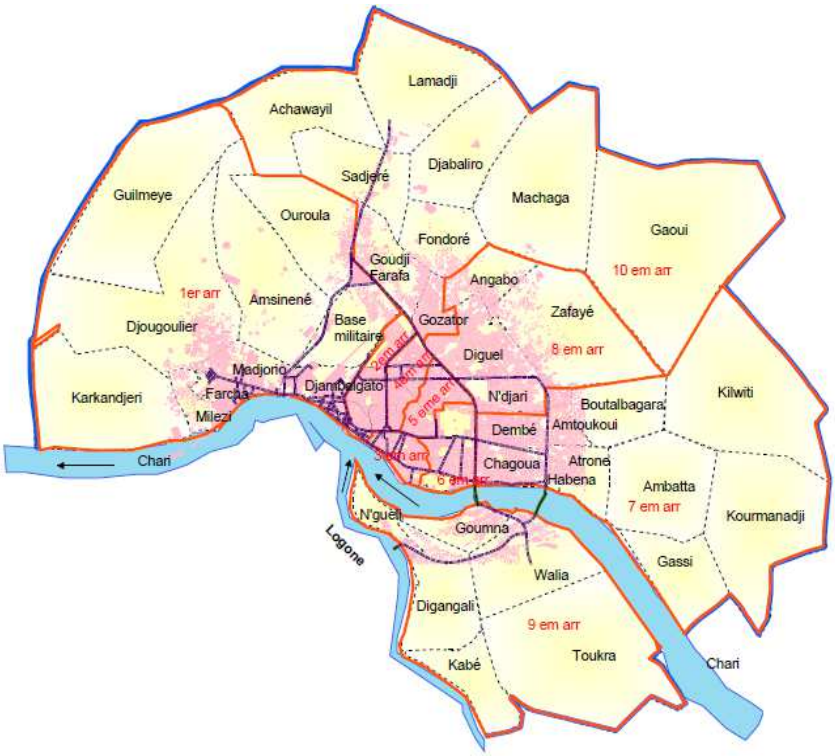


Figure 2: Carte de la ville de N'Djamena et ses différentes communes urbaines (Service Sig/ Voirie).

1.3. Situation économique

Selon la deuxième enquête sur la consommation et le secteur informel au Tchad (ECOSIT II, 2009), plus de la moitié de la population vit avec moins d'un dollar par jour et l'indice de pauvreté est d'environ 53 %. Cette pauvreté touche plus particulièrement les femmes. Au classement de l'indice de développement humain (IDH) du programme des nations unies pour le développement (PNUD), le Tchad figure parmi les dix pays les plus pauvres du monde (170 sur 179 en 2008). Le faible niveau de son revenu par habitant, qui est inférieur à 300 dollars US par an, se reflète également dans les indicateurs de bien-être, qui se situent dans leur ensemble à un niveau peu élevé.

Le Tchad appartient à la Zone Franc (Franc CFA) et est devenu depuis 2003, un pays exportateur de pétrole. Le gouvernement a déterminé un certain nombre de secteurs prioritaires dont les secteurs de l'éducation, de la santé, de l'agriculture et de l'élevage pour bénéficier d'une partie de ces mannes financières additionnelles.

Au plan macroéconomique, le bilan accumulé depuis 1994 par le Tchad est très mitigé dans l'ensemble. Le taux de croissance annuelle de son PIB (produit intérieur brut) réel a été de 5,2% en moyenne entre 1994 et 2003. Il a même dépassé les 9% par an depuis 2001, sous l'effet des investissements dans le domaine pétrolier et de leurs retombées. En 2004, cette croissance a atteint le niveau record de 30% du fait du démarrage de l'exportation du pétrole brut. Cette croissance a ralenti depuis lors, en s'inscrivant en moyenne à 5% en 2005-2006 et a stagné en 2007 et 2008 avec un niveau estimé à 0.2% et -0.4% respectivement, du fait principalement de la baisse de la production pétrolière et des difficultés de la filière cotonnière.

L'inflation, mesurée par la variation de l'indice des prix à la consommation, est restée ces dernières années à un niveau modéré. En effet, l'indice de prix à la consommation s'est établi à 8,3 % en moyenne annuelle en 2008, contre -9 % en 2007 à cause de la crise

alimentaire et de la hausse subséquente des prix des denrées alimentaires, et ce, malgré la bonne production agricole de la campagne de 2007/2008 (Malhado *et al.*, 2009 : INSEED, 2009).

1.4. Situation démographique

La population du Tchad a rapidement augmenté au cours des 20 dernières années. Selon le 2e Recensement Général de la Population et de l'Habitat (RGPH2). En 2009, le taux annuel moyen d'accroissement est de 3,6 % et l'effectif de la population est estimé à 11 175 915 habitants en 2009. Si on confronte ces données du recensement et celles, plus fines, de l'EDST II (Enquête Démographique et de Santé au Tchad) de 2004, la croissance naturelle est de 4,5 %. Ce qui réduit le temps de dédoublement à 23 ans à peine, et représente l'un des taux d'accroissement les plus élevés en Afrique. La population est relativement jeune ; 48 % ont moins de 15 ans; 47 % ont entre 15 et 59 ans et 5 % ont 60 ans et plus (INSEED, 2011).

Les femmes représentent 50,7 % de la population contre 49,3 % des hommes. 80 % de la population environ, est concentrée sur un peu moins de 25 % du territoire, et seulement 21 % habite en ville. Cette population est donc majoritairement rurale : de l'ordre de 79 %. Mais la population urbaine s'accroît à un rythme plus rapide que la population rurale. La population est inégalement repartie sur le territoire national. Cette inégalité est caractérisée par des zones de faibles et de fortes concentrations. La densité moyenne de la population est passée de 4,9 habitants au km^2en 1993 à 8,7 en 2009. Il varie de 0,1 habitant au km^2 dans le Borkou-Ennedi-Tibesti (nord du Tchad) à 70,4 habitants au km^2 au Logone Occidental.

Les femmes en âge de procréer représentent 22,8 % de la population. Le taux brut de natalité est de 45 pour mille. L'indice synthétique de fécondité (ISF) est de 6,3 enfants par femme. Les grossesses sont précoces et nombreuses ; parmi les adolescentes de 15 à 19 ans, 30 % sont déjà mères ou enceintes de leur premier enfant ; elles contribuent pour 15 % à la fécondité totale. La jeunesse de la population a pour effet un pic de croissance de la population élevée, même si le niveau de fertilité va décliner dans un futur proche (INSEED, 2011).

1.5. Situation socioculturelle

Elle est caractérisée par un faible taux d'alphabétisation. Ce taux d'alphabétisation en toutes langues est de 13,5 % dans la population générale. Il est de 23 % chez les hommes et de 5,2 % chez les femmes. Parmi les Tchadiens, 8,3 % savent lire et écrire le français et 2,2 % l'arabe. Le taux brut de scolarisation de nos jeunes est faible en particulier pour les filles. Le taux brut de scolarisation dans le primaire est de 71,6 % en 2000 (Rapport du MEN, 2002), dont 88,3 % chez les garçons et 54,6 % chez les filles. Il y a eu certes un progrès, mais l'accès des enfants tchadiens à l'école est encore faible.

Au niveau de l'enseignement primaire, la situation est marquée par la faiblesse des effectifs des filles qui diminue considérablement, au fur et à mesure qu'on évolue dans le cycle scolaire. De 1997 à 1998, les filles représentaient 39 % des effectifs au CP1 ; elles n'atteignent que 23,6 % au CM2. L'enseignement secondaire de 1997 à 1998 comptait 20 % de filles dont 22 % dans le premier cycle et 2,3 % dans le second cycle (Rapport du MEN, 2002).

La réalité du pays est de fait très liée à son histoire récente, aux guerres qui ont ébranlé les notions d'Etat et de civisme ainsi que les capacités des institutions, créant une situation favorable à la corruption, à l'iniquité fiscale et la justice partisane. Le sentiment d'impunité et l'insécurité sont favorisés par l'extrême pauvreté, le chômage et l'analphabétisme. Sont touchés plus particulièrement, les sociétés rurales et les quartiers populaires en périphérie urbaine, avec

une inégalité d'accès aux soins de santé ou à l'éducation et une grande insuffisance d'équipements et de services essentiels de proximité (eau, énergie, assainissement, sécurité sociale…). Environ 256 groupes ethniques composent cette population, inégalement répartis sur l'ensemble du territoire. L'espérance de vie à la naissance est estimée à 50,3 années. Des centaines de dialectes sont parlés au Tchad. Les religions pratiquées au Tchad sont le Christianisme, l'Islam et les religions traditionnelles (EDST II, 2004).

1.6. Situation sanitaire

Pays enclavé d'Afrique centrale, le Tchad est parmi les pays les plus mal placés du point de vue des indicateurs sanitaires. La mortalité infantile (92 décès pour mille naissances en 2013) et la mortalité maternelle (11 pour 1000 naissances en 2010) sont parmi les plus élevées au monde. La couverture vaccinale est une des plus basses de l'Afrique subsaharienne. De plus, le contexte épidémiologique soumet le pays à des endémies chroniques tels que le paludisme, les maladies diarrhéiques, la tuberculose dont la fréquence et la gravité sont augmentées par le VIH/SIDA, la malnutrition infantile, les carences en iode, en fer, en vitamines, etc., et à des épisodes épidémiques annuels de choléra et de méningite, difficilement sous contrôle.

Le réseau d'égouts dans les centres urbains est quasi absent et il n'existe pas de système de traitement des déchets solides et liquides. L'évacuation anarchique des ordures ménagères et des excrétas reste un réel problème de santé publique qui engendre d'autres situations ingérables tels que la prolifération des mouches, des moustiques, des cafards, des rats, etc., véritables vecteurs de maladies. Un faible pourcentage de la population a accès à l'eau potable (36%) et la qualité douteuse de l'eau de consommation et des aliments offre des conditions très favorables à l'éclosion des maladies infectieuses d'origine hydriques et alimentaires dont la prévention reste difficile à cause du bas niveau d'instruction de la population (EDST, 2004).

L'accès à l'offre de soins de santé est lié à la disponibilité, à la qualité et à la motivation du personnel de santé. Malheureusement, le secteur de santé au Tchad souffre d'un double handicap lié à la fois à l'insuffisance et au manque de qualification des ressources humaines. En 2005, le Tchad comptait 1 Médecin pour 27 680 habitants contre 1 pour 10 000 (norme OMS), 1 Infirmier pour 6 453 habitants contre 1 pour 5 000 (norme OMS) et 1 sage femme pour 9 074 femmes en âge de procréer contre 1 pour 5 000 (norme OMS). Le pays est découpé en 18 délégations sanitaires régionales (DRS), 64 districts dont 56 fonctionnels et 911 zones de responsabilités dont 639 fonctionnelles. Le taux de couverture théorique est de 74,57% en 2007 (annuaire statistique du MSP, 2007).

Le système de santé au Tchad est caractérisé par l'insuffisance quantitative et qualitative des infrastructures de soins, mais aussi et surtout par le manque de ressources humaines. Cependant, le gouvernement a pris la mesure du problème et a entrepris d'y faire face en s'engageant, notamment, dans un processus de table ronde sectorielle associant les partenaires au développement, pour définir une stratégie commune de développement du secteur de la santé. L'accès des populations à des services de base de qualité est l'objectif général de la politique de santé, que s'est assigné le Tchad par l'adoption de son Plan National de Développement Sanitaire (PNDS).

1.7. L’aviculture au Tchad

Le Tchad est un pays à vocation agropastorale. Tant au niveau national que régional, les deux principaux secteurs économiques sont l’agriculture et l’élevage. Actuellement, plusieurs mesures incitatives à travers le PNSA (Programme National pour la Sécurité Alimentaire) sont mises en œuvre pour promouvoir le développement durable de ces deux secteurs majeurs afin de garantir la sécurité alimentaire. Une de ces mesures vise à impulser une nouvelle dynamique dans le but d’améliorer quantitativement et qualitativement les rendements de la filière avicole, en tant que ressources non négligeables à l’autosuffisance alimentaire (MEDP, 2008).

L'élevage de poulets au Tchad est en général de type traditionnel et vivrier avec un cheptel estimé à environ 30 000 000 de têtes. C'est principalement à N'Djamena, la capitale avec ses 993 492 habitants, que l’on retrouve la pratique semi - moderne de cet élevage avicole (type d’exploitation à mi-chemin entre l’élevage traditionnel, extensif et l’élevage moderne intensif conventionnel). Il comprend les poules pondeuses et les poulets de chair, estimés à environ 30 000 têtes par an. Les poussins d'un jour d'âge sont importés essentiellement de la France et du Cameroun, par le biais de la Coopérative des Professionnels pour le Développement de l’Elevage (CPDE). Cette coopérative créée en 1994, regroupe 70 membres issus de l’union des groupements d’aviculteurs professionnels (UGAPRO/T) et a pour mission essentielle l’importation, la production et la vente des volailles (pondeuses et chair). Elle dispose également d’une usine de production composée de broyeuses et de mélangeurs, pour la composition des aliments destinés aux volailles, à partir des intrants locaux.

Le secteur est encore jeune et beaucoup d’efforts restent à accomplir au niveau de la sensibilisation à l’endroit des publics cibles (autorités, aviculteurs, vendeurs, restaurateurs et consommateurs), en termes de biosécurité des aliments et de renforcement de la surveillance épidémiologique des bactériemies animales, notamment chez les volailles.

Toutes les fermes avicoles privées qui étaient répertoriées dans la région de N’Djamena correspondaient à de très faibles investissements et étaient de taille modeste (capacité moyenne de production : 1000 à 2000 sujets par bande), ne possédant en général que deux ou trois bâtiments en moyenne, avec une densité variant entre 3 et 13 sujets / m². Les murs étaient soit en terre battue, soit en semi-dur ou en dur et les toits en tôles (plaques de zinc). Les volailles élevées étaient, entre autres de races Isabrown, Leghorn et Hye-line.

Les performances de ces élevages privés se mesuraient à la nature extensive de leurs capacités de production et se traduisaient par une durée du cycle d’élevage longue (23 mois pour les pondeuses et 2 à 3 mois pour les chairs) et un gaspillage d’intrants (aliments avicoles, matériels biologiques, produits vétérinaires). Le sous-équipement des fermes, associé au manque de professionnalisme des producteurs face à la conduite de l’élevage aviaire ne faisaient qu’aggraver leurs coûts de production déjà très élevés.

2. Généralités sur les salmonelles

2.1. Les salmonelles

2.1.1. Historique

Isolé en 1880 par Eberth, le bacille d'Eberth fut ensuite décrit par Schroeter en 1886 comme agent de la fièvre typhoïde chez l'homme. Cependant, en 1885 Smith et Salmon isolèrent ensemble un bacille qui s'apparentait à celui découvert cinq ans plutôt par Eberth et le nommèrent *Bacillus choleraesuis*. Ce bacille était responsable du cholera chez le porc. En 1889, Klein isola l'agent de la typhose aviaire, identifié plus tard comme *Salmonella* Gallinarum. Le bacille de Loeffler (connu de nos jours sous l'appellation de *Salmonella* Typhimurium) a ensuite été isolé à partir de sang de souris atteintes de salmonellose en 1890. Le terme de *Salmonella* ne fut créé qu'en 1900 par le Français Joseph Lignières, en l'honneur du Docteur Salmon, directeur des services vétérinaires des Etats-Unis à cette même époque (Le Minor *et al.*, 1982 ; Le Minor, 1992).

Des cas de maladies de veaux, avec des symptômes très ressemblants à ceux de la salmonellose ont été décrits dans différentes parties de l'Europe continentale à la fin du XIX^{eme} siècle. Il semblerait que la salmonellose bovine ait existé depuis de nombreuses années et, que les germes isolés chez de nombreux veaux malades, par les pionniers Jensen, Thomassen, et Poels, auraient été probablement des salmonelles. La salmonellose chez le bovin adulte, a été rapportée pour la première fois aux Etats-Unis par Mohler et Buckley en 1902, et en Europe par Miessner et Kohlstock en 1912 (Sojka *et al.*, 1972).

2.1.2. Taxonomie et nomenclature

Sur la base de tests phénotypiques et de tests sérologiques, Kauffmann, pionnier de l'analyse du genre *Salmonella*, avait individualisé plusieurs sous-genres et de très nombreuses espèces de *Salmonella*. Depuis quelques années sur le plan international, grâce aux études moléculaires basées sur l'analyse comparative des gènes codant les ARN ribosomaux et sur des techniques d'hybridation ADN-ADN, il fut proposé que le genre *Salmonella* soit subdivisé en deux espèces distinctes: *Salmonella enterica*, espèce majoritaire et *Salmonella bongori*. La première espèce est, elle-même subdivisée en 6 sous-espèces: *enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae et indica* (Grimont *et al.*, 2000 ; Olsen, 2005).

Tableau 1: Espèces et sous-espèces de *Salmonella* et sources majeures d'isolement (Le Minor, 1992 ; Millemann *et al.*, 2010)

Espèces	Sous-espèces	Sources majeures d'isolement
enterica	*enterica*	Animaux à sang chaud
	salamae	Animaux à sang froid et environnements
	arizonae	Animaux à sang froid, dindes, moutons, chèvres
	diarizonae	Animaux à sang froid, dindes, moutons, chèvres
	houtenae	Animaux à sang froid et environnement
	indica	Animaux à sang froid et environnement
bongori	---	Animaux à sang froid et environnement
subterranea	----	environnement

Le nombre de sérotypes est supérieur à 2600 sérotypes, dont seulement 23 sérotypes pour *S. bongori* (Guibourdenche *et al.*, 2010 ; Yan *et al.*, 2003). Selon l'Institut Pasteur de Paris, le nombre de sérotypes répertoriés dans chaque sous-espèce, jusqu'à fin 2007 est le suivant :

enterica subsp. *enterica* : 1547
enterica subsp. *salamae* : 513
enterica subsp. *arizonae* : 100
enterica subsp. *diarizonae* : 341
enterica subsp. *houtenae* : 73
enterica subsp. *indica* : 13
bongori : 23

Soit un total de 2610 sérotypes. Quatre-vingt-dix-neuf pour-cent des souches isolées chaque année appartiennent à la sous-espèce *enterica* (Guibourdenche *et al.*, 2010).

Classiquement, tous les sérovars sont considérés comme pathogènes pour les animaux ou pour l'homme. Cependant, certains d'entre eux paraissent strictement spécifiques de leur hôte, comme par exemple *S.* Typhi chez l'homme ou *S.* Abortusovis chez les ovins. D'autres sérovars, comme *S.* Dublin chez les bovins, semblent bien adaptés à l'espèce hôte mais se révèlent germes pathogènes opportunistes pour d'autres espèces animales. Enfin, le groupe le plus largement représenté rassemble des sérovars qualifiés d'ubiquistes comme *S.* Typhimurium. Des différences de pathogénicité existent entre sérovars et les facteurs de virulence ou de toxicité ne sont pas uniformément distribués entre les sérovars (Baumler, 1997).

2.1.3. Schéma de Kauffmann-White-Le Minor

Chacune des sous-espèces est subdivisée en sérovars, dont la définition dans le schéma de Kauffman – White-Le Minor est basée sur l'identification des facteurs antigéniques O, H et Vi. Le seul antigène K reconnu chez les Salmonelles est l'antigène Vi (antigène de virulence ou de surface), qui peut exister chez Typhi, Paratyphi C et Dublin. L'antigène Vi de certaines salmonelles n'est pas un antigène de virulence (Popoff *et al.*, 2001).

Chaque sérovar est défini par une association caractéristique de ces facteurs, appelée formule antigénique. Selon Le Minor et Popoff (1987), ce schéma constitue une nomenclature des sérovars qui sont classés selon la formule antigénique. Il se base sur des facteurs nécessaires à une identification pratique et ayant peu de facteurs accessoires.

Toutes les subdivisions résultent des multiples combinaisons des antigènes somatiques O, de nature polysaccharidique, des antigènes flagellaires H, de nature protéique et les antigènes capsulaires (Vi). Le type de classement en fonction des antigènes O et H porte le nom de schéma de Kauffmann – White-Le Minor. Les noms des sérotypes doivent être écrits en caractères pleins (non italiques) avec une majuscule (Ex: *Salmonella enterica* subsp. e*nterica* sérotype Typhimurium). Cependant, les simplifications suivantes sont acceptées: *Salmonella* Typhimurium ou *S.* Typhimurium (Grimont et Weill, 2007)

La classification se fait par groupe antigénique O:; il y a le groupe O2, O4, O7...., puis au sein de chaque groupe O, selon les antigènes flagellaires phase 1 puis phase 2. La formule antigénique est caractéristique d'une souche appartenant à un sérovar défini (exemple: *S.* Typhimurium: 1,4, [5], 12:i:1, 2). Les facteurs liés à une lysogénisation sont soulignés et les facteurs accessoires sans relation avec la présence d'un bactériophage, sont placés entre crochets (Le Minor et Popoff 1987 ; Le Minor, 1988, Popoff *et al.*, 2004). Le tableau 2 donne quelques exemples de formules antigéniques de *Salmonella*.

Tableau 2: Principaux sérovars de *Salmonella* extraits du tableau de Kauffmann-White-Le Minor (Le Minor, 1992)

TYPE	ANTIGENE O	PHASE 1	PHASE 2
	GROUPE B		
S. Kisangani	1, 4.5, 12	a	1, 2
S. Abortus equi	4, 12	-	e, n, x
S . Paratyphi B	1, 4, 5, 12	b	1, 2
S. Java	1, 4, 5, 12	b	(1, 2)
*S.*Wien	4, 12	b	l, w
S. Abortus ovis	4, 12	c	1, 6
S. Stanley	4, 5, 12	d	1, 2
S. Schwarzengrund	1, 4, 12, 27	d	1, 7
S. Reading	4, 5, 12	e, h	1, 5
S. Chester	4, 5, 12	e, h	e, n, x
S. Derby	1, 4, 12	f, g	-
S. Essen	4, 12	g, m	-
S. Typhimurium	1, 4, 5, 12	i	1, 2
S. Bredeney	1, 4, 12, 27	l,v	1, 7
S. Brandenburg	4, 12	l, v	e, n, z15
S. Kiambu	4, 12	z	1, 5
S. Brancaster	1, 4, 12	z29	-
	GROUPE C1		
S. Choleraesuis	6,7	c	1,5
S. Larochelle	6,7	e, h	1,2
S. Montevideo	6,7	g, m, s	-
S. Oranienburg	6,7	m, t	-
S. Thompson	6,7	k	1,5
S. Virchow	6,7	r	1,2
S. Infantis	6,7	r	1,5
S. Bareilly	6,7	y	1,5
S. Tennessee	6,7	z29	-
	GROUPE C2		
S. Gatuni	6,8	b	e,n,x
S. Muenchen	6,8	d	1,2
S. Manhattan	6,8	d	1,5
S. Newport	6,8	e,h	1,2
S. Kottbus	6,8	e,h	1,5
S. Blockley	6,8	k	1,5
S. Bovis morbificans	6,8	r	1,5
S. Glostrup	6,8	z10	e,n; z15
	GROUPE C3		
S. Kentucky	(8), 20	i	z6
	GROUPE D1		
S. Enteritidis	1,9,12	g,m	-
S. Dublin	1,9,12	g,p	-
S. Panama	1,9,12	l,v	1,5
S. Goettingen	9,12	l,v	e,n; z15
S. Javiana	1,9,12	l,e23	1,5
S. Gallinarum-pullorum	1,9,12	-	-
	GROUPE D2		
S. Strasbourg	(9), 46	d	1, 7
	GROUPE E1		
S. Anatum	3,10	e,h	1,6
S. Meleagridis	3,10	e,h	l,w
S. London	3,10	l,v	1,6
	GROUPE E2		
S. Newington	3,15	e,h	1,6
	GROUPE E4		
S. Senftenberg	1,3,19	g, s, t	-
	GROUPE I		
S. Livingstone	16	b	e,n,x
S. Malstatt	16	b	z6
	GROUPE L		
S. Minnesota	21	b	c,n,x

2.1.4. Caractères morphologiques

Les salmonelles sont des bacilles droits à Gram-négatif, hôtes facultatifs du tractus digestif, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche. Ils ont un diamètre de 3 à 4 µm et mesurent en moyenne 0,8 µm de large sur 3,5 µm de long. La membrane cytoplasmique de la bactérie entoure le cytoplasme et possède la structure classique avec deux feuillets phospholipidiques contenant des protéines. À l'extérieur de la membrane cytoplasmique on trouve très généralement la paroi qui forme une enveloppe rigide constituée de polymères de surface, des structures protéiques externes tels que le glycocalyx, des appendices comme les flagelles et les pili. Ces structures ont des rôles importants pour la survie de la bactérie, et interviennent souvent comme facteurs de virulence **(**figures 3, 4, 5 et 6**)**:

- **Le glycocalyx:** Il est constitué de polysaccharides et recouvre la membrane externe. Il n'a pas de rôle vital pour la bactérie mais lui confère certaines propriétés. Il intervient lorsque les bactéries se développent dans le sol ou dans l'eau. Il participe aussi à l'adhérence de la bactérie sur la cellule hôte.

- **Les flagelles**: Constitués principalement d'une protéine -la flagelline- ils permettent à la bactérie de se déplacer par chimiotactisme. Celui-ci s'effectue par l'intermédiaire de récepteurs protéiques membranaires. Les flagelles sont également porteurs des antigènes H.

- **Les fimbriae** (ou pili): Constitués essentiellement d'une protéine (la piline), ils sont observables au microscope électronique sous forme d'appendices raides. Ils sont de deux types: les pili communs et les pili sexuels. Les pili communs sont très nombreux (cent à deux cents par cellule). Ils confèrent notamment des propriétés hémaglutinantes aux bactéries qui les portent. Les pili sexuels sont l'expression de certains plasmides. Toutes les salmonelles n'en possèdent pas et lorsqu'ils sont présents, ils sont peu nombreux (un à quatre par bactérie). Ces pili sont impliqués dans les phénomènes de fixation de bactériophages et de transfert de matériel génétique entre bactéries au cours de la conjugaison (Desperez, 1992).

- **Le lipopolysaccharide (LPS**): il est composé de trois parties, le lipide A fixé à la membrane externe (c'est l'endotoxine des entérobactéries), le core (oligosaccharide constant dans une même espèce bactérienne) et les chaînes polysaccharidiques latérales appelées antigènes O et possédant un fort pouvoir immunogène. Les mutants R ont perdu ces chaînes latérales et sont moins pathogènes. Du fait de sa forte charge électronégative, le LPS confère à la bactérie les propriétés suivantes : résistance aux sels biliaires, aux détergents, aux protéases, aux lipases, au lysozyme, à de nombreux antibiotiques. Il est thermostable et sa structure est représentée sur la figure 5. Au moins trente gènes, situés aux loci *rfa*, *rfb* et *rfc*, sont requis pour la synthèse du LPS. Leur position sur le chromosome de *S*. Typhimurium est connue avec précision (Popoff et Norel, 1992).

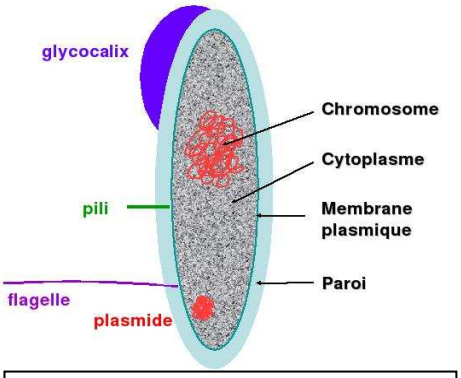


Figure 3: Structure d'une *Salmonella*

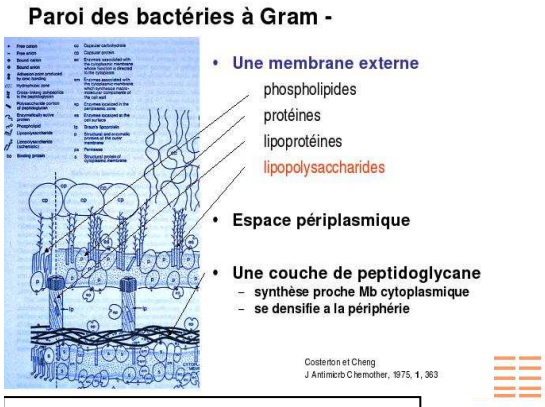


Figure 4: Paroi d'une bactérie Gram-

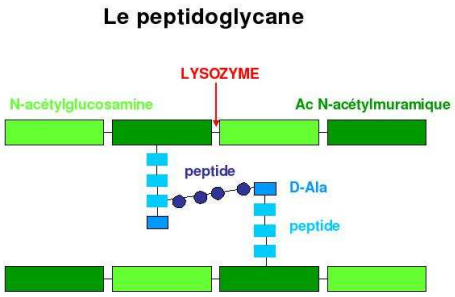


Figure 5: Structure du peptidoglycane

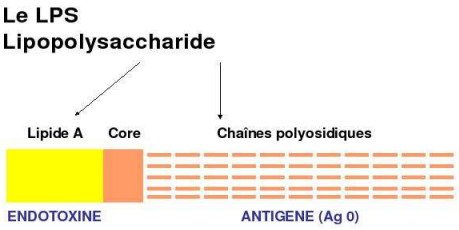


Figure 6: Structure du LPS

2.1.5. Caractères culturaux

Les salmonelles sont des germes mésophiles aéro - anaérobies. Elles ne sporulent pas et ne possèdent pas de capsule. En effet, les salmonelles se développent sur des milieux ordinaires à base d'extraits de viande. A un pH voisin de la neutralité, et à une température optimale de croissance de 37°C, les colonies sont généralement rondes, lisses (ou Smooth : S) à bords réguliers et ont un diamètre de 2 à 3 mm. Les salmonelles donnent des cultures homogènes après repiquage en bouillon. Il arrive exceptionnellement que des cultures de salmonelles soient isolées sous forme rugueuse (ou Rough : R).

Les salmonelles parviennent aussi à se développer, mais plus lentement, dans des conditions moins favorables de température (de 5 à 47°C), avec une croissance nettement ralentie pour les températures inférieures à 10°C. Une température de 72°C pendant 15 minutes, utilisée lors de la pasteurisation assure leur destruction. La réfrigération permet la survie des Salmonelles. La congélation provoque un abaissement de leur nombre, mais n'entraîne pas leur complète disparition (Desperez, 1992).

Les salmonelles supportent une gamme de pH allant de 4,5 à 9, avec un optimum entre 6,5 et 7,5. Elles se développent bien pour des valeurs d'activité de l'eau (Aw) oscillant entre 0,945 et 0,999. Dans les aliments, les salmonelles peuvent se multiplier jusqu'à des valeurs d'Aw de 0,93. La plupart des salmonelles sont capables de sur un milieu minimum, sans facteur de croissance. Quand elles sont adaptées à un hôte pour lequel elles ont un pouvoir pathogène manifeste, elles peuvent exiger un ou plusieurs facteurs de croissance pour cultiver (Desperez, 1992).

2.1.6. Caractères biochimiques

Les salmonelles possèdent les caractères biochimiques généraux de la famille des *Entérobacteriaceae* : bacilles à Gram négatif, mobiles grâce à une ciliature péritriche, ou immobiles, non sporulés, donnant une réponse négative au test à l'oxydase.

Les méthodes utilisées visent à identifier l'expression du phénotype au niveau du métabolisme de la cellule. On recherche ainsi :

- **la fermentation du sucre ou d'alcools** en présence d'un indicateur de pH (rouge phénol ou bleu de bromothymol). On peut ainsi mettre en évidence la présence d'acides produits par fermentation d'un substrat fermentescible. Lorsqu'ils sont en quantité suffisante, l'indicateur de pH vire à une autre coloration.

- **la production de métabolites** : recherche de nitrites produits à partir de nitrates, d'indole à partir du tryptophane, recherche des gaz produits au cours de la fermentation du glucose…

- **les enzymes bactériennes** : la décarboxylase de la lysine (LDC) et de l'ornithine (ODC), la tétrathionate réductase (TTR), la désaminase du tryptophane (TDA), l'uréase, la bétagalactosidase, la production d'H2S à partir du thiosulfate (présence d'une thiosulfate réductase)…

- **l'aptitude à cultiver en milieu minimal** en utilisant une source de carbone définie (par exemple le citrate de sodium en milieu de Simmons) (Caron et Menard, 1997 ; Desperez, 1992).

Tableau 3: Principaux caractères biochimiques utilisés pour l'identification des salmonelles (Caron et Menard, 1997).

Tests	Réactions	Tests	Réactions
Motilité (1)	+	Fermentation de :	
Réduction des nitrates	+	Glucose avec production de gaz (2)	+
Oxydase	-	Mannitol	+
Catalase	+	Maltose	+
Uréase	-	Lactose (3)	-
Indole	-	Saccharose (3)	-
Production de H_2S	+	Salicine	-
Utilisation du citrate Simmons	+	Adonitol	-
ONPG (4)	-	Dulcitol	+
Malonate de sodium	-	Lysine décarboxylase	+
Croissance sur KCN (5)	-	Arginine déshydrogénase	+
Rouge de méthyle	+	Ornithine décarboxylase	+
VP (6)	-	Désamination de la phénylalanine	-
TDA	-		
Gélatinase	-	Tétrathionate réductase	+

1 - Sauf *Salmonella* Gallinarum ; 2 – Sauf Typhi et Gallinarum ; 3 – *Salmonella* Arizonae fermente le lactose ; 4 – Ornithonitrophényl α-D- galactopyranose; 5 – Cyanure de potassium; 6 – VP : Voges – Proskauer

2.1.7. Caractères antigéniques

Comme toutes les entérobactéries, les salmonelles possèdent trois types d'antigènes ayant un intérêt de diagnostic. On peut distinguer des antigènes somatiques (O), des antigènes flagellaires (H) et des antigènes de surface (Vi). Les antigènes O sont représentés par un chiffre

arabe (1 à 67) et les antigènes H par une lettre pour la phase 1 et un nombre ou une lettre pour la phase 2 (Arlet *et al.*, 2006)

2.1.7.1. Les antigènes somatiques (paroi ou AgO)

Les antigènes somatiques sont portés par les chaînes de polysaccharides du LPS, l'ensemble fixé au « core », structure commune à touts les salmonelles. Le core est lui-même fixé au lipide A assurant ainsi l'ancrage du LPS à la membrane externe. Ils sont thermostables. Dans le schéma de classification de Kauffmann-White-Le Minor, les différents sérovars de salmonelles sont répartis en groupes A, B, C,…au sein desquels tous les sérovars ont au moins un facteur O en commun. Il existe :

- ✓ Des facteurs O majeurs: les souches qui les possèdent en commun, font partie d'un même groupe. Par exemple dans le groupe B, toutes les souches possèdent l'antigène O4 dont *S*. Typhimurium.

- ✓ Des facteurs O accessoires : leur intérêt est mineur, étant donné qu'ils sont souvent communs à de nombreux groupes (O12 est commun aux groupes A, B et D). Leur présence est liée à la modification de la structure du LPS par une enzyme, par un bactériophage ou par un plasmide. Cas antigènes fournissent une agglutination fine et granuleuse (Le Minor et Popoff, 1987).

2.1.7.2. Les antigènes flagellaires (AgH)

Ils sont portés par la flagelline, protéine de structure des flagelles présents chez les salmonelles mobiles. L'antigène H, de nature protéique, est thermolabile. La majorité des souches de salmonelles est biphasique pour cet antigène. Il peut s'exprimer alternativement sous deux formes différentes chez un même sérovar. Dans une même souche, certains bacilles peuvent avoir des antigènes dits «en phase 1», désignés avec des lettres minuscules et des antigènes «en phase 2» désignés par des chiffres arabes. Dans le schéma de Kauffmann-White-Le Minor, il existe deux colonnes correspondant à l'antigène H ; la première pour la phase 1 et la seconde pour la phase 2. Lorsqu'une des deux phases seulement est apparente, on fait apparaître l'autre phase en la cultivant en présence du sérum anti-phase apparente grâce à la technique d'inversion de phase (Le Minor et Popoff, 1987).

2.1.7.3. Les antigènes d'enveloppes Vi (capsulaires ou antigènes K)

Cet antigène est de nature polysaccharidique, visqueux et lâche, présent au niveau de la capsule. Toujours identique à lui-même, il n'existe que chez 2 sérovars de salmonelles; *S*. Typhi et *S*. Paratyphi et reste exceptionnel chez *Salmonella* Dublin. Il fut appelé Vi, car on le tenait pour responsable de la virulence du sérovar Typhi. Cet antigène peut masquer l'agglutinabilité de l'antigène O. Il est codé par deux loci de gènes chromosomiques*: via*A *et via*B (Popoff et Norel, 1992).

2.1.7.4. Les antigènes M et R

Ils n'existent que chez quelques salmonelles, généralement peu mobiles. Ce sont des antigènes plutôt rares et qui ne présentent pas d'intérêt pour l'identification des salmonelles. L'antigène M existe essentiellement chez *Salmonella* Paratyphi B ; il est responsable de l'aspect muqueux des colonies. L'antigène R est avirulent, dérive de l'antigène O, ses colonies sont rugueuses (forme Rough : R). Il est plus aisément phagocyté et plus sensible aux activités bactéricides cellulaires et sériques. Ils ne sont mis en évidence que chez les formes R (Rough)

de *Salmonella.* Chez les formes S, ceux-ci seraient dans la profondeur de la paroi, masqués par l'antigène O. Les souches R ne sont donc pas sérotypables (Le Minor et Popoff, 1987).

En résumé, pour l'identification d'un sérovar (ou sérotype), on doit donc d'abord rechercher l'antigène O majeur par réaction d'agglutination sur lame. Les deux spécificités de l'antigène H sont ensuite déterminées en commençant par rechercher les plus courantes.

2.1.8. L'habitat et la pathogénicité

2.1.8.1. L'habitat

Le réservoir des salmonelles est très vaste. Elles sont présentes aussi bien chez les animaux à sang chaud, malades ou porteurs sains (oiseaux, mammifères dont l'homme et les rongeurs), que chez les animaux à sang froid (reptiles, poissons et insectes) (Humbert, 1992).

Les salmonelles possèdent deux caractéristiques majeures qui expliquent, probablement, leur très large dissémination :

- ✓ la diversité des animaux susceptibles de les héberger.
- ✓ la capacité de survie des salmonelles dans leur environnement (Bouvet, 1995).

Elles peuvent se retrouver dans le milieu extérieur (sols, eaux, aliments pour animaux) ou dans les aliments destinés à l'homme. Dans ce cas, elles proviennent en très grande majorité d'une contamination d'origine fécale où elles peuvent persister longtemps et même s'y multiplier, lorsque les conditions de croissance sont favorables. En effet, elles peuvent survivre de 4 à 9 mois (selon les températures: 4 à 20 °C) dans les sols ou dans les étangs, plus d'un an dans les poussières, 28 mois dans les fientes sèches de volailles, 5 ans dans le duvet de couvoirs et 13 mois sur des carcasses de poulets congelés à - 21 °C (Euzeby, 1997 ; Murray, 2000).

Le réservoir principal, dans lequel les salmonelles se multiplient activement est constitué par le tube digestif de leurs hôtes potentiels, au point qu'ils sont actuellement considérés par certains auteurs comme hôtes normaux du tractus digestif (sauf *S.* typhi, *S.* Paratyphi A, B et C, qui sont considérés comme parasites de l'intestin) ; leur présence dans l'environnement ou dans l'eau, ne serait due qu'à des contaminations fécales (Bornert, 2000). Chez les poulets, le lieu de prédilection des salmonelles est le cæcum, ce qui explique leur diffusion systématique dans les fientes cæcales. Les animaux qui sont porteurs sains, excrètent de façon intermittente les salmonelles, à raison de 10^2 à 10^7 bactéries par gramme de fèces (Humbert, 1998).

2.1.8.2. Spécificité d'hôte

Sur des bases cliniques et épidémiologiques, les salmonelles ont pu être classées en trois catégories écologiques distinctes selon leurs hôtes préférentiels:

- ✓ Les sérovars spécifiques à l'homme: *Salmonella* Typhi; *S.* Paratyphi A, B, C et *S.* Sendai, respectivement responsables de la fièvre typhoïde et paratyphoïde
- ✓ Les sérovars spécifiques ou adaptés à certains animaux et qui peuvent exprimer une certaine pathologie particulière chez certaines espèces animales: exemple, *Salmonella* Dublin chez les bovins (mais aussi chez l'homme), *S.* Abortus ovis, *S.* Abortus equi, *S.*

Typhimurium variant Copenhagen chez les pigeons et *S.* Pullorum-Gallinarum chez les volailles (Humbert, 1998).

- ✓ Les sérovars dits ubiquistes sont les plus courants. Ils se retrouvent indifféremment chez plusieurs espèces à la fois. C'est le groupe des principaux agents de salmonelloses actuelles, dangereuses pour l'homme et pour les animaux (exemple: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *S.* Infantis et *S.* Saint Paul (Humbert, 1998).

2.1.8.3. La pathogénicité

2.1.8.3.1. Le pouvoir pathogène

Toutes les salmonelles sont potentiellement pathogènes, mais la gravité de l'affection provoquée est fonction de la souche et de la quantité de bactéries ingérées. La contamination passe par la voie digestive (figure 7). L'apparition d'une infection salmonellique dépend donc de la virulence de la souche (Van Asten et Van Dijk, 2005) et de la physiologie de l'hôte. Les différences de virulence peuvent être observées selon le sérotype et les espèces animales, en particulier avec l'existence d'une spécificité d'hôte et de sérotypes adaptés aux hôtes : *S.* Gallinarum-Pullorum chez les volailles, *S.* Choleraesuis chez le porc, *S.* Abortusovis chez les moutons, *S.* Abortusequi chez les chevaux, *S.* Dublin chez les bovins, etc., (Baumler, 1997).

Les salmonelles peuvent en général, entraîner:

- ✓ soit un portage sain, limité strictement au niveau du tractus digestif. L'excrétion fécale de salmonelles peut être intermittente, allant de moins de 10 à 10^7 germes par gramme de fèces. On parle dans ce cas de porteur inapparent ;

- ✓ soit un portage sain avec passage de quelques bactéries dans l'organisme mais sans symptômes apparents, les salmonelles sont hébergées dans les monocytes et les macrophages où elles sont capables de survivre sans se multiplier ;

- ✓ soit un portage latent, lorsque le portage ne peut être détecté en l'absence d'excrétion de germes ;

- ✓ soit une maladie avec symptômes diarrhéiques et hyperthermie, lorsque le système immunitaire de l'hôte est déficient ou dépassé par le nombre de salmonelles envahissant l'organisme. Elle survient à la faveur d'ingestion d'une dose de l'ordre de 10^5 à 10^8 germes.

La virulence des souches semble être due à de nombreux facteurs, liés d'une part aux éléments structuraux de la souche tels que les pili, les flagelles, le L.P.S., le système de captation du fer, les toxines, la capacité de survie dans les macrophages et la présence d'un plasmide. D'autre part, ils sont plutôt liés à l'hôte, comme la dose infectante, la voie d'inoculation et l'état immunologique de l'individu (Murray, 1986). Mais les bases moléculaires qui permettent la transgression de la barrière digestive puis la survie et la multiplication, dans les cellules de défense d'un hôte donné, sont encore mal connues (Humbert, 1998). En revanche, Millemann (1998b), a noté que le pouvoir pathogène d'une bactérie correspond à l'association d'un pouvoir invasif et d'un pouvoir toxique bien définis.

2.1.8.3.2. Le pouvoir invasif

Le pouvoir invasif des différentes souches est souvent associé à plusieurs facteurs, comprenant entre autres, la capacité des souches à se multiplier et coloniser la région iléo-cæcale du tube digestif, mais aussi le nombre important de bactéries présentes dans la lumière intestinale. La localisation des salmonelles dans les organes internes tels que le foie et la rate, s'explique par la richesse de ces organes en tissu réticulo-endothélial, lieu d'élection de ces bactéries (Carroll *et al.*, 2004).

2.1.8.3.3. Le pouvoir toxique

Trois types de toxines sont associés aux infections à salmonelles:

- ✓ L'endotoxine ou toxine glucidolipidoprotéique est certainement responsable des symptômes toxiques dans une salmonellose invasive. L'action de cette toxine sur les paramètres biologiques aboutit à une hypotension artérielle, à l'installation d'un collapsus cardio-vasculaire et dans certains cas à la survenue d'un état de choc pouvant aboutir à la mort. Cette action toxique a pour support le lipide A.

- ✓ Les deux autres toxines sont la cytotoxine, élaborée par la membrane externe, qui inhibe la synthèse des protéines dans les cellules épithéliales et l'entérotoxine, ressemblant à la toxine du choléra, qui serait responsable de l'augmentation du taux intracellulaire d'A.M.P. (Adénosine Mono-Phosphate) cyclique avec, comme effet, l'accumulation des fluides dans les interstices cellulaires (Rhen et Dorman, 2005).

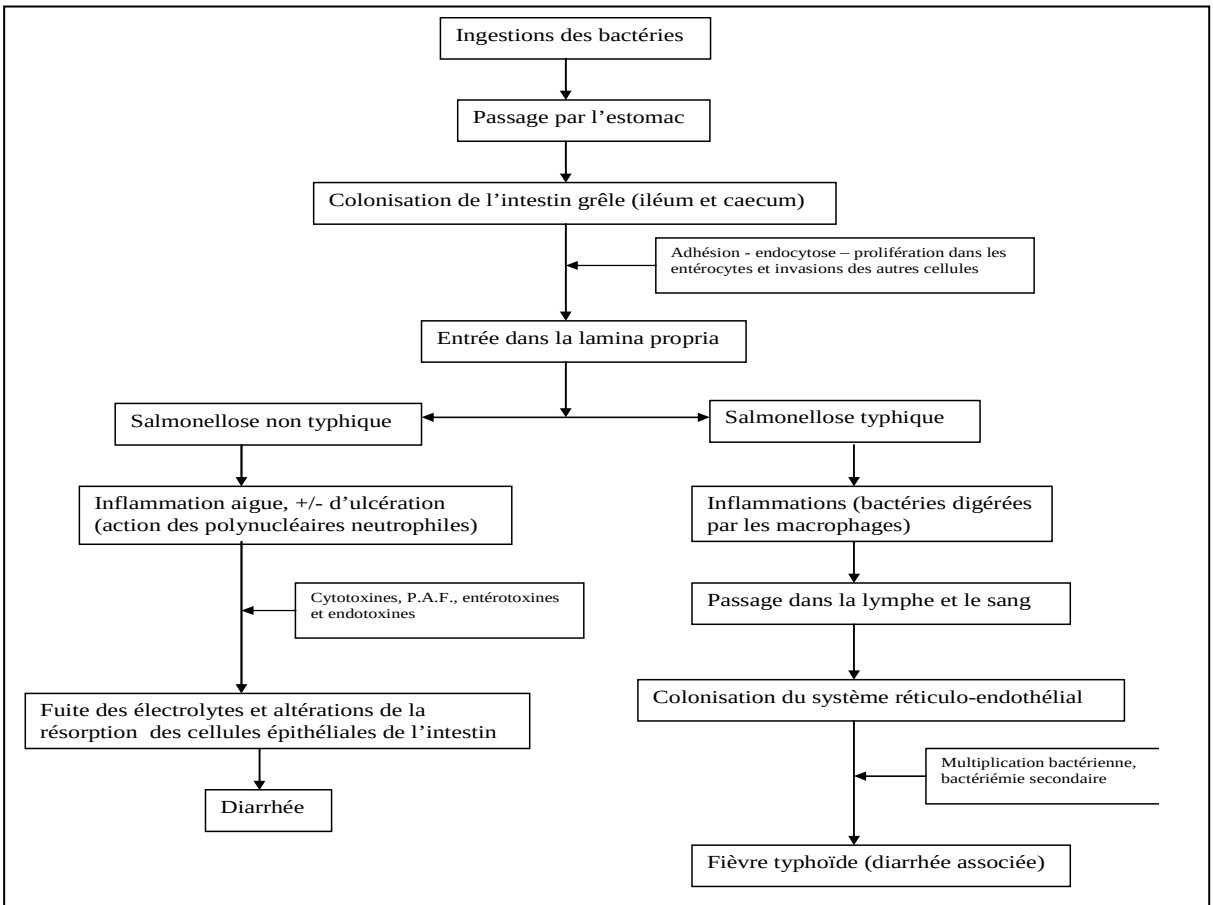


Figure 7 : Mécanisme de la pathogénicité de *Salmonella* (Gransart, 1998).

2.1.8.3.4. Les facteurs de virulence

Les facteurs de virulence qui sont identifiés chez les salmonelles impliquent plusieurs déterminants dont :

a. Les pili ou fimbriae

L'attachement aux cellules cibles, étape nécessaire à la colonisation et à la pénétration dans les cellules, est sous la dépendance de trois types d'appendices : les pili de type 1 qui sont les pili communs ; ils se fixent sur des résidus de D-mannose portés par les cellules eucaryotes ; les pili se fixant sur des ligands différents du D-mannose et enfin les pili plus courts, identifiés chez *Salmonella* Typhimurium. La bactérie du genre *Salmonella* possède une motilité à base de flagelles et exprime plusieurs types de fimbriae qui peuvent être utiles pour l'adhésion à des entérocytes (Van Asten et Van Dijk, 2005).

b. Invasion et colonisation de l'organisme

Le statut de la bactérie est déterminé par les facteurs de virulence, dont certains ont été identifiés récemment chez les *Salmonella*, alors que d'autres, dits facteurs de virulence «classiques» ont été étudiés depuis des décennies (Van Asten et Van Dijk, 2005). Les invasines codées par les gènes *SPI-1* permettent l'invasion de l'épithélium intestinal en quelques minutes grâce à un système de sécrétion de type III très efficace (*T3SS* ou *SSTT*) (Schlumberger *et al.*, 2005, Zhang *et al.* 2003). Environ 4% du génome de *Salmonella* (environ 180 gènes) sont associés à la virulence (Jarvelainen *et al.*, 2003).

Les gènes de virulence sont en partie organisés en îlots de pathogénicité : au moins 12 îlots de pathogénicité de *Salmonella* (*SPI*) ont été décrits. Ils ont probablement été acquis par transfert horizontal de gènes entre bactéries «éloignées». Ces gènes agissent de concert pour provoquer la diarrhée chez les veaux (Zhang *et al.* 2003). Les Produits de gène *SPI-2* et de gène plasmidique *spv* sont nécessaires pour la réplication intracellulaire, en particulier dans les macrophages (Rhen et Dorman, 2005 ; Waterman et Holden, 2003) et dans l'infection systémique chez la souris, par *Salmonella* Typhimurium (Baumler, 1997) et chez les veaux par *Salmonella* Dublin (Zhang *et al.* 2003).

c. Survie dans les phagocytes

In vitro, les salmonelles survivent dans les macrophages en inhibant la fusion phagosomes-lysosomes. De plus, elles se protègent de l'action toxique des radicaux oxygénés produits par les macrophages grâce à la synthèse de différents enzymes : catalase, superoxyde dismutase, glutathion-réductase. La synthèse d'une douzaine de protéines leur permet de se protéger des défensines et de s'adapter à un environnement acide (Popoff et Norel, 1992). En effet, en fonction de l'espèce hôte, certains sérotypes trouvent refuge contre les défenses humorales et des neutrophiles dans les macrophages. La réplication au sein de cette niche est une condition préalable pour le développement ultérieur d'une infection systémique (Santos et Baumler, 2004).

d. Le complexe lipopolysaccharidique

Le complexe lipopolysacchiridique de la surface des *Salmonella* est constitué notamment d'une chaîne polysaccharidique responsable de la spécificité antigénique somatique (antigène O). Cet antigène O joue un rôle important en inhibant la fixation du complexe d'attaque membranaire au niveau des membranes bactériennes. Les mutants dépourvus

d'antigène O (mutant « rough ») ou présentant une altération des antigènes O (mutant « semi-rough ») sont avirulents ou moins virulents. Le lipide A, est indirectement responsable de la fièvre, de l'anorexie, de l'abattement et du choc septique, provoquant la libération de cytokines (TNF Alpha, IL-1, IL-2, IL-6) par les macrophages (Popoff et Norel, 1992).

e. Synthèse de toxines et systèmes de captation du fer

Salmonella Enteritidis possède la capacité de synthétiser une cytotoxine thermolabile de 26 kDa. Une entérotoxine thermolabile a aussi été identifiée notamment chez *Salmonella* Typhimurium, elle s'apparente immunologiquement et fonctionnellement à la toxine du choléra et à la toxine LT d'*Escherichia coli.* Le fer, élément indispensable à la multiplication des salmonelles, n'est pas disponible dans l'organisme ; il est plutôt lié à la transferrine (dans le sérum), à la lactoferrine (dans les sécrétions) ou à l'ovo-transferrine dans les œufs. La synthèse de sidérophores, systèmes de captation de fer, permet aux salmonelles d'entrer en compétition avec la transferrine, la lactoferrine ou l'ovo-transferrine (Popoff et Norel, 1992).

2.1.9. Le diagnostic

Dans un échantillon soumis à l'analyse bactériologique, les salmonelles peuvent non seulement être présentes en petit nombre par rapport à une flore bactérienne nombreuse et variée, mais aussi se trouver dans un état physiologique précaire. Dans ce cas, le diagnostic peut être réalisé à l'aide des méthodes bactériologiques et immunologiques disponibles et variées. La recherche bactériologique des salmonelles nécessite quatre étapes : pré-enrichissement, enrichissement, isolement, identification. L'examen complet peut comprendre en plus l'antibiogramme. L'ensemble requiert au moins 72 heures, mais des résultats partiels peuvent être obtenus dans des délais plus courts et communiqués en cas d'urgence (Caron et Menard, 1997 ; Humbert et Salvat, 1997).

2.1.9.1. Les milieux

Il existe actuellement un nombre important de milieux d'isolement et de bouillons sélectifs d'enrichissement ; l'utilisation des milieux sélectifs repose sur l'expérience et le choix de l'utilisateur.

Tableau 4: Milieux d'enrichissement liquides (Caron et Menard, 1997)

Milieux d'enrichissement	Principe du milieu	Utilisation
Bouillon au Tétrathionate (+ novobiocine)	Croissance des salmonelles favorisée. Nombreux coliformes inhibés Gram + inhibés Les genres Klebsiella, Proteus, Pseudomonas et E. coli lactose (-) ne sont pas inhibés.	37°C, 24 à 48 heures
Bouillon au Sélénite	Le sélénium semble réagir avec les groupements soufrés de certains composés cellulaires.	37°C, 12 à 24 heures
Bouillon Rappaport Vassiliadis Soja (bouillon au vert malachite et chlorure de magnésium)	La multiplication sélective des souches de salmonelles est basée sur : -Forte pression osmotique, pH bas -Présence de vert malachite comme inhibiteur -Peu d'apport nutritif	42°C, 24 à 48 heures
Milieu semi solide de Rappaport Vassiliadis	Très sélectif grâce à la présence du chlorure de magnésium et au vert malachite et par addition de novobiocine.	42°C, maximum 24 heures

Tableau 5: milieux sélectifs solides (Caron et Menard, 1997)

Milieux d'isolement sélectifs solides	Principe du milieu	Utilisation	Aspects des colonies de *Salmonella*	Remarques
Milieu *Salmonella* – *Shigella* (S.S)	-Formation d'acide à partir du lactose avec révélation du pH acide par virage au rouge neutre : les colonies fermentant le lactose sont colorées en rouge. -La production d'hydrogène sulfuré à partir du thiosulfate de sodium qui, en présence de citrate ferrique, produit un précipité noir.	37°C de 18 à 24 heures	Colonies beiges à centre noir pour les souches H2S (+)	Certaines colonies de *Proteus* et de *Citrobacter* ont un aspect macroscopique identique
Milieu de Rambach	-Formation d'acide à partir du propylène glycol pour la plupart des salmonelles. -Révélation de la présence d'une béta-galactosidase par un indicateur coloré pour les Entérobacteriaceae qui possèdent cette enzyme.	37°C de 18 à 24 heures	Colonies rouges fuschia (certaines souches de salmonelles peuvent y apparaitre incolores	Certaines colonies de *Citrobacter freundii* ont des colonies de couleur fuschia
Milieu SM ID	-Formation d'acide à partir du glucorunate de sodium pour les S*almonella*. -Révélation de la présence d'une béta-galactosidase par un indicateur coloré pour les *Entérobacteriaceae* qui possèdent cette enzyme.	37°C de 18 à 24 heures	Colonies roses. D'autres colonies peuvent apparaitre incolores ou bleu - violacées	Certaines souches d'*E. coli* béta-galactosidase-du genre *Morganella* ou *Shigella* peuvent être roses.
Milieu XLT4	- Formation d'acide lors de l'utilisation des sucres contenus dans le milieu. -Décarboxylation de la lysine en cadavérine. -La production d'hydrogène sulfuré à partir du thiosulfate de sodium en présence de citrate ferrique ammoniacal.	37°C de 18 à 24 heures	Colonies jaunes rosées à rouges avec un centre noir (absence de centre noir pour les salmonelles H2S (-)	Milieu très sélectif vis-à-vis des souches de *Salmonella*. Les Citrobacters, certaines souches d'*Enterobacter* et d'*E. coli* donnent des colonies jaunes. *Proteus, Pseudomonas, Providencia, Yersinia* et *Actinobacter* sont totalement inhibés
Milieu XLD	-Utilisation des 3 sucres par fermentation (présence de rouge phénol qui vire au jaune par acidification. -inhibition des bactéries Gram + par le désoxycholate de sodium (sel biliaire). -la décarboxylation de la lysine par la LDC conduit à une alcalinisation. -en présence de citrate de fer ammoniacal, un précipité noir est formé lorsqu'il y a réduction du thiosulfate de sodium par les bactéries en H2S+	37°C de 18 à 24 heures	Colonies roses à rouges avec ou sans centre noir (production de H2S)	Salmonella Arizonae : lactose(+) produit des colonies jaunes
Milieu Hektoen	-inhibition de bactéries Gram(+) par la présence de sels biliaires. -présence de 3 glucides (salicine, saccharose et lactose). L'identification de salmonelles repose sur la non-attaque de ces glucides. -en présence de thiosulfate de sodium, les bactéries H2S(+) réduisent le citrate ferrique ammoniacal et se manifeste par l'apparition de sulfure de fer (couleur noire) au centre des colonies. - le système d'indicateurs colorés, composé de bleu de bromothymol et de fuschine acide permet de colorer en jaune orangé les entérobactéries lactose(+) et en bleu vert les lactose(-)	37°C de 18 à 24 heures	Colonies vertes ou bleuâtres à centre noir.	Le bleu de bromothymol : indicateur de pH La fuschine acide (qui se colore en présence d'aldéhyde) : teinte saumonée si la souche utilise 1 ou plusieurs de ces glucides présents.

2.1.9.2. Méthodes bactériologiques

2.1.9.2.1. Dans les élevages et environnements

La méthode bactériologique classique consiste en un isolement et une identification de la sous-espèce de salmonelle puis d'une identification intra-spécifique. Les techniques de recherche varient en fonction de l'origine du prélèvement. Lorsque l'échantillon provient de chiffonnettes, de fonds de boîtes, de poussières d'éclosoirs, de plumes, de l'eau, de prélèvements intestinaux, d'œufs incubés, d'organes prélevés sur des animaux morts, la recherche s'effectue en trois étapes : pré-enrichissement dans un milieu liquide non sélectif, destiné à revivifier les bactéries, enrichissement dans un ou plusieurs milieux sélectifs afin d'obtenir une multiplication sélective des salmonelles, et isolement sur un milieu solide pour obtenir des colonies isolées. Le milieu d'isolement sélectif permet d'orienter le diagnostic. L'adjonction de certains substrats non acidifiés par la majorité des salmonelles (lactose, glycérol, cellobiose, salicine, saccharose) permet de différencier les colonies de salmonelles des colonies formées par d'autres entérobactéries. La détection d'une C8-estérase propre aux salmonelles s'effectue en versant sur une gélose d'isolement un substrat chromogène (le 4-méthylumbelliféryl-caprylate=MUCAP) qui libère de la 4-méthylumbelliférone fortement fluorescente à 365 nm. D'autres milieux utilisent une propriété commune à la majorité des salmonelles comme l'acidification du propylène-glycol, l'acidification du glucuronate, la fermentation du xylose, l'absence de bêta-galactosidase, la décarboxylation de la lysine, la production d'H2S. Dans un échantillon comme des organes prélevés après sacrifice, les salmonelles sont dans un état physiologique satisfaisant et constituent la flore dominante ou exclusive de l'échantillon. L'isolement se réalise alors directement sur un milieu gélosé nutritif non sélectif. La détermination du sérovar et la lysotypie sont les dernières étapes de l'identification. L'identification du sérovar s'effectue par des réactions d'agglutination sur lame avec une culture humide et des sérums commercialisés (Humbert et Salvat, 1997)

2.1.9.2.2. Une méthode horizontale de référence (ISO 6579, AFNOR 2002)

Elle se fait en 3 étapes successives suivies d'une purification et d'une identification biochimique:

- ✓ Pré-enrichissement
  - Eau peptonnée tamponnée (EPT) *pendant 18 h – 20 h à 37°C.*
- ✓ Enrichissement dans deux milieux sélectifs :
  - Bouillon Tétrathionate/novobiocine de Mueller-Kauffmann (MKTTn) *pendant 24 h à 37°C,*
  - Bouillon Rappaport Vassiliadis Soja *à 42°C pendant 24 h*
- ✓ Isolement sélectif :
  - Géloses XLD et Hektoen (milieu au choix) *pendant 24 h à 37°C.*
- ✓ Purification
  - Etalement sur une gélose nutritive (1 colonie à 4 si la 1ère est négative) *pendant 24 h à 37°C.*
- ✓ Epreuves biochimiques
  - TSI et galeries API 20E

2.1.9.2.3. Dans les denrées alimentaires

La méthode de recherche systématique s'appuie sur la méthode de référence AFNOR. Elle fait intervenir un stade de pré-enrichissement permettant de revitaliser les bactéries avant leur passage sur milieu sélectif. C'est la revivification.

Il existe deux protocoles selon le type de produit. Le protocole I est inspiré de la méthode de routine NF V08-052 de mai 1997, longtemps utilisée, et qui concerne les produits frais ou décongelés et le protocole II inspiré de la méthode de référence ISO 6579 de 2002 pour les produits déshydratés, chauffés ou traités par additifs chimiques. Dans le second cas un pré-enrichissement est indispensable alors qu'il ne l'est pas dans le premier. L'ensemble des opérations d'identification durent de cinq à sept jours (Elgroud *et al.*, 2009).

2.1.9.2.4. Méthode utilisée en santé animale

Des méthodes standardisées et validées par l'AFNOR, sont utilisées en santé animale pour l'isolement et l'identification des salmonelles, ou pour la recherche de sérovars particuliers dans l'environnement des productions animales. C'est le cas de la N.F U 47-100 et la N.F U 47-101 de Février 2005, utilisées respectivement pour la détection des salmonelles dans l'environnement des productions animales et chez les oiseaux. Les procédures classiques se font en quatre étapes successives (Elgroud *et al.*, 2009):

- ✓ Pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée (EPT).
- ✓ Enrichissement dans 2 milieux sélectifs liquides au choix parmi le bouillon de Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS), bouillon au tétrathionate de Muller-Kauffmann, bouillon sélénite-cystine ou semi-solide, milieu semi-solide de Rappaport-Vassiliadis (MSRV).
- ✓ Isolement sur au moins un milieu sélectif solide, le milieu XLT4 et/ou le milieu Hecktoen.
- ✓ Identification biochimique et sérologique des colonies présentant les caractéristiques de *Salmonella* grâce aux galeries classiques d'identification ou galeries d'identification biochimique, ainsi que les sérums permettant l'identification des principaux sérovars.

2.1.9.3. Les méthodes immunologiques

2.1.9.3.1. Les techniques d'immunofluorescence

C'est l'un des procédés de recherche rapide des *Salmonella*. Cette technique conduit à un nombre important de résultats faussement positifs (environ 5 à 10 %).

2.1.9.3.2. Les techniques immunoenzymatiques

La technique ELISA (*Enzyme-linked immuosorbent assay*) est une méthode de diagnostic basée sur la formulation d'un complexe Ag-Ac dont l'anticorps en présence est couplé à une enzyme. Le marquage peut être réalisé par diverses enzymes, dont la peroxydase et la phosphatase. Le couplage a lieu sur l'anticorps dans la majorité des cas. Plusieurs variantes de cette technique existent dans la recherche : ELISA direct, ELISA indirect, ELISA sandwich et ELISA compétition (Liebana, 2002)

2.1.9.4. Les méthodes sérologiques

L'infection salmonellique entraîne une réponse du système immunitaire avec une production d'anticorps et une activation d'une réponse cellulaire. Les anticorps sont détectables dans le sérum des animaux infectés. La surveillance sérologique est basée sur les mêmes critères statistiques que la surveillance bactériologique. Elle permet de déterminer la prévalence des animaux sérologiquement positifs. Elle peut être utilisée conjointement à la méthode bactériologique de manière à améliorer la sensibilité des résultats.

En effet, les anticorps peuvent persister plusieurs mois, alors que l'excrétion bactérienne est devenue très faible. A l'inverse, au début de l'épisode infectieux, les anticorps sont à des taux encore très bas, et un cheptel infecté pourrait échapper à un dépistage sérologique. Il faut noter que l'usage de la vaccination peut conduire à l'obtention de résultats sérologiques positifs en l'absence de méthode analytique discriminante pour les salmonelles vaccinales de même sérogroupe (Feuillet, 2007 ; Liebana *et al.*, 2003).

Les tests sérologiques sont très sensibles et moins coûteux que les recherches bactériologiques, mais tout résultat sérologique positif doit être confirmé par la bactériologie.

Les anticorps recherchés sont les Ac anti-LPS et les Ac-antiflagelles. Ils ne sont donc pas entièrement spécifiques de *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium.
Les différentes méthodes analytiques sont :

- ✓ Agglutination rapide par plaque (RPA) : basée sur un antigène pullorique. Avec l'agglutination rapide sur lame, il existe une réaction croisée entre les Ac-anti Enteritidis et l'Ag pullorique (spécifiques chez les volailles);

- ✓ Agglutination lente en tube ;

- ✓ ELISA indirecte basée sur l'antigène LPS (antigène de paroi) des deux sérotypes Enteritidis et Typhimurium (sérogroupe B et D) ;

- ✓ DAS-blocking ELISA basée sur les Ac monoclonaux d'un Ag spécifique d'épitope flagellaire (antigène gm du sérotype Enteritidis ou antigène i de Typhimurium)

Il est important de rappeler que la contamination par les salmonelles conduit à la production d'anticorps circulants si et seulement si, la souche est invasive (Humbert et Salvat, 1997).

2.1.10. Les marqueurs épidémiologiques

Les marqueurs épidémiologiques sont des facteurs de discrimination très importants qui permettent de distinguer au sein d'une espèce bactérienne, les isolats d'une même origine ou d'origine distincte (Deplano, 2002). La diversité de *Salmonella*, tant au niveau de son habitat naturel qu'au niveau de son action sur l'hôte, rend délicate l'identification de l'espèce seule et la compréhension de la pathogénie de cette bactérie. D'où la nécessité de développer des techniques pour sa caractérisation, permettant de la discriminer au-delà du genre, en espèces, sous-espèces et en entité « type ». C'est ainsi que le développement de marqueurs épidémiologiques permettant la caractérisation et le suivi de souches bactériennes au cours du temps, s'est imposé (Gransart, 1998 ; Liebana, 2002).

2.1.10.1. Les marqueurs phénotypiques

Ce sont des techniques dites « traditionnelles », basées sur les caractères phénotypiques exprimés par les bactéries. Elles sont toujours mises en œuvre dans le cadre de la surveillance épidémiologique des contaminations par les salmonelles. Ce sont entre autres : la sérotypie, la biotypie, la lysotypie, la bactériocinotypie et l'antibiotypie (Millemann, 1998a).

2.1.10.1.1. La sérotypie

L'identification des sérotypes selon le schéma de Kaufmann-White-Le Minor est fondée sur la formule antigénique. La sérotypie décline la structure antigénique réelle des *Salmonella*, en tenant compte du déterminisme génétique des facteurs antigéniques. La sérotypie est la détermination des antigènes de surface par l'utilisation d'une série de sérums contenant des anticorps mono ou polyclonaux permettant ainsi de classer les souches en sérotypes. C'est la méthode la plus utilisée, même si la discrimination demeure peu absolue. En effet, les salmonelles sont classées selon leurs antigènes somatiques O (lipopolysaccharidiques) et leurs antigènes flagellaires H (région centrale de la flagélline hautement antigénique) d'où l'intérêt de la détermination combinée de plusieurs variétés d'antigènes pour une même souche (Fields *et al.*, 2006; Van Duyne *et al.*, 2006). La sérotypie permet de démontrer l'importance des sérotypes et leur fréquence, mais aussi de faire une analyse comparative plus fine, des sérotypes isolés chez les animaux et chez l'homme (Traub *et al.*, 2005).

2.1.10.1.2. La biotypie

La biotypie détermine les différences ou variations des caractères biochimiques de certaines souches au sein d'un même sérotype. La plupart des salmonelles sont prototrophes (elles n'ont aucune exigence en facteurs de croissance), à l'exception de sérotypes très adaptés à un hôte particulier (Typhi, Abortus-ovis…) qui sont auxotrophes pour un ou plusieurs facteurs de croissance. La technique du biotypage est simple mais la discrimination apportée n'est pas très importante (Grimont, 1992).

Des tests biochimiques révélant la présence de la gélatinase, de la betaglucuronidase ou la fermentation du dulcitol et du lactose permettent de subdiviser l'espèce *enterica* en six sous espèces. Cependant, les variations dans la durée d'incubation et la taille de l'inoculum peuvent affecter l'interprétation des résultats. Certaines souches fraîchement isolées peuvent exhiber des réactions différentes comparées aux souches conservées. La reproductibilité et le pouvoir de discrimination peuvent ainsi être mis en cause lors de la caractérisation de certaines souches (Dijkshoorn *et al.*, 2001).

2.1.10.1.3. La lysotypie

La lysotypie étudie la sensibilité des souches, ou leur résistance, à une série de bactériophages sélectionnés. La lysotypie est une méthode plus discriminante que la sérotypie, car elle permet de pousser la différenciation à l'intérieur des clones bactériens donnés. Elle est aussi reproductible et rapide mais sa capacité de typage est parfois limitée, car le lysotype peut être modifié après acquisition d'un plasmide ou d'un bactériophage ou modification du LPS (Lipopolysaccharide). Par ailleurs, la lysotypie perd son intérêt lorsqu'un type particulier de clone devient prédominant. C'est le cas avec *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Enteritidis qui dominent dans certaines régions géographiques pendant certaines périodes. (Gorman et Adley, 2004 ; Maré *et al.*, 2001)

2.1.10.1.4. La bactériocinotypie

La bactériocinotypie repose sur la recherche de la production de bactériocines ou de la sensibilité aux bactériocines. Cette technique est peu discriminante. Elle s'est montrée très peu discriminante dans des études épidémiologiques de souches de *Salmonella* Typhimurium (Millemann *et al.*, 1995). L'intérêt de son emploi serait de l'associer à la lysotypie pour mettre en évidence une grande variété à l'intérieur d'un même sérotype (Giovanacci, 1999).

2.1.10.1.5. L'antibiotypie

La sensibilité ou la résistance des *Salmonella* aux antibiotiques permet de parler d'antibiotypes. En général, les salmonelles sont sensibles au chloramphénicol et à beaucoup d'antibiotiques à large spectre, comme les ampicillines et autres dérivés. La distinction des antibiotypes pour des études d'intérêts épidémiologiques résulte de l'acquisition et du maintien de caractères de multirésistance aux antibiotiques obtenus par des transferts plasmidiques (Grimont, 1992). Toutefois, l'antibiotypie peut s'avérer utile en investigations localisées et limitée à de courtes périodes (Dijkshoorn *et al.*, 2001). Elle est surtout d'intérêt médical, car elle permet un suivi plus précis des souches particulières comme *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Enteritidis (Davis *et al.*, 2002 ; Moore *et al.*, 2003).

2.1.10.2. Les marqueurs génotypiques

Ces marqueurs sont, quant à eux, basés sur l'analyse de l'ADN total, chromosomique ou plasmidique, et sont très utilisés pour la caractérisation moléculaire de nombreuses espèces bactériennes. On rencontre ainsi les marqueurs liés à l'ADN plasmidiques, aux profils de restriction de l'ADN génomique (électrophorèse directe, utilisation de sondes…) et aux profils d'amplification de l'ADN génomique (Eric-PCR, rep-PCR, RAPD, PCR ribotypie, etc.) (Grimont, 1992).

2.1.10.2.1. Marqueurs liés à l'ADN plasmidique

Les plasmides sont des molécules d'A.D.N qui sont circulaires et extra-chromosomiques. Eléments mobiles, ils ne sont pas constants et ne portent pas d'informations génétiques essentielles à la survie des bactéries (Wachsmuth *et al.*, 1991). Les plasmides sont des structures auto-réplicatives contenant souvent des gènes codant la résistance aux antibiotiques et/ou des gènes de virulence (Popoff et Norel, 1992).

Les salmonelles hébergent des plasmides de multiples tailles allant de 1 à 200 kb. Les profils plasmidiques sont des outils épidémiologiques très intéressants. Grâce à ces marqueurs, on peut analyser le nombre et la taille de ces plasmides après migration électrophorétique en gel d'agarose. La comparaison des différents profils de restriction ainsi obtenus, permet de déterminer les liens de parenté entre les souches concernées sur la base du pouvoir discriminant entre plasmides de tailles similaires ou distinctes.

Pour *Salmonella* Enteritidis isolée de la filière aviaire, il a été montré que le typage plasmidique est plus discriminant que le ribotypage et l'IS200-typage, mais il l'est moins pour *Salmonella* Typhimurium (Millemann *et al.*, 1995).

2.1.10.2.2. Marqueurs liés à l'ADN chromosomique

Les méthodes de typage liées à l'ADN génomique sont très nombreuses. Elles sont fondées soit sur la restriction des molécules d'ADN, soit sur son amplification.

2.1.10.2.2.1. La RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism.)

Les enzymes utilisées dans cette restriction classique, sont conçues spécifiquement pour reconnaître et digérer l'ADN à des sites bien précis. On obtient alors plus d'une centaine de fragments qui sont ensuite séparés par électrophorèse. La comparaison des profils obtenus (Restriction Endonucléase Analysis) est très difficile en raison du nombre élevé de fragments. Les variations de taille sont le reflet du polymorphisme de ces fragments obtenus par restriction (Stanley *et al.*, 1994).

2.1.10.2.2.2. Electrophorèse en champ pulsé (Pulsotypage)

C'est la méthode de choix pour l'étude d'épidémiologie moléculaire des bactéries pathogènes. La technique consiste à diriger des enzymes sur des sites de digestion rares (macrorestriction), dans le but précis de diminuer le nombre de fragments de restriction (fragments de 20 à 30 kb). Les fragments restant sont de grandes tailles et mieux exploitables (de 50 à 1000 kb), (Dijkshoorn *et al.*, 2001). Les enzymes les plus couramment utilisées sont *Xba*I, *Spe*I et *Not*I (Millemann, 1998a ; Struelens *et al.*, 2001).

Le principe du pulsotypage consiste à soumettre les fragments d'ADN à des champs électriques alternatifs pendant des temps de pulsation précis. Les fragments ainsi orientés, migrent selon leurs tailles (Struelens *et al.*, 2001). La technique de pulsotypage est actuellement la technique de référence pour le typage bactérien, elle est très discriminante, reproductible, sûre et efficace (Eriksson *et al.*, 2005 ; Moore *et al.*, 2003).

Toutefois, certains auteurs précisent que son interprétation exige une très grande prudence, en particulier pour des isolats collectés sur de longues périodes de temps. De petites variations de profils observées par cette technique peuvent cacher des modifications complexes (Boerlin *et al.*, 1996). D'autre part, les résultats obtenus par cette technique ne concordent pas toujours avec ceux obtenus par d'autres techniques telles que la ribotypie (Olsen *et al.*, 1997).

2.1.10.2.2.3. IS-typage (Typage par séquences d'insertion)

Les séquences d'insertion (ou IS pour Insertion Sequence) sont des éléments transposables du génome bactérien, insérés dans des régions moins conservées que les ARN ribosomiques. Ces séquences sont très variables en nombre de copies (de 1 à 100 copies) et en tailles (de 0,7 à 2,5 kb) (Saunders, 2001). Les enzymes les plus souvent utilisées pour fragmenter le génome sont *Bgl*II, *Pvu*II et surtout *Pst*I qui donnent des profils de bonne clarté et interprétables (Millemann *et al.*, 1995 ; 2000).

Les séquences IS sont utilisées comme sondes d'hybridation des fragments de restriction pour discriminer des souches phylogénétiquement proches, mais issues de diverses espèces. C'est le cas par exemple des séquences *IS1* et *IS3* d'*Escherichia coli* et *IS630* de *Shigella sonnei* qui peuvent hybrider des régions bien précises du génome de certains sérotypes de *Salmonella* (Matsutani et Ohtsubo,1993 ; Millemann *et al.*, 1995).

L'IS*200* a été identifiée à l'origine sur des mutants de *Salmonella*, à savoir *Salmonella* Typhimurium LT2. C'est une séquence d'environ 700 pb, retrouvée sur le chromosome de la plupart des salmonelles mais aussi sur l'ADN plasmidique de quelques sérotypes (Lam et Roth, 1983). En 1997, Olsen *et al.*, rapportaient que *Salmonella* Typhimurium pouvait posséder entre 5 et 20 copies de la séquence IS*200* sur son génome, alors que *Salmonella* Enteritidis ou *Salmonella* Dublin n'en comportaient que 2 ou 3 copies, et *Salmonella* Agona n'en possèdait pas du tout.

L'IS*200* est considérée comme un marqueur possédant un très bon pouvoir discriminant, car les profils sont obtenus grâce au polymorphisme de fragments de restriction des sites d'insertion, mais aussi des réarrangements de l'ADN suite aux transpositions. Cette méthode est généralement utilisée dans les investigations épidémiologiques, en association avec d'autres techniques telles que la PFGE et la ribotypie (Chadfield *et al.*, 2001, Millemann *et al.*, 2000).

2.1.10.2.2.4. La ribotypie

L'Acide ribonucléique ribosomique (L'ARNr), organisé en opérons ubiquitaires, est très bien conservé chez de nombreuses espèces bactériennes. Le principe de la ribotypie repose sur l'utilisation d'opérons 16S et 23S de l'ARN ribosomique d'*Escherichia coli* pour hybrider les gènes des autres bactéries correspondants (Grimont, *et al.*, 2000). La comparaison de profils obtenus par les sondes ribosomiques 16S ou 23S a permis de constituer à partir de nombreuses souches bactériennes, des arbres phylogénétiques. Il a ainsi permis de déterminer les relations phylogénétiques existant entre les sérotypes de *Salmonella* (Old *et al.*, 1999).

Dans des conditions standardisées, la ribotypie est très reproductible et a un grand pouvoir de discrimination. Elle est très efficace dans la taxonomie des espèces et le typage moléculaire des souches génétiquement hétérogènes (Eriksson *et al.*, 2005 ; Millemann, 1998a). La ribotypie offre la possibilité de varier la nature de la sonde (ADN ou ARN), la taille de l'opéron ribosomique recherché, mais aussi le type et le nombre d'enzymes de restriction.

En 1995, Millemann a utilisé la ribotypie dans son étude épidémiologique sur *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Enteritidis isolées en élevage avicole, qui présentaient entre elles de probables liens de clonalité. En utilisant 4 enzymes de choix (*HindIII, BglII, PvuII* et *SmaI*), 9 ribotypes différents ont été recensés parmi les *Salmonella* Typhimurium, prouvant ainsi leurs liens de clonalité. Par contre, les isolats de *Salmonella* Enteritidis assez homogènes n'ont pas montré de liens dans ce cas précis. Eriksson *et al.* (2005) ont aussi démontré dans leur étude, l'efficacité de la ribotypie et de la PFGE pour la détermination des sources et des voies de contamination, lors d'épidémies de salmonelloses survenues en Suède et en Norvège.

2.1.10.2.2.5. RAPD (Random Amplified polymorphic DNA)

C'est une technique d'amplification d'ADN qui utilise une seule et courte amorce oligonucléotidique dont la séquence est choisie au hasard, ce qui permet d'améliorer le nombre de fragments de différentes tailles de profils d'ADN après électrophorèse en gel d'agarose. Elle est souvent utilisée pour le typage de plusieurs espèces bactériennes et en particulier, *Listeria monocytogénes* et *Salmonella* (Millemann *et al.*, 1996 ; Yan *et al.*, 2003).

La RAPD est une technique simple, rapide, efficace et discriminante pour le typage des bactéries mais elle manque de reproductibilité, car elle fait intervenir plusieurs facteurs qui sont

difficiles à maîtriser (Eriksson *et al.*, 2005). L'emploi de plusieurs amorces permet aussi d'avoir des profils significatifs, surtout pour *Listeria monocytogénes* (Giovanacci, 1999), de façon peu significative pour *Salmonella* Typhimurium avec les amorces OPG04, OPG10 et OPH4. Les résultats dans ce cas précis, ne montrent pas de corrélation avec les ribotypes (Millemann *et al.*, 1996).

2.1.10.2.2.6. ERIC-PCR et REP-PCR

Le génome bactérien possède de nombreux gènes spécifiques codant pour des courtes séquences hautement conservées dites séquences ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) et REP (Repetitive Extragenic Palindromic), retrouvées chez plusieurs espèces.

L'utilisation d'amorces spécifiques (ERIC 1R et ERIC 2) et (REP 1R et REP 2) permettent d'amplifier l'ADN qui est compris entre ces différentes séquences (Millemann *et al.*, 2000 ; Schneider et De Bruijn, 1996). Comme l'espace entre les séquences répétées diffère d'une unité à l'autre, on obtient ainsi différents profils par électrophorèse sur gel d'agarose.

Ces techniques permettent d'analyser et de rendre compte de la variabilité de l'ensemble du génome des bactéries appartenant à des phylums proches ou éloignés (Brisabois, 2001 ; Versalovic *et al.*, 1994).

3. Epidémiologie des infections à salmonelles

3.1. Les salmonelloses aviaires

3.1.1. Généralités

La salmonellose aviaire est une maladie causée par des sous-espèces de *Salmonella*. Elle peut aller d'un portage sain à une maladie mortelle (Bell et Kyriakides, 2002). Les volailles sont en général, connues comme des porteurs asymptomatiques (Rostagno *et al.* 2006). Les infections aviaires causées par les sérovars spécifiques Pullorum, responsable de la pullorose observée chez les poussins, et Gallinarum, responsable de la typhose chez la poule, sont des maladies graves, aujourd'hui rares dans les pays européens, mais encore prédominantes dans les pays émergents. Les salmonelloses provoquées par les autres sérotypes de salmonelles sont appelées paratyphoses.

S'il existe de nombreux sérovars de salmonelles ubiquistes connus chez les poulets (plus de 200 y ont été identifiés). *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium sont les plus fréquemment isolées. Les pertes directes en élevage sont en général assez maîtrisées, alors que les conséquences hygiéniques pour l'alimentation humaine et les pertes indirectes liées aux pertes commerciales qui en découlent, par leur fréquence et leur gravité, font de cette maladie une zoonose majeure (Barrow *et al.*, 1987 ; Dunkley *et al.*, 2009 ; Nisbet et Ziprin, 2001).

Le développement de l'incidence des toxi-infections alimentaires collectives chez l'Homme causées par *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Enteritidis, suite à la consommation de viande de volailles, d'œufs et d'ovoproduits, a révélé l'importance sanitaire et économique de la contamination de la filière avicole par ces bactéries (Cox *et al.*, 2000).

3.1.2. La pathogénie

3.1.2.1. Les étapes de l'infection

La contamination se fait le plus souvent par voie orale. Les salmonelles résistent à l'acidité gastrique et arrivent dans l'intestin grêle où elles se multiplient. La première étape de l'invasion par les salmonelles est une étape de colonisation intestinale. Elles adhèrent à l'épithélium et pénètrent par un phénomène d'endocytose dans les cellules épithéliales iléales et cæcales, notamment les tissus lymphoïdes incluant les plaques de Peyer, les amygdales cæcales et préférentiellement dans les cellules M. Dans le cas des salmonelles provoquant des maladies systémiques, le site d'attachement préférentiel se situe au niveau des plaques de Peyer (Euzeby, 1997).

L'infection salmonellique initie, par chimiotactisme, une réponse inflammatoire intestinale avec l'afflux d'hétérophiles et de macrophages. Les salmonelles survivent et se multiplient dans les macrophages. À proximité de la sous muqueuse, où elles sont phagocytées par des macrophages, les monocytes et les polynucléaires neutrophiles, les salmonelles sont capables de survivre dans ces cellules en inhibant la fusion phagosome / lysosome (Nakamura *et al.*, 1993). Elles peuvent alors atteindre les nœuds lymphatiques et mésentériques puis le sang (invasion systémique), sans doute à l'intérieur de ces cellules phagocytaires (macrophages, leucocytes hétérophiles) et s'installent dans le foie, la rate et la moelle osseuse. Dans cette brève période, une phase de multiplication survient dont la vitesse dépend de la virulence de la souche et de la résistance de l'hôte. La multiplication bactérienne peut aboutir à

la mort de l'hôte, où le nombre des bactéries peut atteindre un plateau avant de décliner (Euzeby, 1997 ; Mahammad *et al.*, 2010). Il existe 3 cas de figure pour le déroulement de l'infection, le portage sain étant le plus fréquent chez les volailles.

- ✓ L'infection est strictement limitée à la sphère digestive et peut correspondre à un portage latent avec élimination épisodique des salmonelles dans les fèces. Les porteurs latents sont cliniquement et anatomiquement indécelables, ils peuvent excréter des salmonelles, de façon continue ou intermittente. C'est le cas le plus fréquemment rencontré. Dans ce cas de figure, les salmonelles sont retrouvées dans différentes portions de l'intestin par culture, alors que les écouvillons cloacaux révèlent qu'il n'y a plus d'excrétion dans l'environnement. Leur lieu d'élection et de multiplication, chez le poulet est le cæcum. A ce stade de l'infection, les porteurs ne sont donc pas facilement détectables (Protais *et al.*, 1997).

- ✓ La colonisation du tube digestif précède le passage de la barrière digestive, avec invasion systémique et présence des bactéries dans les sécrétions et les excrétions, ainsi que dans l'appareil génital.

- ✓ Seule l'infection systémique demeure avec le portage chronique.

La majorité des sérovars de salmonelles :

- ✓ sont responsables d'un cycle fécal/oral avec multiplication et excrétion fécale.
- ✓ sont responsables d'une infection qui se limite au tube digestif, avec seulement une transmission horizontale avec ré-excrétion intermittente ou permanente dans l'environnement.
- ✓ se caractérisent par une adaptation à des hôtes variés et une répartition large dans l'environnement d'un poulailler : eau, sol, locaux, rongeurs, insectes, etc.

Le caractère invasif pour les volailles vaut essentiellement pour Enteritidis, ainsi que Typhimurium, mais aussi pour certaines souches de serotypes Heidelberg, Hadar, etc. (Jouy *et al.*, 2002). *Salmonella* Typhimurium, très ubiquiste, contamine en surface environ 2 p. cent des œufs. *Salmonella* Enteritidis contamine environ 1 p. cent des œufs : très invasives, les souches de ce sérovar sont en effet capables de coloniser l'oviducte et les ovaires, entraînant la contamination interne de l'œuf. Au final, même si un très petit nombre d'œufs se trouve contaminé, le volume des œufs consommés est tel qu'il s'agit d'un problème significatif de santé publique (Protais *et al.*, 1997).

3.1.2.2. Symptômes et lésions

Les rapports hôte/bactéries dépendent du sérovar et de la souche, de sa dose initiale, de l'âge des animaux au moment de l'infection, de leur matériel génétique, de leur statut immunitaire (les symptômes sont observés essentiellement sur les poussins de moins de 15 jours et sont rares sur les poulets de plus de 4 semaines), de l'environnement de l'élevage.

Les symptômes ne sont pas spécifiques et sont similaires quel que soit le sérovar. Dans quelques cas particuliers (hôtes à risques, ingestion d'une grande quantité de salmonelles, invasivité de certaines souches pour un même sérovar, etc.), une pathologie transitoire, essentiellement digestive avec diarrhée, est parfois accompagnée d'atteinte de l'état général.

Compte tenu de sa forte affinité pour le tractus génital, lorsque *Salmonella* Enteritidis passe la barrière digestive et envahit l'organisme de l'hôte (infection systémique), l'infection

peut être transmise verticalement. Dans le cas des poules pondeuses, l'infection est ainsi transmise aux œufs du fait de l'aptitude à coloniser l'ovaire et l'oviducte, et à la descendance dans le cas où il s'agit d'œufs issus de reproducteurs (Humphrey, 1999 ; Protais *et al.*, 1997).

En résumé, *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium, sont actuellement les sérotypes les plus rencontrés dans les salmonelloses aviaires (paratyphoses) :

- ✓ Ils provoquent les formes cliniques les plus graves, surtout observées chez les jeunes animaux souvent d'allure septicémique, et notamment en période périnatale avec une mortalité brutale dans les jours qui suivent l'éclosion, de la prostration (poussins en boule, frileux), une diarrhée liquide blanchâtre et un ventre gonflé.

- ✓ On observe également de nombreuses mortalités en coquille. L'autopsie révèle une non-résorption du sac vitellin avec un contenu souvent liquide et grumeleux, un aspect cuit généralisé, une hépatomégalie avec des lésions dégénératives nodulaires, des lésions cæcales plus ou moins intenses avec présence fréquente d'un magma caséeux (parfois très discret), éventuellement de la péricardite et de l'aérosacculite.

- ✓ Chez les poussins plus âgés et donc plus résistants, l'allure est davantage subaiguë. Les poussins atteints sont tristes, cyanosés, assoiffés, présentent une diarrhée aqueuse jaune verdâtre, parfois hémorragique (Humphrey, 2006).

- ✓ Ils sont ubiquistes (surtout Typhimurium) et disposent de réservoirs amplificateurs tels que les porcs et les bovins.

3.1.2.3. La contamination de l'œuf

Plusieurs mécanismes aboutissent à la contamination interne ou externe de l'œuf aux différents étages de l'appareil génital.

3.1.2.3.1. Surface des œufs

La contamination de la coquille se produit lors du passage dans le cloaque au moment de la ponte, ou sur le matériel d'élevage contaminé. C'est le mode de contamination le plus souvent retrouvé. Les salmonelles survivent au cours du stockage mais n'ont aucune possibilité de multiplication à la surface de la coquille. La contamination des denrées alimentaires a lieu au cours de la préparation et l'intoxication a lieu à la faveur d'une rupture de la chaîne du froid avant la consommation (Protais *et al.*, 1997).

3.1.2.3.2. Contamination interne des œufs

Les salmonelles peuvent contaminer le milieu interne de l'œuf. La contamination interne se fait :

- ✓ soit par transmission trans-ovarienne avec contamination du jaune d'œuf,

- ✓ soit par contamination dans l'oviducte (essentiellement dans la partie haute) à la faveur d'une remontée des bactéries du cloaque dans l'oviducte, avec contamination du blanc d'œufs avant la formation de la coquille (Protais et Lahellec, 1989 ; Cox *et al.*, 2000).

Le blanc d'œuf n'est pas un milieu favorable à la multiplication des salmonelles. Il possède une activité antibiotique naturelle grâce à deux protéines, l'ovotransferrine et le

lysozyme. Elles agissent respectivement en appauvrissant le milieu en fer, indispensable à la croissance bactérienne, et en détruisant les parois de certaines bactéries.

Ces deux protéines n'expliquent qu'une partie du potentiel antimicrobien. D'autres agents antibactériens présents dans le blanc d'œuf restent à identifier. Les sites de contamination les plus fréquents sont, soit la partie externe de la membrane vitelline, soit l'albumen l'entourant, ou par passage des salmonelles au travers de la coquille, à la faveur d'une solution de continuité (fêlure, lavage par exemple).

La coquille assure la protection de l'œuf contre toute pénétration microbienne susceptible de le contaminer. L'intégrité de la coquille est donc déterminante pour le maintien de la qualité sanitaire de l'œuf (Rose *et al.,* 1999).

L'émergence des salmonelles en tant que cause majeure de salmonelloses humaines dans de nombreux pays est attribuée à cette capacité à coloniser le tissu ovarien des poules et à être présent dans le contenu d'œufs en coquille. La contamination interne des œufs semble être surtout le résultat de la capacité des souches de salmonelles (en particulier *S.* Enteritidis) à coloniser les tissus reproducteurs tels que les ovaires et les parties hautes de l'oviducte (Jouy *et al.*, 2002).

3.1.3. Epidémiologie analytique

3.1.3.1. Habitat

L'épidémiologie des salmonelles dépend principalement du type de salmonelles mis en cause lors d'une salmonellose. L'ubiquité de ces entérobactéries permet de les retrouver dans différents milieux (Tableau 6). Elles sont disséminées dans l'environnement à partir des déjections des animaux contaminés ne présentant souvent pas de symptômes cliniques apparents. Les salmonelles peuvent être ainsi présentes à toutes les étapes de la chaine de production de la filière avicole depuis des troupeaux de reproducteurs jusqu'aux élevages et abattoirs (Hanes, 2003 ; Murray, 2000).

Les salmonelles peuvent en outre survivre pendant de très longues périodes dans le milieu extérieur : de quelques jours à 9 mois dans le sol, quelques mois dans les aliments non acidifiés, sur les tiges et les feuilles ensilées et plus d'un an dans les poussières, le duvet et les matières fécales bovines (Gray et Fedorka-Cray, 2001). Elles peuvent aussi se fixer sur de nombreux supports, tels que : les bottes, les brosses, les pelles, les roues de brouette, les vêtements et autres (figure n°8).

La contamination peut aussi s'étendre à l'eau, aux aliments pour animaux, aux sous produits d'activités agroalimentaires, aux environs des fermes, aux poissons et aux reptiles (Berends *et al.,* 1996). Les rongeurs et les insectes sont aussi cités comme source importante de *Salmonella* dans un élevage (Letellier *et al.*, 2006).

Tableau 6 : Principaux sérovars classés selon l'origine des souches en France en 2009 (IRS, 2012).

Santé et production animales		Hygiène des aliments		Ecosystème naturel	
Sérovars	**nb**	**Sérovars**	**nb**	**Sérovars**	**nb**
Senftenberg	2719	Typhimurium	635	Typhimurium	31
Indiana	939	Derby	515	Mbandaka	23
Montevidéo	816	Dublin	413	Stourbridge	17
Typhimurium	814	Montevidéo	236	Eboko	14
Mbandaka	731	Indiana	182	S.IIIb 38:r:z	8
Enteritidis	517	Hadar	149	Veneziana	7
Derby	396	Enteritidis	140	Derby	7
Kottbus	314	S.I 1,4[5],12:i-	116	S.I 1,4[5],12:i-	7
Regent	300	Agona	111	S.IIIb 47:lv:z_{53}	6
Livingstone	205	Mbandaka	106	Kottbus	6
Napoli	190	Tennessee	80	Ohio	5
Anatum	167	Give	77	S.IIIb 61:i:z_{53}	4
Infantis	153	Senftenberg	76	Napoli	4
Dublin	137	Livingstone	76	Panama	4
Kedougou	116	Rissen	75	Enteritidis	4
Saintpaul	115	S.I 1,3,19:z_{27}:-	72	Bredeney	4
Agona	109	Bredeney	68	Infantis	4
Bredeney	94	Anatum	52	Tennessee	4
Veneziana	80	Paratyphi B	51	S.IIIb 17:z_{10}:enxz_{15}	3
Bareilly	71	Infantis	51	Tudu	3
Newport	71	S.IIIb 61:k:1,5,7	50	Rissen	3
Hadar	67	Kottbus	44	Hadar	3
S.I 1,4[5],12:i-	65	Kedougou	42		
Lille	63	London	41		
Virchow	60	Brandenburg	39		
Sous total	9309	Sous total	3497	Sous total	171
Autres sérovars	1039	Autres sérovars	757	Autres sérovars	64
Nombre total de Souches inventoriées	10348	Nombre total de Souches inventoriées	4254	Nombre total de Souches inventoriées	235

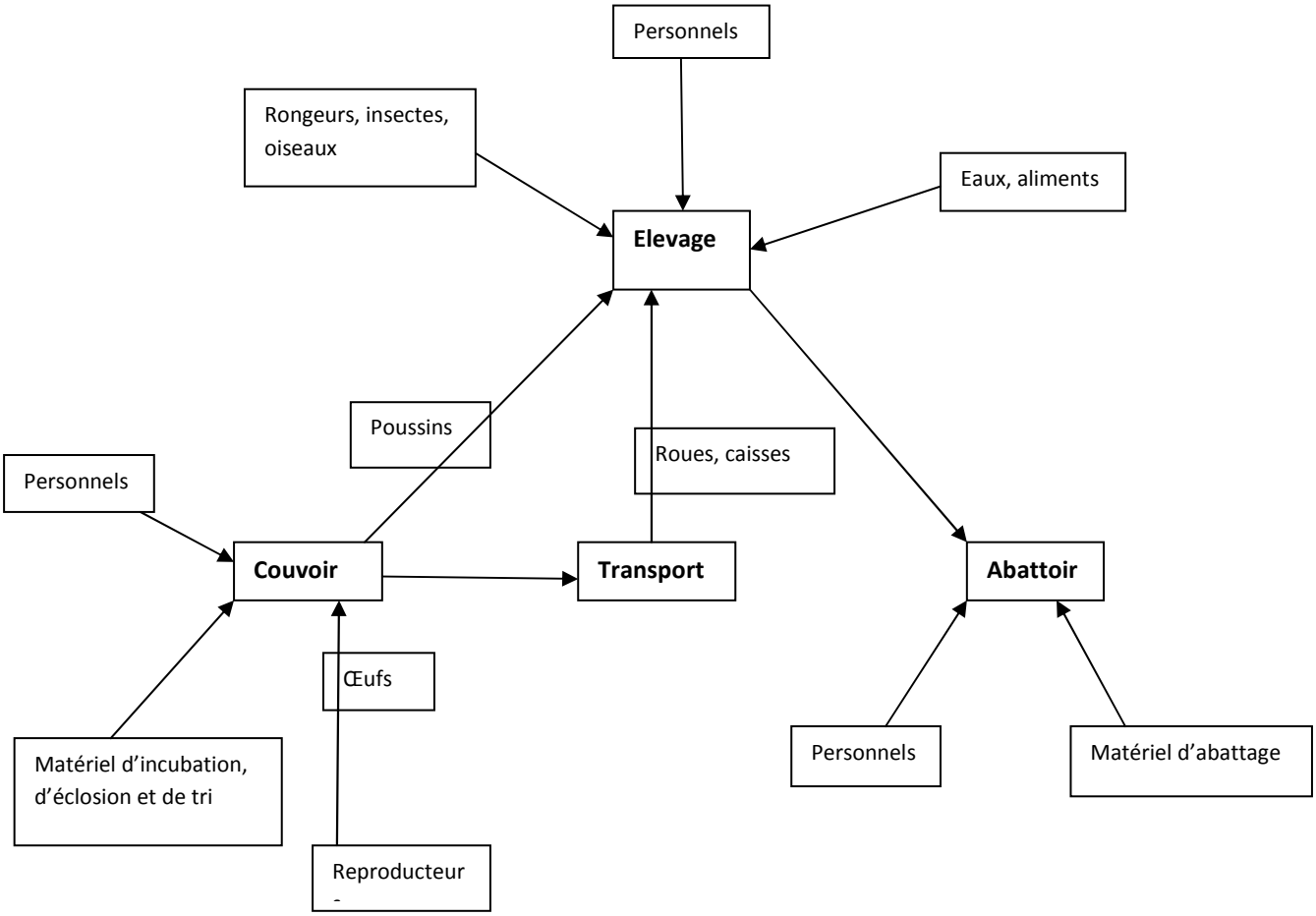


Figure n° 8 : Cycle de transmission des salmonelles dans la filière avicole (Feuillet, 2007)

3.1.3.2. Facteurs de contamination

Le manque d'hygiène et les aliments contaminés constituent des facteurs de risque majeur pour les élevages. L'hygiène à la ferme est très importante, et permet de limiter les cycles de contamination de lots successifs de volailles par les salmonelles résidentes de la production et de circonscrire une contamination, au niveau d'une loge ou d'un compartiment bien précis (Lo Fo Wong et Hald, 2000).

La taille du troupeau, les aliments conditionnés à l'extérieur de la ferme, l'achat des poussins infectés, la saison, le mauvais aménagement des effluents d'élevage, une succession de bandes sans nettoyage et désinfection représentent tout aussi des facteurs prédisposant à la contamination de la ferme (Dahl *et al.*, 1997).

Les aliments représentent une source importante de contamination du fait de nombreux points critiques à contrôler : les matières premières végétales ou animales ; les équipements, la décontamination lors de la granulation, le stockage et le transport. La distribution d'un aliment contaminé, à des poussins ou à des adultes, est à l'origine de porteurs sains qui sont responsables de la dissémination des germes au sein de la bande (Barrow et Lovell, 1991).

Le portage sain ou asymptomatique de *Salmonella* dans l'intestin est en effet fréquent chez les volailles, et présente une nette influence sur la persistance chez les animaux et la contamination des élevages.

3.1.3.3. Sources de l'infection

Dans les élevages avicoles, en général, les sources des agents infectieux sont très diverses. On distingue ainsi, cinq catégories principales de sources de salmonelles parmi lesquelles :

- l'environnement de l'élevage avec les animaux domestiques, les rongeurs, les insectes, l'homme (chaussures, vêtements), les équipements (chariots, caisses), les autres animaux de rente, les oiseaux (sauvages) ;
- les poussins livrés ;
- les roues des camions de livraisons (aliments, poussins) ;
- l'aliment et l'eau de boisson ;
- les matières fécales (fientes) qui représentent la source la plus potentielle.

L'élevage intensif qui concentre de nombreux animaux sur un espace réduit, favorise la contamination entre animaux et au passage, le milieu extérieur. Les bâtiments et leurs abords par le biais du fumier, du lisier et autres effluents, le matériel d'élevage, les moyens roulants sont également une source importante de contamination.

A cette liste, s'ajoutent les reptiles qui représentent aussi une source de contamination potentielle, bien qu'elle soit difficile à évaluer (Protais *et al.*, 1997).

3.1.3.4. Modes de transmission

Compte tenu des formes très bénignes de l'infection à *Salmonella*, la contamination passe généralement inaperçue. Il existe la transmission horizontale directe ou indirecte qui passe par de nombreux vecteurs:

- Voies principales : le personnel, l'équipement, les autres animaux de rentes et de compagnie
- Voies secondaires : oiseaux, rongeurs, insectes etc.
- Autres voies : aliment, eau, air contenant des poussières, fèces, plumes.

La transmission horizontale peut être réduite de manière efficace par la mise en place de barrières sanitaires strictes et par le nettoyage et la désinfection de l'environnement de la ferme. Au sein du troupeau de poules pondeuses, la transmission horizontale se fait surtout par l'ampleur du mécanisme d'ingestion / multiplication / excrétion et le recyclage des germes infectieux (Humbert, 1992).

Lorsque les salmonelles s'installent, le taux de colonisation en salmonelles reste souvent entre 0 et 40 p. cent dans un lot et varie selon les différents stress. En effet, lorsque les volailles sont stressées, elles ont tendance à manger les fientes, ce qui contribue à une augmentation accrue des salmonelles (Bornert, 2000 ; Humbert, 1992)

3.2. La salmonellose chez les autres espèces animales

3.2.1. Généralités

En général, les bactéries du genre *Salmonella* sont pathogènes pour de nombreuses espèces animales, avec toutefois des différeences selon les couples hôte-sérovar et l'intervention ou non de facteurs de risque. L'infection ne se traduit donc pas toujours par une expression clinique, et les animaux peuvent être apparemment sains jusqu'à des niveaux de portage élevés. L'expression clinique elle-même varie également en fonction du couple hôte-sérovar. Les infections à salmonelles engendrent ainsi chez les bovins et chez les ovins des problèmes de fertilité provoqués principalement par les sérotypes qui leur sont inféodés (Fresney *et al.*, 2007 ; Smith, 2002).

3.2.2. Les bovins

Les principaux sérotypes responsables de salmonelloses cliniques chez les bovins sont : *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Bovismorbificans et *Salmonella* Typhimurium. D'autres sérotypes ont parfois été isolés chez des animaux malades. La salmonellose sévit chez les bovins adultes de manière sporadique, mais prend une allure épizootique chez les veaux. (Pedro et Szyfres, 1989). Les vaches laitières, en raison de leur réceptivité particulière aux salmonelles, constituent une plaque tournante pour la circulation des salmonelles en milieu rural (Martel et Prave, 1994). La salmonellose bovine revêt plusieurs aspects selon le type d'animaux atteints et selon le sérovar. Elle se manifeste classiquement par une entérite hémorragique hyperthermisante, contagieuse, accompagnée parfois de symptômes respiratoires. La mortalité est importante en l'absence de traitement approprié. La forme abortive de salmonellose est en régression du fait de la diminution des infections par *S*. Dublin. Les lésions observées diffèrent selon le mode aigü ou chronique de la maladie (Caron et Menard, 1997).

3.2.3. Les porcins

Les porcins sont les hôtes de nombreux sérotypes de *Salmonella* et constituent le principal réservoir de *Salmonella* Choleraesuis (Proux *et al.*, 2001 ; Korsak *et al.*, 2004). Les sérotypes de *Salmonella* Enteritidis sont généralement isolés dans l'intestin et les ganglions mésentériques des pors tandis que *S.* Choleraesuis est très invasive. La fréquence de l'infection chez le porc par divers types de salmonelles, explique que les denrées d'origine porcine soient incriminées comme source de l'infection humaine (Fedorka-Cray *et al.*, 2000).

3.2.4. Les équidés

Salmonella Abortusequi provoque des avortements chez la jument dans les derniers mois de gestation et de l'arthrite chez les poulains. Ce sérotype a une répartition mondiale, mais le cheval est également sensible à d'autres types de salmonelles, en particulier à *Salmonella* Typhimurium (Pedro et Szyfres, 1989).

3.2.5. Les chiens et les chats

Ces animaux peuvent être infectés par divers sérotypes et être des porteurs asymptomatiques. Ils contractent l'infection en ingérant les fèces d'autres chiens, d'autres animaux ou de l'homme. Les chats et les chiens peuvent aussi s'infecter avec des aliments contaminés (Pedro et Szyfres, 1989).

3.3. Moyens de lutte

3.3.1. Lutte thérapeutique

L'efficacité de la médication par les antibiotiques pour traiter et prévenir les infections à salmonelles ubiquitaires continue de faire débat. En effet, l'utilisation des antibiotiques a montré son efficacité dans le contrôle de l'évolution des salmonelles, mais l'utilisation anarchique est souvent à l'origine de graves problèmes de résistance bactérienne et de leur plus grande dissémination en aviculture.

Chez les poulets de chair dont la durée de vie est courte, il n'est généralement pas nécessaire d'utiliser les antibiotiques. Cependant, certains éleveurs prennent des initiatives pour traiter des troubles digestifs, assimilés à des salmonelloses, par des antibiotiques qui parfois déséquilibrent la flore intestinale avec comme conséquences le risque de salmonelloses, l'excrétion durable du germe et la sélection de bactéries résistantes (Humbert et Salvat, 1997).

Pour diminuer le taux de portage salmonellique de poulets destinés à la consommation, il est théoriquement possible d'utiliser les antibactériens mais il faut préciser les risques pour la santé humaine en matière de résistance des bactéries. Il est toujours recommandé d'utiliser les antibiotiques avec précautions, au bon moment, à la bonne dose et pendant une durée appropriée (Humbert et Salvat, 1997 ; Singer *et al.*, 1992).

3.3.2. Prophylaxie

3.3.2.1. Prophylaxie sanitaire (biosécurité)

A travers le monde, il a été démontré que l'application des mesures sanitaires et les programmes de contrôle peuvent contribuer de manière considérable à la réduction de la prévalence des salmonelles chez la volaille, par le biais des mesures telles les bonnes pratiques d'élevage et de biosécurité. Les barrières sanitaires représentées par les mesures générales d'hygiène sont les premiers éléments à mettre en place avant l'emploi des procédés spécifiquement adaptés à la lutte contre le danger *Salmonella* ou tout autre traitement (Humbert et Salvat, 1997).

3.3.2.2. Mesures générales d'hygiène

Les locaux, le personnel et l'environnement doivent répondre à certains principes généraux :

- ✓ Un isolement rigoureux des locaux vis à vis de l'extérieur, pour protéger les locaux, les équipements et les animaux ;
- ✓ le respect du principe de la marche en avant avec délimitation d'une zone propre et d'une zone sale ;
- ✓ Le non entrecroisement des courants de circulation (matières premières et produits finis ou produits avec déchets) ;
- ✓ La propreté, la désinfection et le bon état d'entretien des équipements et du matériel ;
- ✓ La propreté et sensibilisation à l'hygiène du personnel ;
- ✓ La propreté et le lavage des mains, le changement et désinfection des bottes sont essentiels pour la protection des bâtiments d'élevages (Humbert et Salvat, 1997).

3.3.2.2.1 Approvisionnements

Les aliments et l'eau, peuvent être contaminés par les matières premières animales mal stérilisées ou par des matières végétales contaminées par des vecteurs tels les rongeurs, soit pendant leur stockage ou leur distribution. Il faut pour cela des matières premières de qualité et des conditions de stockage satisfaisantes, une désinfection spécifique des silos de l'élevage ainsi qu'une qualité d'eau irréprochable. Les véhicules de transport et tous les «intrants» doivent être contrôlés rigoureusement, notamment par l'installation de pédiluves et de nettoyage et désinfection des véhicules et des cages (Schneitz et Mead, 2000).

3.3.2.2.2. Nettoyage et désinfection

Les opérations de nettoyage et de désinfection doivent suivre un protocole complet, comportant des étapes fondamentales et précises (Van Immerseel *et al.,* 2005):

- ✓ Pré-nettoyage consistant en des opérations de rangement, de balayage, de raclage et de dépoussiérage ;
- ✓ Nettoyage qui se fait généralement à l'eau chaude additionnée d'un détergent et qui aboutit à la propreté visuelle ;
- ✓ Rinçage intermédiaire ;
- ✓ Désinfection. Elle utilise des désinfectants efficaces en agro-alimentaire tels que les alcalins chlorés, les peroxydes d'acides, les produits iodés, les biguanidines, et à un moindre degré les ammoniums quaternaires qui doivent être employés conformément aux spécifications des fabricants en matière de dose, de température, de temps de contact et de nettoyage préalable ;
- ✓ Rinçage final ;
- ✓ Séchage.

Ce protocole doit être appliqué à la lettre à chaque fin de temps de travail tout au long de la chaine de transformation (généralement en fin de journée), car l'omission d'une quelconque étape peut aboutir à l'inefficacité relative, sachant que l'emploi des détergents n'est pas compatible avec les désinfectants ; ce qui peut entraîner la persistance des contaminations croisées. Enfin, les opérations du protocole doivent être formalisées, décrites et gérées en plan de nettoyage de qualité, et vérifiées régulièrement par des analyses bactériologiques

Le personnel doit s'être lavé les mains avant la prise du travail, après les pauses, après manipulation d'aliments ou objets souillés, toutes les 45 minutes à 1 heure au cours du travail, et surtout après usage des toilettes. Le lavage des mains consiste en un savonnage soigneux des mains et des avants bras pendant 30 secondes, suivi d'un rinçage et d'un séchage au moyen d'un essuie mains à usage unique. Les produits irritants, les essuie mains à air chaud, les savonnettes, l'eau trop chaude ou trop froide et les robinets à commande manuelle sont proscrits (Van Immerseel *et al.,* 2005).

3.3.2.3. Mesures spécifiques

- ✓ Infrastructures, équipements et matériels appropriés ;
- ✓ Clôture et isolement strict des élevages ;
- ✓ Protection des bâtiments contre les insectes et les rongeurs ;
- ✓ Désinfection et vide sanitaire entre bandes successives : système tout plein-tout vide (ALL IN ALL OUT, Van Immerseel *et al.,* 2005) ;
- ✓ Propreté de l'environnement immédiat en évitant l'épandage de litière à proximité des élevages ;

- ✓ Elimination des porteurs au moyen d'examens sérologiques ;
- ✓ Evacuation des salissures vers des fosses septiques ou réseaux d'eau usée ;
- ✓ Dératisation et désinsectisation ;
- ✓ La propreté et le lavage des mains, le changement et désinfection des bottes sont essentiels pour la protection des bâtiments d'élevages (Bell, 2002 ; Schneitz et Mead, 2000).

3.3.2.4. Prophylaxie médicale

3.3.2.4.1. Additifs alimentaires anti-*Salmonella*

3.3.2.4.1.1. Acidification de l'eau de boisson

L'acidification de l'eau de boisson consiste à supplémenter l'eau de boisson avec un acide organique (acide butyrique) qui, non seulement abaisse le pH de l'eau, mais surtout abaisse le pH du contenu intestinal, le plus loin possible dans l'intestin, avec un effet également dans les cæca. L'acidification n'agit pas comme un antibiotique, mais comme un agent modifiant le milieu intestinal, le rendant défavorable à la multiplication des salmonelles, son action est limitée dans le temps ; ce qui implique des administrations répétées et régulières tout au long du lot. Le but de la supplémentation n'est pas d'éliminer toutes les salmonelles, mais d'abord de les empêcher de se développer, en agissant le plus tôt possible, puis de maintenir cette population de salmonelles en dessous d'un seuil d'excrétion, enfin d'empêcher la contamination du lot entier (Van Immerseel *et al.*, 2005).

3.3.2.4.1.2. Les prébiotiques

Ce sont des ingrédients des aliments non digestibles qui ont un effet favorable pour la stimulation sélective de la croissance, ou de l'activité d'un nombre restreint d'espèces bactériennes déjà présentes dans l'intestin. La flore intestinale transforme ces prébiotiques par fermentation, en acide gras volatils, ce qui peut conduire à une modification de l'ensemble de la flore. C'est l'exemple des fructo-oligosaccharides (Van Immerseel *et al.*, 2005).

3.3.2.4.1.3. Les probiotiques

C'est une autre classe de composants utilisables dans l'aliment : des micro-organismes vivants, inclus dans les aliments qui ont un effet favorable sur l'hôte par amélioration de l'équilibre de la flore intestinale. Chez la volaille, des tests avec des probiotiques et en particulier certaines souches de *Bacillus* et des Lactobacilles, ont permis de réduire le niveau de colonisation de l'intestin par *Salmonella* (Van Immerseel *et al.*, 2005).

3.3.2.4.1.4. Concept de NURMI et RANTALA : les flores de barrière

On sait que les poulets sont très sensibles aux infections à salmonelles durant la première semaine de vie car le développement de la flore intestinale est progressif. Le principe de la flore de barrière consiste à donner à l'animal le plus précocement possible, en général à 1 jour d'âge, une flore équilibrée non pathogène qui va coloniser la lumière intestinale des poussins. En s'implantant la première, cette flore va empêcher l'adhésion et donc l'implantation ultérieure de germes issus du milieu extérieur, donc peu contrôlés et susceptibles d'être pathogènes (colibacilles, salmonelles) ou indésirables (salmonelles) (Feuillet, 2007).

Lorsque la flore anaérobie est dominante, elle baisse la tension en oxygène et favorise ainsi les anaérobies. En acidifiant le milieu par les bactéries lactiques qui produisent des acides

gras volatils, pouvant inhiber la croissance des entéropathogènes et produisant des bactériocines dont l'action est proche de celle des antibiotiques. Ces germes constituent une barrière entre des germes exogènes et la muqueuse intestinale, d'où leur nom de flore de barrière (Schneitz et Mead, 2000; Van Immerseel *et al.*, 2005).

3.3.3. La vaccination

La vaccination en élevage de poulet de chair ne serait pas justifiée, vu la durée de vie très courte des animaux ; néanmoins la vaccination pourrait venir compléter l'ensemble des mesures préconisées en prophylaxie sanitaire et en aucun cas ne peut suffire seule. En revanche, la vaccination des poulettes au moyen de vaccins tués, d'autovaccins ou de vaccins atténués ont montré une certaine efficacité qui se traduit par une réduction nette du portage et de l'excrétion. Mais cette prévention n'est ni suffisante ni durable, si le contexte environnemental n'est pas satisfaisant. Aujourd'hui, il est utopique de vouloir élever des oiseaux sans salmonelles, mais chacun des acteurs de la filière volaille doit se mobiliser pour diminuer la prévalence et éradiquer les sérotypes les plus pathogènes (Barrow et Wallis, 2000).

L'innocuité doit être la qualité première des vaccins. Les vaccins tués doivent tout simplement subir une inactivation correcte alors que les vaccins vivants, d'utilisation plus risquée pour la santé humaine, doivent être stables, non-sujets à des mutations réversibles, incapables de survivre dans l'environnement et surtout avirulents. D'une manière générale, les vaccins vivants sont considérés comme plus efficaces que les vaccins tués. Les vaccins vivants peuvent être distribués dans l'eau de boisson, alors que les vaccins tués nécessitent une ou deux injections. Il existe dans le commerce, des vaccins spécifiques contre *S.* Enteritidis et *S.* Typhimurium. Les autovaccins donnent des résultats assez satisfaisants selon les sérotypes ciblés, mais ne permettent pas l'élimination totale des salmonelles, car le portage persiste au niveau des organes (foie, rate et colon) et l'excrétion des salmonelles se poursuit dans les fientes des animaux vaccinés (Barrow et Wallis, 2000 ; Feuillet, 2007).

3.4. Les salmonelloses humaines

3.4.1. Généralités

Les salmonelles sont des bactéries entériques, acquises par voie orale et adaptée à la vie dans le mucus du tractus digestif. Elles ont un tropisme particulier pour le tube digestif des animaux en général, et des volailles en particulier, qui constituent sans doute le réservoir d'origine. Ce tropisme est lié à l'évolution de ces bactéries avec leur niche écologique durant des millénaires, qui a abouti à une sélection de gènes adaptés, notamment liés à leur caractère microaérobie, à leur métabolisme et à leurs caractères physiques, leur permettant de se mouvoir dans le mucus digestif. La maladie humaine la plus fréquemment associées aux salmonelloses est, par conséquent, une entérite aiguë causée par une infection intestinale qui peut se compliquer par des localisations secondaires et d'un syndrome post-infectieux (Fresney *et al.*, 2007).

A l'exception de *Salmonella* Typhi et des sérotypes paratyphiques (A, C et certaines souches de B) qui sont spécifiques de l'homme, toutes les autres infections dues aux salmonelles non typhiques peuvent être considérées comme des zoonoses. La salmonellose est sans doute la zoonose d'oringine alimentaire la plus répandue dans le monde. En général, l'homme se contamine en ingérant des aliments contaminés, le plus souvent d'origine animale (viande, et en particulier de volailles, produits carnés, œufs et produits laitiers) consommés crus, insuffisamment cuits ou recontaminés après cuisson. C'est la maladie la plus importante en termes d'impact sur la morbidité et la mortalité chez l'Homme. Les salmonelles humaines surviennent sous forme sporadique ou de TIA mais elles peuvent aussi entraîner des épidémies régionales, voire internationales (Delmas *et al.*, 2010 ; Majowics *et al.*, 2010).

3.4.2. Tendances épidémiologiques

3.4.2.1. Epidémiologie descriptive

Depuis de nombreuses années, *Salmonella* constitue une des causes majeures des infections du tractus digestif humain, liée à la consommation de denrées alimentaires d'origine animale.

Vu le large spectre d'animaux pouvant être porteurs de *Salmonella*, une grande variété de produits alimentaires, consommés crus, peu cuits ou ayant fait l'objet d'une contamination post-cuisson, peut être à l'origine d'une contamination humaine : viande - et particulièrement volaille -, produits carnés, œufs et produits laitiers. Plus rarement la contamination peut avoir pour origine un contact direct avec un animal malade ou porteur sain par l'intermédiaire des mains.

Les salmonelloses d'origine alimentaire peuvent donner lieu à des foyers très importants, qui peuvent atteindre une échelle nationale voire internationale, si un aliment commercialisé à large diffusion se trouve contaminé.

En France, une étude menée par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), à partir de six sources de données (Centre national de référence, réseaux sentinelles, données de surveillance départementale, données de l'assurance maladie), a permis d'estimer le nombre de cas annuels confirmés de salmonelloses humaines non-typhiques pour la période 1995-1999. Il y aurait ainsi entre 32 000 et 43 000 cas entraînant de 6 000 à 10 700 hospitalisations compliquées de 100 à 560 décès (Delmas *et al.*, 2006 ; Vaillant *et al.*, 2004).

Durant les années 2006, 2007 et 2008, ce sont 3 127 foyers de toxi-infection alimentaire collective (TIAC), maladie à déclaration obligatoire, soient 33404 patients qui ont été déclarés par les médecins, les biologistes, les responsables d'établissements ou les particuliers aux Autorités de Santé. La moitié des foyers de TIAC dont l'agent infectieux a pu être déterminé était dû aux bactéries du genre *Salmonella*.

Le Centre National de Référence des *Salmonella* à l'Institut Pasteur répertorie environ 10000 isolements annuels de *Salmonella* chez l'homme depuis 2004. Le sérotype majoritaire est Typhimurium (ubiquitaire), suivi par le sérotype Enteritidis (filière œuf). Ces deux sérotypes représentent 70% de tous les isolements de *Salmonella* (Tableau 8). Il était jusqu'à présent assez difficile d'avoir une idée du nombre réel de cas annuels (TIAC + cas sporadiques) mais une enquête nationale (Institut Pasteur-Afssaps-InVS) auprès de 3375 laboratoires de biologie médicale a révélé environ 17 000 cas humain annuels confirmés de salmonellose en France pour l'année 2008 (Weill et Le Hello, 2011).

Une liste descriptive des épidémies de salmonelloses survenues en France entre 2002 et 2010 est indiquée dans le tableau 7 qui suit.

Tableau 7 : Description des principales épidémies d'origine alimentaire dues à *Salmonella* et répertoriées au CNR-Salm entre 2002 et 2010 en France (Vaillant *et al.,* 2012).

Sérotype	Année	Lieu	Nombre de cas	Origine
Typhimurium	2002	France entière	27	Sauce sèche
Cerro	2002	France entière	22	Poudre crème pâtissière
Newport	2003	France entière	14	Viande de cheval
Agona	Janvier-juin 2005	France entière	141 (nourrissons)	Poudre de lait infantile
Worthington	Janvier-juillet 2005	France entière	54 (personnes âgées)	Poudre de lait
Manhattan	Août-novembre 2005	Sud Est	40	Charcuterie
Stourbridge	Avril-juillet 2005	Fance, Suède, Suissse	18 cas en deux épisodes	Fromage de chèvre d'origine inconnue
Oranienburg	Juin-juillet 2005	Île-de-France	7	Viande de cheval suspectée
Montevideo	Octobre-décembre 2006	France entière	23	Fromage
Meleagridis	Novembre 2006	Nord	5	Viande de cheval
Bredeney	2007	France entière	10	Inconnu
Rissen	2007	France entière	18	Inconnu
Brandenburg	2008	France entière	35	Saucisson sec
Typhimurium	2008	France entière	101	Rosette
Muenster	2008	France entière	25	Fromage au lait cru
Typhimurium	2008	France entière	112	Inconnu
Putten	2008	France entière	8	Steak haché de bœuf
Give	2008	France entière	57	Lait en poudre
Ajiobo	2008	France entière	16	Inconnu
Hadar	2009	France entière	71	Viande de volaille
Newport	2010	France entière	28	Fromage au lait cru
Typhimurium	2010	France entière	34	Viande de cheval
Newport	2010	France entière	10	Fromage au lait cru
Typhimurium	2010	France entière	35	Fromage au lait cru
4,12:i:-	2010	France entière	132	Saucisse sèche
4,5,12:i:-	2010	France entière	554	Steak haché de bœuf

Le tableau 8 montre la distribution des 15 principaux sérotypes isolés des salmonelloses humaines en France. Deux sérotypes sont largement prédominants : Typhimurium et Enteritidis qui représentent 70 % de tous les isolements.

Tableau 8 : les 15 principaux sérotypes enregistrés au CNRS (Centre national de référence des *Salmonella*) depuis 2002 en France (Vaillant *et al.,* 2012)

	2002 (N=11 775)	2003 (N=10 472)	2004 (N=10 589)	2005 (N=11 439)	2006 (N=10 154)	2007 (N=8 124)	2008 (N=10 378)	2009 (N=9 947)	2010 (N=9 405)
1	Enteritidis (4469)	Enteritidis (4144)	Enteritidis (3897)	Typhimurium (3992)	Typhimurium (4103)	Typhimurium (2978)	Typhimurium (4787)	Typhimurium (3867)	Typhimurium (3027)
2	Typhimurium (3998)	Typhimurium (3222)	Typhimurium (3635)	Enteritidis (3638)	Enteritidis (2878)	Enteritidis (2148)	Enteritidis (1941)	Enteritidis (1777)	Enteritidis (1711)
3	Hadar (282)	Virchow (201)	Typhi (151)	Agona (274)	Derby (150)	Derby (127)	1,4,[5],12:i:- (410)	1,4,[5],12:i:- (1011)	1,4,[5],12:i:- (1098)
4	Infantis (178)	Hadar (178)	Hadar (131)	Infantis (210)	Typhi (148)	Hadar (123)	Derby (177)	Hadar (177)	Kentucky (208)
5	Virchow (174)	Typhi (167)	Derby (128)	Typhi (187)	Napoli (144)	1,4,[5],12:i:- (122)	Kentucky (139)	Typhi (170)	Newport (191)
6	Derby (162)	Newport (161)	Newport (122)	Derby (158)	Hadar (140)	Typhi (120)	Typhi (138)	Derby (160)	Typhi (181)
7	Typhi (154)	Infantis (139)	Virchow (122)	Hadar (147)	Infantis (135)	Newport (118)	Newport (126)	Newport (139)	Derby (167)
8	Brandenburg (142)	Brandenburg (131)	Infantis (122)	Virchow (142)	Virchow (118)	Kentucky (113)	Panama (105)	Infantis (134)	Panama (148)
9	Heidelberg (126)	Derby (109)	Agona (102)	Newport (133)	1,4,[5],12:i:- (113)	Infantis (108)	Hadar (105)	Kentucky (130)	Infantis (128)
10	Newport (99)	Agona (92)	Brandenburg (87)	Panama (124)	Newport (105)	Panama (89)	Brandenburg (101)	Panama (107)	Napoli (100)
11	Dublin (92)	Heidelberg (90)	Napoli (80)	1,4,[5],12:i:- (99)	Panama (95)	Virchow (87)	Infantis (100)	Virchow (85)	Dublin (81)
12	Paratyphi B (85)	Napoli (83)	Panama (80)	Manhattan (95)	Agona (73)	Napoli (71)	Give (90)	Napoli (81)	Hadar (76)
13	Bovismorbificans (77)	Dublin (69)	Paratyphi A (77)	Napoli (93)	Brandenburg (64)	Bredeney (59)	Virchow (77)	Saint-Paul (77)	Corvallis (70)
14	Panama (75)	Indiana (67)	Indiana (77)	Indiana (86)	Paratyphi B (64)	Agona (55)	corvallis (71)	Dublin (74)	Kottbus, Virchow (66)
15	Blockley (57)	Paratyphi B (63)	Paratyphi B (62)	Brandenburg (82)	Manhattan (64)	Montevideo (54)	Bovismorbificans (69)	Montevideo (57)	Saint-Paul (64)

.

a - En Europe

Sur les trois dernières décennies, on a observé l'évolution de sérotypes particuliers de *Salmonella* dans l'élevage animal intensif, puis chez l'homme. S. Enteritidis est à l'origine de l'épidémie la plus récente, qui chez l'homme a atteint son point culminant en 1992 dans de nombreux pays européens (Tableaux 9, 10 et 11). Le déclin actuel de ce sérotype peut laisser place à la réémergence de *S.* Typhimurium en tant que sérotype principal pour la salmonellose humaine.

Tableau 9 : Distribution des cas confirmés de salmonelloses par serovars chez les humains, 2008-2009 (EFSA Journal, 2011)

2009			2008		
Top 10 TESSy			Top 10 TESSy (Système de Surveillance Européenne)		
Sérotypes	N	%	Sérotypes	N	%
S. Enteritidis	53 382	52.3	*S.* Enteritidis	70 091	58
S. Typhimurium	23 759	23.3	*S.* Typhimurium	26 423	21.9
S. Infantis	1 616	1.6	*S.* Infantis	1 317	1.1
S. Newport	760	0.7	*S.* Virchow	860	0.7
S. Virchow	736	0.7	*S.* Newport	787	0.7
S. Derby	671	0.7	*S.* Agona	636	0.5
S. Hadar	507	0.5	*S.* Derby	634	0.5
S. Kentucky	460	0.5	*S.* Stanley	529	0.4
S. Saintpaul	452	0.4	*S.* Bovismorbificans	501	0.4
S. Bovismorbificans	433	0.4	*S.* Kentucky	497	0.4
Others	19 225	18.8	Others	18 495	15.3
Total	102 001	100	Total	120 760	100

Tableau 10 : Serovars de *Salmonella* isolés lors des TIA confirmés dans l'UE, 2009 (EFSA Journal, 2011)

Sérotypes	TIA		Cas humains		
	N	% total de l'EU	N	Hospitalisés	décès
S. Enteritidis	193	59.5	2 620	720	4
S. Typhimurium	51	15.7	908	108	2
S. Ohio	1	0.3	39	39	0
S. Bovismorbificans	2	0.6	34	3	0
S. Bredeney	1	0.3	3	1	0
S. Dublin	1	0.3	3	1	0
S. Hadar	1	0.3	2	0	0
S. Napoli	2	0.6	45	2	0
S. Newport	3	0.9	160	7	0
S. Paratyphi B var java	2	0.6	7	6	0
S.enterica subsp. Arizonae	1	0.3	2	0	0
S. spp., unspecified	58	17.9	445	71	0
S. Infantis	4	1.2	124	5	0
S. Virchow	1	0.3	2	0	0
S. Manhattan	1	0.3	3	1	0
S. group C2	1	0.3	23	4	0
S. group D	1	0.3	80	18	0
UE Total.	324	100.0	4 500	988	6

Tableau 11 : Cas de TIA confirmés et possibles causé par *Salmonella* dans l'UE, 2009. (EFSA Journal, 2011)

Pays	TIA total es		TIA confirmées				TIA possibles			
	N	Taux pour 100 000	N	Cas humains			N	Cas humains		
				Cas	Hospitalisés	Décès		Cas	Hospitalisés	Décès
Austria	2008	2.49	8	228	37	0	200	519	117	1
Belgium	5	0.05	1	39	39	0	4	29	2	0
Czech republic	19	0.18	1	147	5	0	18	432	25	0
Danmark	14	0.25	5	628	3	2	9	94	2	0
Estonia	19	1.42	1	6	3	0	18	48	16	0
Finland	1	0.02	1	28	0	0	0	-	-	-
France	147	0.23	104	843	166	1	43	503	27	0
Germany	343	0.42	20	282	48	1	323	1 338	272	0
Greece	38	0.34	-	-	-	-	38	140	66	0
Hungry	23	0.23	11	146	34	1	12	164	24	1
Ireland	7	0.16	-	-	-	-	7	74	15	1
Italy	111	0.18	-	-	-	-	111	356	-	-
Latvia	48	2.12	-	-	-	-	48	236	-	-
Lithuania	50	1.49	6	122	70	0	44	171	125	0
Malta	14	3.38	-	-	-	-	14	88	-	0
Netherlands	13	0.08	3	36	8	1	10	34	10	0
Poland	161	0.42	95	1 181	361	0	66	399	157	0
Portugal	3	0.03	3	45	35	0	0	-	-	-
Romania	3	0.01	3	130	68	0	0	-	-	-
Slovakia	298	5.51	3	121	18	0	295	848	153	0
Slovenia	4	0.20	3	36	3	0	1	42	17	1
Spain	156	0/34	54	469	90	0	102	772	134	2
Sweden	7	0.08	2	13	0	0	5	53	5	0
United Kingdom	30	0.05	-	-	-	-	30	1 227	73	4
UE Total	1 722	0.35	324	4 500	988	6	1 398	7 567	1 240	10
Norway	1	0.02	-	-	-	-	1	5	1	0
Switzerland	1	0.01	-	-	-	-	1	3	1	0

b - Aux USA et Canada

Les salmonelloses d'origine alimentaire peuvent donner lieu à des foyers très importants qui peuvent atteindre une échelle nationale voire internationale, si un aliment commercialisé à large diffusion se trouve contaminé.

En 1994 aux Etats-Unis, par exemple, une épidémie provoquée par une crème glacée a touché 224 000 personnes. On évalue à 1,4 million par an le nombre d'infections à *Salmonella* non typhique, entraînant 168 000 visites médicales, 15 000 hospitalisations et 580 décès. Le sérotype le plus isolé est *Salmonella* Typhimurium (31 %), suivi par *S.*Enteritidis (13 %) (Kennedy *et al.*, 2004 ; CDC, 2006).

Le coût d'un cas de salmonelloses humaines dans ce pays peut aller, selon les estimations, d'une quarantaine de dollars US $ à 4,6 millions par an, selon que l'affection n'entraîne pas de complication ou qu'elle débouche sur une hospitalisation et un décès (Mead *et al.*, 1999). D'une manière globale, aux USA comme au Canada, *S.* Typhimurium est le sérotype le plus fréquemment rapporté suivi du sérotype Enteritidis (Tableau 12).

Tableau 12 : Répartition des 20 sérotypes de *Salmonella* humains les plus fréquents isolés des pays de l'Amérique du Nord en nombre et en pourcentages (Hendriksen *et al.*, 2011)

Pays	Canada			USA		
Population	33 212 696			303 824 640		
Année	2001	2003	2007	2001	2003	2005
Nombre total	6359	5531	6455	31675	31484	33348
Sérotypes parmi les top 20 de la région (%)	76.9	76.6	79.5	74.3	78.9	75.4
Typhimurium	21	20	20.8	22.1	21.1	20.9
Enteritidis	21.5	12.5	25.7	17.7	15.4	20.2
Newport	2.3	3.3	2.2	10	12.2	9.9
Heidelberg	13.9	19.9	8.7	5.9	5.7	5.7
Javiana	-	1.2	-	3.4	5.3	4
Montevideo	0.8	-	-	2	2.7	2.4
Saintpaul	1.5	2	1.9	1.5	2.6	2
Muenchen	-	-	1.3	1.8	2.5	2.2
Thompson	3.7	2.6	2.7	1.6	1.6	1.3
Oranienburg	-	1.7	2.2	1.9	1.8	1.8
Infantis	1.9	2.2	2	1.4	1.7	1.5
Braenderup	-	-	-	1.2	1.7	1.8
Agona	1.9	2.6	1.7	1.2	1.6	-
Mississipi	-	-	-	-	1.4	1.7
I 1,4,5,12:i:-	-	1.5	2.9	-	1.6	-
Typhi	1.8	2.4	2.4	1.1	-	-
Paratyphi B var. Java	1	1.3	-	1.5	-	-
Hadar	3.9	3.4	2.2	-	-	-
Stanley	1.7	-	1.3	-	-	-

c - En Afrique

D'une manière générale, *S.* Enteritidis et *S.* Typhimurium représentent dans la majorité des cas entre 20 % à 30 % des isolats de *Salmonella* dans ce continent (Aragaw *et al.*, 2007 ; Ahmed *et al.*, 2009 ; Flor *et al.*, 2011).

Une étude menée à l'Institut Pasteur d'Alger, de 1998 à 2002 par Aboun *et al.* (2003) et portant sur des lots de prélèvement de 51826 échantillons, issus des secteurs étatiques et privés des 3 régions du pays, a permis l'isolement de 232 souches durant ces 5 années. Le sérotype majoritaire était *S.* Enteritidis (48,28 %), suivi de *S.* Virchow (11,64 %), de *S.* Pullorum-Gallinarum (11,21 %), de S. Hadar (6,03 %), de S. Livingstone (2,15 %), de S. Dublin, (1,72 %), de *S.* Typhimurium,.Heidelberg, Isangui, Brunei (1,29 %), de *S.* Senftenberg, *S.* Montevideo, *S.* Brunei, *S.* Newport etc. Ces résultats sont obtenus sur des prélèvements de divers organes de volailles (foie, rate, cœur, grappe ovarienne, intestins, poumons), œufs, aliments, éclosoirs, litières et fientes issus des différentes régions d'Algérie et de différents types de productions aviaires.

Au Maroc, Maaroufi *et al.*, cité par Aboun *et al.*, (2003) ont, pour la période 1994 à 1998, isolé 179 souches dont 105 *S.* Enteritidis (59 %), 11 souches de *S.* Pullorum ainsi que *S.* Gallinarum (6 %) et d'autres souches moins fréquentes (34 %). Au Ghana, Sackey *et al.* (2001) ont isolé 7/97 (7,2 %) salmonelles du contenu intestinal de poulets en ferme et 13/87 (6,8 %) souches des carcasses de poulet en découpes. Toutes les salmonelles isolées étaient résistantes à plusieurs antibiotiques et particulièrement à l'érythromycine. La distribution des sérotypes de *Salmonella* au Sénégal, en Tunisie et au Cameroun sont récapitulés dans le tableau 13 qui suit :

Tableau 13 : Répartition des 15 sérotypes de *Salmonella* humains les plus fréquents isolés de quelques pays africains en nombre et en pourcentage ((Hendriksen *et al.*, 2011)).

Pays	**Cameroun**				**Sénégal**				**Tunisie**			
Population	18 467 692				12 853 259				10 383 577			
Année	2001	2003	2005	2007	2001	2003	2005	2007	2001	2003	2005	2007
Nombre total	242	182	151	99	232	176	151	102	720	599	363	243
Sérotypes parmi les tops 15 de la région (%)	98.8	87.2	69.5	55.6	42.2	57.4	44.2	29.4	86.8	79.5	94.4	89.3
Enteritidis	20.7	18.4	21.2	19.2	19.8	8.0	19.2	4.9	14.3	27.9	28.1	49.0
Typhimurium	71.9	53.3	28.5	18.2	4.3	5.1	-	10.8		4.0	7.4	11.5
Livingstone	-	-	-	-	-	-	-	-	21.1	26.7	5.3	-
Corvallis	-	-	-	-	-	1.7	2.6	-	14.0	3.5	6.1	-
Braenderup	-	-	-	1.0	-	-	-	-	13.1	-	3.6	-
Anatum	-	-	-	-	-	-	-	-	4.3	3.2	11.0	4.9
Infantis	-	0.5	-	-	-	-	-	-	5.7	-	10.2	1.6
Kentucky	-	-	-	-	6.0	9.7	4.0	3.9	-	2.8	-	6.2
Newport	-	-	-	-	-	-	-	-	2.5	2.7	5.2	-
Mbandaka	0.8	-	-	-	-	-	-	2.0	5.3	-	2.8	-
Amsterdam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.0	3.3	6.6
Hadar	-	1.6	1.3	1.0	4.3	1.7	2.6	2.9	-	2.5	-	-
Altona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.1	2.1
Muenster	-	-	-	-	-	1.1	2.6	-	-	-	1.9	1.2
bredeney	-	-	-	-	-	4.0	5.3	-	-	-	-	-

d - Au Tchad

La description des salmonelles au Tchad remontent aux années 1960 et 70. Les diagnostics de routine ainsi que les enquêtes systématiques effectuées par le Laboratoire de Farcha à N'Djamena ont permis, au courant de ces deux décennies, d'isoler chez les hommes et neuf espèces animales, plus d'une centaine de souches de salmonelles, appartenant à une cinquantaine de sérotypes différents (Perpezat *et al.*, 1964 ; Vigier et Chamoiseau, 1967). Ces différents sérotypes sont récapitulés dans les tableaux 14 et 15 qui suivent :

Tableau 14 : Sérotypes de *Salmonella* isolés à N'Djamena au Tchad (Perpezat *et al.*, 1964).

Sérotypes	Nombre	Source	Origine
S. Dublin	1	Hémocultures	Humaine
S. Uganda	1	Coprocultures	Humaine
S. Singapore	1	Coprocultures	Humaine
S. Hull	2	Coprocultures	Humaine
S. Branderup	1	Coprocultures	Humaine
S. Colindale	1	Coprocultures	Humaine
S. Infantis	2	Coprocultures	Humaine
S. Manhattan	1	Coprocultures	Humaine
S. Shubra	1	Coprocultures	Humaine
S. Stanleyville	2	Coprocultures	Humaine
S. Derby	1	Coprocultures	Humaine
S. Ligna	1	Coprocultures	Humaine
S. Chagoua	2	Coprocultures	Humaine
S. Enteritidis	5	Ganglions mesenter.	Bovins
S. Dublin	2	Ganglions mesenter.	Bovins
S. Amager	1	Ganglions mesenter.	Bovins
S. Milezi	1	Ganglions mesenter.	Bovins
S. Tchad	1	Ganglions mesenter.	Bovins
S. Dublin	1	Viscères	Caprins
S. Enteritidis	1	Viscères	Caprins
S. infantis	1	Viscères	Caprins
S. Teshie	1	Viscères	Caprins
S. Amager	1	Viscères	Caprins
S. Babelsberg	1	Viscères	Caprins
S. Farcha	1	Viscères	Caprins
S. Gallinarum	26	Cadavres	Poules
S. Hull	2	Cadavres	Poules
S. Anatum	1	Cadavres	Poules
S. Virchow	1	Cadavres	Poules
S. Stanleyville	1	Cadavres	Poules
S. Schwarzengrund	1	Cadavres	Poules
S. Amager	2	Viscères	Varans
S. Anatum	1	Viscères	Varans
S. Cubana	3	Viscères	Varans
S. Langerhorn	1	Viscères	Varans
S. Hull	1	Viscères	Varans
S. Riggil	3	Viscères	Varans
S. Colombo	1	Viscères	Crapauds
S. Hull	2	Viscères	Crapauds
S. Rubislaw	4	Viscères	Crapauds
S. Stanleyville	1	Viscères	Crapauds
S. Thiaroye	1	Viscères	Crapauds
S. Djermaya	1	Viscères	Crapauds
S. Dougia	1	Viscères	Crapauds
S. Goulfey	2	Viscères	Crapauds

Tableau 15: Sérotypes de *Salmonella* isolés à N'Djamena et alentours, Tchad (Vigier et Chamoiseau, 1967)

Sérotypes	Nombre	Source	Origine
S. Kalamu	1	Coprocultures	Humaines
S. Korbol	1	Coprocultures	Humaines
S. Amifisan	1	Coprocultures	Humaines
S. Nottingham	1	Coprocultures	Humaines
S. Stanleyville	3	Coprocultures	Humaines
S. Dublin	1	Masses musculaires	Bovins
S. Derby	2	Excréments	Porcins
S. Infantis	2	Viscères	Ovins
S. Enteritidis	2	Viscères	Cobaye
S. Poona	2	Viscères	Cobaye
S. Gallinarum	9	Cadavres	Poules
S. Oranienburg	1	Cadavres	Poules
S. Rubislaw	1	Cadavres	Poules
S. Stanleyville	1	Cadavres	Poules
S. Typhimurium	2	Cadavres	Poules
S. Uganda	1	Cadavres	Poules
S. Cubana	3	Cadavres	Lézards
S. Farcha	1	Cadavres	Lézards
S. Kalamu	1	Cadavres	Lézards
S. Kottbus	1	Cadavres	Lézards
S. Ona	1	Cadavres	Lézards
S. Ouakam	1	Cadavres	Lézards
S. Riggil	2	Cadavres	Lézards
S. Amager	1	Eaux	STEE*
S. Hadar	1	Eaux	STEE
S. Infantis	1	Eaux	STEE
S. Teschie	1	Eaux	STEE
S. Thiaroye	1	Eaux	STEE
S. Colindale	1	Eaux	STEE
S. Stanleyville	2	Eaux	STEE
S. Idikan	1	Oeufs	Poule

**STEE: Société Tchadienne d'eaux et d'électricité*

Au bilan, selon le rapport FAO/OMS, cité par Galanis *et al.* (2006), les sérotypes les plus fréquemment isolés chez les humains à travers le monde étaient *Salmonella* Enteritidis (65 %), suivi par *Salmonella* Typhimurium (12 %) et Newport (4 %). De nombreuses études rapportées à travers certains pays du continent sud américain (tableau 16), asiatique (tableau 17) et de l'Océanie (tableau 18) montrent la prédominance des sérotypes Enteritidis et Typhimurium (Hendriksen *et al.*, 2011).

Tableau 16 : Répartition des 15 sérotypes de *Salmonella* d'oriine humaine les plus isolés des pays d'Amérique latine en nombre et en pourcentage (Hendriksen *et al.*, 2011).

Pays :	**Argentine**				**Colombie**			**Brésil**			
Population	40 482 000				45 013 672			196 342 592			
Année	2001	2003	2005	2007	2001	2003	2005	2001	2003	2005	2007
Nombre total	648	453	507	520	143	245	378	290	480	647	867
Sérotypes parmi les top 15 de la région (%)	91	90.8	87.9	88.1	91	87.6	91.4	74.4	61.3	75.2	89.8
Enteritidis	39.5	25.6	34.1	20.2	47.6	19.2	32.5	42.8	45.8	24.9	69.4
Typhimurium	10.8	13.2	23.1	38.3	24.5	44.9	36.2	1	3.3	6.5	8.7
Agona	9.1	10.8	4.9	4.8	1.4	0.4	0.8	1.7	0.4	19.9	-
Newport	10.6	6.8	5.7	8.1	0.7	1.6	1.1	4.1	1.9	6.8	1
Infantis	6.6	7.9	8.3	3.7	2.8	2	0.3	2.4	1	1.9	0.6
Montevideo	4.2	-	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Panama	1.4	2.2	1.4	1.3	2.1	2.4	-	3.4	1.3	3.9	1.5
Saintpaul	1.4	1.1	1	2.1	2.8	1.2	1.1	6.9	2.1	0.8	1.3
Dublin	-	-	-	-	2.8	4.1	3.2	-	-	0.8	0.9
Corvallis	2	1.8	2.8	1.5	-	-	-	-	-	-	0.7
Anatum	0.8	1.8	-	1.7	-	0.8	-	0.7	-	2.3	0.7
Oranienburg	0.9	6.2	2.4	1.3	-	-	-	-	-	0.8	0.9
Derby	2.5	-	0.8	1.5	1.4	3.7	-	-	0.6	0.3	0.6
Braenderup	-	1.1	2	-	1.4	-	2.4	-	0.8	1.1	-
Heidelberg	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	0.5

Tableau 17 : Répartition des 15 sérotypes de *Salmonella* d'origine humaine les plus isolés des pays Asiatiques en nombre et en pourcentage (Hendriksen *et al.*, 2011).

Pays	**Japon**				**Malaisie**			**Thaïlande**			
Population	127 288 416				25 274 132			65 493 296			
Année	2001	2003	2005	2007	2003	2005	2007	2001	2003	2005	2007
Nombre total	2864	2422	1529	963	929	1396	859	4134	3426	6369	2720
Sérotypes parmi les top 15 de la région (%)	77.2	80.7	68.5	72.8	90	94.5	80.6	74.4	70.9	67	77.5
Enteritidis	52.5	59.2	47.4	44.7	21.2	21.9	34.7	8.6	11.5	11	16.5
Weltevreden	-	-	-	-	15.5	13.5	17.1	15.9	11.1	9	6.1
Stanley	-	-	-	1.2	1.5	1.1	2	5.9	8.6	12.4	10.9
Typhimurium	4.4	4.5	4.1	6.9	4.2	3.5	6.1	4.2	-	2.6	7.4
Rissen	-	-	-	-	-	0.4	-	6.3	6.4	8.9	8.1
Anatum	-	-	-	-	-	-	-	8.2	6.4	4.8	4.5
Corvallis	1.7	0.8	-	-	9.3	6.3	9.1	-	3.9	5.7	4.6
Choleraesuis	-	-	-	-	-	-	-	-	3.4	4.8	7.8
Virchow	1.3	1.9	1	-	-	0.4	-	2.5	2.4	2.3	-
Infantis	3.9	4.4	5.2	5.5	-	-	-	-	-	-	-
Albany	-	-	-	-	0.9	0.8	0.7	2.4	2.9	1.7	1.4
Hadar	2	-	1	-	-	-	-	3.3	2.9	-	-
Agona	1.9	2.1	1.5	1	0.9	0.6	1	-	2.2	-	1.4
Derby	-	-	1.3	-	-	-	-	2.7	2	-	2.6
Saintpaul	3.8	2.6	2.2	6	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 18 : Répartition des 15 sérotypes de *Salmonella* d'origine humaine les plus isolés des pays de l'Océanie en nombre et en pourcentage (Hendriksen *et al.*, 2011).

Pays	**Australie**		**Nouvelle Zélande**			
Population	21 007 310		4 173 460			
Année	2001	2003	2001	2003	2005	2007
Nombre total	6932	6808	2605	1601	1460	1341
Sérotypes parmi le top 15 de la région (%)	75.9	68.7	86.7	87.7	81.5	79.7
Typhimurium	44.5	41.5	64	59.5	51.8	44.4
Enteritidis	4.4	3.4	6.5	8.6	10.3	11.3
Virchow	7.1	5.1	-	1.2	1.1	2.5
Saintpaul	5.5	4.4	0.6	1.7	4.5	1.9
infantis	-	3	2.8	5.6	4.6	6.4
Branderburg	-	-	5.3	3.4	4.7	3.5
Bovismorbificans	2.3	1.7	-	-	-	-
Muenchen	1.9	2	-	-	-	-
Hvittingfoss	2.2	-	-	-	-	-
Heidelberg	-	-	4.9	0.7	-	-
Anatum	-	1.8	-	-	-	-
Mississipi	-	-	-	0.9	1.5	0.8
Thompson	-	-	0.6	0.6	1.1	-
Mbandaka	-	-	0.5	0.6	-	1
Montevideo	-	-	-	2.3	-	-

3.4.2.2. Épidémiologie analytique

3.4.2.2.1. Réservoir animal de la bactérie

Les sérotypes de salmonelles sont souvent catégorisés en fonction de l'espèce animale hôte habituelle. On peut citer *S.* Dublin et Bovismorbificans qui infectent les bovins, Choleraesuis, Derby, Panama, Brandenburg et Typhisuis qu'on retrouve chez le porc, Abortusovis chez les ovins, Gallinarum, Pullorum, Enteritidis, Hadar, Heidelberg, Virchow, Saint Paul, Infantis et Kottbus surtout inféodés chez les volailles (dinde, poulet, canard, etc.).

Certains sérotypes par contre sont ubiquistes et peuvent se retrouver chez beaucoup d'espèces animales, généralement à l'état latent et peuvent atteindre l'homme, soit par voie alimentaire qui est la plus courante, soit par contacts directs ou indirects. C'est le cas par exemple de Typhimurium qu'il est possible de trouver chez la totalité des animaux d'élevage et la plupart des animaux sauvages (Korsak *et al.*, 2004, Weill, 2009). Aux USA, *Salmonella* a été associé à des toxi-infections collectives à partir de reptiles domestiqués (CDC, 1999 ; Mitchel et Shane, 2000).

Les élevages de volailles représentent donc des réservoirs de salmonelles, susceptibles de conduire à des infections humaines. Ce portage peut aussi être marqué par une infection cliniquement exprimée. Dans ce cas, l'excrétion est très variable allant de 10 bactéries à 10^7 bactéries par gramme de fèces, pouvant être continue ou intermittente et souvent favorisée par le stress (Clifton-Hadley *et al.*, 2002 ; Feuillet, 2007).

3.4.2.2.2. Signes cliniques et traitements

Les salmonelloses d'origine animale provoquent une infection intestinale chez l'homme. Celles-ci sont provoquées par des *Salmonella* ubiquistes présentes chez l'homme et

les animaux et se caractérisent par une période d'incubation de 8 à 48 heures, après l'ingestion d'aliments contaminés et le développement rapide d'une fièvre, de céphalées et de malaises. La durée d'incubation dépend de la dose ingérée, de la santé de l'hôte et des caractéristiques de la souche de *Salmonella.*

Dans la phase d'état, les principaux symptômes sont des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements et de la diarrhée. L'évolution clinique est, en général, bénigne et la guérison intervient au bout de 2 à 4 jours. Bien que la salmonellose affecte des sujets de tous âges, la fréquence est beaucoup plus élevée chez les jeunes enfants, les personnes âgées et les malades immunodéprimés chez lesquels l'infection peut être plus sévère, voire mortelle (Weill, 2008).

Dans les formes habituelles, la guérison est spontanée en quelques jours et seul un traitement symptomatique est préconisé. Le recours aux antibiotiques est donc à réserver aux patients présentant soit une forme sévère ou des risques de complication. Les fluoroquinolones (FQ) sont considérées comme le traitement de choix chez l'adulte. Chez l'enfant, il est fait appel aux céphalosporines de troisième génération (C3G), les FQ étant en général déconseillées pour cette tranche d'âge. Les antibiotiques plus anciens, les aminopénicillines, l'association triméthoprime -sulfaméthoxazole (Sxt) et beaucoup plus rarement, les phénicolés, peuvent être utilisés comme solutions alternatives (Weill, 2008).

3.4.2.2.3. Prévention

La meilleure protection contre le risque de salmonellose est une bonne cuisson des aliments, en particulier des viandes, à au moins 65°C pendant 15 à 30 minutes. Pour le steak haché congelé ou surgelé, la cuisson doit être effectuée sans décongélation préalable, car elle augmente le risque de multiplication bactérienne. Le froid bloque le développement des bactéries mais ne les tue pas (Fresney *et al.*, 2007).

.

De 1985 à 1997, la prévalence des infections à *Salmonella* Enteritidis a fortement augmenté en France : elle touche les élevages de volailles et a la particularité d'être présente non seulement à la surface de la coquille de l'œuf, mais dans le contenu même d'œufs intacts. Il est pour cette raison conseillé de conserver les œufs au réfrigérateur, de maintenir au froid les préparations à base d'œufs sans cuisson (mayonnaise, crèmes, pâtisseries ...) et de les consommer le plus près possible de leur fabrication.

De plus, les personnes les plus vulnérables (personnes âgées, malades, nourrissons, femmes enceintes) devraient éviter la consommation d'œufs crus ou peu cuits. Enfin, il est conseillé de se laver les mains après contact avec un animal vivant (en particulier les reptiles), voire d'éviter les contacts avec les reptiles de compagnie pour toutes les personnes vulnérables (les nourrissons, les femmes enceintes, les personnes immunodéprimées,…).

4. La résistance aux antimicrobiens

4.1. Généralités

En général, la résistance aux antibiotiques est un caractère propre à la bactérie qui, en tant que tel, s'exprime par la synthèse ou non de protéines. Elle intervient grâce à deux événements génétiques majeurs bien distincts (Bryan, 1998). Elle peut être naturelle, souvent d'origine chromosomique, ou peut être due à une mutation ou à un transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les intégrons et les transposons, on parle dans ce cas, de résistances acquises:

- ✓ Dans la résistance naturelle, l'antibiotique n'a pas de cible ou ne peut pas l'atteindre : la pénétration de l'antibiotique est empêchée (membranes imperméables, absence d'un système de transport) ou inactivée (présence de beta-lactamases chromosomiques). Cette résistance est une caractéristique intrinsèque de la bactérie.

- ✓ Dans la résistance induite par mutation, une altération du chromosome entraîne la synthèse des protéines modifiées, rendant par exemple les membranes imperméables, ou alors le système de transport devient inaccessible à l'antibiotique, ou encore la dérépression des béta-lactamases et une modification de la cible (enzyme ou ribosome) qui ne peut plus fixer l'antibiotique.

- ✓ Dans la résistance d'origine plasmidique, l'acquisition d'une information génétique supplémentaire permet la synthèse de protéines additionnelles, dont la présence modifie la structure des membranes ou, dont l'activité enzymatique se révèle capable de modifier la cible ou d'inactiver l'antibiotique. Tout comme le chromosome, le plasmide, élément génétique autonome peut aussi subir des mutations (par exemple l'apparition des beta-lactamases modifiées qui ne sont plus inactivées par les beta-lactamines) (Roy, 2001 ; Seyfarth and Schicklmaier, 1999).

Pour le clinicien comme pour l'épidémiologiste, seuls les mécanismes de résistances acquis sont pertinents. Ce sont ces mécasnismes de résistance qui nécessitent d'être détectés et surveillés et seulement eux seront adressés dans la suite de ce document.

4.2. Mécanismes de résistance aux antimicrobiens

Les protéines mises en cause dans cette résistance aux antibiotiques sont le plus souvent spécifiques d'une classe d'antibiotiques et peuvent être responsables de résistance multiples aux antibiotiques ou MDR (multidrug resistance). Depuis l'avènement de l'antibiothérapie, l'utilisation des antibiotiques semble s'accompagner inexorablement de l'émergence de bactéries résistantes. Cette résistance peut être le résultat de mutations spontanées, avec activation ou modification de déterminants chromosomiques, déjà présents dans le génome bactérien, ou la conséquence de l'acquisition de gènes situés sur des éléments génétiques mobiles. Ces résistances peuvent avoir un spectre étroit, limité à un ou quelques antibiotiques de structure voisine, mais on observe, depuis plusieurs années, l'émergence de mécanismes de résistances croisées à des médicaments de structures et de modes d'actions différents. Les bactéries sont ainsi parvenues à développer trois types de mécanismes de résistances aux antibiotiques :

- ✓ Le premier résulte de la production d'enzymes inactivatrices des antibiotiques (ex : β-lactamases) (tableau 19).

- ✓ Le deuxième consiste en la modification des cibles des antibiotiques empêchant l'action de ces derniers, comme par exemple la résistance aux fluoroquinolones par modification des topoisomérases de classe II (tableau 20).

- ✓ Enfin, le troisième mécanisme est la réduction des concentrations intracellulaires d'antibiotiques (tableau 21). Ce dernier phénomène peut être dû à une imperméabilité (ex : résistance à l'imipénème par modification ou perte de la porine OprD chez *Pseudomonas aeruginosa*) et/ou à un transport actif vers l'extérieur de la cellule, via des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux (Casin *et al.*, 1999 ; Cattoir, 2004 ; Giraud, *et al.*, 2000).

Tableau 19 : Mécanismes de résistance aux β-lactamines (Frye et Fedorka-Cray, 2007)

Gènes	Déterminant génétique	Mechanisme (s)	Phénotype de résistance
Chromosome ou plasmide	Gènes codant la β -lactamase	inactivation enzymatique	Les β-lactames (les types et niveau d'expression des β-lactamases determinant la resistance aux β-lactames individuelles)
Chromosome	Gènes codant pour le PLP	Cibles d'altérations	Les β -lactames
Chromosome	Gènes codant pour la pompe d'Efflux	Efflux Actif dû à la sur-expression de la pompe d'efflux MDR	Multiple antibiotiques incluant les β-lactames
Chromosome	Gènes codant pour les Porines	Dimunition de l'Efflux dû à la perte des porines	Multiple antibiotiques incluant les β-lactames
Chromosome	Gène *opr*D de *Pseudomonas aeroginosa* codant une chaine protéique specifique	Dimunition de l'Efflux dû à la perte des *opr*D	Les Carbapenemes, les β-lactames

Tableau 20 : Mécanismes biochimiques de résistance aux antibiotiques (Bryan, 1998)

Antibiotiques	Résistance chromosomique	Résistance extra-chromosomique
Aminosides	Diminution de la perméabilité Modification de la cible (protéine S12 de la sous-unité 30 S)	Inactivation enzymatique par des acétyltransférases, des nucléotidyltransférases et des phosphotransférases
Bêta-lactamines	Diminution de la perméabilité Diminution d'affinité des PLP Augmentation de la synthèse des PLP Synthèse de nouvelles PLP Inactivation enzymatique par des céphalosporinases	Inactivation enzymatique par diverses bêta-lactames
Glycopeptides		Modification de la cible (synthèse de D-alanine-D-lactate au lieu du dipeptide D-alanyl-D-alanine) Hydrolyse du dipeptide D-alanyl-D-alanine
Macrolides et apparentés		Méthylation de l'ARNr 23S
Phénicolés	Diminution de la perméabilité	Efflux actif spécifique Inactivation enzymatique par des chloramphénicol acétyltransférases
Quinolones	Diminution de la perméabilité Modification de la cible (gène *gyrA, gyrB* ou *parC*	
Rifampicine	Modification de la cible (ARN polymérase ADN dépendante)	
Sulfamides	Diminution de la perméabilité Modification par mutation de la dihydroptéroate	Dihydroptéroate synthétase additionnelle et sans affinité pour les sulfamides
Tétracyclines	Diminution de la perméabilité	Efflux actif spécifique
triméthoprime	Diminution de la perméabilité Modification par mutation de la dihydrofolate réductase	Dihydrofolate réductase additionnelle et insensible au triméthoprime

Tableau 21: Mécanismes d'efflux dans la résistance bactérienne aux antibiotiques (Cattoir, 2004)

Antibiotique	Cible bactérienne	Mécanismes de résistance			
		Inactivation enzymatique	Modification de la cible	Imperméabilité cellulaire	Efflux actif
Inhibition de la synthèse de la paroi (peptidoglycane)					
β-Lactamines	PLP[a]	+++	++	++	++
Glycopeptides	Précurseurs D-Ala-D-Ala[b]		+++		
Inhibition de la synthèse protéique					
Aminosides	ARN ribosomal 30S	+++	++	+	+
MLS	ARN ribosomal 50S	+	+++		++
Tétracyclines	ARN ribosomal 30S		++		+++
Phénicolés	ARN ribosomal 50S	++			++
Oxazolidinones	ARN ribosomal 50S		++		
Inhibition de la synthèse ou du fonctionnement de l'ADN					
Fluoroquinolones	Topoisomérases		+++		++
Rifamycines	ARN polymérase		+++		+
Sulfamides	DHFS[c]		++		+
Triméthoprime	DHFR[d]		++		+

a = Protéine liant les pénicellines ou protein bindin penicillin (PBP) ; b= Précurseurs pentapeptidiques du peptidoglycane constitués d'un motif D-Ala-Ala ; c= Dihydrofolate synthase ; d= Dihydrofolate réductase ; MLS= Macrolides, Lincosamides, Streptogramines.

4.3. Modalités d'acquisition de résistance

Plusieurs mécanismes de transfert vertical et horizontal entre bactéries, de gènes codant la résistance aux antibiotiques, ont été décrits. Les mécanismes de transfert horizontal de gènes s'effectuent généralement entre une bactérie donneuse et une bactérie receveuse. Parmi ces modalités, on rencontre les processus de transformation, de transduction, de conjugaison et de mutation. Ce transfert entre bactéries implique donc l'intervention d'éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides, les transposons et les intégrons qui jouent un rôle prépondérant dans la dissémination des résistances (Roy, 2001).

4.3.1. La transformation

Elle intervient à la suite de la fixation et de l'absorption par une bactérie réceptrice, dite compétente, de l'ADN libre présent dans l'environnement. L'ADN exogène absorbé se recombine avec l'ADN de la receveuse dont le résultat est l'apparition de nouveaux caractères génétiques stables. Ce phénomène semble toute fois rare, à cause de la dénaturation rapide de l'ADN libre dans l'environnement (Winokur *et al.*, 2001).

4.3.2. La transduction

La transduction s'observe surtout entre les souches appartenant à une même espèce bactérienne. Elle correspond à un transfert partiel d'ADN bactérien grâce aux bactériophages. Plusieurs études ont montré que, *Salmonella* Typhimurium DT104 pouvait transférer de manière efficace ses gènes de résistance par transduction. Ce phénomène est peut être à l'origine du transfert de SGI1 (*Salmonella* genomic island 1) au sein du genre *Salmonella* (Gebreyes et Thakur, 2005 ; Mulvey *et al.*, 2006).

4.3.3. La conjugaison

Elle s'effectue par contact préalable entre une bactérie donneuse et une bactérie receveuse, permettant ainsi le transfert du matériel génétique plasmidique. Le transfert de plasmide peut intervenir entres deux espèces différentes comme *Salmonella* et *Escherichia*

pour le gène codant la résistance aux céphalosporines *cmy-2*, ou à l'intérieur d'une même espèce (Schwarz et Chaslus-Danclas, 2001 ; Winokur *et al.*, 2001).

4.3.4. La mutation

L'apparition de mutations est un phénomène rare (de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-12}) et très spontané (Catry *et al.*, 2003). Une résistance acquise par mutation se transmet verticalement au sein du clone bactérien et peut conférer aux bactéries la capacité de résister à l'action de certains antibiotiques (Peyret, 1994).

4.4. La mesure de la résistance aux antibimicrobiens

L'antibiogramme est conçu pour prédire la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Il permet de classer une souche pathogène en catégorie clinique sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R). L'antibiogramme sert également à la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne et peut orienter l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles. Différentes techniques sont utilisées dont la plus courante est la méthode de diffusion en milieu gélosé, pour évaluer l'activité inhibitrice de plusieurs anti-infectieux représentatifs des principales familles d'antibiotiques sur une souche bactérienne, en mesurant les diamètres d'inhibition autour de disques chargés en antibiotique.

La surface d'un milieu de culture (en général Mueller-Hinton), est ensemencée en nappe avec une culture bactérienne pure, un disque de papier buvard imprégné d'antibiotique est ensemencé sur la surface de la gélose qui commence à diffuser au sein de la gélose, en créant un gradient de concentration décroissant au fur et à mesure que l'on s'éloigne du disque, après incubation de 18-20 heures. Le diamètre d'inhibition suit une loi inverse à la valeur de la CMI (concentration minimale inhibitrice).

- ✓ Si le diamètre mesuré est inférieur au diamètre critique inférieur, la souche est résistante.
- ✓ Si le diamètre mesuré est supérieur ou égal au diamètre correspondant au seuil critique supérieur, la souche est sensible.
- ✓ Si le diamètre est compris entre les deux valeurs, la souche est considérée comme intermédiaire.

Ces règles sont applicables selon les recommandations relatives à la technique et aux modalités d'interprétation suivies par des référentiels nationaux tels que : Le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie pour la France (CA-SFM), le Clinical and Laboratory Standards Institute pour les Etats-Unis (CLSI) , le British Society of Antimicrobial Chemotherapy pour la Grande Bretagne (BASC) et le Deutsches Institut fur Normung (DIN) pour l'Allemagne (EFSA, 2007).

4.5. *Salmonella* et résistance aux antimicrobiens

Salmonella est naturellement sensible à tous les antibiotiques habituellement efficaces sur les bactéries à Gram négatif.

La résistance aux antibiotiques chez *Salmonella* est devenue, ces dernières décennies, matière à inquiétude pour la santé publique dans le monde (Weill *et al.*, 2004c). C'est à partir de 1997, que l'OMS signalait l'augmentation alarmante de l'incidence de souches de *Salmonella* non typhiques résistantes aux antibiotiques (WHO, 1997).

En 2002, plusieurs études comparatives de la résistance aux antibiotiques chez *Salmonella* non typhiques d'origine humaine, animale ou environnementale réalisée dans l'UE et à travers d'autres continents a montré des niveaux de multi-résistances très inquiétants (Boerlin et Reid-Smith, 2008 ; Cobbold *et al.*, 2006 ; Lauderdale *et al.*, 2006).

L'analyse de la sensibilité aux antimicrobiens des souches humaines du sérotype Typhimurium a montré des niveaux élevés et stables de multi-résistance depuis 1993. Il s'est avéré que cette multi-résistance est due à la présence d'un clone particulier, individualisé grâce à son lysotype DT104. Ce clone a intégré dans son chromosome, un îlot génomique de 43 kb, appelé *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1), dont une partie porte les différents gènes impliqués dans la résistance à l'ampicilline (A), bla_{PSE-1}, à la streptomycine (S) et à la spectinomycine, *aad*A1, au chloramphénicole (C), *flo*R, aux sulfamides (Su), *sul*1, et aux tétracyclines (T), *tet*G, d'où son nom de clone «penta-résistant» ou «ACSSuT» (Cloeckaert *et al.*, 2007 ; Mulvey *et al.*, 2006 ; Weill, 2009). Il a d'abord émergé au Royaume-Uni dès 1989 dans le bétail, puis chez les volailles, moutons, porcs et chevaux et enfin chez l'homme. Il a ensuite disséminé en Amérique du Nord et dans plusieurs pays européens (Aarestrup *et al.*, 2007 ; Casin *et al.*, 1999 ; Glynn *et al.*, 1998 ; Threlfall *et al.*, 2003).

Salmonella Enteritidis, sérotype prédominant chez l'homme jusqu'en 2004 en France, est resté majoritairement multi-sensible aux antibiotiques sur la période 1993 à 2004, tandis que le sérotype Hadar, souvent retrouvé dans la filière avicole, présentait des niveaux élevés de multi-résistance aux antibiotiques (Weill, 2009).

Ces dernières années, de plus en plus de sérotypes de *Salmonella* ont acquis des résistances diverses à plusieurs familles d'antibiotiques tels que les beta-lactamines (Weill *et al.*, 2004), les aminosides, les quinolones (Cloeckaert et Chaslus-Dancla, 2001), les fluoroquinolones (Walker *et al.*, 2000), les céphalosporines, etc., molécules de choix lorsqu'un traitement s'avère nécessaire lors des infections systémiques à *Salmonella* (Stevens *et al.*, 2006 ; Threlfall, 2002 ; Weill, 2009).

Depuis 2000, c'est le cas de *Salmonella* Kentucky résistante à haut niveau aux fluoroquinolones, qui a été identifiée chez l'homme en France, au Danemark, en Grande-Bretagne et aux USA. Les patients étaient le plus souvent de retour d'un voyage au Maghreb. Cette souche appelée ST198 serait apparue dans les années 90 en Egypte, aurait ensuite acquis petit à petit tous ses déterminants de multi-résistance dont la résistance à la ciprofloxacine en 2000. Ensuite elle semble s'être disséminée rapidement à l'ensemble du continent africain à partir de 2005, puis au Moyen-Orient et maintenant en Asie (Le Hello *et al.*, 2011, Guillon et al, 2013). Elle a également été détectée dans des élevages de volaille : des poulet en Ethiopie en 2007 (Le Hello *et al.*, 2011), des poules pondeuses en Algérie en 2009 (Bouzidi *et al.*, 2011), des dindes au Maroc dès 2006 (Bouchrif *et al.*, 2008) et en Pologne en 2010 (Wasyl *et al.*, 2012). Devant l'émergence mondiale de cette souche hautement résistante aux antibiotiques, plusieurs microbiologistes dont Le Hello *et al.* (2013), suggèrent d'inclure cette souche à la liste des sérotypes ciblés par les programmes de contrôle et d'éradication des salmonelles en filière avicole.

TRAVAUX DE RECHERCHE

Introduction

L'état de l'art avait montré que les volailles constituaient une des sources majeures de salmonelloses humaines d'origine alimentaire. De cet état des lieux, il ressortait que les salmonelles étaient présentes à tous les maillons de la filière aviaire, ce qui constituait un réel problème pour la sécurité des aliments et la santé publique dans le monde.

Au Tchad, il y a bientôt 40 ans, les isolements de salmonelles, potentiels agents de toxi-infections alimentaires, n'étaient plus réalisés pour des raisons liées à l'histoire tumultueuse de notre pays. A N'Djamena, comme sur tout le territoire national, la consommation des œufs de poules et des poulets de chair n'a cessé d'augmenter ces deux dernières décennies. Dans les domaines vétérinaires et médicaux, le diagnostic des toxi-infections alimentaires et des gastroentérites ne se posait jamais dans le sens d'une suspicion des salmonelloses. Afin de rendre possible la prise en charge thérapeutique et la prévention des salmonelloses animales et humaines, nous nous sommes donnés comme but principal, à travers notre étude et en fonction des moyens dont nous avons disposé, de sonder la présence des salmonelles dans les élevages et leur environnement ainsi que chez les patients souffrant de diarrhées et autres formes de gastroentérites qui avaient consulté les hôpitaux au moment de notre étude dans la région de N'Djamena. Les objectifs de notre étude étaient donc les suivants:

- Déterminer la prévalence de contamination par des salmonelles des élevages de poulets de chair et de poules pondeuses de N'Djamena ;
- Déterminer la prévalence de contamination des humains par des salmonelles dans les hôpitaux de N'Djamena ;
- Evaluer les facteurs de risques potentiels liés à la contamination des élevages et de leur environnement ;
- Déterminer la résistance aux antibiotiques des souches isolées ;
- Evaluer des proximités génétiques des souches isolées dans le but d'établir des liens phylogénétiques et épidémiologiques entre les souches de salmonelles isolées des élevages et chez les humains.

Nous avons conduit cette étude en alternance entre la France et le Tchad sur deux étapes de six (6) mois chacune par an et ceci pendant 4 ans:

- Une étape qui s'est déroulée à N'Djamena et qui nous av permis d'effectuer les échantillonnages dans les élevages et hôpitaux de N'Djamena et de réaliser les analyses bactériologiques (isolement, identification et confirmation biochimique) au sein du Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques (LRVZ) de N'Djamena.

- Une autre étape qui s'est déroulée en France et qui nous a permis de rédiger la synthèse bibliographique, de réaliser le sérotypage, l'antibiogramme et la caractérisation moléculaire (ERIC-PCR, IS-PCR et PFGE) de nos souches au sein de l'unité MASQ de l'ENVA et de l'unité CEB de L'Anses. Ces typages génotypiques avaient pour but de montrer d'éventuels liens phylogénétiques de l'ensemble des souches isolées pouvant permettre de prouver l'existence de liens épidémiologiques entre les souches aviaires et humaines identifiées au cours de cette étude.

5. Isolement et identification des salmonelles

5.1. Matériel et méthodes

5.1.1. Matériel

5.1.1.1 - Echantillonnages

La ville de N'Djamena est située au sud ouest du territoire Tchadien. Elle est constituée de 10 communes urbaines avec une population estimée à environ 993 492 habitants (RGPH2, INSEED, 2009). Elle dispose de 57 élevages avicoles, recensés par la direction des études et des statistiques du Ministère de l'Elevage, dont seuls 30 étaient fonctionnels. Elle compte aussi 7 hôpitaux publics, 4 hôpitaux privés et plusieurs cliniques privées dont les emplacements géographiques dépendent de l'importance de densité de population par commune urbaine.

Notre étude a porté sur 16 des 22 fermes avicoles retenues au départ, toutes privées et 5 hôpitaux dont 4 hôpitaux publics et 1 hôpital privé, ayant bien voulu participer à notre investigation. Les 6 élevages restants que nous n'avons pu échantillonner pendant la période de notre deuxième campagne étaient en attente de poussins qui devaient arriver de France. Tous les prélèvements ont été effectués par le même opérateur dans toutes les fermes et les hôpitaux visités pour échantillonnages. Les deux campagnes de collecte ont duré chacune six (6) mois : du 01/08/2010 au 31/01/2011 et du 01/09/2011 au 28/02/2012.

5.1.1.2 – Questionnaires

Notre étude s'est appuyée sur une approche participative à deux volets :

- Dans un premier temps, nous avons effectué une première visite d'informations et de recensement dans chaque élevage, dans le but d'associer, sur la base du volontariat, les aviculteurs à notre étude ;

- Une deuxième visite a été réalisée pour échantillonner et nous permettre, à travers une fiche de questionnaire, de pouvoir répondre à un certain nombre d'interrogations se rapportant à des rubriques, tels que :

    - l'emplacement et l'environnement de l'exploitation ;
    - ses infrastructures et son équipement ;
    - son fonctionnement et son hygiène (désinsectisation ; dératisation ; fréquences de nettoyage des équipements ; des infrastructures ; présence de sanitaires ; d'eau et de savon ; habits spécifiques ; etc.) ;
    - la qualification de son personnel de la main d'œuvre ;
    - la source et le conditionnement de l'alimentation destinée aux volailles ;
    - l'utilisation des médicaments vétérinaires ;
    - une dernière rubrique pour les observations personnelles du répondant.

Les questionnaires ont été conçus en mode fermé à semi-fermé. Les questions étaient courtes et précises, ne nécessitant en général que des réponses par oui ou non, des chiffres puis une petite observation finale du répondant.

5.1.1.3. Localisation des sites d'échantillonnages dans N'Djamena

Les 16 élevages de volailles et les 5 établissements sanitaires impliqués dans notre étude sont représentés ci-dessous, en fonction de leur localisation géographique sur la carte urbaine de N'Djamena (figure n° 9).

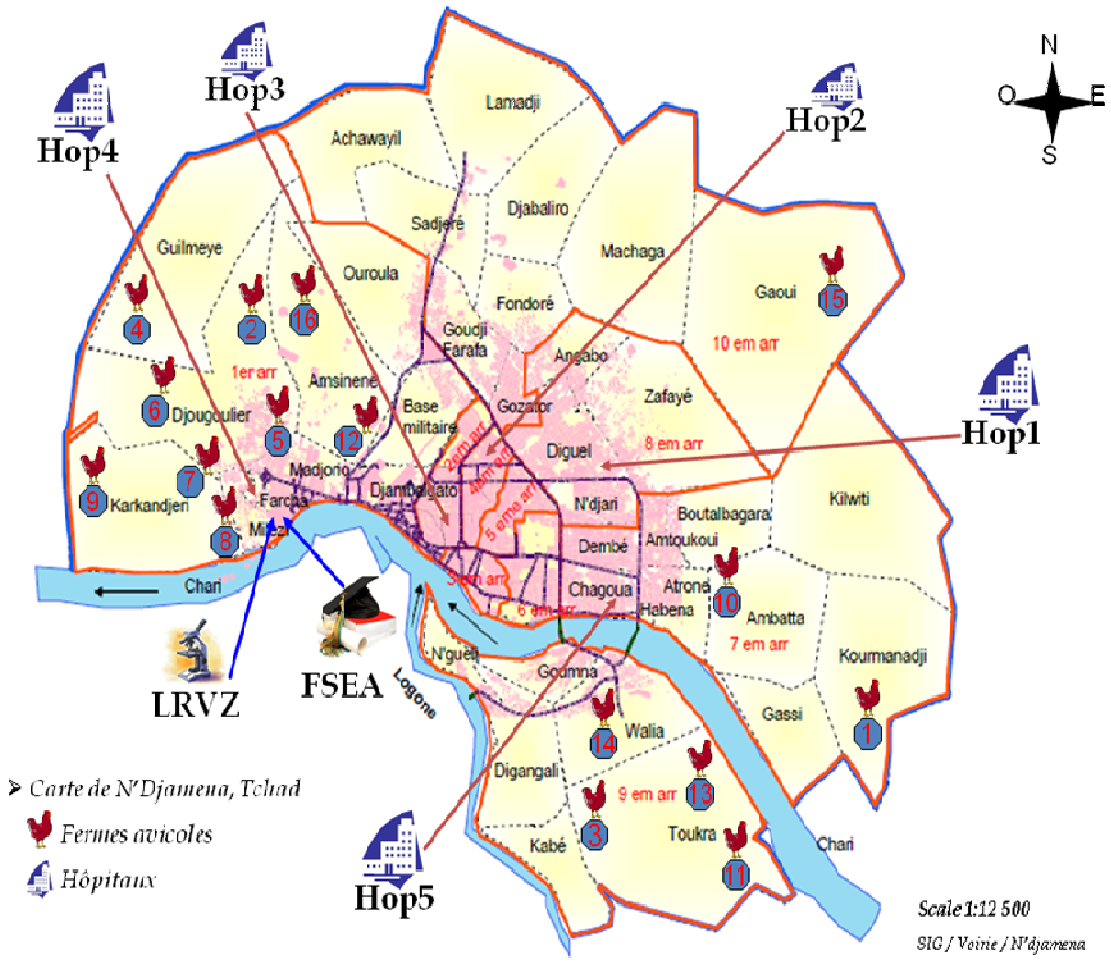


Figure 9: Localisation des fermes avicoles et hôpitaux sur la carte de N'Djamena

5.1.2 - Méthodes

5.1.2.1- Echantillonnages

Tous les échantillons ont été collectés sur deux campagnes. Lors de la première campagne de collectes, les prélèvements ont concerné 9 élevages de volailles et 4 hôpitaux de la capitale. La deuxième campagne a impliqué 7 élevages de volailles supplémentaires et 5 hôpitaux (les 4 hôpitaux de la seconde campagne étaient les mêmes que ceux de la 1ère campagne). Les prélèvements ont été réalisés selon les protocoles suivants :

5.1.2.1.1- Elevages (Tableau 22)

Les prélèvements ont tous été effectués tous les samedis matins entre 7 h - 10 h. Chaque bâtiment abritant les volailles était divisé au tiers quelle que soit sa superficie.

Fientes : au niveau de chaque tiers du bâtiment, on prélève au hasard 15 fientes, qui sont aussitôt mises dans un sachet de prélèvement stérile (AES Chemunex, Combourg, France). Cette opération permet de faire des collectes groupées en pools (3 pools par bâtiment) de prélèvements de 15 fientes chacun.

Surfaces : de la même façon, on applique 2 chiffonnettes humidifiées sur la litière de chaque tiers du bâtiment. Les chiffonnettes ainsi chargées sont ensuite mises dans un sachet stérile (AES Chemunex, Combourg, France). Trois pools de prélèvements de 2 chiffonnettes chacun sont ainsi réalisés pour chaque bâtiment.

Abreuvoirs : on choisit trois abreuvoirs de chaque tiers du bâtiment et on y prélève 5 mL d'eau fournie la veille aux volailles. On réalise pour chaque bâtiment, un pool de 6 x 5 mL d'eau issue de chaque tiers du bâtiment. Les prélèvements sont mis dans un sachet stérile (AES Chemunex, Combourg, France).

Mangeoires : on choisit, au hasard, trois mangeoires de chaque tiers du bâtiment et on y prélève 5 à 10 g d'aliments fournis la veille aux volailles. On réalise pour chaque bâtiment, un pool de 6 x (5 à 10 g) d'aliments issu de chaque tiers du bâtiment.

Les prélèvements sont transférés au fur et à mesure dans des caissons isothermes ne dépassant pas 4°C et ramenés au LRVZ (Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques) de N'Djamena, dans un délai ne dépassant pas 4 h et pré-enrichis dans l'heure qui suit. La dilution est faite au 1/10 pour tous les échantillons (25g dans 225 mL).

5.1.2.1.2- Hôpitaux (Tableau 23)

Les prélèvements (selles des patients malades hospitalisés ou non) sont récupérés directement auprès des techniciens de laboratoires de chaque hôpital tous les deuxièmes jours de la semaine entre 11h et midi. Ils sont mis dans des sachets stériles (AES Chemunex, Combourg, France).

Ces prélèvements sont ensuite mis dans un caisson isotherme et ramenés au laboratoire dans un délai ne dépassant pas 4 h et pré-enrichis dans l'heure qui suit. La dilution est faite également au 1/10 (10g dans 90 mL d'EPT).

Tableau 22 : Organisation des échantillonnages dans les fermes avicoles

Echantillonnages	Période	Nombre de fermes	Type de prélèvements	Nombre de prélèvements par ferme	Modalités de prélèvements
Première campagne	01 Août 2010 au 31 Janvier 2011	9 fermes	Fientes	3 pools de 15 fientes	15 fientes au hasard par tiers du bâtiment
			Litières	3 pools de 2 chiffonnettes	2 chiffonnettes sur la litière par tiers du bâtiment
			Eaux	1 pool de 6 x 5 mL	5 mL par abreuvoirs et par tiers du bâtiment
			aliments	1 pool de 6 x 10 g	10 g par mangeoire et par tiers du bâtiment
Sous-total		9		8 pools de 63 prélèvements	72 pools de 567 prélèvements
Deuxième campagne	01 Septembre 2011 au 28 Février 2012	7 fermes	Fientes	3 pools de 15 fientes	15 fientes au hasard par tiers du bâtiment
			Litières	3 pools de 2 chiffonnettes	2 chiffonnettes sur la litière par tiers du bâtiment
			Eaux	1 pool de 6 x 5 mL	5 mL par abreuvoirs et par tiers du bâtiment
			aliments	1 pool de 6 x 10 g	10 g par mangeoire et par tiers du bâtiment
Sous-total		7		8 pools de 63 prélèvements	56 pools de 441 prélèvements
Total		16		63 prélèvements en 8 pools	1008 prélèvements en 128 pools

Tableau 23 : Organisation des échantillonnages dans les hôpitaux

Echantillonnages	Période	Nombre d'hôpitaux	Type d'échantillons	Nombre d'échantillons par hôpitaux	Modalités d'échantillonnage
Première campagne	01 Août 2010 au 31 Octobre 2010	4	Selles d'origine humaine	10 échantillons par hôpital et par semaine	Une visite de collectes sur rendez vous dans un seul hôpital par semaine pendant 03 mois
	Sous-total	4		40 échantillons par mois	120 échantillons
Deuxième campagne	01 Septembre 2011 au 28 Février 2012	5	Selles d'origine humaine	10 échantillons par hôpital et par semaine	Une visite de collectes sur rendez vous dans un seul hôpital par semaine pendant 06 mois
	Sous-total	5		50 échantillons par mois	300 échantillons
	Total	5		90 échantillons	420 échantillons

5.1.2.2. Analyse bactériologique

Les analyses bactériologiques ont été réalisées selon la norme NF CEN ISO 6579, 2002.

5.1.2.2.1. Méthode de recherche de *Salmonella*

La recherche des isolats de *Salmonella* a été réalisée en 4 étapes suivant la norme Française ci-dessus citée : le pré-enrichissement, l'enrichissement sélectif, l'isolement sur gélose et enfin l'identification biochimique par les galeries appropriées.

5.1.2.2.2. Schéma d'analyse

- **Pré-enrichissement (préparation de la solution mère : inoculum)**

On a ajouté 225 mL d'EPT (AES Chemunex, Combourg, France) aux 25 g de prélèvements issus des élevages (90 ml d'E.P.T pour 10 g de selles humaines). La solution mère obtenue a été laissée 30 mn à la température ambiante pour revivification et étuvée ensuite pendant 18 - 20 h à 37° C. Ceci permet aux salmonelles (éventuellement présentes) et aux autres bactéries de se multiplier en abondance. Elles deviennent ainsi facilement détectables par la suite.

Le pré-enrichissement permet la croissance des salmonelles soumises à un stress ou endommagées par des facteurs comme l'exposition à la chaleur, la congélation, la déshydratation, les agents de conservation, une forte pression osmotique ou d'importantes fluctuations de température.

- **Enrichissement sur bouillons sélectifs**

0,1 mL de la solution mère a été mis dans des tubes à vis stériles contenant 10 ml de bouillon RVS (AES Chemunex, Combourg, France) et étuvé pendant 24 h à 42° C. La sélectivité du bouillon RVS et la température d'incubation relativement élevée entraînent l'élimination d'une grande partie de la flore d'accompagnement et favorisent la croissance des salmonelles.

1 mL de cette solution mère a été mis parallèlement dans de tubes à vis stérile contenant 9 ml de bouillon MKTTn (AES Chemunex, Combourg, France) et étuvé pendant 24 h à 37° C.

- **Isolement sur géloses sélectives**

1 goutte de l'inoculum du bouillon RVS a été ensemencée par strie d'épuisement dans une première boîte contenant de la gélose Hektoen (AES Chemunex, Combourg, France). La même opération a été répétée avec une autre boîte contenant de la gélose XLD (AES Chemunex, Combourg, France).

1 goutte de l'inoculum du bouillon MKTTn a été ensemencée dans une première boite contenant de la gélose Hektoen. La même opération a été répétée avec une autre boîte contenant de la gélose XLD. Toutes les boîtes de Pétri sont incubées à 37° C pendant 24 h.

- **Purification**

Après 24 heures, les colonies isolées sur les géloses présentant les caractéristiques macroscopiques des salmonelles (colonies rougeâtres à centre noir sur XLD et colonies

verdâtres ou bleuâtres à centre noir sur Hektoen) étaient repiquées, pour purification sur gélose Hektoen pour être soumises à une identification plus fine.

1 à 4 colonies suspectes (colonies vertes à nuances bleuâtres et à centre noir, bien rondes et à contours réguliers) ont été récupérées et ensemencées sur gélose Hektoen puis incubées pendant 24 h à 37° C.

- **identification biochimique:**

1 à 2 colonies issues des boîtes de purification ont été ré-ensemencées par stries sur gélose nutritive et étuvées pendant 24 h à 37° C.

Nous avons d'abord effectué la coloration de Gram et la recherche de l'oxydase afin de vérifier les caractères majeurs des Entérobactéries. La coloration de Gram est une technique qui permet de mettre en évidence les caractères morphologiques ($Gram^-$ ou $Gram^+$, forme et taille) des bactéries. L'identification des souches de salmonelles fait appel à une sélection biochimique des isolats analysés, en fonction de réactions biochimiques bien déterminées.

La confirmation des caractéristiques biochimiques a été réalisée, grâce à des galeries Microgen GNA (AES Chemunex, Combourg, France). L'incubation a été faite à 37° C pendant 18 h à 20 h. Cette galerie permet de rechercher 12 caractères biochimiques.

5.1.2.3. Le sérotypage

Le sérotypage a été effectué au sein de l'unité CEB (Caractérisation et Epidémiologie Bactérienne) du Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et des Procédés agroalimentaires (LERQAP) de l'Anses (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et de du Travail) de Maisons-Alfort en France, par agglutination sur lame mince à l'aide d'une culture fraîche de salmonelles et des sérums appropriés. Il a d'abord été vérifié que les isolats n'étaient pas en phase rugueuse (Rough: R.) ou auto agglutinables.

Les sérotypes ont été déterminés par les sérums O polyvalents ou sérums de mélange : OMA, OMB, OMC, OMD, OME, OMF et OMG, puis par les sérums monovalents anti O et enfin par les sérums anti H (HMA, HMB, HMC et H1), selon le schéma de sérotypage.

En pratique, les sérums polyvalents OMA et OMB permettent de déterminer le sérotype de 99 % des souches de *Salmonella*. L'utilisation des sérums monovalents anti-O permet de préciser le groupe auquel appartient la salmonelle. Le facteur 1 et le facteur 12 ne sont pas recherchés ou rarement, car ils sont retrouvés chez de nombreux sérotypes et peuvent provoquer des agglutinations gênantes. Enfin le tableau de Kauffman-White-Le Minor, est utilisé pour la détermination de la formule antigénique et la lecture des résultats du sérotypage (Guibourdenche *et al.*, 2010).

5.1.2.4 - La méthode PTS (Premi Test *Salmonella*)

Pour minimiser le coût et le temps de sérotypage par la méthode classique, certains isolats de *Salmonella* issus de la deuxième campagne de collectes ont été sérotypés grâce à la méthode PTS (Premi® Test *Salmonella* system, Check-Points BV, Wageningen, The Netherlands). La PTS utilise la réaction de détection multiplexe par ligation, pour générer un ensemble de molécules d'ADN circulaires qui sont ensuite amplifiées par PCR au moyen d'une seule paire d'amorces. Les produits de PCR sont ensuite hybridés sur une puce à ADN de faible densité. Les signaux d'hybridation sont détectés grâce à la présence de marqueur à biotine incorporée dans l'une des amorces de PCR (Wattiau *et al.*, 2008).

Un ensemble de marqueurs génétiques présents sur la puce d'ADN ont été sélectionnés dans le but de produire des profils d'hybridation unique, pour identifier et discriminer les sérotypes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.

5.2. Résultats

5.2.1. Etude des questionnaires issus les fermes

Les informations collectées grâce aux questionnaires nous ont permis de caractériser les fermes avicoles de N'Djamena, dans lesquels ont été effectués les différents échantillonnages. Toutes les volailles étaient, entre autres de races Isabrown, Leghorn, Hye-line, Hybro-chair et d'âge compris entre 40 et 60 jours pour les chairs, et entre 2 et 23 mois pour les pondeuses. Les volailles ne présentaient aucun signe de maladie au moment de nos deux campagnes d'étude.

5.2.2. Caractéristiques des fermes avicoles enquêtées

Le nombre de fermes avicoles de la première campagne était de neuf (9), alors que celui de la deuxième campagne était de sept (7). Tous les élevages étudiés correspondaient à de très faibles investissements et étaient de taille modeste (capacité moyenne : 1000 sujets par bande), ne possédant en général qu'un ou deux bâtiments (13/16) avec une densité variant entre 3 et 13 sujets / m². Les murs étaient soit en terre battue, soit en dur ou en semi-dur et les toits en tôles (plaques de zinc).

L'équipement se limitait aux mangeoires, abreuvoirs et aux radiants de chauffage manuel au charbon de bois avec absence de systèmes de ventilation. La variation de l'humidité était méconnue dans les bâtiments, avec comme conséquence, un manque d'humidité, surtout en saison de fortes canicules qui peuvent durer plus de 4 mois par année. L'éclairage se faisait par les lampes tempêtes et à batteries, rarement par un générateur de courant. Le sol était en béton (10 sur 16 élevages) et dans 11 cas / 16 recouvert par une litière de paille hachée. Dix élevages parmi les 16 étudiés avaient une clôture, la plupart en grillage, mais en mauvais état, ce qui donnait libre accès aux animaux de la basse-cour (caprins, ovins, canards, chiens, chats…). Les sources d'abreuvement d'eau étaient des puits ouverts ou des forages (12 élevages / 16) (Tableau 24).

Les performances de ces élevages privés se mesuraient à la nature extensive de leurs capacités de production et se traduisaient par une durée du cycle d'élevage longue (23 mois pour les pondeuses et 2 à 3 mois pour les poulets de chair) et un gaspillage d'intrants (aliments avicoles, matériels biologiques, produits vétérinaires). Le sous-équipement des fermes, associé au manque de professionnalisme des producteurs face à la conduite de l'élevage aviaire n'ont fait qu'aggraver leurs coûts de production déjà très élevés.

La classification des fermes avicoles impliquées dans notre étude s'est faite selon le niveau de contamination de nos fermes (Tableau 27). Ceci dans le but de mesurer l'influence de la typologie de chaque ferme avicole sur les taux de contamination observés. Cette mesure est réalisée grâce au test statistique de Fisher afin de déterminer la corrélation statistique entre les facteurs de risque de contamination et les différentes caractéristiques des 16 fermes avicoles impliquées dans notre étude (Tableau 24).

Tableau 24 : Typologie des élevages de volailles enquêtés de N'Djamena, Tchad

Caractéristiques des élevages	**Répartitions des élevages par pourcentage de contamination des élevages**		**Total**
	Elevages < 30 %	**Elevages > 30 %**	
Capacité de production	500 – 5000	500 - 5000	
Nombre d'élevages	7	9	16
Origine des poussins			
• Afrique	1	4	5
• Hors d'Afrique	6	5	11
Nombre de bande par fermes			
• 1 à 2	6	8	14
• 3 et +	1	1	2
Densité des volailles par bandes			
• 1 à 5 oiseaux / m^2	2	4	6
• 6 et +	5	5	10
Taux de mortalité par bande			
• 0 à 5 %	5	9	14
• 6 % à +	1	1	2
Abreuvement			
• Eaux de robinet	2	2	4
• Eaux de forage	5	7	12
Nombre de bâtiments			
• 1	2	1	3
• 2 à +	5	8	13
Structure des bâtiments			
• En dur	5	8	13
• Terre battue	2	1	3
Structure du plancher			
• Béton	3	7	10
• Terre battue	4	2	6
Litière			
• Paille hachée	5	6	11
• Copeaux de bois	2	3	5
Main d'œuvre			
• 1 à 2 ouvriers	6	5	11
• 3 à +	1	4	5
Niveau d'instruction des ouvriers			
• CEP	5	4	9
• Brevet et +	2	5	7
Combinaisons de travail (habits, gants et chaussures)			
• Oui	5	7	12
• Non	2	2	4
Visite vétérinaire			
• Aucune	1	1	2
• 1 à +	6	8	14
Hygiène			
• Présence de sanitaires			
1. Oui	3	4	7
2. Non	4	5	9
Hygiène			
• Savon et désinfectant			
1. Oui	6	8	14
2. Non	1	1	2

Propreté de l'environnement de la ferme (désinfection) • Oui • non	 4 3	 7 2	 11 5
Utilisation de pédiluves • Oui • Non	 6 1	 8 1	 14 2
Désinsectisation • Oui • Non	 6 1	 8 1	 16 0
Dératisation • Oui • Non	 5 2	 2 7	 7 9
Isolation - aération • Moyenne • bonne	 4 3	 4 5	 8 8
Clôture de la ferme • oui • non	 3 4	 7 2	 10 6
Vide sanitaire • 1 à 2 semaines • 3 semaines à +	 2 5	 4 5	 6 9
Accès des autres animaux à la ferme • Oui • Non	 7 1	 7 1	 14 2

5.2.3. Enquêtes dans les hôpitaux

Pour rendre possible les collectes d'échantillons dans les différents hôpitaux concernés par notre étude, il nous a fallu obtenir une autorisation d'accès, auprès de la Délégation Régionale Sanitaire (DRS) de N'Djamena. La DRS est l'organe directeur qui, sous la tutelle du Ministère de la Santé Publique, coordonne tout le système de santé tchadien organisé par région administrative. Cette autorisation était notre carte d'accès dans les centres de santé et nous permettait de recueillir directement auprès de laboratoires respectifs de ces hôpiatux, tous les échantillons de selles disponibles des patients malades hospitalisés.

5.2.4. Prévalence de contamination des élevages

Sur les deux campagnes d'investigation, un total de 128 pools d'échantillons (48 pools de fientes, 48 pools de chiffonnettes de surface, 16 pools d'aliments et 16 pools d'eaux) collectés de 14 fermes de poules pondeuses et de 2 fermes de poulets de chairs ont été analysés. De ces pools d'échantillons, 56 (43,75 %) sont révélés positifs à la présence de *Salmonella* (Tableaux 25 et 27).

Tableau 25 : Prévalence de *Salmonella* par type d'échantillons et bande de volailles.

Type d'échantillons	Nombre d'échantillons par pools					
	Poules pondeuses (n = 112)		Poulets de chairs (n = 16)		Total (n = 128)	
	Examinés	Positifs (%)	Examinés	Positifs (%)	Examinés	Positifs (%)
Fientes	42	13 (30,95)	6	3 (50)	48	16 (33,33)
Litière	42	16 (38,1)	6	4 (66,66)	48	20 (41,66)
Aliments	14	10 (71,42)	2	2 (100)	16	12 (75)
Eaux	14	8 (57,14)	2	(0)	16	8 (50)
Total	112	47 (41,96)	16	9 (56,25)	128	56 (43,75)

5.2.5. Prévalence de contamination dans les hôpitaux

Sur les deux campagnes de notre étude, nous avons collecté un total de 420 échantillons de selles des patients malades hospitalisés dans les cinq hôpitaux impliqués dans notre enquête. De ce total, 37 (8,8 %) échantillons sont positifs au genre *Salmonella* (Tableaux 26).

Tableau 26 : Prévalence de *Salmonella* par hôpital enquêté

Hôpitaux	Nombre d'échantillons de selles humaines (n= 420)	
	Examinés	Positifs (%)
Hop1 (hôpital public)	90	6 (6,66)
Hop2 (hôpital public)	90	4 (4,44)
Hop3 (hôpital privé)	90	1 (1,11)
Hop4 (hôpital public)	60	10 (16,66)
Hop5 (hôpital public)	90	16 (17,77)
Total	420	37 (8,8 %)

5.2.6. Distribution des sérotypes de *Salmonella* dans les élevages

Des 56 pools d'échantillons retrouvés positifs au genre *Salmonella*, nous avons identifié 84 isolats de *Salmonella* appartenant à 28 sérotypes différents (Tableaux 28). Les sérotypes les plus fréquemment rencontrés étaient *Salmonella* Colindale (19%) et *Salmonella* Minnesota (18%), suivi par *S.* Havana et *S.* Riggil (6 % chacune), *S.* Amager (4,7 %), *S.* Idikan, Mississipi, *S.* Kottbus et Muenchen (3,6 %). Les autres sérotypes étaient très peu représentés. Nous souhaitons apporter deux remarques : - sept des 28 sérotypes identifiés étaient isolés dans au moins deux fermes avicoles différentes ; - les 16 fermes impliquées dans notre étude se sont révélés positives aux salmonelles.

Tableau 27 : Distribution des différents échantillons (+) par ferme avicole dans la région de N'Djamena

Fermes	Caractérisation des élevages et des prélèvements		
	Age des volailles et type de bandes	Nombre de pools d'échantillons positifs	Pourcentage des prélèvements (+) par ferme
1	23 mois / pondeuses	Litière (1), Fientes (2) aliments (1)	**50 % (4/8)**
2	4 mois / pondeuses	Litière (2)	25 % (2/8)
3	7 mois / pondeuses	Litière (2), Fientes (2) aliments (1)	**62,5 % (5/8)**
4	6 mois / pondeuses	Eaux (1) aliments (1)	25 % (2/8)
5	8 mois / pondeuses	aliments (1)	12,5 % (1/8)
6	48 jours / chairs	Fientes (3), litière (3), aliments(1)	**87,5 % (7/8)**
7	50 jours / chairs	Litière (1) aliments (1)	25 % (2/8)
8	12 mois / pondeuses	Eaux (1) aliments (1)	25 % (2/8)
9	7 mois / pondeuses	Litière (2) Fientes (2) eaux (1) aliments (1)	**75 % (6/8)**
10	13 mois / pondeuses	Litière (1), Eaux (1) aliments (1),	**37,5 % (3/8)**
11	14 mois / pondeuses	Fientes (1) Eaux (1)	25 % (2/8)
12	17 mois / pondeuses	Litière (1) Eaux (2) aliments (1)	**62,5 % (5/8)**
13	4mois / pondeuses	Fientes (1)	12,5 % (1/8)
14	5 mois / pondeuses	Litière (2), Eaux (1)	**37,5 % (3/8)**
15	3 mois / pondeuses	Fientes (2) Eaux (1) aliments (1)	**50 % (4/8)**
16	2 mois / pondeuses	Litière (3), Fientes (3) Aliments (1)	**87,5 % (7/8)**
Total des prélèvements (+)		56	43,75 %

Tableau 28 : Distribution des différents sérotypes de *Salmonella* isolés de 16 fermes avicoles dans la région de N'Djamena

Fermes	Caractérisation des volailles et des isolats de *Salmonella*		
	Age des volailles et type de bandes	Sérotypes de salmonelles par élevage	Nombre d'isolats par élevage
1	23 mois / pondeuses	*S*. Havana (3)	**6**
		S. Kalina (1)	
		S. Idikan (2)	
2	4 mois / pondeuses	*S*. Muenchen (2)	4
		S. Gamaba (2)	
3	7 mois / pondeuses	*S*. Amager (4)	**10**
		S. Eppendorf (1)	
		S. Oakland (2)	
		S. Muenchen (1)	
		S. Gloucester (1)	
		S. Typhimurium (1)	
4	6 mois / pondeuses	*S*. Kottbus (1)	3
		S. Colindale (2)	
5	8 mois / pondeuses	*S*. Mississipi (3)	3
6	48 jours / chair	*S*. Colindale (7)	**7**
7	50 jours / chair	*S*. Limete (1)	2
		S. Colindale (1)	
8	12 mois / pondeuses	*S*. Bokanjac (2)	3
		S. Havana (1)	
9	7 mois / pondeuses	*S*. Colindale (6)	**10**
		S. Wilhelmsburg (2)	
		S. Ried (2)	
10	13 mois / pondeuses	*S*. Telelkebir (2)	4
		S. Kinondoni (2)	
11	14 mois / pondeuses	*S*. Winterthur (1)	2
		S. Virchow (1)	
12	17 mois / pondeuses	*S*. Derby (1)	**7**
		S. Stanley (1)	
		S. Kottbus (2)	
		S. Winterthur (1)	
		S. Tennessee (1)	
		S. Enteritidis (1)	
13	4mois / pondeuses	*S*. Minnesota (1)	1
14	5 mois / pondeuses	*S*. Minnesota (3)	3
15	3 mois / pondeuses	*S*. Riggill (5)	**7**
		S. Hull (1)	
		S. Havana (1)	
16	2 mois / pondeuses	*S*. Minnesota (11)	**12**
		S. Idikan (1)	
Total des sérotypes et isolats de *Salmonella*		28 sérotypes	84

5.2.7. Distribution des sérotypes de *Salmonella* dans les hôpitaux

L'ensemble des méthodes de diagnostics réalisés sur les 420 échantillons de selles humaines nous a mis permis d'identifier 55 souches de salmonelles appartenant à 21 sérotypes différents. Le sérotype majoritaire était *Salmonella* Stanleyville (n = 8), suivi par *S.* Anatum (n = 5), *S.* Braenderup (n = 4), *S.* Kottbus, *S.* Herston, *S.* Ona, *S.* Colindale, *S.* Idikan, *S.* Farcha, *S.* Altona, *S.* Hato (n = 3 chacun) et de *S.* Enteritidis, Havana, Urbana, Amsterdam (n = 2, chacun). Les autres sérotypes étaient peu représentés (Tableaux 29).

Tableau 29 : Distribution des différents sérotypes de *Salmonella* d'origine humaine isolés de 5 hôpitaux dans la région de N'Djamena.

Hôpitaux	Sérotypes	Nombre d'isolats par hôpital	Proportions d'isolats par hôpital
Hôp5	*S.* Anatum	5	**47,27 %** **(26 isolats de 9 sérotypes)**
	S. Braenderup	4	
	S. Stanleyville	3	
	S. Altona	3	
	S. Farcha	3	
	S. Hato	3	
	S. Havana	2	
	S. Urbana	2	
	S. Hull	1	
Hôp4	*S.* Stanleyville	5	**27,27 %** **(15 isolats de 6 sérotypes)**
	S. Colindale	3	
	S. Idikan	3	
	S. Enteritidis	2	
	S. Teshie	1	
	S. Vom	1	
Hôp1	*S.* Herston	3	**14,54 %** **(8 isolats de 4 sérotypes)**
	S. Ona	3	
	S. Kottbus	1	
	S. I:8:i:-	1	
Hôp2	*S.* Kottbus	2	**9,1 %** **(5 isolats de 3 sérotypes)**
	S. Amsterdam	2	
	S. I:6, 7:a:-	1	
Hôp3	*S.* Muenchen	1	**1,82 %**
Total	**21 sérotypes**	**55 isolats**	**100 %**

Tableau 30 : Récapitulatif des isolats et sérotypes de *Salmonella* sur les deux campagnes dans les fermes avicoles et dans les hôpitaux.

Année	Nombre d'isolats dans les élevages	Nombre d'isolats dans les hôpitaux	Observations
Première campagne: **01/08/2010 au 31/01/2011**	N = 46 *(9 fermes)*	N = 12 *(4 hôpitaux)*	**58 isolats de 21 sérotypes différents (27,6 % *Salmonella* Colindale)**
Deuxième campagne: **01/09/2011 au 28/02/2012**	N = 38 *(7 fermes)*	N = 43 *(5 hôpitaux)*	**81 isolats de 24 sérotypes différents. (18,5 % *Salmonella* Minnesota)**
TOTAL	**16 fermes = 84 isolats de 28 sérotypes différents**	**5 hôpitaux = 55 isolats de 21 sérotypes différents**	**139 isolats (42 Sérotypes, très diversifiés)**

5.3. Discussion

5.3.1. Prévalence de *Salmonella* dans les fermes avicoles

Avant notre étude, il n'y avait aucune information récente disponible sur la prévalence du genre *Salmonella* sur les fermes avicoles Tchadiennes. De ce fait, pour discuter du taux de prévalence de *Salmonella* dans la région concernée par notre étude, il faut repartir dans les années 1960 et 70 pour disposer de quelques informations à travers les études menées par Guard *et al.* (1973) ; Le Minor *et al.* (1969) et Perpezat *et al.* (1963). Ces investigations dites de routine avaient permis d'isoler, chez au moins neuf espèces animales, une centaine de souches de *Salmonella* appartenant à plusieurs sérotypes différents (Tableaux 14 et 15).

Nous retiendrons qu'au cours de notre étude, 43,75 % des 128 pools d'échantillons examinés, étaient positifs au genre *Salmonella* (tableaux 25 et 27). Parmi les salmonelles isolées, 10,71 % (9/84) étaient issus des échantillons collectés de deux fermes de poulets de chair dont la cohorte était âgée de 50 jours. Il apparaît clairement que ce résultat n'est pas représentatif de toute la population de poulet de chair de N'Djamena du fait du petit nombre d'échantillons, et ne devrait pas être interprété comme le taux de prévalence réelle des infections à *Salmonella* dans ces fermes. Cependant, ce résultat met en lumière le besoin de contrôle sanitaire et la contamination des fermes de poulets de chair dans la région autonome de N'Djamena.

Salmonella non typhique (NTS) est largement disséminée dans la nature, colonisant une gamme étendue d'animaux y compris les mammifères, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les insectes (Butaye *et al.*, 2006), mais il existe peu d'informations concernant les réservoirs environnementaux et les modes de contamination de NTS, plus particulièrement dans le contexte africain (Morpeth *et al.*, 2009). Plusieurs études menées dans les pays industrialisés et en voie de développement, rapportaient des taux de prévalence de *Salmonella* assez important dans les élevages de poulets de chair (EFSA, 2011; Kim *et al.*, 2007 ; Siemon *et al.*, 2007).

A l'échelle africaine, il est important de souligner l'étude réalisée en Algérie par Elgroud *et al.* (2009) qui a montré un taux de prévalence de *Salmonella* de 37 % dans les élevages de poulets de chair. Au Cameroun, Wouafo *et al.* (2010), à travers leur étude menée sur les échantillons de poulets de chair vendus en détails dans 8 marchés de Yaoundé, avaient révélé un taux de contamination par les salmonelles de 60 %. Au Sénégal, Cardinale *et al.* (2005) avaient mis en évidence un taux de contamination de 10,1% dû à *Salmonella*, sur des échantillons issus des plats de poulets vendus dans les restaurants de rue à Dakar. Enfin, une étude précédente de Cardinale *et al.* (2004) menée entre 2000 et 2001, sur 70 élevages de volailles (prélèvements de fientes), au Sénégal, faisait état d'un taux de prévalence de contamination par les salmonelles de 28,6 %.

Dans notre présente étude, en prenant en compte chaque type d'élevages, le taux de prévalence le plus important (75 sur 84 isolats soit 89,28 %) était issu des quatorze fermes de poules pondeuses. Au sein de ces différentes fermes, les pondeuses étaient âgées de 2 à 23 mois (dernier âge de reforme). A la lumière de ces résultats, nous pouvons affirmer que notre étude a montré d'une part, que l'excrétion de *Salmonella* par les volailles s'était faite à tous les âges selon les différentes bandes échantillonnées. Cette excrétion permanente de germes par les volailles serait dû à des facteurs de stress tels que les températures élevées, les déficits hygrométriques, le début et la fin de la période de ponte, etc. (Bouzidi *et al.*, 2012 ; Golden *et al.*, 2008 ; Humphrey, 2006).

D'autre part, notre résultat a montré que la prévalence de salmonelles était assez constante dans les échantillons issus des litières que les autres pools d'échantillons (fientes, mangeoires et abreuvoirs). La résistance singulière de *Salmonella* face au phénomène de dessiccation (Davies et Wray, 1996) pourrait expliquer cette forte probabilité d'isoler les salmonelles des échantillons issus des litières, par rapport aux pools issus de fientes, d'eaux et d'aliments où la flore compétitrice est plus importante. Les différentes sources d'où ont été isolés les différents sérotypes de *Salmonella* sont listées dans les tableaux 25 et 27. Les fermes 3, 9 et 16 étaient les plus fortement contaminées (Tableau 27).

Le taux de prévalence (43,75 %) assez élevé rapporté au cours de notre étude met en lumière une très forte contamination des fermes de poulets de chair et de pondeuses en exploitation dans la région de N'Djamena. Il est important de signaler que les 16 fermes impliquées dans notre étude étaient toutes révélées positives à la présence de *Salmonella*. Ce résultat pourrait être justifié par le choix de méthodes d'échantillons et de diagnostics bactériologiques utilisés lors de notre étude, qui étaient très sensible pendant nos campagnes d'investigations pour l'isolement des sérotypes de *Salmonella*. Il peut aussi s'expliquer par la combinaison de mauvaises pratiques de propreté et de désinfection de l'ensemble des équipements et des surfaces comme le plancher, les murs et l'emploi du personnel non qualifié.

D'après les études conduites par Huneau-Salaun *et al.* (2009) et Davies et Breslin (2003), la détection du taux élevé de contamination au sein des bandes de volailles en cage, ne serait pas nécessairement liée à la sensibilité des méthodes d'échantillonnages et d'analyse, mais pourrait plutôt être associée à une défaillance de propreté et de désinfection des bâtiments de poulets ou à un contrôle sanitaire insuffisant. Il est actuellement admis que la majorité des contaminations chez les poules pondeuses semble être tributaire d'une contamination persistante au sein de la ferme. Baggesen *et al.* (1992) ont démontré dans leur étude que la contamination par le genre *Salmonella* de la bande précédente constitue une source potentielle d'infection pour la bande suivante au sein d'une même ferme de volailles. Aussi, Namata *et al.* (2008), ont rapporté au terme de leur étude que les transmissions verticale et horizontale jouent un rôle important dans la contamination par *Salmonella* des troupeaux de poules pondeuses et de poulets de chair dans les élevages.

Van Immerseel *et al.* (2005) ont souligné que l'introduction seule de poussins sans salmonelles, par la vaccination des bandes parentales contre *Salmonella,* est certes, un moyen efficace pour contrôler la transmission verticale dans un troupeau, mais ne suffira pas à prévenir la contamination des volailles par l'environnement si en outre, aucune mesure hygiénique n'est prise simultanément. Plusieurs études ont également suggéré que l'ensemble des mesures à prendre pour limiter la contamination horizontale dans les élevages comprenait un nettoyage et une désinfection efficaces des bâtiments et l'application des mesures sanitaires appropriés contre les vecteurs de germe mobiles et immobiles (Davies, 2004 ; Garber *et al.,* 2003 ; Van Immerseel *et al.,* 2005 ; Wales *et al.,* 2007 ; Murase *et al.,* 2001).

Toutes ces découvertes semblent corroborer le taux de prévalence élevé montré par notre étude. Ce résultat est d'une part en accord, avec l'état général très rudimentaire des infrastructures et équipements de l'ensemble des fermes avicoles impliquées dans notre étude qui n'étaient pas aux normes, d'autre part avec les mesures de biosécurité sanitaire déplorable concernant les contrôles contre les rongeurs, les reptiles, les oiseaux sauvages, les animaux errants et les amphibiens qui étaient très mal assurés. Tous ces constats supposent à terme que les mesures d'hygiène et de contrôle sanitaire au sein des troupeaux de volailles contribuent fortement à une réduction considérable de contamination par le genre *Salmonella* dans les fermes avicoles.

5.3.2. Prévalence de *Salmonella* dans les hôpitaux

Les souches de salmonelles d'origine humaine ont été isolées à partir d'un seul produit pathologique dans les situations cliniques suivantes : gastroentérites, diarrhées et dysenteries. Au cours de cette étude 8,8 % des 420 échantillons de selles recueillies auprès des 5 hôpitaux de la capitale et examinées par coprocultures, sont révélés positifs au genre *Salmonella* (Tableau 26). Ce taux de prévalence, assez important dépeint un tableau clinique alarmant, lorsque l'on sait que tous les sérotypes de salmonelles peuvent, en théorie, causer une infection systémique chez les humains au statut immunitaire diminué, surtout chez les jeunes enfants et les sujets âgés ou immuno-déprimés (Bäumler *et al.*, 2000 ; Graham *et al.*, 2000a). D'un point de vue épidémiologique, cette étude de prévalence dans les hôpitaux offre une approche bien singulière et une première description assez représentative du schéma de dissémination de *Salmonella* spp, dans la région de N'Djamena.

Dans les pays industrialisés, c'est en premier lieu l'importance économique et sociétale de ces pathologies qui est considérable. En 2001, sur 1 836 cas confirmés de salmonelloses en France, 63,2 % ont été acquis dans des collectivités. Le milieu scolaire était le plus touché, étant donné qu'il représentait 24 % des cas de salmonelloses. Les cas contractés dans un cadre familial étaient également important avec un pourcentage de 43,8 % (Haeghebaert *et al.*, 2002). Sur la période 2002 à 2010, le CNR-Salm a sérotypé 60 335 souches de *Salmonella*. En 2010, 92 Tiac confirmées à *Salmonella* ont été déclarées. Ces Tiac à *Salmonella* ont été à l'origine de 1066 malades et 145 hospitalisations. Parmi les cas dont l'âge était enregistré, 32 % concernaient les enfants âgés de 1 à 4 ans, 15 % des enfants de 5 à 14 ans, 39 % des personnes âgées de 15 à 64 ans et 14 % des personnes âgées de 65 ans et plus (Delmas *et al.*, 2010).

D'après les travaux de Frenzen *et al.*, (1999) et de Sarwari *et al.*, (2001), aux USA les coûts annuels de salmonelloses sont estimés entre 400 millions et 3,5 milliards de dollars US, pour l'ensemble de l'économie américaine. Ces valeurs ont tenu compte des coûts médicaux et des pertes de productivité. En Europe, en considérant que 95 % des salmonelloses ont une origine alimentaire, les coûts annuels varient entre 560 millions et 2,8 milliards d'euros. Un cas unique de salmonellose est estimé, quant à lui, à une valeur comprise entre 24 euros et 3,8 millions euros (Parlement européen et Conseil de l'Union européenne, 2001).

En Afrique, la salmonellose est identifiée comme une maladie tropicale négligée, causant des diarrhées sanguinolentes ou non et des septicémies graves, en particulier chez des nourrissons, des personnes âgées et/ou immunodéprimées tels que des patients vivant avec le VIH Sida. Elle est associée à une mortalité très importante dans les pays sous développés et en voie de développement (Dione *et al.*, 2011 ; Feasey *et al.*, 2012). Ces dernières observations contrastent avec celles des pays développés où les mortalités liées aux infections à *Salmonella* non typhique sont très faibles, du fait probablement des systèmes et règles de surveillance bien efficaces. Dans la plupart des pays africains, *Salmonella* non typhique est citée parmi les 3 bactéries pathogènes les plus communes, responsables des infections du système sanguin chez les adultes et les enfants (Shaw *et al.*, 2008 ; Siguaque *et al.*, 2009). Les cas de décès liés aux maladies dues à *Salmonella* non-typhiques invasives, parmi les patients hospitalisés, oscillaient entre 4,4 % et 27 % chez les enfants et de 22 % à 47 % chez les adultes (Brent *et al.*, 2006 ; Enwere *et al.*, 2006 ; Gordon *et al.*, 2002 ; 2008).

D'un pays africain à un autre, ces données de prévalence peuvent varier en fonction des réalités socio-économiques, démographiques et géographiques. Il est à noter que l'étude réalisée par Hill *et al.*, (2007), révélait que les NTS représentaient 8,6 % des cas de d'infection, surtout liés aux jeunes enfants, dans un hôpital de la capitale gambienne. Au Sénégal, d'après

les travaux menés sur les données de patients infectés par le VIH et recensés par le CHU de Dakar, de 1996 à 2005, Seydi *et al.* (2008) rapportaient 62 cas (8,8 %) d'infections à *Salmonella* non-typhique. Par exemple au Malawi, 64 % de nouveaux nés décédés suite à de méningites, étaient infectés par *Salmonella* non typhique (Graham *et al.*, 2000b ; Milledge *et al.*, 2005). Kariuki *et al.*, (2006), ont rapporté à travers leurs travaux, un total de 336 *Salmonella* non typhique isolés par hémocultures de 1994-2005, chez des enfants âgés de 0 à 13 ans admis en pédiatrie, dans un hôpital rural au Kenya.

En effet, loin d'être exhaustives, ces données montrent l'importance récurrente des infections humaines à *Salmonella* dans les différentes régions d'Afrique. Il faut signaler que le taux de prévalence (8,8 %) révélé par notre étude prend en compte ni la classe d'âge, ni le sexe ou le statut immunologique des personnes enquêtées. Il met plutôt en lumière une situation globale d'infection à *Salmonella* non-typhi chez les patients de tous âges et des deux sexes reçus en consultation dans les hôpitaux de N'Djamena, impliqués dans cette étude.

5.3.3. Distributions des salmonelles dans les fermes avicoles

Les 84 sérotypes de *Salmonella* isolés au cours de cette étude étaient uniques, car très hétérogènes et largement disséminés dans les 16 fermes avicoles investiguées (Tableaux 28 et 30). Contrairement à plusieurs études menées à travers le monde, dont les sérotypes majoritairement isolés étaient *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium (Aboun *et al.*, 2003 ; EFSA, 2011 ; Ottomo *et al.*, 2007), notre présente étude n'en a révélé que 2 dont un seul Enteritidis et un seul Typhimurium au sein de deux bandes différentes de pondeuses.

A notre connaissance, *S.* Colindale, sérotype majoritaire dans notre étude, était décrit plutôt chez les humains et pour la première fois en 1955 à partir de selles d'une femme souffrant de diarrhée aiguë qui était arrivée à Londres (Angleterre) après plusieurs jours passés au Nigéria (Audrey et Holt, 1955). Ce même sérotype était aussi décrit au Tchad par Perpezat *et al.* (1964), puis par Vigier et Chamoiseau (1967) des échantillons de selles humaines à l'hôpital principal de N'Djamena et des échantillons d'eaux destinés à la consommation humaine dans la même ville. En Gambie, il a été rapporté comme le sérotype prédominant (21,42%) de NTS dans les cas d'infection entérique chez les enfants âgés de moins de 5 ans (Dione *et al.*, 2011). Plus récemment, il a été identifié en France chez les femmes immuno-déficientes (Lebeaux *et al.*, 2012).

Nous pouvons affirmer qu'à l'échelle des infections animales, en particulier chez les poulets, c'est la première description du sérotype Colindale. Il était isolé de deux fermes de poulets de chair (9 %) et de 3 différentes fermes de pondeuses (10 %). Dans ces fermes, les volailles ne présentaient aucun signe clinique de salmonellose. Ce portage asymptomatique de salmonelles, par les volailles, présente de sérieuses conséquences, pour la sécurité alimentaire et la santé publique à cause du risque de contamination des aliments et de consommation des produits contaminés.

Salmonella Minnesota était le deuxième sérotype le plus fréquent (18 %). Il était isolé de trois différentes fermes de pondeuses de N'Djamena. Une étude menée sur tout le territoire belge en 2010, rapportait un taux de prévalence de *S.* Minnesota de 6,1 % chez les volailles, en particulier chez les poulets de chair (Rapport CODA-CERVA, 2010). *Salmonella* Kottbus, Muenchen et Idikan étaient chacun retrouvés dans deux fermes différentes de poules pondeuses. 5 isolats de *S.* Havana étaient isolés dans 3 différentes fermes et 3 isolats de Mississipi isolés dans une ferme de poules pondeuses. Dans les années 60 à 70, une souche de *S.* Idikan a été décrite à N'Djamena par Vigier et Chamoiseau (1967), sur des échantillons d'œufs de poules pondus sans coquilles et souillés par les fientes.

Cinq isolats de *S.* Riggil et 4 isolats de *S.* Amager sont respectivement identifiés des fermes n° 15 et n° 3. Ces deux derniers sérotypes étaient déjà décrits par Perpezat *et al.*, (1964) chez les reptiles (lézards et iguanes), connus comme réservoirs importants de salmonelles (Butaye *et al.*, 2006 ; Pasmans *et al.*, 2005). Les autres sérotypes de *Salmonella* étaient diversement disséminés dans les différentes fermes avicoles étudiées. Notre étude a également révélé 3 isolats de *S.* Muenchen dans les fientes et chiffonnettes de surface dans 2 fermes différentes de pondeuses. Peu isolé en Afrique, ce sérotype a été rapporté par Boase *et al.* (1999) et Buxton *et al.*, (1999) comme impliqués, dans des cas de toxi-infections alimentaires associées à la consommation de jus de fruit non pasteurisé aux USA et au Canada. D'autres intoxications causées par *S.* Muenchen avaient été rapportés par Proctor *et al.* (2001), associées à la consommation de germes de luzerne crus.

5.3.4. Distribution des salmonelles dans les hôpitaux

Au cours de notre présente étude, l'analyse des échantillons de selles issus des 5 hôpitaux de la ville de N'Djamena, a permis de révéler de nombreux sérotypes de salmonelles, particulièrement hétérogènes (Tableaux 29 et 30). La diversité des sérotypes observée chez les humains dans cette étude, témoigne de la singularité de ce résultat, contrairement aux pays industrialisés et à de nombreux pays africains, où la carte de distribution des salmonelles semblait assez homogène (Galanis *et al.*, 2006 ; EFSA, 2011). Tous les sérotypes ont été isolés chez des patients consultés dans les différents hôpitaux investigués pour des épisodes de troubles digestifs accompagnés de diarrhées. Les différents sérotypes identifiés se caractérisent par leur répartition spécifique en fonction de la localisation géographique de chaque hôpital. Seuls les sérotypes Kottbus et Stanleyville ont été retrouvés dans deux hôpitaux situés dans des zones urbaines de N'Djamena bien éloignés l'une de l'autre. La plupart de ces sérotypes étaient déjà décrits par Guard *et al.* (1973) et Le Minor *et al.* (1969) dans les échantillons de selles collectés à l'hôpital principal de la ville de Fort-Lamy, rebaptisée N'Djamena.

Nous avons observé, à travers ce résultat, que la dissémination des souches de *Salmonella* chez les humains reste assez faible dans les différentes communes urbaines de N'Djamena, bien que les sources de contamination et les facteurs de risques restent encore inconnus. Cependant, il est admis de manière générale qu'en Afrique, *Salmonella* non typhique, demeure à ce jour, une des causes majeures des infections infantiles et est responsable des taux de morbidité et de mortalité élevés (Feasey *et al.*, 2012 ; Graham *et al.*, 2000a). Ce taux est particulièrement important chez les jeunes enfants et chez les personnes âgées ou immuno-déprimées, lorsque le traitement aux antibiotiques appropriés n'est pas disponible (Kariuki *et al.*, 2006 ; Morpeth *et al.*, 2009;).

D'après les travaux de Vandenberg *et al.* (2010), sur les 59 % de *Salmonella* non typhique invasive isolées par hémocultures chez des enfants dans un hôpital de district rural en République Démocratique du Congo où le paludisme est endémique, les sérotypes les plus représentés étaient *S.* Typhimurium (61%), et *S.* Enteritidis (22%). Le taux de mortalité lié à ces sérotypes était de 23 % et la plupart des isolats étaient multirésistants aux antibiotiques testés (92 %). Keddy *et al.* (2009) avaient rapporté dans leurs travaux, 652 isolats de *Salmonella* Typhimurium invasive chez des patients dans un hôpital de province en Afrique du Sud entre 2006 et 2007. Ces patients étaient âgés de 15 à 64 ans et 93 % de ceux testés, étaient infectés par le VIH. L'ensemble de ces données épidémiologiques mettent en lumière l'impact réel des infections à *Salmonella* non typhique invasive en Afrique et les facteurs de risques associés, d'où la nécessité d'améliorer les connaissances actuelles sur les facteurs de risques environnementaux qui sous-tendent les processus de propagation et de contamination. Les résultats montrés par notre étude dans les hôpitaux de N'Djamena viennent de surcroît plutôt s'ajouter à ce sombre tableau épidémiologique des infections à salmonelles dans le contexte africain, et en particulier au Tchad où aucun système d'alerte ou de veille sanitaire efficace n'existe.

5.3.6. Analyse statistique des facteurs de risques de contamination

L'évaluation de la typologie des fermes a été rendue possible grâce aux traitements des informations contenues dans les questionnaires collectés pendant les deux campagnes d'études. Etant donné que les 16 fermes avicoles impliquées dans notre étude étaient toutes révélées positives aux salmonelles, nous avons scindé l'analyse de nos données en deux cas. Nous avons utilisé le Test de Fisher (Logiciel R) pour effectuer toutes les analyses statistiques avec un intervalle de confiance à 95 %. Le cas n°1 (TC < 30 %) traite les données des élevages que nous avons appelé faiblement contaminés et le cas n°2 (> 30 %) traite les données des élevages dits assez fortement contaminés. La comparaison statistique en termes de facteurs de risques de contamination de ces deux cas nous donne le tableau qui suit :

Tableau 31 : Analyse statistique de quelques facteurs de risque liés aux pourcentages de contamination des élevages par les salmonelles.

Facteurs de risques	Cas 1	Cas 2	p α	OR	Intervalle de confiance à 95%
Origine des poussins					
• Afrique	1	4	0,307	0,2295	] 0,0036 - 3,4038[
• Hors d'Afrique	6	5			
Structure du plancher					
• Béton	3	7	0,302	0,2385	] 0,0137 - 2,7635[
• Terre battue	4	2			
Main d'œuvre					
• 1 à 2 ouvriers	6	5	0,307	4,3579	] 0,2938 - 274,4487[
• 3 et +	1	4			
Niveau d'instruction des ouvriers					
• CEP	5	4	0,357	2,9027	] 0,2682 - 46,9331[
• BEPC/T et +	2	5			
Dératisation					
• Oui	5	2	0,126	7,4155	] 0,6252 - 145,3864[
• Non	2	7			
Clôture de la ferme					
• Oui	3	7	0,302	0,2385	] 0,0137 - 2,7635[
• Non	4	2			

CEP : certificat d'études primaires ; BEPC/ T : brevet d'études du premier cycle/ Tchad

***Cas 1** : Correspond aux élevages avec un pourcentage de contamination < 30 %*
***Cas 2** : Correspond aux élevages avec un pourcentage de contamination > 30 %*

Les différences de contamination observées sont statistiquement non significatives (p > 0,05). Les caractéristiques des élevages qui sont considérés ici comme des facteurs de risque potentiels de contamination n'ont pas montré d'influences significatives sur les pourcentages de contamination observées au niveau des 16 élevages étudiés, probablement à cause du faible nombre des fermes impliquées dans notre étude.

6. Détermination de l'antibiorésistance des salmonelles isolées

6.1. Matériel et méthode

6.1.1. Matériel

Un total de 139 souches de salmonelles isolées au cours de cette étude a été testé avec 16 antibiotiques différents pour la mesure de résistances. Les antibiotiques utilisés sont : AMP (ampicilline), AMC (amoxicilline + acide clavulanique), CHL (chloramphenicol), SXT (triméthoprime + sulfaméthoxazole), CEF (céfalotine), CTX (cefotaxime), CAZ (ceftazidime), SSS (sulfamides), STR (streptomycine), TET (tetracycline), CS (colistine), K (kanamycine), GM (gentamycine), NA (acide nalidixique), OFX (ofloxacine), ENR (enrofloxacine).

6.1.2. Méthode

La mesure de résistance des souches bactériennes aux antibiotiques ou antibiogramme, a été effectuée à l'unité CEB (Caractérisation et Epidémiologie Bactérienne) du Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur l'Hygiène et la Qualité des Aliments (LERHQA) de l'Anses, Maisons-Alfort. Elle a été réalisée selon la méthode de diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton à partir de 16 disques d'antibiotiques (BIORAD), selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2009).

Les antibiotiques testés sont: AMP: (10 µg), AMC: (20/10 µg), CHL: (30 µg), SXT: (1,25/23,75 µg), CEF: (30 µg), CTX: (30 µg), CAZ: (30 µg), SSS: (200 µg), STR: (10 UI), TET: (30 UI), CS: (50 µg), K: (30 UI), GM: (10 UI), NA: (30 µg), OFX: (5 µg), ENR: (5 µg).

A partir d'une culture de souche bactérienne pure de 18 à 24 h solide à 37 °C sur milieu solide, des suspensions à 0.5 MC Farland sont préparées en sérum physiologique et écouvillonnées sur des géloses Mueller-Hinton. Seize disques d'antibiotiques sont apposés sur chaque gélose Mueller-Hinton. La lecture s'est effectuée 18 à 20 h après incubation à 37°C.

Les mesures des diamètres des zones d'inhibition ont été réalisées par un automate de lecture, OSIRIS system (BIORAD), puis les résultats sont interprétés selon les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2011). *Escherichia coli* ATCC 25922 a été utilisée comme souche contrôle qualité.

6.2. Résultats

6.2.1. Antibiorésistance des isolats de salmonelles

Parmi les 139 souches de *Salmonella* isolées de 16 fermes avicoles et de 5 hôpitaux, la majorité était sensible à tous les 16 différents antibiotiques testés (Standards CLSI), excepté quelques sérotypes qui étaient diversement résistants. Il s'agissait de certaines souches issues des fermes avicoles dont *Salmonella* Colindale qui présentaient une sensibilité diminuée aux quinolones et fluoroquinolones (NA, OFX, ENR), *Salmonella* Limete résistante à 3 antibiotiques (SXT, SSS, TET), *Salmonella* Minnesota résistant à 5 classes différentes d'antimicrobiens (AMP, CHL, SXT, SSS, STR, TET) et de 2 isolats de *S.* Enteritidis d'origine humaine, résistant aussi aux fluoroquinolones (NA, OFX, CIP) (Tableau 32).

Tableau 32 : Profils d'antibiorésistance des souches de salmonelles isolées des fermes avicoles et hôpitaux de N'Djamena.

Sérovars	Nombre d'isolats		Origines	Résistance aux antimicrobiens
	Testés	Résistants		
Salmonella Colindale	16	12	Aviaire	NAL[1], OFX[1], ENR[1]
Salmonella Limete	1	1	Aviaire	SXT, SSS, TET
Salmonella Minnesota	15	15	Aviaire	AMP, CHL, SXT, SSS, STR, TET
Salmonella Enteritidis	2	2	Humaine	NA, OFX, CIP

1= sensibilité diminuée. NB : tous les autres isolats de salmonelles sont multi-sensibles
NAL: acide nalidixique, OFX: ofloxacine, ENR: enrofloxacine, CIP: ciprofloxacine, SXT: trimethoprime-sulfamethoxazole, SSS: Sulfonamide, TET: tétracycline, AMP: ampicilline, CHL: chloramphénicole, STR: streptomycine.

6.2.2. Séquençage du gène codant la MR observée chez *Salmonella* Minnesota

Le séquençage à été réalisé par la société Eurofins MWG Operon (Eurofins MWG GmbH, Anzinger Str. 7a/ D-85560 Ebersberg, Germany). Quatre paires d'amorces différentes ont été utilisées pour le séquençage complet du gène codant la multi-résistance observée chez *S.* Minnesota. Il s'agissait des amorces : GGCATCCAAGCAGCAAGC (segment conservé, 5'-CS-Int1), AAGCAGACTTGACCTGAT (3'-CS-Int1) et GACATCATTCCGTGGCGTTA (T-531-Fw), TGGCACAGCGGATCGCAAAC (T-531-Rv). Les deux premières amorces sont celles qui s'hybrident dans les segments conservés des intégrons dans le sens 5' – 3' et les deux suivantes sont les amorces qui ont été nécessaires pour terminer le séquençage dans les deux sens.

L'analyse des différentes séquences a permis de révéler deux gènes cassettes codant la résistance aux aminoglycosides (streptomycine) et au trimethoprime (**figure n°10**) localisés au niveau d'une des parties variables de l'intégron de classe 1.

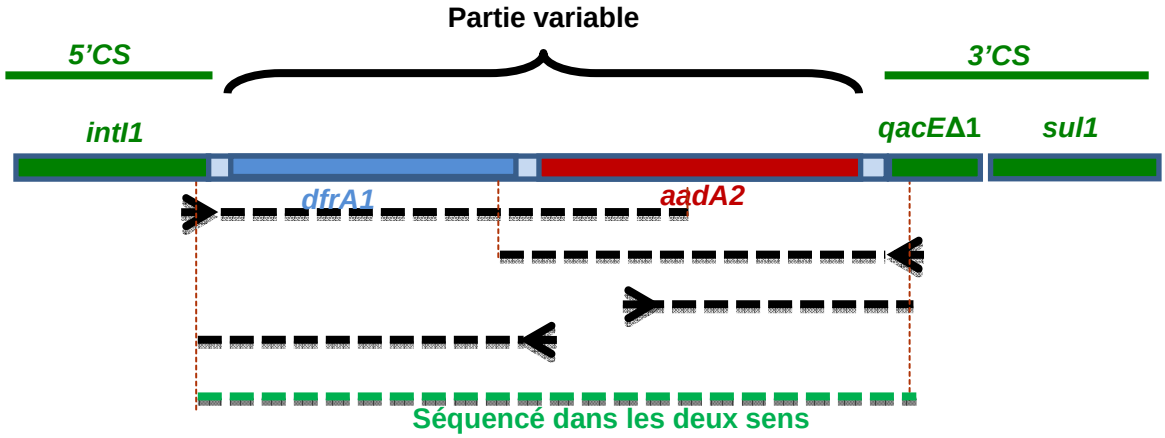


Figure 10 : Diagramme schématique de la partie variable de l'intégron de classe 1 montrant les deux gènes cassettes (*dfr*A1 et *aad*A2) et les 2 segments conservés (5'-CS et 3'-CS)

6.3. Discussion

Notre étude a montré que la majorité des souches de *Salmonella* isolées était sensible à toute la gamme d'antibiotiques testée. Dans le passé, *S.* Colindale ne semblait porter de résistance acquise (Dione *et al.,* 2011). Mais au cours de cette dernière décennie, un isolat a été décrit en 2008, portant le gène *qnrB1* codant la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones, associé à une résistance à l'ampicilline et au céfotaxime (Murray *et al.,* 2008). Cette proportion non négligeable d'isolats de *Salmonella* Colindale d'origine aviaire, présentant une résistance aux fluoroquinolones, en particulier à l'acide nalidixique, ne faisait que compléter l'augmentation croissante des résistances bactériennes à cette molécule, observée au cours de ces dernières années (Aarestrup *et al.* 2003 ; Giraud *et al.,* 2006).

Les isolats de *Salmonella* Minnesota étaient quant à eux, multi-résistants à l'ampicilline, au chloramphénicol, au triméthoprime, aux sulfamides, à la streptomycine et à la tétracycline. A notre connaissance, aucune étude antérieure n'avait encore rapporté cette multi-résistance de *S.* Minnesota. Ce phénotype de multi-résistance observé pourraitt être attribué à des gènes localisés dans une structure génomique particulière appelée *Salmonella* Génomique Island 1 (SGI1). Cette structure est souvent associée à des résistances multiples aux antimicrobiens rencontrées chez certains lysotypes de *S.* Typhimurium et chez quelques bactéries à Gram négatif (Mulvey *et al.,* 2006). Le séquençage d'une partie de cet intégron a permis de révéler deux gènes cassettes localisés au niveau de la partie variable de l'intégron de classe 1. La première cassette est identifiée par le gène *dfr*A1 (dihydrofolate réductase de type A1) codant la résistance au trimethoprime et la deuxième cassette par le gène *aad*A2 (aminoglycoside-*o*-adenyltransférase de type A2) codant la résistance aux aminoglycosides. Ces deux gènes *dfr*A1 et *aad*A2 codant respectivement pour la résistance au trimethoprime et à la streptomycine, sont assez fréquents chez de nombreuses salmonelles d'origines humaine, animale et environnementale (An Vo *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2004 ; Michael *et al.*, 2006 : Randall *et al.*, 2004). C'est aussi le cas de *Salmonella* Limete qui était résistant aux sulfamides, au triméthoprime et à la tétracycline. Les 2 isolats de *Salmonella* Enteritidis d'origine humaine étaient quant à eux, résistants à l'acide nalidixique, à l'ofloxacine et à la ciprofloxacine. La résistance à bas niveau de *Salmonella* Enteritidis aux fluoroquinolones n'est pas nouvelle. Plusieurs études menées dans de nombreux pays, ont montré que *Salmonella* Enteritidis, isolée chez les animaux comme chez les humains, présentait des résistances de plus en plus accrues aux antimicrobiens de la famille des fluoroquinolones (Aarestrup *et al.,* 2003 ; Cheung *et al.*, 2005 ; Hopkins *et al.*, 2005). En effet, il est certain que dans de nombreux cas, la salmonellose est une infection à guérison spontanée. Cependant, dans des situations assez graves le recours aux antibiotiques est recommandé pour la guérison des malades. Le traitement habituel repose sur les bêta-lactamines (ampicilline) ou les fluoroquinolones (ciprofloxacine) ou encore sur l'association sulfamides + trimethoprime communément appelée cotrimoxazole.

Au cours de notre présente étude, nous n'avons pas détecté beaucoup de résistances parmi nos isolats. Cependant, la question de résistance chez les salmonelles demeure toujours un enjeu de santé publique, car elle affecte assez souvent les traitements de base contre la salmonellose invasive. Il n'existe pas de système de sécurité sociale au Tchad. L'assurance maladie n'existe pas et les dépenses de santé sont à la charge des malades. Les prélèvements bactériologiques et antibiogrammes ne sont pas pratiqués. Les fluoroquinolones et les céphalosporines de troisième génération sont devenues aujourd'hui des antibiotiques de premier choix pour le traitement des salmonelloses. Il est donc indispensable que leur prescription et leur utilisation soient réglementées pour prévenir une sélection des souches résistantes à ces antibiotiques comme c'est le cas dans de nombreux pays (Hopkins *et al.*, 2005 ; Wiuff *et al.*, 2000).

7. Caractérisation moléculaire des salmonelles isolées

7.1. Généralités

Plusieurs méthodes génotypiques sont utilisées avec succès pour évaluer et déterminer la contribution des bactéries pathogènes, d'origines diverses, aux infections humaines. Les méthodes moléculaires de typage de souches bactériennes constituent actuellement un moyen épidémiologique important pour la détermination de potentielles sources d'infections. En effet, la distribution des souches typiques de *Salmonella* circulant parmi les différentes espèces animales offre une information précieuse pour la compréhension épidémiologique de la résistance bactérienne et de la dissémination des clones particuliers dans l'environnement. Dans cette étude, nous avons utilisé les méthodes appelées IS-PCR (Insertion Sequence-Polymerase Chain Reaction), ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction) et PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) ou pulsotypage, dans le but d'une part d'indiquer l'existence d'une diversité de clones au sein du genre *Salmonella* et d'autre part, de proposer une analyse plus fine de ces clones pouvant appartenir à des groupes phylogénétiquement proches ou éloignés et d'identifier les possibles sources et réservoirs d'infections dues à salmonelles dans la ville de N'Djamena.

7.2. Matériel et méthodes

7.2.1. Matériel

Nous avons mené l'analyse sur l'ensemble des 41 différents sérotypes isolés au cours des deux campagnes de collectes dans les 16 fermes avicoles et les 5 hôpitaux de N'Djamena.

7.2.2. Méthodes

7.2.2.1. La PCR

7.2.2.1.1. Extraction de l'ADN par la methode d'ébullition

Après une culture de nuit de la souche bactérienne dans 5 mL de BHI à 37°C, nous avons prélèvé 1,5 mL de cet inoculum dans un tube Eppendorff de 2 mL que nous avons centrifugé à 12000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé et le précipité re-suspendu dans 100 µL d'eau ultra pure stérile, le tout re-centrifugé à 12000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant a été encore éliminé une seconde fois, puis le précipité dissout dans 100 µL d'eau ultra pure stérile. Cette dernière suspension a été portée à ébullition pendant 10 min, puis centrifugée à 12000 tr/min pendant 10 min (pour séparer l'ADN des autres constituants de la bactérie). Nous avons prélevé délicatement 60 µL du surnageant dans un autre tube Eppendorf, que nous avons aliquoté en 2 fois 30 µL, dans des tubes PCR de 0,5 µL, et conservé à -20° C jusqu'à utilisation.

7.2.2.1.2. Principe de la PCR

La PCR (Polymerisation Chain Reaction) repose sur une amplification d'extraits d'ADN par la Taq polymérase, en présence d'amorces spécifiques et de nucléotides (dNTP). L'amplification permet d'obtenir en un nombre très élevé de copies d'une séquence particulière d'ADN. La polymérisation se réalise dans un mélange réactionnel contenant :

- De faibles quantités d'extraits d'ADN possédant la séquence à amplifier ;

- Les deux amorces nucléotidiques complémentaires qui encadrent la cible à amplifier ;
- La Taq polymérase et un mélange des quatre dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP).

Elle débute par une étape de dénaturation thermique de l'ADN à amplifier, suivie d'une hybridation des séquences oligonucléotidiques complémentaires ou amorces aux extrémités 3' des deux brins du fragment d'ADN matrice. L'allongement des amorces dans le sens 5'→ 3' est ensuite assuré par la Taq polymérase. Les molécules filles d'ADN ainsi formées sont dénaturées de nouveau, et un autre cycle peut recommencer. La réaction se répète ainsi plusieurs fois et cela en fonction du programme PCR préalablement défini et enregistré ou non dans le thermocycleur.

7.2.2.1.3. ERIC-PCR et IS - PCR

7.2.2.1.3.1. ERIC – PCR

C'est une PCR dont les profils permettent d'indiquer l'existence d'une diversité au sein du genre ou clone bactérien. Dans cette PCR, les régions d'ADN génomique à amplifier correspondent à des séquences hautement répétées et conservées dans le génome bactérien. Elle permet d'une part de rendre compte de la dispersion des séquences d'ADN caractéristiques de chaque souche bactérienne et, d'autre part de proposer une analyse plus fine du génome bactérien appartenant à des groupes phylogénétiquement proches ou éloignés.

Les séquences d'unités ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), également connues comme des unités intergéniques répétées sont présentes en plusieurs copies au sein du génome de *Salmonella*, de *E. coli* et d'autres entérobactéries. Ces éléments, longs de 126 pb sont très bien conservés au niveau nucléotidique. La position de ces éléments dans le génome des entérobactéries varient selon les espèces et peut être utilisée comme marqueur génétique pour caractériser les isolats des espèces bactériennes (Hulton *et al.*, 1991). Les séquences des deux amorces oligonucléotidiques utilisées sont:

ERIC 1R: 5' ATG-TAA-GCT-CCT-GGG-GAT-TCA-C 3'
ERIC 2 : 5' AAG-TAA-GTG-ACT-GGG-GTG-AGC-G 3'

Le mélange réactionnel ou mix de l'Eric pcr, comprenant les volumes nécessaires à la réaction a été réalisé avec une paire d'amorces : ERIC 1R et ERIC 2. Chaque volume de 25 µL pour une réaction pcr, était composé de 2,5 µL de Tampon 10X ($MgCl_2$), de 0,5 µL de dNTP (10 mM), de 0,2 µL de Taq DNA polymerase (5 U μL^{-1}), de 0,25 µL d'amorce ERIC 1R (50 µM), de 0,25 µL d'amorce ERIC 2 (50 µM), de 2,5 µLd'extraits d'ADN et de 18,8 µL d'eau ultra pure stérile pour ajuster le volume final.

L'amplification a été ensuite réalisée dans un thermocycleur (Courtaboeuf, France), de type Perkin Elmer 9700 d'après le programme suivant : une pré-dénaturation à 94° C pendant 3 min, une hybridation à 48° C pendant 1 min et une élongation à 72° C pendant 4 min, suivi de 35 cycles de dénaturation à 94° C pendant 1 min, d'hybridation à 51° C pendant 1 min et d'élongation à 72° C pendant 4 min puis une dernière phase de dénaturation à 94° C pendant 1 min, d'hybridation à 51° C pendant 1 min et une élongation finale à 72° C pendant 10 min.

Après l'amplification, la migration des produits PCR a été réalisée sur le gel d'agarose à 2% (Sigma-Aldrich) dans une cuve d'électrophorèse contenant du TBE 1X à 120 V pendant 2 h 30 min. Le gel a été ensuite coloré au BET (bromure d'éthidium) pendant 45 min et visualisé sous UV (260 nm) à l'aide d'un appareil polaroid pour la capture d'image.

7.2.2.1.3.2. IS – PCR

Les différents isolats ont été également caractérisés par l'IS (Insertion Sequence) PCR. Il s'agit pour ce type de PCR, d'amplifier les segments qui se trouve entre les gènes, en utilisant pour chacun, un couple d'amorce défini ciblant des séquences connues et répétées du génome des bactéries. On obtient ainsi des profils spécifiques de chaque souche, selon l'emplacement et le nombre de copies de ces séquences au sein du génome bactérien (Millemann *et al.*, 2000).

Les séquences des deux amorces oligonucléotidiques utilisées sont:

IS 1R: 5' AGGCGCATCTGAAAAACCTCGG 3'
IS 2: 5' CGGAACCCCCAGCCTAGCTGGG 3'

Le mix de l'IS-pcr a été réalisé avec une paire d'amorces : IS 1R et IS 2. Chaque volume de 25 µL pour une réaction IS-pcr, était composé de 2,5 µL d'extraits d'ADN, de 2,5 µL de Tampon 10X ($MgCl_2$), de 0,5 µL de dNTP (10 mM), de 4 µL d'amorce IS 1R (5 µM), de 4 µL d'amorce IS 2 (5 µM), de 0,2 µL de Taq DNApolymerase (5 U μL^{-1}) et de 11,3 µL d'eau ultra pure stérile pour ajuster le volume final.

L'amplification a été ensuite réalisée dans un thermocycleur (Courtaboeuf, France) de type Perkin Elmer 9700 d'après le programme suivant : une pre-dénaturation à 94° C pendant 3 min, une hybridation à 52° C pendant 1 min et une élongation à 72° C pendant 4 min, suivi de 45 cycles de dénaturation à 94° C pendant 1 min, d'hybridation à 53° C pendant 1 min et d'élongation à 72° C pendant 4 min puis une dernière phase de dénaturation à 94° C pendant 1 min, d'hybridation à 53° C pendant 1 min et une élongation finale à 72° C pendant 20 min.

Après l'amplification, la migration des produits IS-pcr a été réalisée sur le gel d'agarose à 2% (Sigma-Aldrich) dans une cuve d'électrophorèse contenant du TBE 1X à 120 V pendant 3 h. le gel a été ensuite coloré au BET pendant 60 min et visualisé sous UV (260 nm) à l'aide d'un appareil polaroid pour la capture d'image.

7.2.2.2. Electrophorèse en champ pulsé (pulsotypage)

7.2.2.2.1. Principe du pulsotypage

La technique utilisée est basée sur l'analyse de l'ADN total qui est un marqueur très stable. Initialement, l'utilisation d'enzymes de restriction à haute fréquence de coupure rendait l'interprétation complexe, du fait de la présence d'un nombre élevé de fragments sur le gel. Le recours à des enzymes de restriction à faible fréquence de coupure a permis de diminuer le nombre de fragments. Cependant, ces fragments étaient de plus haut poids moléculaire et dans un gel classique, de telles molécules avaient une mobilité restreinte et n'avaient donc pas la possibilité d'être séparées.

En 1984, apparaît un nouveau concept de séparation des molécules d'ADN supérieure à 50 Kb. Celui-ci a été proposé par Schwartz et Cantor (1984). Il s'agissait d'utiliser des champs électriques activés alternativement (champs pulsés). Cette technologie permet de séparer des molécules d'ADN variant de quelques Kb à environ 10 Mb. Le protocole utilisé pour cette étude est celui décrit par Peters *et al.* (2003). Ce dernier a été adapté à partir d'un protocole défini pour *Escherichia* coli par le CDC (Center for Diseases Control) d'Atlanta, Etats Unis d'Amérique. Un protocole standardisé a également été publié par Ribot *et al.* (2006). Il comporte trois grandes étapes :

7.2.2.2.2. Extraction de l'ADN

Au préalable à l'extraction de l'ADN, il est nécessaire de mettre en culture les bactéries. Un premier ensemencement est réalisé sur gélose Drigalski (Bio Merieux, Marcy l'Etoile, France), afin de vérifier la pureté des souches. Une colonie de cette gélose est ensuite repiquée sur une gélose de TSAYE (Oxoid Basingstoke, Hampshire, England). A partir de ces boîtes, une suspension bactérienne est réalisée dans un tampon CSB (Cell Suspension Buffer). Cette suspension est alors incubée quelques minutes avec de la protéinase K, afin d'améliorer l'étape de lyse en dégradant les protéines. L'un des critères important du protocole est l'obtention d'un ADN purifié. Il ne doit subir aucune dégradation c'est à dire aucune coupure physique ou enzymatique.

Pour ce faire, l'ADN est emprisonné dans des petits blocs d'agarose (plugs) afin de le protéger pour les étapes suivantes. Les plugs sont alors incubés dans une solution de lyse contenant de la protéinase K. L'adjonction d'un détergent (le SDS) au moment de l'inclusion du matériel génétique dans l'agarose permet de délipider la membrane bactérienne et de renforcer l'étape de la lyse. Les plugs sont enfin rincés plusieurs fois à l'eau puis au TE (Tris-Ethylène Diamine Tétra-acétique Acide) puis stockés à 4° C ou utilisés directement pour la digestion enzymatique.

7.2.2.2.3. Digestion enzymatique

Le choix des enzymes de restriction est important, et il se porte sur celles ayant des sites de restriction rares sur le chromosome bactérien. Elles permettent de couper le chromosome en 10 à 20 fragments de grandes tailles, qui seront alors séparés par l'électrophorèse en champ pulsé. Différents facteurs entrent en jeu pour le choix des enzymes. Le pourcentage en guanine et cytosine (GC %) du génome bactérien à analyser est important à prendre en compte. Un ADN avec un faible pourcentage sera coupé en un petit nombre de fragments, si on utilise des enzymes reconnaissant des sites riches en guanine et cytosine. L'utilisation d'enzymes de ce type permettra, sur des séquences riches en adénine et thymine, d'obtenir un nombre de fragments limité.

Pour la même raison, l'utilisation d'enzymes ayant des sites de restriction riches en adénine et thymine, telles que *Spe*I ou *Xba*I seront préconisées chez les bactéries à Gram négatif dont le chromosome est riche en guanine et cytosine. *Xba*I est d'ailleurs l'enzyme majoritairement utilisée pour le pulsotypage des salmonelles, notamment dans notre travail. Les plugs sont mis à incuber dans une solution contenant l'enzyme choisie au bain-marie, à la température optimale d'action de l'enzyme (37° C pour *Xba*I). La digestion dure au minimum 4 heures mais elle peut être réalisée sur une nuit.

7.2.2.2.4. Séparation électrophorétique

Une fois la digestion terminée, les plugs sont insérés dans un gel d'agarose. Ce dernier est ensuite déposé dans une cuve à électrophorèse en champ pulsé (CHEF-DR III, Bio-Rad, Marnes La-Coquette, France) dont le générateur est programmé pour la séparation des fragments d'ADN (Figure 11). L'électrophorèse dure environ 20 heures. Différents facteurs interviennent dans la séparation des fragments d'ADN lors de l'électrophorèse. La concentration en agarose est notamment un paramètre essentiel. Les fragments d'ADN migrent d'autant plus loin que les concentrations d'agarose sont plus faibles. La concentration est choisie en fonction de la taille des fragments à séparer. Pour des fragments de grandes tailles (jusqu'à 3 Mb), il est préférable d'utiliser une faible concentration d'agarose. Les gels sont Classiquement à 1 %, pour permettre une bonne vitesse de migration ainsi qu'une bonne résolution tout en limitant l'éventuelle fragilité du gel.

La température du tampon d'électrophorèse a également des effets importants sur la mobilité de l'ADN, en particulier lorsque la migration s'effectue à fort voltage pendant 20-24 heures. Une augmentation de la température augmente la mobilité de l'ADN, mais diminue la résolution des profils. Le maintien d'une température entre 12 et 16°C est nécessaire pendant toute la durée de l'électrophorèse, pour obtenir un bon compromis entre durée et résolution. Il faut donc adjoindre un dispositif de refroidissement. La température utilisée est, le plus couramment, de 14° C. Enfin, les cinétiques de pulsation doivent être optimisées pour chaque espèce et pour chaque enzyme, afin d'obtenir une séparation adéquate. La durée des phases de pulsation (correspondant aux inversions alternatives d'orientation du champ électrique) augmente, au cours de l'électrophorèse. Les phases de pulsations de faibles durées en début d'électrophorèse vont favoriser la séparation des fragments de petites tailles, alors que les phases de longues durées en fin de migration, vont permettre une bonne séparation des fragments de grandes tailles (Grattard, 2000).

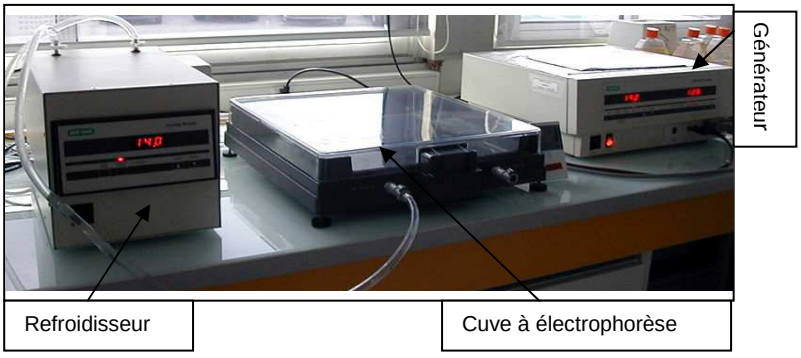


Figure 11 : Photo du système d'électrophorèse en champ pulsé, CHEF DR III

A la fin de la migration, le gel est enlevé de la cuve et mis à colorer dans une solution de BET (bromure d'éthidium), agent intercalant fluorescent sous lumière ultraviolette, pendant 30 minutes puis rincé 30 minutes à l'eau ultra pure avant la lecture. Le gel est photographié

pour disposer d'un document archivable. Les marqueurs de taille sont essentiels pour interpréter les profils. Des marqueurs commercialisés peuvent être utilisés. Il est possible, ainsi que présenté dans ce projet, de se servir d'une souche de salmonelle dont le poids moléculaire des fragments est connu. La souche sert alors à la fois de marqueur de taille et de témoin d'extraction et de restriction. La souche préconisée est une *Salmonella* Braenderup H9812. Cette étape est primordiale pour la comparaison des souches analysées dans différents gels.

L'ADN de certains sérotypes, de certains clones de salmonelles est sensible à la dégradation (Liesegang et Tschape, 2002). Le protocole d'extraction et de migration est alors adapté, le Tris présent dans différents tampons est remplacé par de l'Hepes et du thiourée, à la concentration finale de 100 µM, qui est ajouté dans le tampon de migration. L'analyse de l'ensemble des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel BioNumerics (Applied Maths, Pays-Bas). Ce logiciel permet de créer et gérer des bases de données ainsi que d'analyser de nombreuses expériences. Chaque souche correspond à une entrée dans la base de données et peut être associée à une ou plusieurs expériences.

7.3. Résultats

7.3.1. ERIC-PCR et IS-PCR

Toutes nos PCR ont été répétées au moins deux fois afin de nous assurer de la fiabilité et de la reproductibilité de nos résultats. Pour chaque groupe de sérotypes, une Enterobacterial Repetitive Intergenique Consensus – Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) et une IS-PCR (Insertion Sequence – Polymerase Chain Reaction) ont été réalisées comme marqueurs génétiques, dans le but de comparer les profils phylogénétiques et les liens de clonalité de nos souches entre elles. Dans chaque groupe de souches communes, un isolat représentatif a ensuite été choisi et caractérisé à nouveau, les uns à coté des autres sur un même gel. Quelques photos de gel d'électrophorèse sont choisies pour illustrer les résultats obtenus pour chacune des deux méthodes (ERIC-PCR et IS-PCR).

Les différentes photos montrant les profils moléculaires représentatifs des différents sérotypes de *Salmonella* étudiés (Figures 12, 13, 14, 15). Le Marqueur VIII (DNA Molecular Weight Marker VIII. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne), a été utilisé pour l'évaluation des tailles de bandes sur le gel d'électrophorèse. Les tailles des bandes de ce marqueur sont comprises entre 19 et 1114 paires de bases (pb).

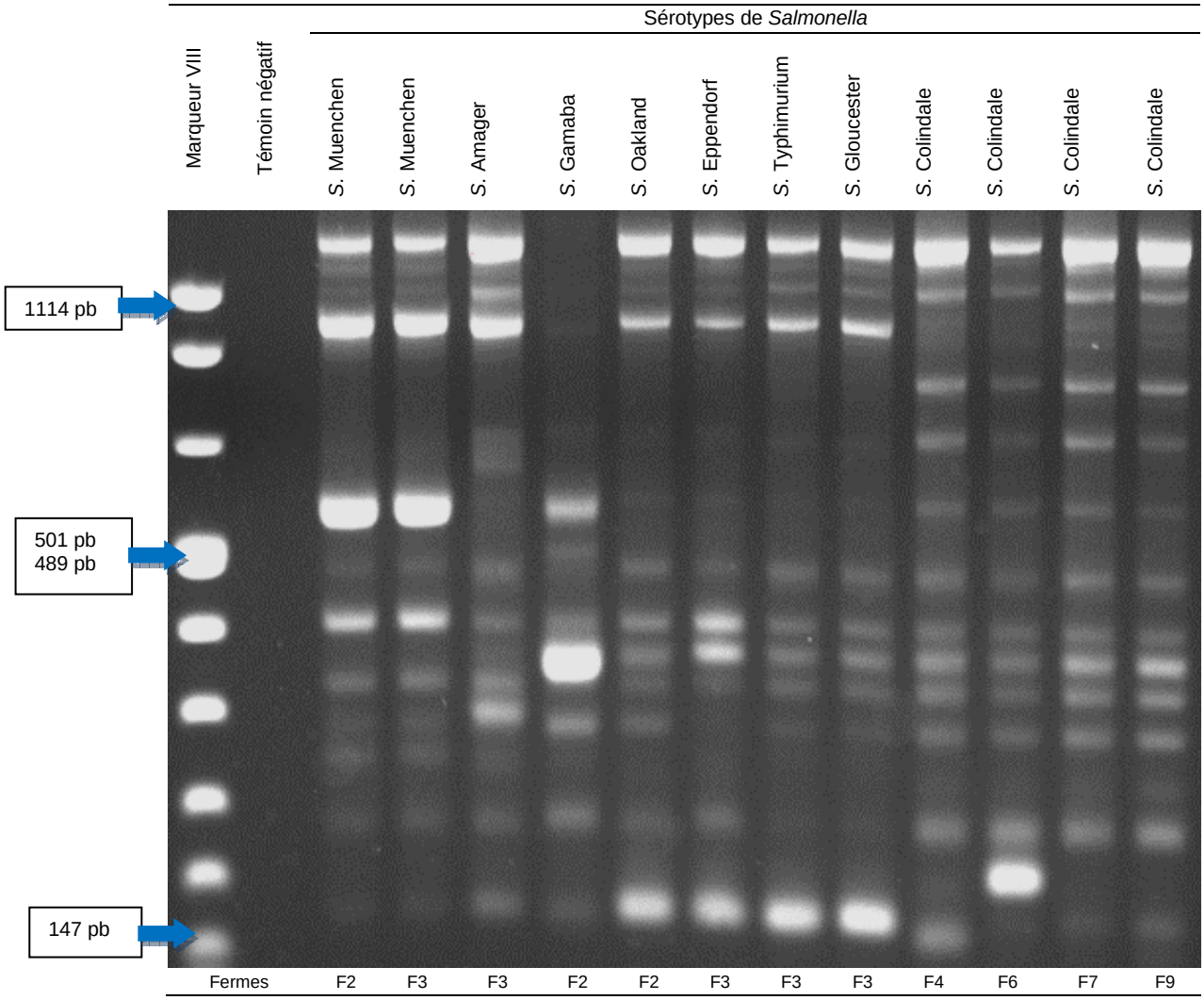
Cent trente neuf souches de salmonelles ont été ainsi caractérisées par les deux PCR (ERIC-PCR et IS-PCR), dont 84 souches d'origine aviaire et 55 souches d'origine humaine. Les multiples fragments d'ADN des différents isolats générés par ERIC-PCR et révélés sur le gel d'agarose étaient composés de 6 à 14 bandes avec des tailles variant entre 147 pb et 3 kb. Les profils ERIC semblables sont identifiés par les chiffres en caractères romains. Les fragments générés par IS-PCR montraient entre 6 et 12 bandes avec des tailles allant de 90 pb à 3,5 kb. Les profils IS identiques sont désignés par les lettres de l'alphabet Français. Les 48 profils obtenus à l'issue de chacune des deux PCR pour la totalité des souches étudiées sont récapitulés dans le tableau n° 33.

Tableau 33: Récapitulatif de différents profils des souches de *Salmonella* isolées chez les humains et chez les volailles à N'Djamena.

N° d'ordre	Référence isolats	Sérotypes	ERIC PCR	IS PCR	Profils d'anti-biorésistance	Origine
1	FA101, FA102, FA106, FA1505	*S.* Havana	I	A	*WT*	Elevage
2	FA103	*S.* Kalina	II	B	*WT*	Elevage
3	FA104, FA105	S. Idikan	III	C	*WT*	Elevage
4	Hop411, Hop412, Hop413	S. Idikan	III	C	*WT*	Humaine
5	FA201, FA202, FA306	S. Muenchen	IV	D	*WT*	Elevage
6	Hop301	S. Muenchen	V	E	*WT*	Humaine
7	FA203, FA205	S. Gamaba	VI	F	*WT*	Elevage
8	FA301, FA302, FA305, FA308	S. Amager	VII	G	*WT*	Elevage
9	FA304, FA309	S. Oakland	VIII	H	*WT*	Elevage
10	FA303	S. Eppendorf	IX	I	*WT*	Elevage
11	FA310	S. Typhimurium	X	J	*WT*	Elevage
12	FA307	S. Gloucester	XI	K	*WT*	Elevage
13	FA402, FA403, FA702	S. Colindale	XII	L	*WT*	Elevage
14	Hop403,Hop404, Hop408	S. Colindale	XII	L	*WT*	Humaine
15	FA601, FA603, FA605, FA606, FA607	S. Colindale	XIII	M	NA, OFX, ENR	Elevage
16	FA602, FA604	S. Colindale	XIII	M	NA, OFX, ENR	Elevage
17	FA901, FA902, FA904, FA905, FA907, FA908	S. Colindale	XII	M	NA, OFX, ENR	Elevage
18	FA501, FA502, FA503	S. Mississippi	XIV	N	*WT*	Elevage
19	FA801, FA803	S. Bokanjac	XV	O	*WT*	Elevage
20	FA802	S. Havana	XVI	P	*WT*	Elevage
21	FA1202,	S. Derby	XVII	Q	*WT*	Elevage
22	FA401, FA1203, FA1207	S. Kottbus	XVII	Q	*WT*	Elevage
23	Hop101, Hop202, Hop204	S. Kottbus	XVII	Q	*WT*	Humaine
24	FA906, FA910	S. Ried	XVIII	R	*WT*	Elevage
25	FA903, FA909	S. Wilhelmsburg	XIX	S	*WT*	Elevage
26	FA1001, FA1002	S. Telelkebir	XX	T	*WT*	Elevage
27	FA1003, FA1004	S. Kinondoni	XXI	U	*WT*	Elevage
28	FA701	S. Limete	XXII	V	SXT, SSS, TET	Elevage
29	FA1101	*S.* Winterthur	XXIII	W	*WT*	Elevage
30	FA1102	S. Virchow	XXIV	X	*WT*	Elevage
31	FA1201	S. Stanley	XXV	Y	*WT*	Elevage
32	Hop501, Hop502, Hop504	S. Stanleyville	XXVI	Z	*WT*	Humaine
33	FA1205	S. Winterthur	XXVII	AB	*WT*	Elevage
34	FA1204	S. Tennessee	XXVIII	AC	*WT*	Elevage
35	FA1206	S. Enteritidis	XXIX	AD	*WT*	Elevage
36	Hop414, Hop415	S. Enteritidis	XXIX	AD	NA, OFX, CIP	Humaine
37	FA1501, FA1503, FA1504, FA1506, FA1507	*S.* Riggil	XXX	AE	*WT*	Elevage
38	FA1502	*S.* Hull	XXXI	AF	*WT*	Elevage
39	Hop520	*S.* Hull	XXXI	AF	*WT*	Humaine
40	FA1301	S. Minnesota	XXXII	AG		
41	FA1401, FA1402, FA1403	S. Minnesota	XXXII	AG		
42	FA1601, FA1602, FA1603, FA1606, FA1609, FA1608, FA1605, FA1604, FA1603, FA1612, FA1610, FA1611	S. Minnesota	XXXII	AG	AMP, CHL, SXT, SSS, STR, TET	Elevage
43	FA1607	*S.* Idikan	XXXIII	AH	*WT*	Elevage
44	Hop102	S. I 8:i:-	XXXIV	AI	*WT*	Humaine
45	Hop103, Hop104, Hop105	*S.* Herston	XXXV	AJ	*WT*	Humaine
46	Hop106, Hop107, Hop108	*S.* Ona	XXXVI	AK	*WT*	Humaine
47	Hop201, Hop203	S. Amsterdam	XXXVII	AL	*WT*	Humaine
48	Hop205	*S.* I 6, 7:a:-	XXXVIII	AM	*WT*	Humaine
49	Hop401, Hop402, Hop405, Hop406, Hop407	*S.* Stanleyville.	IXL	AN	*WT*	Humaine
50	Hop410	*S.* Vom	XL	AO	*WT*	Humaine
51	Hop409	S Teshie	XLI	AP	*WT*	Humaine
52	Hop503, Hop505	S. Urbana	XLII	AQ	*WT*	Humaine
53	Hop506, Hop507	*S.* Havana	XLIII	AR	*WT*	Humaine
54	Hop508, Hop510, Hop513	*S.* Farcha	XLIV	AS	*WT*	Humaine
55	Hop509, Hop512, Hop515, Hop517	S. Braenderup	XLV	AT	*WT*	Humaine
56	Hop511, Hop514, Hop516	S. Altona	XLVI	AU	*WT*	Humaine
57	Hop518, Hop522, Hop524	*S.* Hato.	XLVII	AV	*WT*	Humaine
58	Hop519, Hop521, Hop523, Hop525, Hop526	*S.* Anatum	XLVIII	AW	*WT*	Humaine

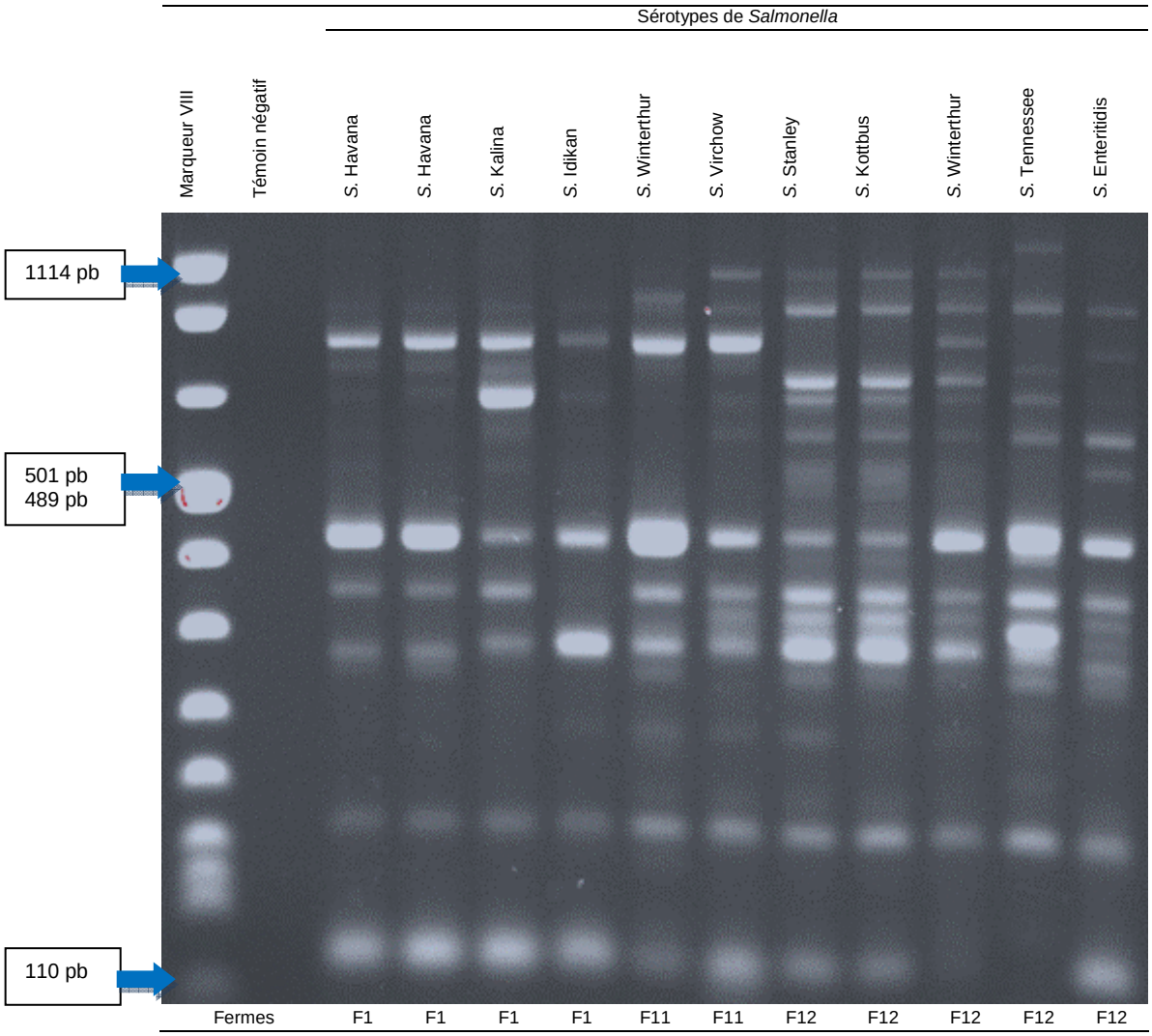
WT : wild type (type sauvage)

Figure 12 : Profils ERIC-PCR de quelques salmonelles issues des élevages de volailles.



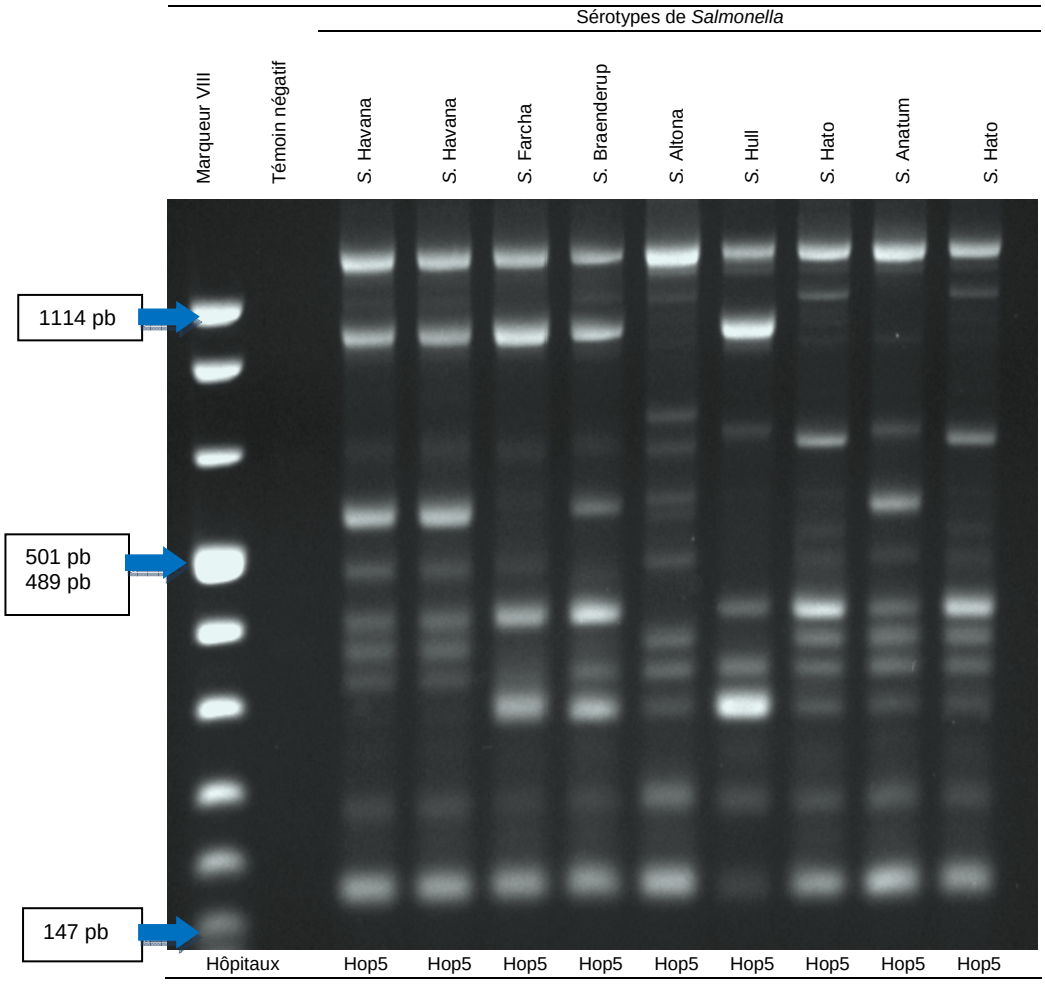
Profils indistinguables pour *S.* Muenchen issues de 2 fermes différentes. Deux profils différents pour les *S.* Colindales (FA6≠FA4=FA7=FA9).

Figure 13 : Profils IS-PCR de quelques salmonelles issus des élevages de volailles.



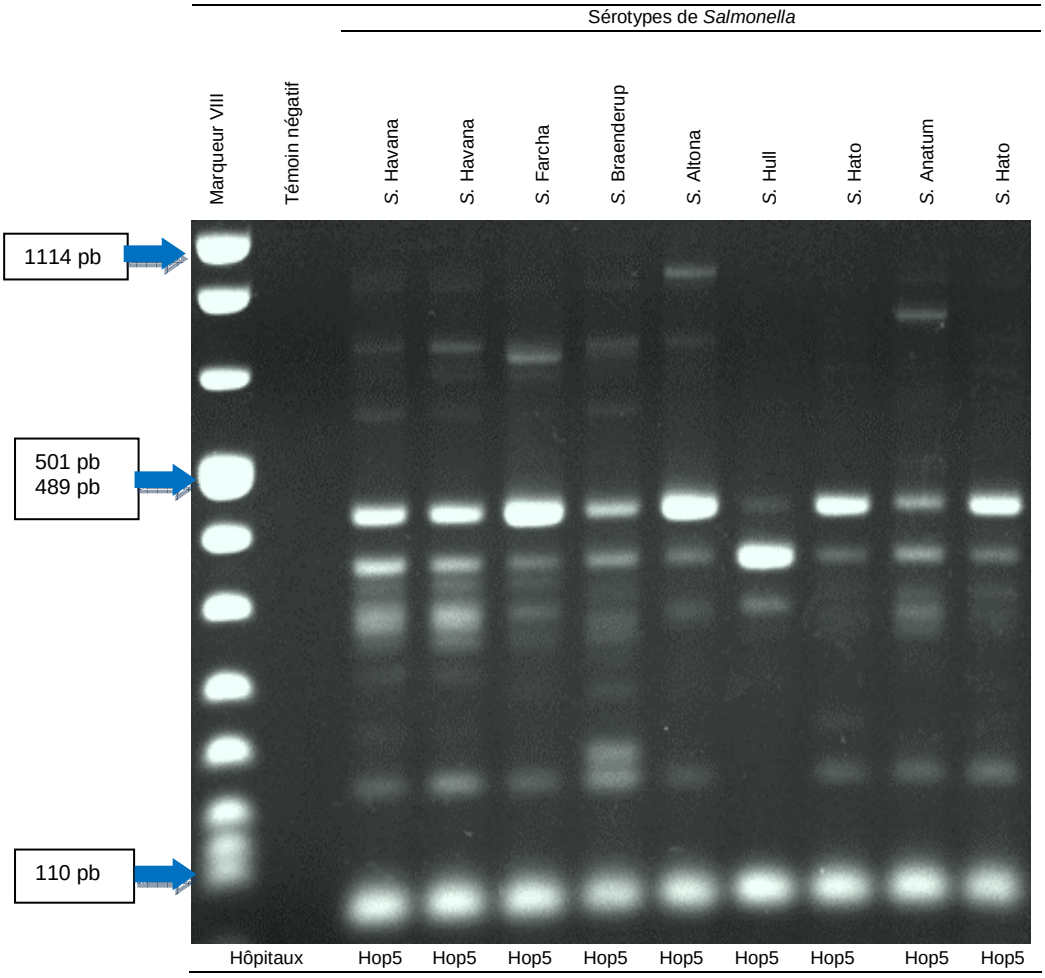
Profils IS différents pour chaque sérotype, sauf les deux souches de *S.* Havana qui ont des profils IS indistinguables.

Figure 14 : Profils ERIC-PCR de quelques salmonelles d'origine humaine



Profils Eric différents pour chaque sérotype. Les deux souches de *S.* Havana ont des profils Eric indistinguables. Idem pour les deux souches de *S.* Hato.

Figure 15 : Profils IS-PCR de quelques salmonelles d'origine humaine

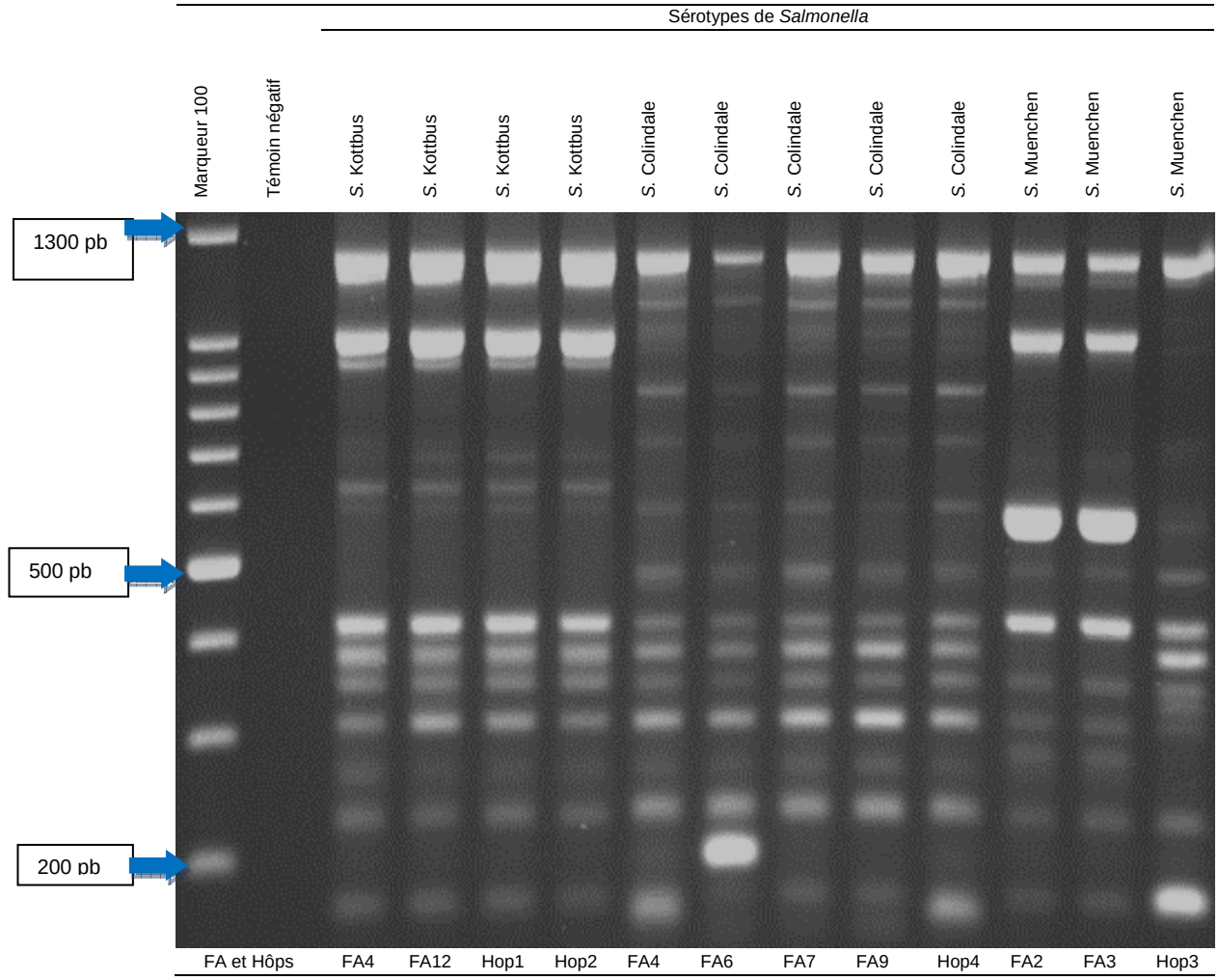


Profils IS différents pour chaque sérotype, à l'exception des deux *S.* Havana qui possèdent un profil IS non distinguable. Idem pour les deux *S.* Hato.

7.3.2. Comparaison des profils ERIC-types et IS-types des isolats communs de salmonelles d'origine aviaire et humaine

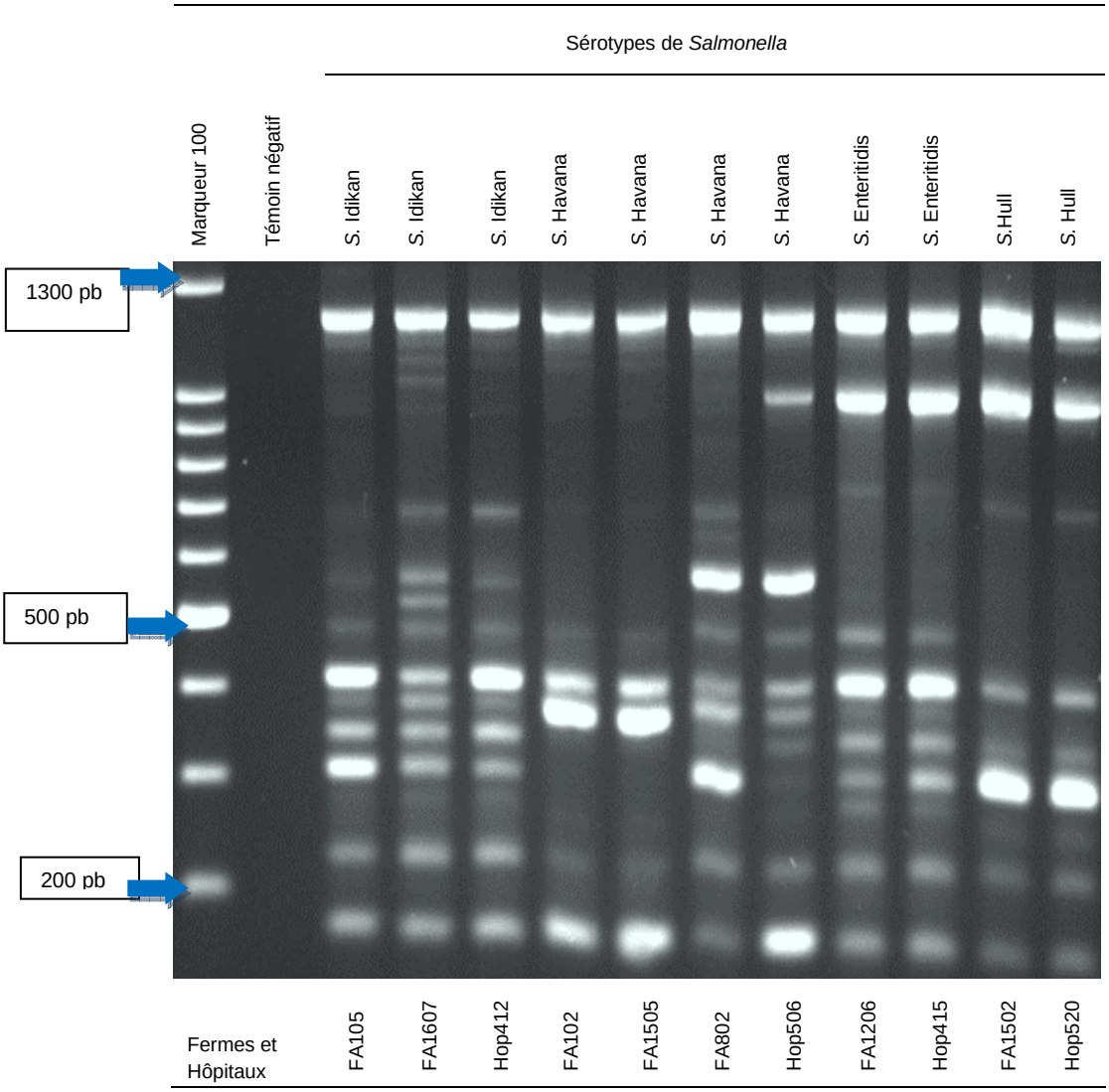
Dans le but d'évaluer la contribution et l'impact des salmonelles d'origine aviaire (poules pondeuses et poulets de chair) dans les salmonelloses humaines, nous avons procédé à l'analyse par comparaison de profils ERIC et IS de quelques salmonelles appartenant aux mêmes sérotypes, isolées des fermes avicoles et des selles humaines (Figures 16, 17 et 18).

Figure 16 : Profils ERIC-PCR comparatifs de salmonelles d'origine aviaire et humaine



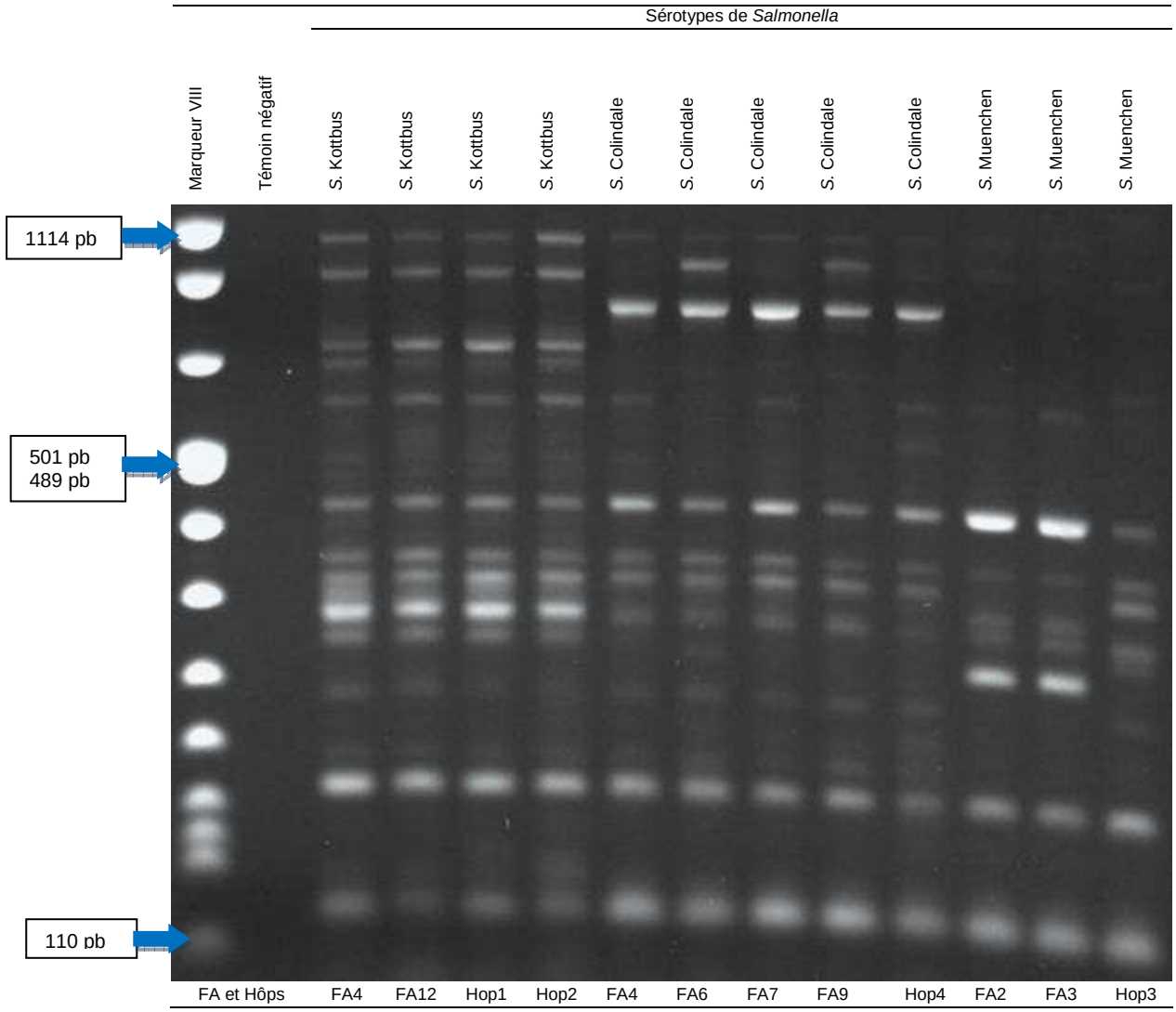
Profils Eric on distinguables pour les 4 sérotypes de Kottbus pourtant issus de 2 fermes différentes et 2 hôpitaux différents. Deux profils différents pour les *S.* Colindales (FA6≠FA4=FA7=FA9=Hop4). Les *S.* Muenchen aviaires ont des profils semblables alors que la souche humaine possède un profil différent.

Figure 17 : Profils ERIC-PCR comparatifs des salmonelles d'origines aviaire et humaine



Profils Eric non distinguables pour les 2 *S.* Idikan (FA105 et Hop412) et différents pour le 3e *S.* Idikan (FA1607). Profils indistiguables pour les *S.* Havana issus des fermes FA1 et FA15. Les deux autres *S.* Havana (FA8 et Hop5) possèdent des profils différents. Profils également indistiguables pour les 2 *S.* Enteritidis et les 2 *S.* Hull issues de 2 sites différents.

Figure 18 : Profils IS-PCR comparatifs des salmonelles d'origines aviaire et humaine



Profils IS indistiguables pour les 4 sérotypes de *S.* Kottbus pourtant issus de 2 fermes différentes et 2 hôpitaux différents. Deux profils IS différents pour *S.* Colindales (FA6=FA9≠FA4=FA7=Hop4). Les *S.* Muenchen aviaires ont un profil IS indistiguable alors que la souche humaine possède un profil IS différent.

7.3.3. L'électrophorèse en champ pulsé ou pulsotypage

L'analyse des résultats du pulsotypage a été effectuée au sein de l'unité CEB (ANSES). L'ADN total des souches a été extrait et digéré par l'enzyme *Xba*I suivant un protocole standardisé et développé spécifiquement pour ce pathogène, sous assurance qualité. Après migration, les fragments d'ADN sont révélés au bromure d'éthidium (BET). L'analyse des profils génomiques est réalisée à l'aide du logiciel BioNumerics (Applied Maths, Pays-Bas) et la comparaison des profils est faite par la construction d'un dendrogramme (figure 19) obtenu après comparaison des coefficients de Dice de chaque profil différent par la méthode UPGMA. Le laboratoire a été accrédité par le COFRAC pour la mise en œuvre de cette méthode (accréditation no.1-2246, section Laboratoires, www.cofrac.fr).

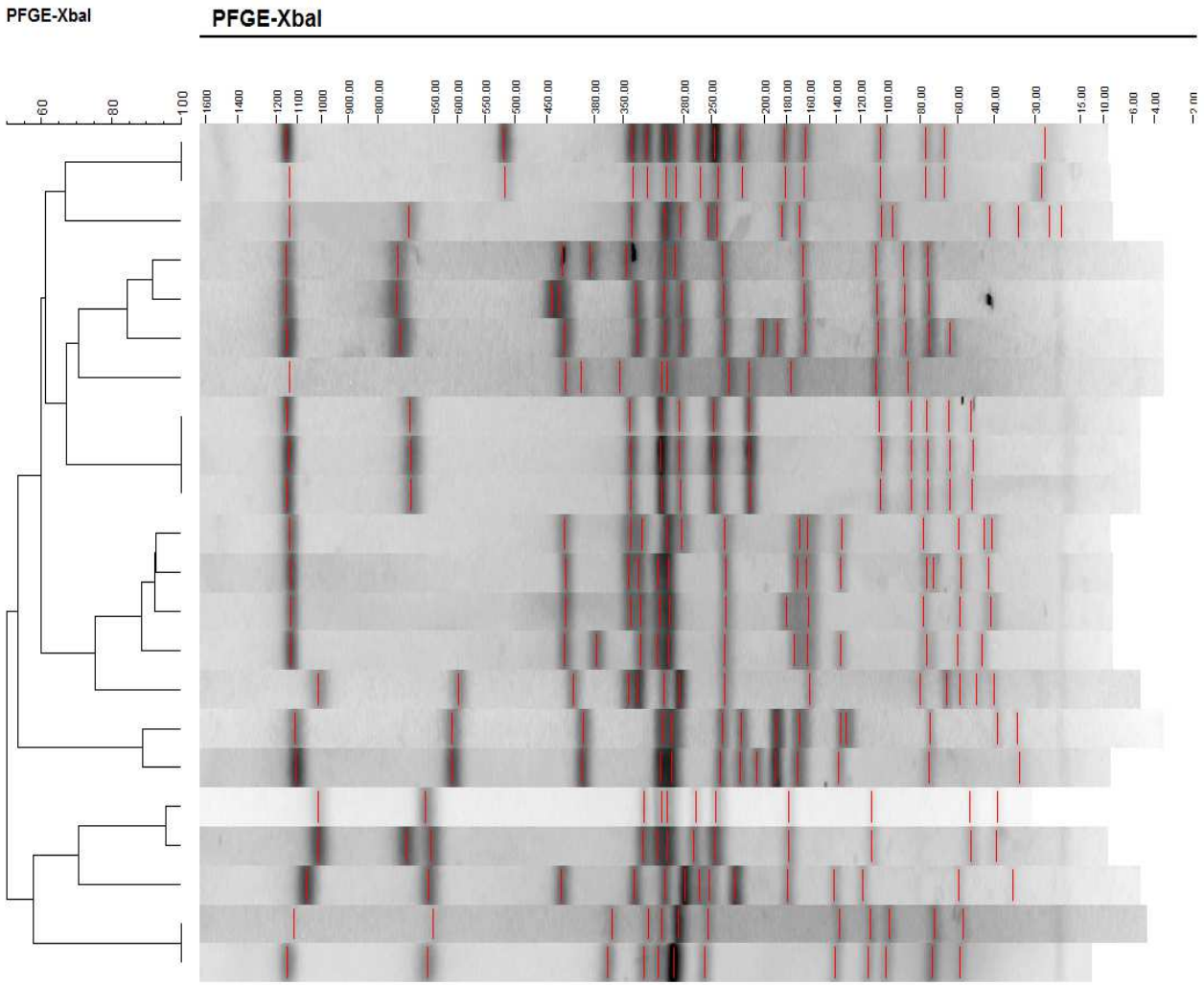
7.3.3.1. Révélation des profils de macrorestriction

Les résultats obtenus lors des différentes expériences ou des analyses effectuées permettent d'estimer un lien génétique entre les différents isolats (tableau 32). Un numéro de profil est attribué suite à l'analyse des résultats de PFGE, il est propre à la base de données de l'unité Caractérisation et épidémiologie des Bactéries (CEB) où ont été réalisés les typages, mais a été défini selon une nomenclature européenne, par un code à 6 lettres associées à un numéro de 4 chiffres (Peters *et al.*, 2003). La première lettre correspond au genre (*S* pour *Salmonella*), les 3 lettres suivantes correspondent à la codification du sérovar (ENT pour Enteritidis). Les 2 dernières lettres correspondent au code de l'enzyme (XB pour *Xba*I). Par exemple, le numéro SENTXB0001 correspond au premier profil observé de *Salmonella* Enteritidis avec l'enzyme *Xba*I. Ce logiciel peut effectuer diverses analyses, telles que le calcul de dendrogramme pour visualiser les groupes d'individus semblables (figure n° 19).

Pour mesurer quantitativement la similarité entre deux profils d'empreintes moléculaires électrophorétiques, le coefficient de Dice a été utilisé. Il se calcule en multipliant par deux le nombre de fragments communs, divisé par le nombre total de fragments dans les deux profils. Différents paramètres doivent être pris en compte pour l'identification des fragments (l'intensité minimale, lors de la recherche automatique, l'élimination des artefacts, l'addition de doubles bandes) et pour la reconnaissance d'homologie de position (degré de tolérance des erreurs résiduelles d'alignement et de position de fragments). Ainsi, certains profils qui présentent des différences minimes peuvent avoir le même numéro.

Après la comparaison deux à deux de tous les profils, une matrice de similarité est obtenue. Le logiciel est capable de construire une représentation graphique de ces matrices, sous forme de dendrogramme. Nous avons utilisé la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) basée sur le regroupement suivant la distance moyenne. Cette méthode utilise un algorithme de regroupement séquentiel dans lequel les relations sont identifiées dans l'ordre de leur similarité et la reconstruction de l'arbre, suite à cet ordre. Il y a d'abord identification des deux séquences les plus proches. Ce groupe est ensuite traité comme un tout, puis la séquence la plus proche est recherchée, ainsi de suite jusqu'à ce qu'il n'y ait plus que deux groupes.

Figure 19 : Dendrogramme fondé sur l'analyse de pulsotypes avec l'enzyme XbaI des sérotypes de *Salmonella* d'origines aviaire et humaine.



11CEB948SAL	MUENCHEN	SMUCXB0001	aviaire
11CEB957SAL	MUENCHEN	SMUCXB0001	aviaire
HOP301	MUENCHEN	SMUCXB0002	homme
12CEB2387SAL	IDIKAN	SIDKXB0001	aviaire
12CEB2390SAL	IDIKAN	SIDKXB0002	homme
FA105	IDIKAN	SIDKXB0003	aviaire
11CEB1317SAL	HAVANA	SHAVXB0002	aviaire
11CEB1048SAL	KOTTBUS	SKOTXB0005	aviaire
11CEB1635SAL	KOTTBUS	SKOTXB0005	homme
11CEB1638SAL	KOTTBUS	SKOTXB0005	homme
11CEB1062SAL	COLINDALE	SCODXB0004	aviaire
HOP404	COLINDALE	SCODXB0003	homme
11CEB1049SAL	COLINDALE	SCODXB0001	aviaire
11CEB1055SAL	COLINDALE	SCODXB0002	aviaire
12CEB2729SAL	HAVANA	SHAVXB0003	homme
12CEB2733SAL	HULL	SHULXB0002	homme
12CEB2384SAL	HULL	SHULXB0001	aviaire
FAI206	ENTERITIDIS	SENTXB0001	aviaire
12CEB2391SAL	ENTERITIDIS	SENTXB0011	homme
12CEB2382SAL	KOTTBUS	SDBYXB0020	aviaire
12CEB2740SAL	HAVANA	SHAVXB0004	aviaire
12CEB2735SAL	HAVANA	SHAVXB0004	aviaire

7.3.3.2. Comparaison des résultats du pulsotypage avec la base de données de l'unité CEB, Anses.

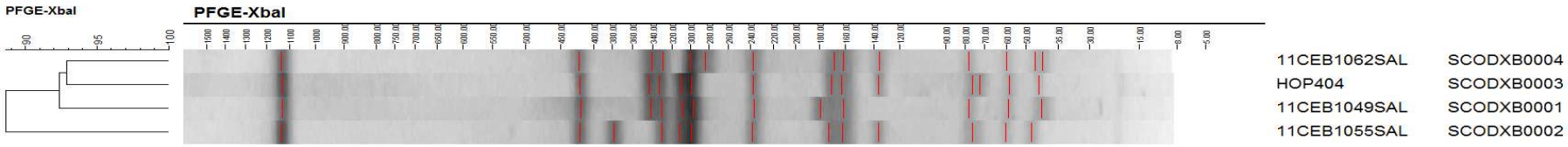


Figure 20 : Dendrogramme des isolats de *S.* Colindale

4 souches de *S.* Colindale analysées, 4 profils différents. Les profils 1, 3 et 4 sont assez proches (>90% de similitude).
Aucune données jusqu'à là dans la base de données de l'unité CEB.

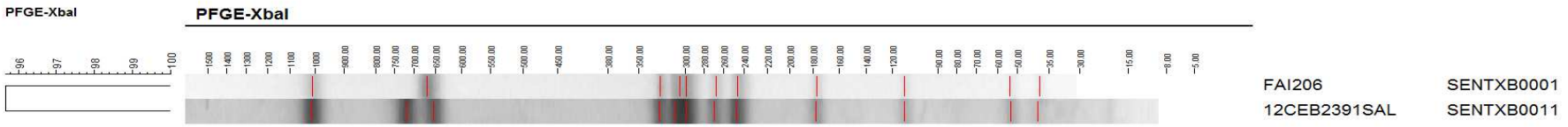


Figure 21 : Dendrogramme des isolats de *S.* Enteritidis

270 souches de *S.* Enteritidis dans la base, 27 profils différents.
Le profil 1 est majoritaire, le 11 beaucoup moins courant et retrouvé dans de l'œuf notamment.

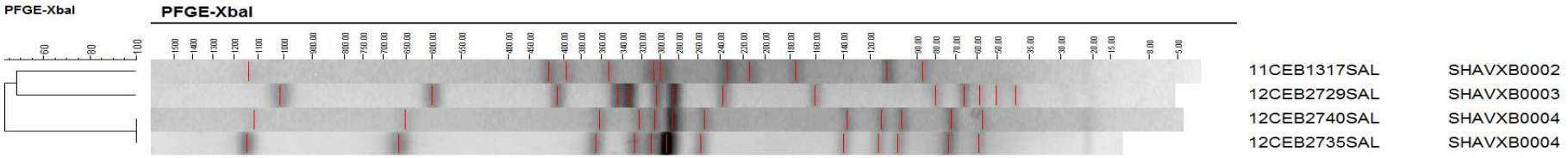


Figure 22 : Dendrogramme des isolats *S.* Havana

4 souches de *S.* Havana analysées, 3 profils observés.
1 seule souche dans notre base avec un autre profil. Cette souche provient de déchets d'alimentation animale dans le 56, elle est de l'année 2004.

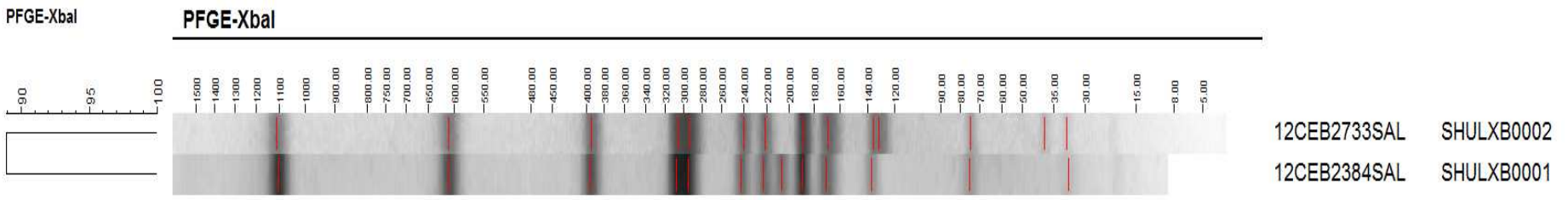


Figure 23 : Dendrogramme des isolats de *S.* Hull

2 souches de *S.* Hull analysées, 2 profils observés.
Pas de données jusqu'à là dans la base de données de l'unité CEB.

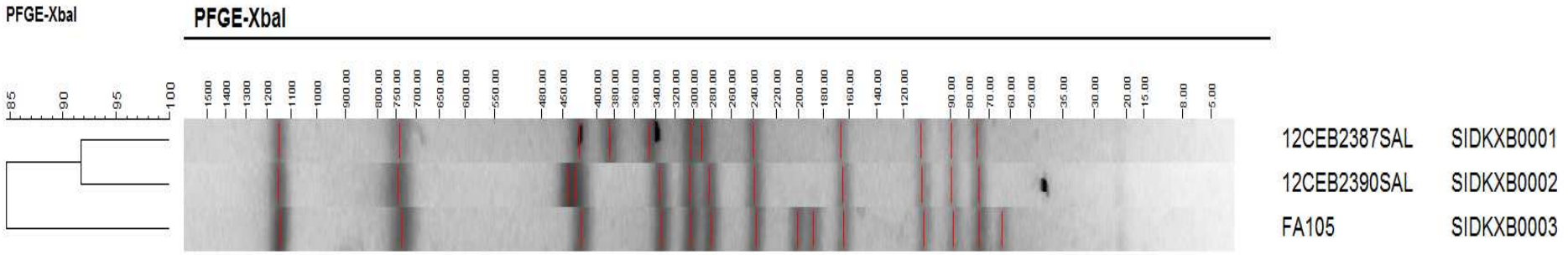


Figure 24 : Dendrogramme des isolats de *S.* Idikan

3 souches de *S.* Idikan analysées, 3 profils observés, les profils 1 et 2 sont proches.
Pas de données jusqu'à là dans la base de données de l'unité CEB.

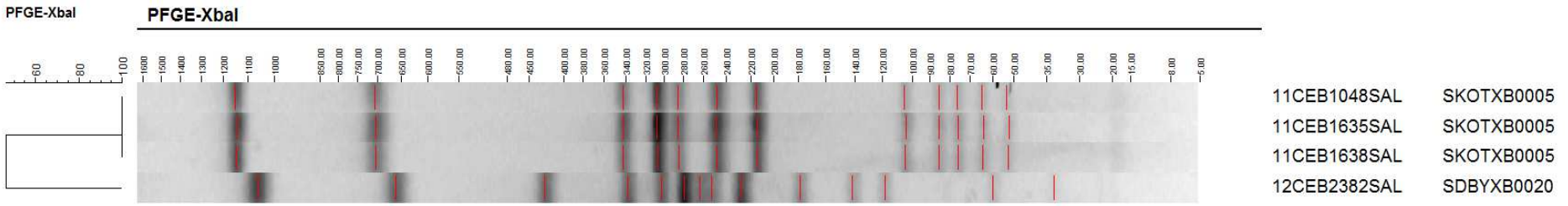


Figure 25 : Dendrogramme des isolats de *S.* Kottbus

4 souches de *S.* Kottbus analysées, 3 ont un même profil nommé SKOTXB0005 qui est nouveau dans la base de données.
26 souches dans la base de données de l'unité CEB et 3 profils seulement, la diversité pour ce sérotype est très faible.
La 4ème souche analysée a un profil typique du sérotype Derby.

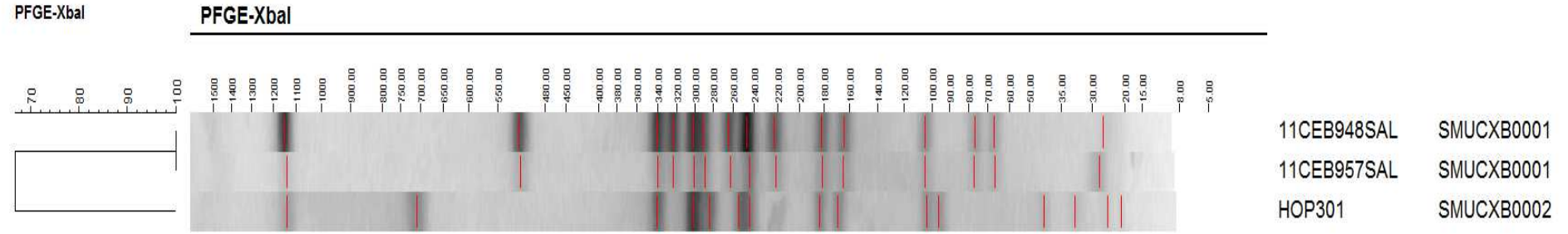


Figure 26 : Dendrogramme des isolats de *S.* Muenchen

3 souches *S.* Muenchen analysées et 2 profils distincts observés.
Pas de données jusqu'à là dans la base de données de l'unité CEB.

Tableau 34 : Récapitulatifs des profils ERIC, IS-PCR, PFGE et d'antibiorésistance de sérotypes communs de *Salmonella* d'origines humaine et aviaire

N°souche labo	Code souche	Sérotype	Profils Xbal	Profils ERIC	Profils IS	profil antibiorésistance	Origines / sources	Filière	Secteur
FAI206	FA1206	ENTERITIDIS	SENTXB0017	XXIX	AD	*WT*	Pondeuse/ litière	Volaille	Santé et production animale
12CEB2391SAL	Hop415	ENTERITIDIS	SENTXB0011	XXIX	AD	*NA, OFX, CIP*	Homme/ selles	Autres	Santé et production animale
12CEB2382SAL	FA1202	DERBY	SDBYXB0020	XVII	Q	*WT*	Pondeuse/ litière	Volaille	Santé et production animale
11CEB1048SAL	FA401	KOTTBUS	SKOTXB0005	XVII	Q	*WT*	Pondeuse/ eaux abreuvoirs	Volaille	Santé et production animale
11CEB1635SAL	Hop101	KOTTBUS	SKOTXB0005	XVII	Q	*WT*	Homme/ selles	Autres	Santé et production animale
11CEB1638SAL	HoP202	KOTTBUS	SKOTXB0005	XVII	Q	*WT*	Homme/ selles	Autres	Santé et production animale
12CEB2740SAL	FA1505	HAVANA	SHAVXB0004	I	A	*WT*	Pondeuse/ aliments/ mangeoires	Volaille	Alimentation animale
12CEB2735SAL	FA102	HAVANA	SHAVXB0004	I	A	*WT*	Pondeuse/ fientes	Volaille	Santé et production animale
12CEB2729SAL	Hop506	HAVANA	SHAVXB0003	XLIII	AR	*WT*	Homme/ selles	Autres	Santé et production animale
11CEB1317SAL	FA802	HAVANA	SHAVXB0002	XVI	P	*WT*	Pondeuse/ aliments/ mangeoires	Volaille	Santé et production animale
11CEB948SAL	FA202	MUENCHEN	SMUCXB0001	IV	D	*WT*	Pondeuse/ litière	Volaille	Santé et production animale
11CEB957SAL	FA306	MUENCHEN	SMUCXB0001	IV	D	*WT*	Pondeuse/ fientes	Volaille	Santé et production animale
HOP301	Hop301	MUENCHEN	SMUCXB0002	V	E	*WT*	Homme/ selles	Autres	Santé et production animale
12CEB2387SAL	FA1607	IDIKAN	SIDKXB0001	XXXIII	AH	*WT*	Pondeuse/ aliments/ mangeoires	Volaille	Alimentation animale
12CEB2390SAL	Hop412	IDIKAN	SIDKXB0002	III	C	*WT*	Homme/ selles	Autres	Santé et production animale
FA105	FA105	IDIKAN	SIDKXB0003	III	C	*WT*	Pondeuse/ litière	Volaille	Santé et production animale
11CEB1049SAL	FA402	COLINDALE	SCODXB0001	XII	L	*WT*	Pondeuse/ aliments/ mangeoires	Volaille	Alimentation animale
11CEB1062SAL	FA702	COLINDALE	SCODXB0004	XII	L	*WT*	Pondeuse/ aliments/ mangeoires	Volaille	Alimentation animale
HOP404	Hop404	COLINDALE	SCODXB0003	XII	L	*WT*	Homme/ selles	Autres	Santé et production animale
11CEB1055SAL	FA602	COLINDALE	SCODXB0002	XIII	M	*NA, OFX, ENR*	Poulet de chair/ fientes	Volaille	Santé et production animale
12CEB2733SAL	Hop520	HULL	SHULXB0002	XXXI	AF	*WT*	Homme/ selles	Autres	Santé et production animale
12CEB2384SAL	FA1502	HULL	SHULXB0001	XXXI	AF	*WT*	Pondeuse/ eaux abreuvoirs	Volaille	Santé et production animale

7.4. Discussion

Les outils de diagnostics moléculaires sont devenus de nos jours un moyen efficace dans l'étude de l'épidémiologie des agents infectieux. Ils permettent d'évaluer les potentiels facteurs de risques potentiels génétiques et environnementaux, d'identifier l'étiologie, la distribution et d'assurer la prévention des maladies infectieuses au sein d'une petite ou d'une vaste communauté (Fernandez *et al.*, 2003 ; Traub *et al.*, 2005).

Les profils génotypiques générés par les différentes méthodes de typage moléculaire des souches bactériennes constituent un outil épidémiologique important pour la détermination de potentielles sources d'infections. De plus, la distribution des souches typiques de *Salmonella* circulant parmi les différentes espèces animales offre une information précieuse pour la compréhension épidémiologique de la dissémination des génotypes particuliers des clones (Olsen *et al.*, 1992). Dans le but d'évaluer les proximités phylogénétiques de nos souches, et de déduire les possibles liens épidémiologiques entre celles issues des élevages et celles issues des hôpitaux, nous les avons caractérisées sur le plan moléculaire grâce aux méthodes de l'IS-PCR, d'ERIC-PCR et du Pulsotypage (Tableau 34).

7.4.1. Analyse comparative des Profils ERIC-types, IS-types et antibiotypes

Nous avons analysé les différents profils des isolats de *Salmonella* issus des fermes avicoles et des hôpitaux par comparaison de sérotypes communs entre eux, en fonction du degré d'homogénéité ou d'hétérogénéité des ERIC-types, des IS-types et d'antibiotypes.

7.4.1.1. Profils homogènes

- *S.* Gamaba : 2 isolats issus d'une même ferme, présentant les mêmes profils ERIC, IS et d'antibiorésistance. C'est aussi le cas des 2 isolats de *S.* Oakland, des 2 isolats de *S.* Bokanjac, des 2 isolats de *S.* Ried, des 2 isolats de *S.* Wilhelmsburg, des 2 isolats de *S.* Telelkebir et des 2 isolats *S.* Kinondoni. Ces souches sont issues de différentes fermes avicoles. Il est probable qu'elles soient des souches identiques par sérotype.

- *S.* Amager : issus d'une même ferme ont montré les mêmes profils ERIC, IS et d'antibiorésistance. Ce résultat est identique pour les 3 isolats de *S.* Mississipi retrouvés dans une autre ferme. Les 5 *S.* Riggil également isolés dans une seule et même ferme ont présenté également les profils ERIC, IS et d'antibiorésistance identiques. On posera toujours l'hypothèse d'un possible même souche circulant au sein de chaque ferme au moment de l'échantillonnage.

- *S.* Minnesota *:* les 16 isolats étudiés sont issus de trois fermes avicoles différentes. Ils ont tous montré les mêmes profils ERIC, IS et d'antibiorésistance. Ces profils identiques témoignent une fois de plus, du possible caractère clonal de ce sérotype de *Salmonella*. Les trois fermes possèdent comme liens communs, un seul fournisseur d'aliments destinés aux volailles

- *S.* Amsterdam *:* Les 2 souches bien qu'isolées chez deux patients différents d'un même hôpital, ont montré les profils ERIC, IS et d'antibiorésistance identiques. Même résultats pour les 2 souches de *S.* Urbana, également isolées chez 2 patients distincts dans un autre hôpital.

- *S.* Herston : les 3 isolats ont montré les profils ERIC, IS et d'antibiorésistance tous identiques. Ils étaient isolés chez 3 patients différents dans un même centre hospitalier. Profils uniques également pour les 3 isolats de *S.* Ona rencontrés chez 2 patients dans ce même hôpital. C'est aussi le cas des 3 isolats de *S.* Hato et des 3 souches de *S.* Altona retrouvés chez au moins 2 patients différents, cette fois-ci dans un autre hôpital.

- *S.* Anatum : les 5 isolats ont montré les profils ERIC, IS et d'antibiorésistance tous semblables. Ils étaient pourtant isolés chez 4 patients différents au sein d'un même centre de santé. Profils similaires pour les 4 souches de *S.* Braenderup isolés chez deux patients dans ce même centre de santé. A la lumière de ces profils uniques, on peut postuler que c'étaient les mêmes clones qui étaient isolés lors de cette étude.

7.4.1.2. Profils hétérogènes

- *S.* Winterthur : 2 isolats isolés de 2 fermes distinctes qui ont montré deux profils ERIC et IS différents, mais un profil d'antibiorésistance identique. On peut supposer que les deux isolats ne sont pas des clones.

- *S.* Stanleyville : les 8 isolats étudiés ont été retrouvés dans deux hôpitaux différents. Les 5 premiers isolats retrouvés chez 4 patients différents dans un même hôpital ont montré des profils ERIC, IS et d'antibiorésistance tous semblables, alors que les 3 autres isolats rencontrés eux chez 3 patients différents dans un autre hôpital, ont présenté les mêmes profils ERIC, IS et d'antibiorésistance qui leur sont propres. Au sein d'un même hôpital implanté dans la même zone géographique que les patients, on peut affirmer qu'on est en présence de clones. Mais d'un hôpital à un autre, la discrimination de ces isolats obtenue par ces deux méthodes permet de montrer que ces deux groupes du même sérotype ne sont pas des clones.

Les résultats issus des méthodes ERIC et IS PCR offrent les preuves de l'existence d'une diversité moléculaire évidente parmi les sérotypes de salmonelles isolées au cours de cette étude. En s'appuyant d'abord sur la méthode ERIC PCR, nos résultats sont en accord avec plusieurs études menées sur les souches de salmonelles grâce aux séquences d'ERIC. Elles sont décrites pour la première fois comme des unités intergéniques répétitives chez *E. coli*, *S.* Typhimurium et certaines entérobactéries. La séquence d'ERIC est un palindrome imparfait de 126 pb, hautement bien conservée chez ces espèces (Hulton *et al.*, 1991 ; Sharples et Lloyd, 1990).

Cette méthode a donc été utilisée dans le passé avec fiabilité pour discriminer les souches de *Salmonella*, parce que les isolats appartenant à la même souche montraient souvent des profils identiques (Van Lith et Arts, 1994). Ces auteurs suggéraient déjà à cette époque, l'utilisation des amorces d'ERIC1R et ERIC2 pour la discrimination des sérotypes de salmonelles entre eux. Entre temps, Millemann *et al.* (1996) avaient testé les mêmes amorces ERIC et conclu que cette méthode ne permettait pas de discriminer certains isolats de *S.* Enteritidis et *S.* Typhimurium entre eux. Burr *et al.*, (1998), rapportèrent aussi que ERIC-PCR n'était pas très pratique pour l'identification des sérotypes.

Mais, plus récemment, Lim *et al.*, (2005) et Rasschaert *et al.*, (2005), ont démontré dans leur études que ERIC PCR peut être utilisée pour différencier les sérotypes de *Salmonella* entre eux. Il est évident que la méthode ERIC PCR, associée à d'autres méthodes de typage moléculaire, peut non seulement être utilisée comme une méthode appropriée pour grouper et

réduire le nombre de souches de *Salmonella* à sérotyper lors de certaines investigations épidémiologiques (Rasschaert *et al.,* 2005) , mais peut aussi être utilisée efficacement pour identifier et tracer les sources des salmonelles pathogènes dans les aliments. D'après Li *et al.* (2011), la méthode ERIC-PCR peut également être utilisée pour établir les empreintes moléculaires des souches de salmonelles, pour analyser leur similitude génétique afin de fournir la preuve épidémiologique moléculaire permettant de prévenir et de contrôler les salmonelles d'origine alimentaire.

Le choix d'une méthode complémentaire de type IS-PCR, justifie la nécessité d'associer à la méthode ERIC-PCR, un autre outil de typages génotypiques reproductible et fiable, dans le but d'élucider la proximité clonale de nos isolats obtenus grâce à ERIC-PCR et de déterminer la méthode la plus discriminante pour ce typage moléculaire.

Les marqueurs IS (Insertion Sequence) appartiennent aux groupes d'éléments transposables présents en plusieurs copies au sein du génome des bactéries. Le typage IS implique donc d'utiliser la diversité des sites d'insertion. Pour certaines espèces bactériennes, ils peuvent être utilisés comme marqueurs génotypiques et traceurs épidémiologiques pour discriminer de nombreuses sérotypes entre eux. C'est le cas par exemple de *IS256* chez Staphylocoque aureus et de *IS6110* chez *Mycobacterium tuberculosis* (Cave *et al.,* 1994). Pour le genre *Salmonella*, l'*IS200* a été observé pour la première fois sur une souche mutante de *S.* Typhimurium et peut être mis en évidence sur le génome de plusieurs autres souches de salmonelles. Cependant, le nombre de copies de ces éléments IS sur le génome dépend de chaque sérotype de salmonelles (Lam et Roth, 1983, Millemann *et al.*, 1995 ; Stanley *et al.*, 1991).

Plusieurs études réalisées sur la distribution et la localisation des marqueurs IS, au sein du génome des salmonelles, avaient souligné son intérêt phylogénétique et épidémiologique pour la détermination des profils IS types des isolats cliniques de salmonelles. Ils peuvent être utilisés comme outils de diagnostic appropriés pour l'identification des isolats de salmonelles avec une précision assez élevée (Millemann *et al.*, 1995 ; Stanley *et al.*, 1991).

De nos résultats, il ressort que tous les mêmes sérotypes de *Salmonella* qui avaient montré les profils ERIC identiques (figures 12 et 14), avaient également exhibé les mêmes profils IS (figures 13 et 15). Tous les résultats auquels nous sommes parvenus, montre l'intérêt de ces 2 méthodes PCR comme marqueurs moléculaires appropriés pour des études phylogénétiques et épidémiologiques des souches de salmonelles. Nous avons aussi montré, au cours de cette étude que le marqueur phénotypique, tel que l'antibiotypie, reste précieux pour de telles investigations. La combinaison de ces 3 marqueurs permet de tracer avec efficacité la diffusion des souches de salmonelles dans divers types d'environnement, tels que dans les élevages, lors des toxi-infections d'origine alimentaire liés aux hôtes humains, etc.

7.4.2. Analyse comparative des profils ERIC-types, IS-types, antibiotypes et pulsotypes des isolats communs de *Salmonella* d'origine aviaire et humaine.

L'idéal serait d'analyser tous nos isolats grâce à ces 4 marqueurs choisis pour mieux apprécier leur proximité phénotypique et génotypique afin de nous permettre d'établir leurs liens phylogénétiques et épidémiologiques. Mais, limiter par le coût financier élevé des expériences à réaliser, nous avons réduit cette analyse à quelques sérotypes identiques retrouvés à la fois dans les élevages aviaires et chez les humains. Parmi les isolats analysés, plusieurs hypothèses basées sur les différents profils obtenus peuvent être formulées.

7.4.2.1. Profils homogènes

- Les 4 isolats de *S.* Kottbus analysés étaient rencontrés dans 4 endroits différents. Les 2 isolats humains retrouvés dans 2 hôpitaux différents et le 3^{e} isolat retrouvé dans une ferme de poules pondeuses partagent un profil PFGE unique (SKOTXB0005). La méthode PFGE par *Xba*I apparaît donc discriminante pour ces sérotypes. Les profils ERIC, IS et d'antibiorésistance sont également identiques pour ces 3 *S.* Kottbus (Tableau 33). On peut affirmer que ces isolats sont des clones ayant une même origine et circulant entre cette ferme de poules pondeuses et les humains échantillonnés dans les 2 hôpitaux de la ville. Ce résultat confirme bien le réservoir aviaire du sérotype Kottbus, d'où pouvait survenir cette contamination humaine observée. Le 4^{e} isolat de *S.* Kottbus retrouvé dans une autre ferme de poules pondeuses, bien que présentant les profils ERIC-typess, IS-types et d'antibiorésistance identiques que les 3 isolats précédents, avait exhibé un pulsotype différent plutôt proche de celui de *S.* Derby (SDBYXB0020). Pourtant, le sérotypage de Kottbus était exact et formel.

- Les 4 serovars de *S.* Havana analysés étaient isolés de 4 sites différents. Deux de ces serovars issus de 2 fermes différentes (fermes 1 et 15) partagent le même pulsotype (SHAVXB0004). Ils partagent aussi les mêmes profils ERIC, IS et d'antibiorésistance. Ces serovars sont donc des clones. Par contre, les 2 autres serotypes dont l'un est issu d'une ferme de poules pondeuses (SHAVXB0002) et l'autre d'origine humaine (SHAVXB0003) exhibent des pulsotypes différents. Ils partagent cependant, les mêmes profils d'antibiotypes, ERIC-types et IS-types.

- Les 3 souches de *S.* Muenchen étaient isolées dans 3 lieux différents dont 2 aviaires et une humaine. Les 2 isolats aviaires rencontrés dans deux fermes différentes partagent un profil PFGE unique (SMUCXB0001). Ils partagent également les profils d'antibiotypes, ERIC-types, IS-types identiques. Ces deux isolats aviaires sont sans aucun doute des clones. Le 3^{e} sérovar de source humaine présente un autre pulsotype (SMUCXB0002), alors qu'il partage les mêmes profils ERIC, IS et d'antiobrésistance avec les 2 précédents.

7.4.2.2. Profils hétérogènes

- Les 4 isolats de *S.* Colindale analysés venaient de 4 sites différents, dont 3 d'origine aviaire (2 isolats issus de 2 fermes différentes de poulets de chair et 1 isolat issu d'une ferme de poules pondeuses) et un isolat d'origine humaine. Ces isolats partagent 4 profils PFGE différents dont les 3 sont très proches (SCODXB0001, SCODXB0003, SCODXB0004 avec + de 90 % de similitude). Ils partagent aussi 3 profils ERIC-types, 3 profils IS-types et 2 profils d'antibiotypes tous différents (Tableau 33). On peut supposer que ces isolats ne sont pas des clones et que les sources de contamination peuvent être d'origines multiples.

- Les 2 isolats de *S.* Enteritidis retrouvés, l'un issu d'une ferme de poules pondeuses (SENTXB0017) et l'autre chez l'homme (SENTXB0011) montrent 2 profils PFGE différents. Cependant, ils partagent les profils ERIC-types et IS-types identiques alors que les 2 profils d'antibiotypes sont différents. Ce résultat suppose donc 2 origines distinctes des 2 isolats de *S.* Enteritidis. La méthode PFGE est d'autant plus discriminante pour ce sérotype, surtout qu'elle a été toujours utilisée avec succès, pour discriminer les isolats de *S.* Enteritidis entre eux (Fernandez *et al.*, 2003, Rivoal *et al.*,

2009). D'après Mammina *et al.* (2003), la diffusion clonale de certains sérotypes prédominants telle que *S.* Enteritidis par le biais des volailles et des produits dérivés peut être plus importante, contrairement à ce que montre notre présent résultat ou les isolats appartenant à ce sérotype étaient très peu rencontrés.

- Les 3 isolats de *S.* Idikan issus de trois sites différents dont 2 isolats issus de 2 fermes différents de poules pondeuses (SIDKXB001 et SIDKXB003) et un isolat d'origine humaine (SIDKXB002) partagent 3 pulsotypes tous différents. Les pulsotypes 1 et 2 sont assez proches. Ils montrent aussi des profils ERIC-types et IS-types tous différents alors que les profils d'antibiorésistance sont les mêmes. La méthode PFGE a été mieux discriminante pour ces isolats que les 3 marqueurs réunis et permet de postuler que les 3 isolats de *S.* Idikan ne sont pas des clones.

- Les 2 isolats de *S.* Hull issus chacun d'une ferme de poulettes (SHULXB001) et de source humaine (SHULXB002) partagent deux profils PFGE différents. Ils montrent pourtant 2 profils ERIC-types, 2 IS-types et 2 antibiotypes tous identiques deux à deux. Ce résultat démontre encore le haut pouvoir discriminant de la méthode PFGE comparée aux 3 autres marqueurs utilisés. Elle permet d'apporter la preuve de la non clonalité des isolats de *S.* Hull et de souligner que les sources de contamination peuvent être d'origines diverses.

Des trois méthodes de typages moléculaires réalisées au cours de notre étude, il apparaît que la PFGE est la plus reproductible et la plus discriminante par rapport aux deux autres. Sa réalisation est certes lourde et fastidieuse, mais elle s'avère toujours précieuse, lors des investigations épidémiologiques, et souvent dans des contextes où d'autres méthodes de typage ne pouvaient pas discriminer les souches bactériennes entre elles (Brisabois, 2001 ; Stevens *et al.*, 2008).

Le regroupement d'isolats ou les relations entre les isolats reposent principalement sur la comparaison des profils obtenus grâce à leur identité phénotypique ou moléculaire. La caractérisation moléculaire de nos isolats issus des fermes avicoles et des hôpitaux a donc permis d'apporter les informations descriptives sur la diversité génotypique du genre *Salmonella*, à travers les différents sérotypes isolés permettant ainsi d'émettre des hypothèses sur la contamination et les flux des souches dans notre secteur d'étude. Cette caractérisation moléculaire permet non seulement d'élucider la source de contamination ou le véhicule responsable de l'épidémie, mais permet aussi de suivre la diffusion et la dynamique d'un clone bactérien, au sein de l'animal en élevage, au niveau de la matière première à l'abattoir et dans la chaine de transformation (Cardinale *et al.*, 2005 ; Giovannacci *et al.*, 2001).

8. Conclusion générale et perspectives

Les salmonelles sont comptées parmi les premières causes connues de toxi-infections alimentaires collectives et constituent un réel problème de santé publique à travers le monde. Au niveau économique, elles ont une importance cruciale, du fait des pertes de productions qu'elles engendrent.

Un des faits marquants à noter, est la constante adaptation du monde bactérien, dont les salmonelles, vis-à-vis des conditions du milieu environnant. Le challenge du 21e siècle sera donc d'offrir aux consommateurs une alimentation variée, équilibrée et la plus saine possible, le long de toute la chaîne de production et de distribution.

Le taux élevé de prévalence d'infections à *Salmonella* observé dans notre région, est très inquiétant. Notre étude sur les salmonelles d'origines aviaire et humaine isolées dans la ville de N'Djamena, nous a permis de connaître dans un premier temps, la prévalence des salmonelles dans les hôpitaux et les fermes avicoles de la capitale du Tchad qui correspondent, pour les élevages, à des établissements de faibles moyens.

Cette étude nous offre les premières données de base sur les contaminations humaines et dans les filières poules pondeuses et poulets de chair, par les salmonelles dans la ville de N'Djamena, avec un taux de prévalence élevé aussi bien en élevages (43,75 %) que dans les hôpitaux (8,8 %). Elle nous renseigne aussi sur la diversité et les profils de résistance aux antibiotiques des sérotypes de salmonelles isolés lors de nos deux campagnes d'investigations dans la région de N'Djamena.

La caractérisation génotypique de nos souches par ERIC-PCR, IS-PCR et par Pulsotypage, nous a permis de connaitre les liens phylogénétiques des souches étudiées et par voie de conséquence leurs liens épidémiologiques. La clonalité de certaines souches, retrouvées dans les unités d'échantillonnages différentes, met en évidence la diffusion ou la persistance de certains isolats de *Salmonella* entre les élevages et les humains.

L'hétérogénéité de ces sérotypes nous renseigne sur la diversité des sources et réservoirs potentiels des salmonelles à N'Djamena. La comparaison de nos pulsotypes avec ceux de la banque de données de l'ANSES, dépeint le tableau de la répartition géographique universelle de certains sérotypes, probablement facilitée par la mondialisation des échanges commerciaux (surtout alimentaire) et par les mouvements continuels des hôtes tant animaux que humain.

Au niveau des élevages avicoles impliqués dans notre étude, la biosécurité à l'intérieur des fermes était au « niveau zéro ». De ce constat, la reflexion sera menée en accord avec les aviculteurs sur l'importance d'une surveillance renforcée de la conduite d'élevage, en particulier au niveau des mesures d'hygiène et de biosécurité individuelles et collectives mais aussi au niveau du contrôle de tous les intrants et des équipements de travail.

En effet, les systèmes officiels de surveillance des zoonoses devront être créés pour permettre la collecte de données épidémiologiques, afin de mieux orienter la prévention et l'information. Les efforts doivent être prioritairement concentrés sur les secteurs les plus en amont, par rapport au stade de la distribution et de la consommation.

La réussite de la prévention et du contrôle des maladies causés par les sérotypes de *Salmonella*, dépend donc d'une approche puridisciplinaire qui doit impliquer les cliniciens, les consommateurs, les restaurateurs, les producteurs et distributeurs de poulets de chairs, de pondeuses et les autorités en charge de la santé publique.

Des programmes de formation sur la manipulation et la préparation des aliments par les restaurateurs ou à la maison doivent être instaurés par les autorités compétentes, afin de réduire le risque d'infection humaine par le genre *Salmonella* dans la région de N'Djamena.

Une meilleure connaissance de l'écologie et de la dynamique des salmonelles s'avère donc être une étape importante et primordiale pour atteindre un des objectifs suivants : manipuler et proposer les aliments à base de volailles et prosuits dérivés sans salmonelles.

A la lumière de ces résultats, il est urgent de mener une réflexion globale à court terme:

- avec les producteurs locaux afin d'envisager l'amélioration des pratiques d'hygiène et de sécurité sanitaire dans ces exploitations fortement exposées aux contaminations par *Salmonella*.

- sur des programmes éducatifs plus actifs et stratégies de sensibilisation sur la sécurité biologique des aliments issus de l'aviculture et les risques liées aux salmonelles à l'endroit de la population et des professionnels de l'élevage.

- organiser un atelier de restitution et de formation (3 jours) afin d'élaborer un guide de bonnes pratiques d'hygiène et de biosécurité dans les fermes avicoles.

Et à moyen et long termes :

- Plaider pour la mise en place rapide d'un système officiel de surveillance des zoonoses bactériennes pour la collecte de données épidémiologiques dans le but de mieux orienter l'information et la prévention concernant les bactéries pathogènes.

- Reprendre cette étude en impliquant les élevages avicoles et les autres filières animales des 5 grandes villes du Tchad, y compris N'Djamena. Cette étude sera couplée à une vaste enquête épidémiologique sur les salmonelles dans tous les hôpitaux de ces 5 villes en impliquant un nombre assez important de sujets atteints de maladies digestives ou non. Évaluer les liens phylogénétiques et épidémiologiques de l'ensemble des souches isolées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aarestrup, F.M., Hendriksen, R.S., Lockett, J., Gray, K., Teates, K., McDermott, P.F., White, D.G., Hasman, H., Sorensen, G., Bangtrakulnonth, A., Pornreongwong, S., Pulsrikarn, C., Angulo, F.J., and Gerner-Smidt, P., 2007. International spread of multidrug-resistant *Salmonella* Schwarzengrund in food products. Emerg ing Infectious Diseases; 13: 726-731.

Aarestrup, F.M., Wiuff, C., Molbak, K., Threlfall, E.J., 2003. Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp.? Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 47: 827-829.

Aboun, A. A., Benlmouffok, R., Bougueddour, A., Taril, M., Rezkallah, & Selatnia, L., 2003. Les salmonelloses aviaires diagnostiquées à l'Institut Pasteur d'Algérie de 1988 à 2002: serotypes rencontrés, leurs antibiorésistances et les aspects réglementaires. Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie, 2000/2003. ED. ANDS. Alger, Algeria, 64 : 93–114.

AFNOR, 2002. Méthode horizontale pour la recherche de *Salmonella.* Norme NF, ISO 6579.

Ahmed, A.M., Younis, E.E.A., Ishida, Y., Shimamoto, T., 2009. Genetic basis of multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from diarrheic calves in Egypt. Acta Tropica, 111: 144-149.

Aissa, R.B., Al-Gallas, N., Troudi, H., Belhadj, N., Belhadj, A., 2007. Trends in *Salmonella enterica* serotypes isolated from human, food, animal, and environment in Tunisia, 1994-2004. Journal of Infection, 55: 324-339.

An Vo T.T., Van Duijkeren, E., Fluit, A.C, Wannet, W.J.B., Verbruggen A. J., Maas Henny M.E., and Gaastra, W., 2006. Antibiotic resistance, integrons and *Salmonella* genomic island 1 among non-typhoidal *Salmonella* serovar in The Netherlands. Journal of Antimicrobial Agents; 28(3): 172-179.

Andersson, R.C., Ziprin, R.L., 2001. Bacteriology of *Salmonella*. Inc: "Food borne desease handbook"; vol. 1. Hui YH., Pierson, M.D., Gorham, J.R., editors, Marcel Dekker, New York, USA: 247-321.

Aragaw, K., Molla, B., Muckle, A., Cole, L., Wilkie, E., Poppe, C., Kleer, J., Hildebrandt, G., 2007. The characterization of *Salmonella* serovars isolated from apparently healthy slaughtered pigs at Addis Ababa abattoir, Ethiopia. Preventive Vet.eriray Medicine; 82: 252-261.

Arlet G., Barrett, T.J., Butaye, P., Cloeckaert, A., Mulvey, M.R., White, D.G. 2006. *Salmonella* resistant to extended spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. Microbes Infectious; 8(7):1945-54.

Audrey U. P. and Holt H. D., 1955. A new *Salmonella* serotype (*Salmonella* Colindale) of human origin. International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy; 5(1): 1-3

Baggesen, D. L., Olsen, J. E., et Bisgaard, M., 1992. Plasmid profiles and phages types of *Salmonella* Typhimurium isolated from successive flocks of chickens on three parent stock farms. Avian Pathology; 21: 569–579.

Barrow, P.A. et Lovell, M.A., 1991. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella* enteritidis phage type 4. Avian Pathology; 20: 335-348.

Barrow, P.A., Tucker, J.F., et Simpson, J.M., 1987. Inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with *Salmonella* Typhimurium gram-negative facultatively anaerobic bacteria. Epidemiology and Infection*;* 98: 311-322.

Barrow, P.A. et Wallis, T.S., 2000. Vaccination against *Salmonella* infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. In: Wray C., Wray A. (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing: Oxon, 323-338.

Baumler, A.J., 1997. The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. Trends Microbiology; 5: 318-322.

Baümler, A., Tsolis, R., Heffron, F., 2000. Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic basis. In: Wray C., Wray A. (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing: Oxon, 57-72.

Bell, C. et Kyriakides, A., 2002. *Salmonella* in: Foodborne Pathogens. Hasards, risk analysis and control.Woodhead Publishing Limited, p: 307-334.

Berends, B., Urlings, H., Snijders, J., Van Knapen, F., 1996. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. International Journal of Food Microbiologie; 30: 37-53.

Blondelet-Cadot, C., 2001. *Salmonella typhimurium* DT104. Bactériologie, Epidémiologie, antibiorésistance. Etude bibliographique. Thèse de Medécine Vétérinaire. Alfort, n°112. 89p.

Boase, J., S. Lipsky, P. Simani, S. Smith, C. Skilton, and Greenman S., 1999. Outbreak of *Salmonella* serotype Muenchen infections associated with unpasteurized orange juice—United States and Canada. Morbidity and Mortality Wkly. Rep. 48:582–585.

Boerlin, P., Reid-Smith, R.J., 2008. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. Animal Health Research Review; 9(2): 115-26.

Boerlin, P., Bannerman, E., Jemmi, T., et Bille, J. 1996. Subtyping Listeria monocytogenes isolates genetically related to the swiss epidemic clone. Journal of Clinical Microbiology; 34: 2148-2153.

Bornert G., 2000. Le poulet sans salmonelles: mythe ou réalité. Revue de Medécine Vétérinaire; 1515(12): 1083 pages.

Bouchrif, B., Karraouan, B., Ennaji, M.M., Timinouni, M., 2008. Émergence de la résistance aux quinolones chez *Salmonella* spp. à Casablanca – Maroc_Quinolones-resistant *Salmonella* spp. in Casablanca – Morocco. Médecine et maladies infectieuses; 38 : 615–616.

Bouvet, P. 1995. Salmonelles et Salmonelloses en France. Dans: Sécurité alimentaire du consommateur (Collection STAA). Moll, M. et Moll, Editions Lavoisier. pp :1-20

Bouzidi N., Leila A., Zeghdoudi M., Bensouilah M., Elgroud R., Oucief I. , Granier S. A., Brisabois A., Desquilbet L., Millemann Y., 2012. *Salmonella* contamination of laying-hen flocks in two regions of Algeria. Food Research International; 45: 897–904

Brent, A.J., Oundo, J.O., Mwangi, I., Ochola, L., Lowe, B., Berkley, J.A. 2006. *Salmonella* bacteremia in Kenyan children. Pediatric Infectious Disease Journal; 25: 230–236.

Brisabois, A., 2001. Intérêt et limites des techniques de caractérisation des *Salmonella*. Epidémiologie et Santé Animale; 39: 31-42.

Bryan, L.E. 1998. General mechanisms of resistance to antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 22:1-15

Burr, M.D., Josephson, K.L., Pepper, I.L., 1998. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. Letters of Applied Microbiology; 27:24-30.

Butaye, P., Michael, G.B., Schwarz, S., Barett, T.J., Brisabois A., White, D.G., 2006. The clonal spread of multidrug resistant non-typhoidal *Salmonella* seotypes. Microbes and Infections; 8:1891-1897.

Buxton, J., M. Fyfe, A. King, A. Paccagnella, K. Campbell, and A. Ellis. 1999. Outbreak of *Salmonella* serotype Muenchen infection in the United States and Canada associated with unpasteurized orange juice—the British Columbia experience. Can. Commun. Dis. Rep. 25:161–164.

Cardinale, E., Perrier Gros-Claude, J.D., Tall, F., Gueye, E.F., Cissé, M., Salvat, G., 2005a. Risk factors for contamination og ready – to–eat street–vended poultry dishes in Dakar, Senegal. International Journal of Food Microbiology; 103: 157-165.

Cardinale, E., Perrier Gros-Claude, J.D., Tall, F., Gueye, E.F., Cissé, M., Salvat, G., 2003. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken in Senegal. Revue d'Elevage et de Médécine Vétérinaire des Pays Tropicaux, 56: 1-4.

Cardinale, E., Perrier Gros-Claude, J.D., Rivoal, K., Rose, V., Tall, F., Mead, G.C., Salvat, G., 2005b. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. Journal of Applied Microbiology; 99: 968-977.

Cardinale, E., Tall, F., Gueye, E.F., Cissé, M., Salvat, G., 2004. Risk factors for *Salmonella* entérica subsp. entérica infection in Senegalese broiler chicken flocks. Preventive Veterinary Medicine ; 63: 151-161.

Caron, B. et Menard, M-F. 1997. Les salmonelloses bovines: lésions et diagnostic de laboratoire, Bulletin GTV; 2 : 53-65.

Carroll, P., La Ragione, R.M., Sayers, A.R., et Woodward, M.J., 2004. The O-antigen of *S. enterica* serotype Enteritidis PT 4: A significant factor in gastrointestinal colonisation of young but not nexly hatched chicks. Veterinary Microbiology; 102: 73-85.

Casin, I., Breuil, J., Brisabois, A., Moury, F., Grimont, F., and Collatz, E., 1999. Multidrug resistant human and animal *Salmonella* Typhimurium isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with chromosome and Integron encoded β-lactamase PSE-1. Journal of Infectious Diseases; 179: 1173-1182

Catry B., Laevens, H., Devriese, L.A., Opsomer, G., and De Kruif, A. 2003. Antimicrobial resistance in livestock. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy ; 26: 81-93.

Cattoir, V. 2004. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Pathologie et Biologie; 52: 607-616.

Cave, M.D., Eisenach, K.D., Templeton, G., Salfinger, M., Mazurek, G., Bate, J.H., and Crawford, J.T., 1994. Stability of DNA fingerpoint pattern produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology; 32: 262-266.

CDC. 2008. *Salmonella* surveillance: annual summary, 2006. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.

CDC, 1999. Reptile-associated *salmonellosis*: selected states, 1996-1998. Morbidity and Mortality; Wkly Rep. 48, 1009-1013.

CDC, 2006. *Salmonella* surveillance: annual summary. Available at: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2006/SalmonellaIntroduction2006.pdf;

Chadfield, M., Skov, M., Christensen, J., Madsen, M., Bisgaard, M., 2001. An epidemiological study of *Salmonella enterica* serovar 4, 12:b:- in broiler chickens in Denmark.Veterinary Microbiology; 82(3): 233-47

Chauvin, C., Colin, P., Danan, C., Guillemot, D., Sander, P., 2006. Bulletin épidémiologique, AFSSA, n°23, pp : 1-2.

Chen, S., Zhao, S., White, D.G., Schroeder, C. M., Lu, R., Yang, H., MacDermott, P.F., 2004. Characterization of multiple antimicrobial resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meat. Applied and Environnmental Microbiology; 70: 1-7.

Cheung, T.K., Chu, Y.W., Chu, M.Y., Ma, C.H., Yung, R.W., Kam, K.M., 2005. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 56: 586-589.

Clifton-Hadley, F.A., Breslin, M., Venables, L.M., Sprigings, K.A., Cooles, S.W., Houghton, S., Woodward, M.J., 2002. A laboratory study of an inactivated bivalent iron restricted *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. Veterinary Microbiology; 89(2-3): 167-179.

Cloeckaert, A., et Chaslus-Dancla, E. 2001. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*. Veterinary Research; 32: 291-300.

Cloeckaert A., Praud, K., Doublet, B., Bertini, A., Carattoli, A., Bytaye, P., Imberechts, H., Bertrand, S., Collard, J.M., Arlet, G., Weill, F.X., 2007. Dissemination of an extended-spectrum beta-lactamase bla$_{TEM-52}$ gene carrying Incl1 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France, 2001-2005. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 51: 1872-1875.

CLSI, 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Nineteenth Informational. Supplement. M100-S19. Wayne, PA. USA: Clinical and Laboratory Standard Institute.

CLSI, 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty first Informational Supplement. M100-S21. Wayne, PA. USA: Clinical and Laboratory Standard Institute.

Cobbold, R.N., Rice, D.H., Davis, M.A., Besser, T.E., Hancock, D.D., 2006. Long-term persistence of multi-drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Newport in two dairy herds. Journal of American Veterinary and Medicine Association; 228: 585–591.

Cox, N.A., Berrang, M.E., Cason, J.E., 2000. *Salmonella* Penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs: a review. Poultry Science 79, 1571–1574.

Dahl, J., Wingstrand, A., Nielsen, B., Baggesen, D., 1997. Elimination of *Salmonella* Typhimurium infection by the strategic movement of pigs. Veterinary Research; 140: 679-681.

Davies, R.H., 2004. Salmonellosis. Manuel of Diagnostics Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, OIE, World Organisation for Animal Health. pp: 1018-1032.

Davies, R. H., and Breslin, M., 2003. Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. Veterinary Research; 152: 283–287.

Davies, R.H., and Wray, C., 1996. Persistence of *Salmonella* Enteritidis in poultry units and poultry food. British Poultry Science; 37: 586–589.

Davis, M.A., Hancock,D.A. et Besser, T.E., 2002. Multiresistant clones of *Salmonella enterica*: The importance of dissemination. Journal of Laboratory and Clinic Medicine; 3(140): 135-141.

Delmas, G., Pihier, N., ; De Walk, H., Weill, F.X., Gallay, A., Espie, E., Haeghebaert, S., Vaillant, V., Desenclos, J.C., 2006. Foodborne-diseases outbreaks in France between 1996 and 2005. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, 51(52), 418–422.

Delmas, G., Jourdan-Da Silva, N., Pihier, N., Weill, F.X., Vaillant, V., De Valk, H., 2010. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006-2008. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire; (31-32): 344-8.

Deplano, A., 2002. Méthodes moléculaires de typage et de comparaison des bactéries. 2ème Colloque International Francophone de Bactériologie Vétérinaire. Zoopole Saint Brieuc-Ploufragan.France. pp: 109-110.

Desperez C., 1992. La salmonellose du porc. Thèse Médécine Vétérinaire, ENV Alfort, 130p.

Dijkshoorn, L., Towner, K.J. et Struelens, M., 2001. New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Edited by Elsevier Science. Amsterdam, the Netherlands. pp: 353.

Dione, M. M., Ikumapayi U. N., Saha D., Mohammed, N.I., Geerts, S., Ieven, M., Adegbola, R.A., and Antonio, M., 2011. Clonal differences between Nontyphoidal *Salmonella* (NTS) recovered from children and animals living in close contact in The Gambia. PLoS Neglected Tropical Disease; 5:11-48.

Dunkley K.D., Callaway T.R., Chalova V.I., McReynolds J.L., Hume M.E., Dunkley C.S. Kubena L.F., Nisbet D.J., Ricke S.C., 2009. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. Anaerobe; 15: 26–35

ECOSIT II, 2009. Deuxième enquête sur la consommation et le secteur informel au Tchad. Rapport final, 319 pages.

EDST II, 2004. Deuxième enquête démographique et de santé au Tchad. Rapport final, 181 pages.

EFSA Journal, 2011. EU summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks, 2009. 9(3): 2090p.

EFSA J., 2007. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006; 130p.

Elgroud, R., Zerdoumi, F., Benazzouz, M., Bouzitouna, B.C., Granier, S.A., Fremy, S., Brisabois, A., Millemann, Y., 2009. Characteristics of *Salmonella* contamination of broilers and slaughterhouses in the region Constantine (Algérie). Zoonoses and Public Health, 56: 84-93.

Enwere, G., Biney, E., Cheung, Y. B., Zaman, S. M., Okoko, B., Oluwalana, C., Vaughan, A., Greenwood, B., Adegbola, R. and Cutts, F. T., 2006. Epidemiologic and clinical characteristics of community -acquired invasive bacterial infections in children aged 2–29 months in the Gambia. Pediatric and Infectious Disease Journal; 25: 700–5.

Eriksson, J., Lofstom, C., Aspan, A., Gunnarsson, A., Karlsson, I., Borch, E., De Jong, B. et Radstom, A., 2005. Comparison of genotyping methods by application to *S.* Livingstone strains associated with an outbreak of human salmonellosis. International Journal of food microbiology; 104: 93-103.

Euzeby, J.P., 1997. Les salmonelles et les salmonelloses aviaires dues aux sérovars ubiquistes. Revue de médecine vétérinaire ; 148(1): 61-76.

Feasey, N.A., Dougan, G., Kigsley, R.A., Heyderman, R.S., Gordon, M.A., 2012. Invasive non typhoidal *Salmonella* disease : an emerging and neglected tropical disease in Africa. Lancet ; 372: 2489-2499.

Fedorka-Cray, P., Gray, J.T., Wray, C., 2000. *Salmonella* infections in Pigs. (p.191-207) In: WRAY,C.; WRAY,A. *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing, Wallingford, 463p

Fernandez, J., Fica, A., Ebensperger, G., Calfullan, H., Prat, S., Fernandez, A., Alexandre, M., Heitmann, I., 2003. Analysis of molecular epidemiology of Chilean *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates by pulsed-field gel electrophoresis and bacteriophage typing. Journal of Clinical Microbiology, 41(4) :1617–1622.

Feuillet, L. 2007. Etude comparée des vaccins et des flores bactériennes dans la lutte contre les salmonelles en élevage de poules pondeuses : étude bibliographique. Thèse Medécine Vétérinaire. ENV Alfort, 158p.

Fields, P., Fitzgerald, C., Mc Quiston, J.R., Collins, M.L., Bryant, L.T. et Ghessling, L.L. 2006. Multiplex PCR based on suspension arrays for the molecular determination of serotype in *Salmonella*. Proceedings I3S, Saint Malo, France: 43-46.

Flor, M., Sanchas-Vargas, Maisam, A., Abu-El-Haija, Oscar, G., Gomez-Duarte, 2011. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. Travel Medicine and Infectious Diseases; 9: 263-277.

Frenzen, P.D., Riggs, T.L., Buzby J.C., Breuer, T., Roberts, T., Voetsch, D., et Reddy, S., 1999. *Salmonella* cost estimated update using foodnet data. Food Review; 22: 10-5.

Fresney, J., Renaud, F., Leclercq, R., Riegel, P., 2007. Précis de bactériologie clinique. ESKA/ LACASSAGNE, 2e édition, pp : 1764.

Frye, J.G.,and Fedorka-Cray, P.J.. 2007. Prevalence, distribution and characterisation of ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* isolated from animals in the USA from 1999 to 2003. Internatinal Journal of Antimicrobial Agents; 30(2): 134-42.

Galanis, E., Lo Fo Wong, D. M. A., Patrick, M. E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F.J., Wegener, H.C., 2006. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. Emerging Infectious Diseases; 12(3): 381-8.

Garber, L., Smeltzer, M., Fedorka-Cray, P., Ladely, S., Ferris, K.E., 2003. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in table egg layer house environments and mice in U.S layer houses and associated risk factors. Avian Diseases; 47: 134–142.

Gebreyes, W.A., and Thakur, S. 2005. Multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Muenchen from pigs and potential interserovar transfert of antimicrobial resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; p: 503-511

Giovanacci, I., 1999. Origine des Listeria Monocytogenes et de *Salmonella* présentes sur les produits de découpe de porc. Thèse de doctorat d'université. Université de Bretagne occidentale.:pp: 192.

Giovannacci, I., Queguiner, S., Ragimbeau, C., Salvat, G., Vendeuvre, J. L., Carlier, V., and Erme, G., 2001. Tracing of *Salmonella* spp. in two pork slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping. Journal of Applied Microbiology, 90(1) :131-147.

Giraud, E., Cloerckaert, A., Kerboeuf, D., and Chaslus Dancla, E. 2000. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 44(5): 1223-1228

Giraud, E., Baucheron, S., Cloeckaert A., 2006. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. Microbes and Infection; 8:1937-944.

Glynn, M.K., Bopp, C., Dewitt, W., Dabney, P., Mokhtar, P., and Angulo, F.J. 1998. Emergence of multidrug resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. New England Journal of Medicine; 338: 1333-1338

Golden, N. J., Marks, H. M., Coleman, M. E., Schroeder, C. M., Bauer, N. E., Jr., et Schlosser, W. D., 2008. Review of induced molting by feed removal and contamination of eggs with *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. Veterinary Microbiology; 131: 215–228.

Gordon, M.A., Banda, H.T., Gondwe, M., Gordon, S.B., Boeree, M.J., Walsh, A.L., Corkill, J.E., Hart, C.A., Gilks, C.F., Molyneux, M.E., 2002. Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia among HIV-infected Malawian adults: high mortality and frequent recrudescence. AIDS; 16:1633–41.

Gordon, M.A., Graham, S.M., Walsh, A.L., Wilson, L., Phiri, A., Molyneux, E., Zijlstra, E.E., Heyderman, R.S., Hart, C.A., and Molyneux, M.E. 2008. Epidemics of invasive *Salmonella* enterica serovars enteritidis and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection associated with multidrug resistance among adults and children in Malawi. Clinical Infectious Diseases; 46: 963–969.

Gordon, M.A. 2008. *Salmonella* infections in immunocompromised adults. Journal of Infectious Diseases; 56: 413–422.

Gorman, R. et Adley, C.C., 2004. Characterization of *S. enterica* serotype Typhimurium isolates from human food and animal sources in the republic of Ireland. Journal of Clinical Microbiology; 42(5): 2314-2316.

Graham, S.M., Molyneux, E.M., Walsh, A.L., Cheesbrough, J.S., Molyneux, M.E., Hart, C.A. 2000a. Nontyphoidal *Salmonella* infections of children in tropical Africa. Pediatric and Infectious Diseases Journal; 19: 1189–1196.

Graham, S.M., Walsh, A.L., Molyneux, E.M., Phiri, A.J., Molyneux, M.E., 2000b. Clinical presentation of non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia in Malawian children. Trans. R. Soc. Tropical Medicine and Hygiene; 94: 310–314.

Gransart, C. 1998.Les facteurs de virulence des salmonelles. Thèse de Médécine Vétérinaire. Alfort; n°: 13; 115p.

Grattard, F., 2000. Electrophorèse en champ pulsé (PFGE). In : Fresney, J., Renaud F., Hansen, W., et Bollet, C. Précis de Bactériologie clinique. Paris : Editions ESKA. p. 267-277.

Gray, J., et Fedorka-Cray, P., 2001. Survival and infectivity of *Salmonella* Choleraesuis in swine feces. Journal of Food Prot. 64: 945-949.

Grimont, P.A.D., Weill, F.-X., 2005. Rapport d'activités annuel. CNR des *Salmonella*, unité biodiversité des bactéries pathogènes emergentes. Institut Pasteur, Paris, pp:34-36.

Grimont, P.A.D., 1992. Les marqueurs épidémiologiques des *Salmonella*. Médécine et Maladies Infieuses ; 22 (numéro spécial) : 249-257.

Grimont, P.A.D., Grimont, F. et Bouvet, P., 2000. Molecular basis of the diversity in the genus *Salmonella*.In: *Salmonella* in domestic animals. Wray et col. CABI Publishing, British Library, London, U.K.:1-17.

Grimont, P.A.D., et Weill, F.X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars (WHO Collaborating centre for reference and research on *Salmonella*), 166p.

Guard, O., Delpy, P., Sirol, J., 1973. Les infections à S*almonella* au Tchad. A propos de 152 cas observés à l'Hôpital de Fort Lamy en 1970. Revue d'Elevage et de Médécine Vétérinaire des Pays Tropicaux. pp: 33-57.

Guibourdenche, M. 2005. Rapport d'activité. Centre Collaborateur OMS, pour la référence et la recherche des salmonelles. Institut Pasteur de Paris, France.

Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P.I., Bockemuhl, J., Grimont, P.A., and Weill FX., 2010. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Research Microbiology; 161: 26-29.

Guillon, F., Chasset, P., Le Hello, S., Granier, S.A. 2013. Investigation épidémiologique du premier foyer lié à *Salmonella* Kentucky hautement résistante aux fluoroquinolones détecté en élevage avicole en France. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation; 57:22-23.

Haeghebaert, S., LE Querrec, F., Bouvet, P., Gallaya, A., Espie, E., Vaillant, V., 2002. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. B.E.H., 50: 249-253.

Hanes, D., 2003. Non typhoidal *Salmonella*. In: Miliotis, N., Bier, J. (Eds.) International Handbook of Foodborne Pathogens, Marcel Dekker. New York, 137-149.

Hendriksen, R.S., Antonio, R.V., Karlsmose, S., Danilo, M.A., Wong, L.F., Jensen A.B., Wegener, H.C., and Aarestrup, F.M., 2011. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organisation global foodborne infections network country data bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. Foodborne Pathogens Diseases; 8(8): 1-14.

Henzler, D.J., Ebel, E., Sanders, J., Kradel, D., Mason, J., 1994. *Salmonella* Enteritidis in eggs from commercial chickens layer flocks implicated in human outbreak. Avian Diseases; 38(1): 37-43.

Hill, P.C., Onyeama, C.O., Ikumapayi, U.N., Secka, O., Ameyaw, S., Simmonds, N., Donkor, S.A., Howie, S.R., Tapgun, M., Corrah, T., Adegbola, R.A. 2007. Bacteraemia in patients admitted to an urban hospital in West Africa. BMC Infectious Diseases; 7: 2-7.

Hollinger, K., Wray, C., Evans, S., Pascoe, S., Chappell, S., and Jones, Y. 1998. *Salmonella typhimurium* DT104 in cattle in Great Britain. Journal of American Veterinary Association; 213: 1732-1743.

Hopkins, K.L., Davies, R.H., Threlfall E.J., 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *E.* coli and *Salmonella*: recent developments. International Journal of Antimicrobial Agents; 25: 358-373.

Hulton, C.S.J., Higgins, F., and Sharp, P.M., 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *E*. Coli, *Salmonella* Typhimurium and other anterobacteria. Molecules and Microbiology ; 5: 825-834.

Humbert, F., 1992. Salmonelles et filière avicole: aspects épidémiologiques et incidence sur la santé publique. Point vétérinaire ; 24(145) : 201-206.

Humbert,F. 1998. Les Salmonelloses. Manuel de Bactériologie Alimentaire. Ed. Polytechnica. Paris, France.

Humbert, F. et Salvat, G., 1997. Risques de transmission des salmonelles en aviculture : Détection et prévention en Europe. Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz., 16(1):83-90,

Humphrey, T.J., 2006. Are happy chickens safer chickens? Poultry welfare and disease susceptibility British Poultry Science; 47: 379–391.

Humphrey, T.J., 1999. Contamination of eggs and poultry meat with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. In *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals: Epidemiology, pathogenesis, and control. First edition A.M. SAEED, Iowa State Press, Ames, Iowa, 183-192.

Huneau-Salaün, A., Chemaly, M., Le Bouquin, S., Lalande, F., Petetin, I., Rouxel, S., *et al.*, 2009. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. enterica contamination in 519 French laying hen flocks at end of the laying period. Preventive Veterinary Medicine; 89: 51–58.

INSEED, 2009. Note de cadrage macroéconomique. Prévisions 2006-2009. Rapport du département des synthèses et statistiques économiques, 109 pages.

INSEED, 2011. Deuxième Recensement Général de la Population et de l'Habitat en 2009 au Tchad (RGPH2). Rapport provisoire, 219 pages.

IRS (Inventaire du Réseau *Salmonell,*Anses*)*, 2012. Inventaire des *Salmonella* d'origine non humaine en 2009 en France ; 104p.

Jarvelainen, H.A., Galmiche, A. and Zychlinsky A., 2003. Caspase-1 activation by *Salmonella*. Trends Cell Biology; 13: 204-209.

Jones, T.F., Ingram, L.A., Cieslak, P.R., Vugia, D.J., Tobin-D'Angelo, M., Hurd, S., Medus, C., Cronquist, A., Angulo, F.J., 2008. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. Journal of Infectious Diseases; 198: 109-114.

Jouy, E., Proux, K., Humbet, F., Houdayer, C., Lalande, F., Picault, J.P., Salvat, G., 2002. Détection des infections à *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium chez *Gallus gallus* à l'aide d'une technique ELISA. Evaluation de la méthode et comparaison avec la détection bactériologique en élevage. AFSSA-site de Ploufragan. Sciences et techniques avicoles ; 38 : 11-18.

Kariuki, S., Revathi, G., Kiiro, J., Lowe, B., Berkley, J.A., and Hart, C.A., 2006. Decreasing prevalence of antimicrobial resistance in NTS isolated from children with bacteraemia in a rural district hospital, Kenya. International Journal of Antimicrobial Agents; 28: 166-171.

Keddy, K.H., Dwarika, S., Crowther, P., Perovic, O., Wadula, J., Hoosen, A., Sooka, A., Crewe-Brown, H.H., Smith, A.M., 2009. Genotypic and demographic characterization of invasive isolates of *S.* Typhimurium in HIV coinfected patients in South Africa. J Infect Dev Ctries; 3:585–592

Kennedy, M., Villar, R.,Vugia, D.J., Rabatsky-Ehr, T., Farley, M.M., Pass, M., Smith, K.; Smith, P., Cieslak, P.R., Imhoff, B. et Griffin, P.M., 2004. Hospitlizations and Deaths due to *Salmonella* infections. FoodNet, 1996-1999. Clinical Infectious Diseases; 38 (3): 142-148.

Kim, A., Lee, Y.J., Kang, M.S., Kwag, S.I., Cho, J.K., 2007. Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. Journal of Veterinary Medicine and Science; 8: 155–161.

Korsak, N., Clinquart, A., Daube, G., 2004. *Salmonella* spp. dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique ? Annales de Médécine Vétérianire; 148 : 174-193.

Lam, S., et Roth, J.R., 1983. *IS 200*: A *Salmonella*-specific insertion sequence. Cell; 34: 951-960.

Lauderdale, T.L., Aarestrup, F.M., Chen, P.C., Lai, J.F., Wang, H.Y., Shian, Y.R., Huang, I.W., Hung, C.L., 2006. Multidrug resistance among different serotypes of clinical *Salmonella* isolated in Taiwan. Diagnostic Microbiology and infectious diseases ; 55: 148-155.

Le Hello, S., Hendriksen, R.S., Doublet, B.t., Fisher, I., Nielsen, E. M., Whichard, J.M., Bouchrif, B., Fashae, K., Granier, S.A., Da Silva, N.J., Cloeckaert, A., Threlfall, E. J., Angulo, F.J., Aarestrup, F. M., Wain, J., and Weill, F.-X., 2011. International Spread of an Epidemic Population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 Resistant to Ciprofloxacin. J. Infect. Dis. 204: 675–84.

Le Hello, S., Harrois, D., Bouchrif, B., Sontag, L., Elhani, D., Guibert, V., Zerouali, K., Weill, F.-X., 2013. Highly drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198-X1: a microbiological study. The lancet. http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70141-5

Le Minor, L., et Popoff, M.Y., 1987. Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*. Centre collaborateur O.M.S. de référence et de recherche pour les *Salmonella*. Institut Pasteur. Paris. 1-156

Le Minor, L., 1988. Comment désigner les sérotypes de *Salmonella*? Médecine et maladies infectieuses; 12: 859-862.

Le Minor, L., 1992. Taxonomie et Nomenclature des salmonelles. Médecine et maladies infectieuses; 22 : 246-248.

Le Minor, L., Chamoiseau, G., Barbé, E., Charie-Marsaines, C., Egron, L., 1969. Ten new *Salmonella* serotypes isolated in Chad. Annales de l'Institut Pasteur, 116(6) : 775-780.

Le Minor, L., et Véron, M., 1989. Bactériologie médicale. 2nd éd. Flammarion, Paris, 1107 : 411-426.

Le Minor, L., Vigier, M., Segonne, J., Petit, M.T., Collard, N., 1965. Four new serotypes of *Salmonella* isolated in Chad. Ann. Inst. Pasteur, 109(3): 445-447.

Le Minor, L.,Veron, M., et Popoff, M.Y., 1982.Taxonomie des *Salmonella*. Annales de Microbiologie 133B: 223-243.

Lebeaux D., Zarrouk V., Petrover D., Nicolas-Chanoine M.-H., Fantin B., 2012. *Salmonella* Colindale osteomyelitis in an immunocompetent female patient. Médecine et maladies infectieuses; 42: 36–43

Lettelier, A., Arsenault, J., Quessy, S., Boulianne, M., 2006. Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. caecal colonization in broiler and turkey flocks in Quebec, Canada. International Symposium on *Salmonella* and Salmonellosis (I3S) Proceedings, Saint Malo, France, 343-347.

Li, X.Z., Mehrotra, M., Ghimire, S., Adewoye, L., 2007. Beta-lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. Veterinay Microbiology; 15(3-4): 197-214.

Li, Y., Yan-Hong, F., Heng-Weng, Z., Pei, S., Jian-Zhong, W., and Zhong-Jun, Y., 2011. The analysis of Eric PCR genomic polymorphism of *Salmonella* isolated strains in pig carcass. Journal of Animal and Veterinary Advances. 10(13): 1694-1698.

Liebana, E., 2002. Molecular tools for epidemiological investigations of *S.enterica subspecies enterica* infections. Research in Veterinay Science, 72: 169-175.

Liebana, E., Garcia-Migura, L., Clouting, C., Clifton-Hadley, F.A., Breslin, M. et Davies, R.H. 2003. Molecular fingerprinting evidence of the contribution of wildlife vectors in the maintenance of *Salmonella* Enteritidis infection in layer farms. Journal of Applied Microbiology; 94: 1024-1029.

Liesegang, A. et H. Tschäpe. 2002. Modified PFGE method for DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* and *Escherichia* Coli strains. International Journal of Medicine and Microbiology; 291: 645-48.

Lim, H., Lee, K.H., Hong, C.H., Bahk, G.J., and Choi, W.S., 2005. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. International Journal of Food Microbiology; 105: 411-418.

Lo Fo Wong D., and Hald, T., 2000. *Salmonella* in pork (SALINPORK): pre-harvest and harvest control options based on epidemiologic, diagnostic and economic research. Final report to European Commission of Project FAIR1 CT95-0400: 251 p.

Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Frazil, A., Hoekstra, R.M., 2010. The global burden of non typhoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clinical and Infectious Diseases; 50: 882-889.

Mammina, C., Talini, M., Pontello, M., Di Notto, A.M. et Nastasi, A., 2003. Circulation clonale de *Salmonella enterica* sérovar Heidelberg en Italie. Rapport Eurosurveillance, 8(11): 222-225.

Maré, L., Dicks, L.M.T. et Van der Walt, M.L., 2001. Characterisation of south african isolates of *S.*Enteritidis by phage typing numerical analysis of RAPD-PCR banding patterns and plasmid profiles. International journal of food microbiology 64: 237-245.

Martel, J.L. ; et Prave, M., 1994. Évolution du risque salmonellique en médecine vétérinaire. Rev. Med. Vet. 145 : 563-569

Matsutani, S., et Ohtsubo, E., 1993. Distribution of the *Shigella* Sonnei insertion elements in enterobacteriacae. Gene, 127: 111-115.

Mc Dowell SWJ., and Spence A., 1997. Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolates from animal sources in Northern Ireland. Irish Veterinary Journal; 50: 364-368.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 1999. Food related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases; 5: 607-25.

MEDP, 2008. Secteur de l'élevage au Tchad : Etats des lieux et perspectives, 93p.

Melhado, O., Op de Beke A., et Simone, A., 2009. Tchad : Questions générales. Rapport du FMI, 9 (67) : 1-49

MEN, 2002. Stratégie nationale pour la réforme du secteur éducatif au Tchad. Direction des projets de l'éducation nationale. Rapport final, 172 pages.

Michael, G.B., Butaye, P., Cloeckaert, A., Scharwz, S., 2006. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. Microbes and Infection; 8: 1898-1914.

Milledge, J., Calis, J.C., Graham, S.M., Phiri, A., Wilson, L.K., Soko, D., Mbvwinji, M., Walsh, A.L., Rogerson, S.R., Molyneux, M.E., 2005. Aetiology of neonatal sepsis in Blantyre, Malawi; 1996–2001. Annales and Tropical Pediatry. 25:101–10.

Millemann, Y., Lesage-Descauses, M.C., Lafont, J.P., and Chaslus-Dancla, E., 1996. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiologic studies of *Salmonella*. FEMS Immunology Medicine and Microbiology; 14:129-134.

Millemann, Y., Gaubert, S., Remy, D., Colmin, C., 2000. Evaluation of IS*200*-PCR and comparison with other molecular markers to trace *Salmonella enterica* subsp.*enterica* serotype Typhimurium bovine isolates from farm to meat. Journal of Clinical Microbiology; 38(6): 2204-2209.

Millemann, Y., 1998a. Les marqueurs épidémiologiques des salmonelles, Vet. Res., 29 : 3-19.

Millemann, Y., Evans, S., Cook, A., Sischo, B., Chazel, M., Buret, Y., 2010. Salmonellosis. In: Infectious and Parasitic Disease of Livestock, Lavoisier, Paris. 75:947-984

Millemann, Y., Lesage-Descauses, M.-C., Chaslus-Dancla, E., and Lafont J.-P., 1995. Value of plasmid profiling, ribotyping and detection of *IS200* for tracing avian isolates of *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis. Journal of Clinical Microbiology; 33: 173-179.

Millemann,Y. 1998b. Pathogenicity of *Salmonella*: Virulence factors and study models. Veterinary Research; 29: 385-407.

Mitchell, M., Shane, S., 2000. Preliminary findings of *Salmonella* spp. in captive green iguanas (*Iguana iguana*) and their environment. Preventive Veterinary Medicine; 45: 297-304.

Mølbak, K., Gerner-Smidt, P., et Wegener, H.C., 2002. Increasing quinolone eesistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. Emerging Infectious Disease; 8(5): 514–515.

Moore, J.E., Murray, L., Fanning, S., Cormican, M., Daly, M., Delappe, N., Morgan, B., et Murphy, P.G., 2003. Comparison of phenotypic and genotypic characteristics of *S.* Bredeney associated with a poultry-related outbreak of gastroenteritics in northern ireland. Journal of infection; 47: 33-39.

Morpeth, S.C., Ramadhani, H.O., Crump, J.A., 2009. Invasive non-Typhi *Salmonella* disease in Africa. Clinic and Infectious Disease; 49: 606–611.

Moury, F., Frémy, S. et Brisabois, A., 2006. Épidémiologie des salmonelles d'origine non humaine, Données du réseau *Salmonella* – Année 2005. Bulletin épidémiologique de l'AFSSA, N° 20/ mars 2006: 1-6.

MSP, 2007. Annuaire statistique sanitaire du Tchad. Division de la statistique, 427p.

Muhammad, M., Muhammad, L. U., Ambali, A. G., Mani, A. U., Azard ,S., Barco, L., 2010. Prevalence of *Salmonella* associated with chick mortality at hatching and their susceptibility to antimicrobial agents. Veterinary Microbiology, 140:131–135

Mulvey, M.R., Boyd, D.A., Olson, A.B., Doublet, B., Cloerckaert A., 2006. The genetic of *Salmonella genomic island* 1, Microbes and Infections; 8: 1915-1922.

Murase, T., Senjyu, K., Maeda, T., Tanaka, M., Sakae, H., Matsumoto, Y., Kaneda, Y., Ito, T., Otsuki, K., 2001. Monitoring of chicken houses and an attached egg-processing facility in a laying farm for *Salmonella* contamination between 1994 and 1998. Journal of Food Protection. 64, 1912–1916.

Murray, A., Mather, H., Coia, J.E., Brown, D.J., 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance in nalidixic-acid-susceptible strains of *Salmonella enterica* isolated in Scotland. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 62: 1153–5.

Murray, C., 2000. Environmental aspects of *Salmonella*. In: Wray C., Wray A. (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing: Oxon, 265-283.

Murray, M.J., 1986. *Salmonella*: virulence factors and enteric salmonellosis. Journal of American Veterinary Medicine Association; 189: 145-147.

Nakamura, M., Nagamine, N., Norimatsu, M., Suzuki, S., Ohishi, K., Kijima, M., Tamura, Y., Sato, S., 1993. The ability of *Salmonella* Enteritidis isolated from chicks imported from England to cause transovarian infection. Journal of Veterinary and Medicine Science; 55(1): 135-136

Namata, H., Méroc, E., Aerts, M., Faes, C., Cortinas Abrahantes, J., Imberechts, H., Mintiens, J., 2008. *Salmonella* in Belgian laying hens: An identification of risk factors. Preventive Veterinary Medicine; 83: 323–336.

Nisbet, D.J. et Ziprin, R.L. 2001. Salmonellosis in animals. In: Foodborne Disease Handbook. Second edition. Vol. 1: Bacterial Pathogens.edited by Hui,Y.H.et col. Marcel Dekker Inc., NewYork-Basel.:265-284.

O'Brien, S.J., et de Valk, H., 2003. *Salmonella* ''old'' organism, continued challenges. Euro Surveillance; 8:29–31.

Old, D.C., Rankin, S.C. et Crichton, P.B., 1999. Assesment of strain relatedness among *Salmonella* serotypes Salinetis, Duisbourg and San diego by biotyping, ribotyping, *IS 200* fingerprinting and PFGE. Journal of clinical microbiology; 37: 1687-1692.

Olsen, J.E., 2005. Studies of zoonotic *Salmonella*: taxonomy, detection and typing and pathogenesis, ed: Samfundsgrafik, Denmark, 146 p.

Olsen, S.J., MacKinnon, L.C., Goulding, J.S0, Bean, N.H., Slutsker, L., 2000. Surveillance for foodborne disease outbreaks, United States, 1993-1997. MMWR CDC Surveill. Summ. 49(1):1–64.

Olsen, J.E., Skov, M.N., Angen, O., Threlfal, E.J. et Bisgaard, M. 1997. Genomic relationships between selected phage types of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium defined by ribotyping, IS 200 typing and PFGE. Microbiology 14, 1471-1479.

Olsen, J.E., Sorensen, M., Brown, D.J., Gaarslev, K. et Bisgaard, M. 1992. Plasmid profiles as an epidemiological marker in *Salmonella enterica* serovar Berta infections. Comparison of isolates obtained from humans and poultry. APMIS, 100 : 221-228.

Ottomo, Y., Abe, K., Odagiri, K., Shiroto, A., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y., 2007. Detection of *Salmonella* in spent hens and eggs associated with foodborne infections. Avian Diseases; 51:578-83

Parlement Européen et Conseil de l'Uion Européenne. Report to the European Parliament and to the Council on the measures to be put in force for the control and prevention of zoonoses – Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on the moniroting of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC - Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on the control of *salmonella* and other food-borne zoonotic agents and amending Council Directives 64/432/EEC, 72/462/EEC and 90/539/EEC, COM (2001) 452 final, 01.08.2001.

Pasmans, F., Martel, A., Boyen, P., Vandekerchove, D., Wybo, I., Van Immerseel, F., Heyndrickx, M., Collard, J.M., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2005. Characterization of *Salmonella* isolates from captive lizards. Veterinary Microbiology; 110: 285-291.

Pedro, A.N., et Szyfres, B., 1989. Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux », Edition OIE Office international des épizooties.

Perpezat, A., Perreau, P., Thomé, M., Vigier, M., 1964. Différents sérotypes de salmonelles isolés en république du Tchad. Revue Elevage et Médécine Vétérinaire des Pays Tropicaux, 17(1): 35-41.

Peters, T.M., Maguire, C., Threlfall, E.J., Fisher, I.S., Gill, N., Gatto, A.J., 2003. An European collaboration for DNA fingerprinting for Salm-gene project. Euro Surveillance ; 8: 46-50.

Peyret, M., 1994. Mécanismes de résistance aux antibiotiques. In : J. Freney *et al.* Manuel de bactériologie clinique. Vol. 1, coll. Option Bio, Paris. p: 209-226

Popoff, M.Y., 2001. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institute Pasteur, Paris, France.

Popoff, M.Y, Bockemuhl, J, Gheesling L.L, 2003. Supplement 2001 (no.45) to the Kauffmann-White scheme. Research in Microbiology. 154(3), 173-174.

Popoff, M.Y., Bockemühl, J., Gheesling, L.L., 2004. Supplement 2002 (no 46) to the Kauffman-White scheme. Research in Microbiology ; 155: 568-570.

Popoff, M.Y., et Norel, F., 1992. Bases moléculaires de la pathogénicité de *Salmonella*. Médécine et Maladies Infectieuses ; 22: 310-324.

Poppe, C., Smart, N., Khakhria, R., Johnson, W., Spika, J., and Prescott, J. 1998. *Salmonella typhimurium* DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. Can. Vet. J.; 38(9): 559-565.

Proctor, M. E., Hamacher, M., Tortorello, M. L., Archer J. R., and Davis, J. P., 2001. Multistate outbreak of *Salmonella* serovar Muenchen infections associated with alfalfa sprouts grown from seeds treated with calcium hypochlorite. Journal of Clinical Microbiology ; 39: 3461–3465.

Protais, J., Colin, P., Bosher, E., Eono., 1997. *Salmonella* Enteritidis et l'élevage de poulets de chair: différentes voies de contamination horizontale, CNEVA, In : *Salmonella* and salmonellosis proceedings, Ploufragan.

Protais, J., Lahellec, C., 1989. Transmission verticale des salmonelles chez la poule : exemple de *Salmonella* Enteritidis. Science des aliments, N° hors série X 9 : 43-50.

Proux, K., Cariolet, R., Fravalo, P., Houdayer, C., Keranflech, A., Madec, F., 2001. Contamination of pigs by nose-to-nose contact or airborne transmission of *S.* Typhimurium. Veterinary Research; 32: 591-600.

Randall, I.P., Cooles, S.W., Osborn, M.K., Piddock, I.J.V., Woodward, M.J., 2004. Antibiotics resistance genes, integrons, and multiple antibiotic resistance in thirty five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from human and animals in the UK. Journal Antimicrobial Chemotherapy; 53:208-16.

Rapport CODA-CERVA, 2010. *Salmonella* serotypes analysed : Evolution among Poultry, Cattle and Pig Isolates from 1999 to 2010 with Results of Antimicrobial Resistance Testing. Belgian Reference Laboratory for *Salmonella*, animal health. Pp : 1-47

Rasschaert, G., Houf, K., Imberechts, H., Grijspeerdt, K., De Zutter, L., Heyndrickx, M., 2005. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella* enterica isolates. Journal of Clinical Microbiology; 43(8): 3615–3623.

Rhen, M., and Dorman, C.J., 2005. Hierarchical gene regulators adapt *Salmonella enterica* to its host milieus. International Journal of Medicine and Microbiology; 294: 487-502.

Rhen, M.C., O'Connor, D. and Sukupolvi, S., 1992. The outer membrane permeability mutation of the virulence-associated plasmid of *Salmonella* Typhimurium is located in a *traT*-like gene. FEMS Microbiology Letters; 552: 145–154

Ribot, E. M., Fair, M. A., Gautom, R., Cameron, D. N., Hunter, S. B., Swaminathan, B., and Barrett., T. J., 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog. Dis. 359-67.

Riggi, A., 1999. Contribution à l'étude de l'efficacité d'une flore de barrière indéfinie contre la colonisation intestinale par les salmonelles en poulet de chair. Thèse de doctorat vétérinaire, E.N.V.A, Maisons Alfort ; n°102. pp : 182.

Rivoal, K., Protais, J., Quéguiner, S., Boscher, E., Chidaine, B., Rose, V., Gautiet, M., Baron, F., Grosset, N., Ernel G., et Salvat, G., 2009. Use of PFGE to characterize the heterogeneity and clonality of *Salmonella* serotype Enteritidis, Typhimurium and Infantis isolates obtained from whole liquid eggs. International Journal Food Microbiology; 129: 180-186.

Rose, N., Beaudeau, F., Drouin, P., Toux, J.Y., Rose, V., Colin, P., 1999. Risk factors for *Salmonella enterica subsp. enterica* contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. Preventive Veterinary Medicine; 39: 265-277.

Rostagno, M.H., Wesley, I., Trampel, D. et Hurd, H., 2006. *Salmonella* prevalence in market-age turkeys on farm and at slaughter. Poultry science. 85(10): 1838-1842.

Roy P.H., 2001. Dissémination de la résistance aux antibiotiques: le génie génétique à l'œuvre chez les bactéries. M/S, n° 8 et 9. Vol. 13

Sackey, B.A., Mensah, P., Collison, E., et Sakyi-Dawson, E., 2001. Campylobacter, *Salmonella*, *Shigella* and *E. coli* in live and dressed poultry from metropolitan ACCRA. International Journal of food Microbiology, 71: 21-28.

Santos, R.L. et Baumler, A.J., 2004. Cell tropism of *Salmonella enterica*. International Journal of Medicine and Microbiology; 294: 225-233

Sarwari, A., Magder, L., Levine, P., McNamara, A., Knower, S., Armstrong, G., Etzel, R., Hollings worth, J., Morris, G., 2001. Serotypes distribution of *Salmonella* isolates from food animals after slaughter differs from that of isolates found in humans. Infectious Disease Journal; 183: 1295-99.

Saunders, N.A., 2001. Insertion Sequence (IS) Typing and Oligotyping. In:-Dijkshoorn,L., Towner, K.J. et Struelens, M., 2001. New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Elsevier Science. Amsterdam, The Nederlands. Pp : 249-262..

Schlumberger M.C., Muller A.J., Ehrbar K. *et al.* 2005. Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella Sip*A injection into host cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 12548-12553.

Schneider, M.& de Bruijn, F.J. , 1996. REP-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. World Journal of Microbiology and Biotechnology; 12: 163-174.

Schneitz, C. et Mead, G., 2000. Competitive exclusion. In: *Salmonella* in domestic animals. Edited by Wray,C. et Wray,A.CABI publisching, London,UK.:301-322.

Schwartz, D. C., and Cantor, C. R., 1984. Separation of yeast chromosome-sized by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37. p. 67-75.

Schwarz, S., and Chaslus-Dancla, E., 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanism of resistance. Veterinary Research; 32: 201-225

Seydi, M., Soumare, M., Sow, A.I., Diop, S.A., Sow, I., Dieng, A.B., Dia, M.L., Diop, B.M., Sow, P.S., 2008. Non-typhoidal *Salmonella* bacteremia cases in AIDS patients in a Dakar University Hospital (Senegal). Médécine et maladies infectieuses; 38: 25-28.

Seyfarth, A.M., et Schicklmaier, P., 1999. Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. FEMS Microbiology Letters; 170: 251-256

Sharples, G.J., et Lloyd, R.G., 1990. A novel repeated sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. Nucleic Acids Reseach; 18: 6503-6508.

Shaw, A.V., Reddy, E.A., Crump, J.A., 2008. Etiology of community acquired bloodstream infections in Africa [abstract L-620]. In: Program and abstracts of the 46th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (Washington, DC). Alexandria, VA: Infectious Diseases Society of America.

Siemon, C.E., Bahnson, P.B. and Gebreyes, W.A., 2007. Comparative investigation of prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* between pasture and conventionally reared poultry. Avian Diseases; 51: 112-117

Sigaúque, B., Roca, A., Mandomando, I., Morais, L., Quintó, L., Sacarlal, J., Macete, E., Nhamposa, T., Machevo, S., Aide, P., Bassat, Q., Bardají, A., Nhalungo, D., Soriano-Gabarró, M., Flannery, B., Menendez, C., Levine, M.M., Alonso, P.L., 2009. Community-acquired bacteremia among children admitted to a rural hospital in Mozambique. Pediatric Infectious Diseases Journal; 28: 108-113.

Singer, J.T., Optiz, H.M., Gersman, M., Hall, M.H., Muniz, I.G., et Rao, S.V., 1992. Molecular charactezisation of *Salmonella* Enteritidis isolated from poultry and poultry farms environments. Avian Diseases; 36: 324-333.

Smith, B.P., 2002. Salmonellosis in ruminants. *In* Large animal internal medicine (B.P. Smith, ed.).

Sojka, W. J.; Salvin, G.; Brand, T. F. and Davies, G.,1972. A survey of drug resistance in *Salmonella* isolated from animal in England and Wales. British Veterinary; 128: 189-197.

Stanley, J., et Baquar, N. 1994. Phylogenetics of *Salmonella* Enteritidis. International Journal of Food Microbiology. 21 (1-2):79-87.

Stanley, J., Jones, J.C., and Threlfall, E.J., 1991. Evolutionary lines among *S.* Enteritidis phage types are identified by insertion sequence *IS200* distribution. FEMS Microbiology letters, 82:83-90.

Stevens, A., Kaboré, Y., Perrier-Gros-Claude, J.D., Millemann, Y., Brisabois, A., Catteau, A., Cavin, J.F., Dufour, B., 2006. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from beef sampled from slaughterhouse and from retailers in Dakar (Senegal). International Journal of Food Microbiology, 110: 178-186.

Stevens, A., Kerouanton, A., Marault, M., Millemann, Y., Brisabois, A., Cavin, J.F., Dufour, B., 2008. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed field gel electrophoresis and antibiotic testing. International Journal of Food Microbiology; 123: 191-197.

Struelens, M.J., De Ryck, R., Deplano, A., Dijkshoorn, L., Towner, K.J., Struelens, M., 2001. New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. New York: Elsevier. Analysis of microbial genomic macrorestriction patterns by PFGE typing; pp. 159–176.

Threlfall, E.J., 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food-and-water-borne infections. FEMS Microbiology Review; 26: 141-148.

Threlfall, E.J., Fisher, I.S.T., Berghold, C., Gerner-Smidt, P., Tschape ,H., Cormican, M., Luzzi, I., Schneider, F., Wannet, W., Machado, J., Edwards, G., 2003. Résistance aux antibiotiques d'isolats de *Salmonella enterica* issu des cas de salmonellose humaine en Europe en 2000 : résultat d'une surveillance multicentrique internationale. Eurosurveillance; 8(2): 41-45.

Threlfall, E.J., Ward, L.R., et Rowe, B., 1997. Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in endemic *S. typhimurium* DT104 in England and Walles. Eurosurveillance; 2: 81-84

Traub, R.J., Monis, P.T., Robertson, I.D., 2005. Molecular epidemiology : a multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses. International Journal for Parasitology; 35: 1295-1307.

Uche Orji, M., Onuigbo, H.C., et Mbata, T.I., 2005. Isolation of *Salmonella* from poultry droppings and other environmental sources in Awka, Nigeria. International Journal of Infectious Diseases; 9: 86-9.

Vaillant, V., Baron, S., Benrekassa, J., Calavas, D., De Valk, H., Delorme, C., Gouffé-Benadiba, L., Henry, V., Marcé, C., Santolini, J., 2002. Risques microbiologiques alimentaires dans les produits d'origine animale : surveillance et évaluation. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, (HS): 51p.

Vaillant, V., De Valk, H., Baron, S., 2004. Salmonelloses non typhiques. In : Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France. [en ligne]. [http://www.invs.sante.fr/publications/2004/inf_origine_alimentaire/inf_origine_alimentaire.pdf], consulté le 19/05/2011. p : 92-105.

Van Asten, A..J., and Van Dijk, J.E., 2005. Distribution of 'classic' virulence factors among *Salmonella* spp. FEMS Immunology Medicine and Microbiology; 44: 251-259.

Van Immerseel, F., De Buck, J., Boyen, F., Pasmans, F., Bertrand, S., Collard, J.M., Saegerman, C., Hooyberghs, J., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., 2005. *Salmonella* dans la viande de volaille et dans les oeufs: Un danger pour le consommateur qui demande la mise en place d'un programme de lutte efficace. Annales de Médecine Vétérinaire ; 149 : 34–48.

Van Duyne, M.S., Fitzgerald, C., Oxford, W., Fair, M.A., Virgine, F., Barrett, T.J. et Fields, P., 2006. *Salmonella* serotyping: Variably expressed O facteur 6 in serogroupe C2. Proceedings I3S, Saint Malo,France: 39-41.

Van Lith , L.A.J.T., et Arts, H.J.M., 1994. PCR identification of *Salmonella* serotypes. Letterts Applied Microbiology; 19: 273-276.

Vandenberg, O., Nyarukweba, D.Z., Ndeba, P.M., Hendriksen, R.S., Barzilay, E.J., Schirvel, C., Bisimwa, B.B., Collard, J.M., Aidara, K.A., Aarestrup, F.M., 2010. Microbiologic and clinical features of *Salmonella* species isolated from bacteremic children in eastern Democratic Republic of Congo. Pediatric Infectious Diseases Journal; 29: 504–510.

Versalovic, J., M. Schneider, F. J., de Bruijn, and J. R. Lupski. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods Molecular and Cell Biology; 5**:** 25-*40*

Vigier, M., Chamoiseau, G., 1967. Différents sérotypes de *Salmonella* isolés au Tchad. Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, 20(1): 61-65.

Vlieghe, E., Phoba, M.F., Muyembe Tamfun, J.J., Jacobs, J., 2009. Antibiotic resistance among bacterial pathogens in Central Africa: a review of the published literature between 1955 and 2008. International Journal of Antimicrobial Agents; 34: 295-303.

Voetsch, A.C., Van Gilder, T.J., Angulo, F.J., Farleu, M.M., Shallow, S., Marcus, R., Cieslak, P.R., Deneen, V.C., and Tauxe, R.V., 2004. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. CID; 38: 127-134.

Wachsmuth, I.K., Kiehlbauch, J.A., Bopp, C.A., Cameron, D.N, Strockbine, N.A, Wells, J.G, and. Blake, P.A., 1991. The use of plasmid profiles and nucleic acid probes in epidemiologic investigation of foodborne, diarrheal disease. International Journal of Food Microbiology; 12:77-9.

Wales, A., Breslin, M., Carter, B., Sayers, R., Davies, R., 2007. A longitudinal study of environmental *Salmonella* contamination in caged and free range layer flocks. Avian Pathology; 36: 187–197.

Walker; R.A., Lawson, A.J., Lindsay, E.A., Ward, L.R., Wright, P.A., Bolton, F.J., Wareing, D.R.A., Corkish, J.D., Davies, R.H., Threlfall, E.J., 2000. Decreased susceptibility to ciproflaxin in outbreak associated multiresistant *S. typhimurium* DT104. Veterinary Research; 147: 395-396.

Wasyl, D., Hoszowski, A., 2012. First isolation of ESBL-producing *Salmonella* and emergence of multiresistant *Salmonella* Kentucky in turkey in Poland. Food Research Internatinal; 45: 958-961.

Wattiau, P., Van Hessche, M., Schlicker, C., Vander Veken, H., Imberechts, H., 2008. Comparison of classical serotyping and Premi Test assay for routine identification of common *Salmonella enterica* serovars. Journal of clinical microbiology; 46: 4037-4040.

Waterman, S.R. et Holden, D.W., 2003. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. Cell Microbiology; 5: 501-511.

Weill, F.X., 2008. Salmonelles non typhiques d'origine animale et résistance aux antibiotiques. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France ; 161(3) : 221-234.

Weill, F.X., 2009. *Salmonella* : épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. Revue Francophones des Laboratoires, 51^{e} journée de biologie clinique Neiker-Institut Pasteur, pp: 25-35.

Weill, F.-X., Le Hello, S., 2011. Centre National de Référence des *Salmonella*. Institut Pasteur. Rapport d'activité annuel. 72p.

Weill, F.X., Demartin, M., Fabre, L., Grimont, P.A.D., 2004a. Extended-spectrum beta-lactamase (TEM-52) producing strains of *Salmonella enterica* of various serotypes isolated in France. Journal of Clinical Microbiology; 42: 3359-3362.

Weill, F.X., Demartin, M., Tandé, D., Espié, E., Rakotoarivony, I., Grimont, P.A.D., 2004b. SHV-12-liked extended-expectrum beta-lactamase producing strains of *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. Journal of Clinical Microbiology ; 42: 2432-2437.

Weill, F.X., Lailler, R., Brisabois, A., 2004c. Tendances récentes de la résistance aux antibiotiques des *Salmonella* d'origines animale et humaine. B.E.H., 32-33 : 160-162.

Winokur, P.L., Vonstein, D.L., Hoffman, I.J., Uhlenhopp, E.K., and Doern, G.V., 2001. Evidence for transfert of *cmy-2 ampC* β-lactamase plasmids between *E. coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 45(10): 2716-2722

Wiuff, C., Madsen, M., Baggesen, D.I., Aarestrup, F.M., 2000. Quinolone resistance among *Salmonella enterica* from cattle, broilers, and swine in Denmark, Microbial Drug Resistance; 6: 11-17.

World Health Organisation 1997. Antibiotic use in food producing animals must be curtailed to prevent increased resistance in humans. Geneva: The Organisation; WHO Press Release WHO/73, Suisse.

Wouafo, M., Nzouankeu, A., Kinfack , J.A., Fonkoua, M.-C., Ejenguele, G., Njine, T., and Ngandjio, A., 2010. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes in chickens from retail Markets in Yaounde (Cameroon). Microbial Drug Resistance; 16(2): 171-176.

Yan, S.S., Pendrak, M.L., Abela-Ridder, B., Punderson, J.W., Fedorko, D.P. et Foley, S.L., 2003. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. Clinical and applied immunology reviews. 4, 189-204.

Zhang S., Kingsley, R.A., Santos, R.L. *et al.* 2003. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. Infections and Immunology; 71: 1-12.

Zhao, S., McDermott, P.F., White, D.G., Qaiyumi, S., Friedman, S.L., Abbott, J.W., Glenn A., Ayers, S.L., Post, K.W. Fales, W.H., Wilson, R.B., Reggiardo, C. R., Walker, D., 2007. Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals. Veterinary Microbiology; 123: 122–132.

ANNEXES

Premier article paru dans le Journal *Veterinary Microbiology :*

Djim-adjim TABO, Colette D. DIGUIMBAYE, Sophie A. GRANIER, Frédérique MOURY, Anne BRISABOIS, Rachid ELGROUD, Yves MILLEMANN. Prevalence and antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* serotypes isolated from laying hens and broiler chicken farms in N'Djamena, Chad. *Veterinary Microbiology*, **166 (2013): 293-298**. http://authors.elsevier.com/sd/article/S0378113513002927. État : paru

Deuxième article soumis dans le Journal *BMC Infectious Diseases* (Ref: 3899534010568280 du 14/08/2013)

Are *Salmonella*-induced gastroenteritis underestimated in developing countries? Feedback from microbiological investigations in N'Djamena hospitals, Chad.

Djim-adjim TABO, Sophie A. GRANIER, Muriel MARAULT, Anne BRISABOIS, Baïzina MAMA, Yves MILLEMANN

Poster

TABO, D., Diguimbaye, C.D., GRANIER, S.A., MOURY, F.,, BRISABOIS, A., ELGROUD, R., and MILLEMANN, Y., 2013. Epidemiology and antimicrobial resistance of human and avian *Salmonella* isolated in N'Djamena, Chad. International Symposium on *Salmonella* and Salmonellosis (I3S). Proceedings, Saint Malo, France, 450-452.