



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Master des sciences et techniques
BIOTECHNOLOGIES MICROBIENNES

**Evaluation de la contamination de la filière
avicole par *Salmonella spp.***

Sous le thème

Présenté par : Sara LEBRAZI

Soutenu le : 24 juin 2011

Encadré par :

EL ALF : Mme A. MECHATTE

IPM : Dr B. BOUHRIF

FSTF : Pr. L. AARAB

Membres de Jury :

Président : Pr. L. AARAB

Encadrant : Mme A. MECHATTE

Examineur : Pr. ALAOUI BELGHITI

Examineur : Mme N. EL GHACHTOULI



Année universitaire : 2010 /2011



Je dédie ce modeste travail:

A la perle de ma vie, ma mère, que j'adore à la folie, qui m'a tout donné depuis mon enfance jusqu' aujourd'hui, que DIEU te protège et te garde pour nous.

Au plus adorable et gentil père du monde qui ma tout donné sans rien recevoir en parallèle.

A la merveilleuse femme qui m'a considéré comme sa fille et qui m'a aimé de tout son grand cœur, je t'aime et je t'aimerai toujours.

A mes très chers frères Amine, Khalid et Hani.

A toute ma famille sans exception, et particulièrement ma chère tante qui m'a beaucoup soutenu tout au long de ce travail et sa petite famille.

A mes très chères et meilleures amies qu'on a vécu ensemble des bonnes et des mauvais moments durant notre cycle universitaire .

A tous les professeurs et les étudiants de la MST biotechnologies microbiennes.

A tous ceux qui ont une place dans mon cœur.

Remerciements

Avant tout développement sur cette expérience professionnelle, il apparaît opportun de commencer ce rapport de stage par des remerciements à ceux qui m'ont beaucoup appris au cours de ce stage, et même à ceux qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier tout d'abord Monsieur M. ZOÛAK doyen de la Faculté des Sciences et Techniques du Fès.

Mes respectueux remerciements à Monsieur M. IRAQUI responsable de master biotechnologies microbiennes.

J'aimerais bien remercier Monsieur L. AARAB pour son encadrement, ses conseils et ses précieuses orientations qui m'ont beaucoup aidé pour le bon déroulement de cette formation. Ainsi, à tous les professeurs à la faculté des Sciences et Techniques de Fès.

J'ai tout l'honneur d'adresser mes chaleureux remerciements à Mme A. MECHAITTE d'avoir bien voulu m'encadrer pour mon stage et qui a mis à ma disposition tout les matériels nécessaires et les bonnes conditions pour accomplir ce travail. Je la remercie de m'avoir permis de bien bénéficier de sa haute expérience, je la remercie aussi de sa patience, ses conseils et ses offres infinies qui vont surement m'aider pour obtenir mon diplôme.

Je remercie également Dr. A. CHAOUNI pour la précieuse aide qu'il m'a apportée.

Je remercie infiniment mon encadrant au sein de laboratoire de microbiologie et sécurité alimentaire, Dr. B. BOUCHRIJ Pour l'attention et le temps qu'il a consacré à l'évaluation de ce travail malgré leurs lourdes obligations.

Je formule mes remerciements aux membres du jury : Pr. ALAOUI BELGHITI, ainsi que Mme N. EL GHACHTOULI et mes encadrants, d'avoir accepté de

juger ce modeste travail, pour l'attention et le temps consacré à la lecture et au jugement de ce mémoire.

Table des matières

Avant propos	5
Introduction générale.....	8
I. Les Salmonelles	10
1. Historique	10
2. Eléments de taxonomie et règles de nomenclature	11
3. Habitat	11
4. Caractères cultureux et biochimiques.....	12
5. Caractéristiques antigéniques	14
6. Résistance et sensibilité aux agents physiques et chimiques	16
7. Résistance aux antibiotiques	17
8. Pouvoir pathogène	18
II. Manifestations humaines des Salmonelloses : les TIAC.....	20
III. La pathogenèse de l'infection à <i>Salmonella</i> chez les volailles et les œufs.....	21
1. Les sources de contamination.....	21
2. Contamination chez les volailles	23
3. Contamination de l'œuf	28
IV. Méthodes de détection et de caractérisation.....	30
1. Techniques classiques de détection.....	30
V. Mesures de prévention et de contrôle.....	34
1. Mesures à prendre au niveau de la production	34
2. Mesures à prendre au niveau de la commercialisation et la consommation	37
I. Echantillonnage	38
II. Mode opératoire	38
1. Prélèvements.....	38
2. Méthodes d'analyse	39
RESULTATS.....	52
I. Evaluation de la contamination des élevages et leur environnement par <i>Salmonella</i>	52
1. Evaluation de la contamination des surfaces.....	52
2. Evaluation de la contamination par <i>Salmonella</i> dans les poussins d'un jour	52

3.	Evaluation de la contamination par <i>Salmonella</i> dans les œufs non éclos	53
4.	Evaluation de la présence de <i>Salmonella</i> dans les excréments de poules.....	53
5.	Evaluation de la contamination par <i>Salmonella</i> chez les poules	53
II.	Interprétation des résultats de la contamination des élevages par <i>Salmonella</i>	54
1.	Site A.....	54
2.	Site B.....	54
3.	Site C.....	55
4.	Site D	55
III.	Etude phénotypique.....	63
1.	L'antibiogramme	63
2.	Sérotypage.....	63
IV.	Etude génétique	63
1.	PCR.....	63
2.	Recherche de plasmide	63
	Discussion	67
	Conclusion et perspectives.....	70
	Références.....	72
	Annexes	78

Avant propos

Le présent travail a été effectué au laboratoire interne du diagnostic vétérinaire de la société ELALF à Fès et le laboratoire de Microbiologie et Sécurité à l'Institut Pasteur du Maroc à Casablanca en collaboration avec la Faculté des Sciences et Techniques de Fès.

Société AL ALF

La société EL ALF est une société anonyme située à Fès, elle fait partie du groupe CHAOUNI qui englobe les sociétés MOULIN ZALAGH, TRAMANOR et COUVNORD.

La filiale EL ALF a été créée en 1976 avec un capital de 5000000 DH. Le président directeur général de la société est Mr Ali BERBICH, le directeur administratif et financier est Mme Sihame BENHAMAN, la direction de production est sous la responsabilité de Mr Slimane ZAMZOUMI et le poste de responsable de qualité est occupé par Mme Ihssane THAÏFA. L'effectif de la société est estimé à 250 personnes.

La société AL ALF a pour activités principales, la production de l'aliment composé destiné pour les volailles et qui est de l'ordre de 80% et l'aliment pour ruminants.

A la fin de l'année 2007, la flambée des cours mondiaux des intrants agricoles ont obligé la famille Chaouni (Zalagh) et Laabi (Al Atlas) à effectuer un rapprochement afin de créer un méga pôle dans le secteur agroalimentaire au Maroc. Le 3 juillet 2009, les deux groupes ont fusionné pour donner naissance à Atzal Holding - contraction entre Atlas et zalagh, le premier groupe avicole intégré et leader avicole du Maroc.

La fusion entre la société EL ALF et Atlas Couvoirs détient également plusieurs fermes d'élevages à travers le Maroc et produit des œufs de consommation sur les régions de Fès et Casablanca à travers sa filiale Baidat Al Atlas.

Le laboratoire de la société est sous la responsabilité de Mme Asmae MECHATTE et il a comme missions :

- Effectuer des analyses microbiologiques des aliments destinés aux bétails et volailles.

- Effectuer des analyses microbiologiques des volailles de différents âges (des poussins d'un jour jusqu'aux poulets mûres) pour les clients de la société EL ALF pour leur apporter un service après vente.
- Effectuer des analyses sérologiques des poussins.

INSTITUT PASTEUR

Historique

L'institut a été créé en 1929 à Casablanca, sur l'initiative du Dr. Emile Roux (à l'époque directeur de l'Institut Pasteur à Paris) et de Mr. Lucien Saint, Résident Général de la République Française au Maroc. Et ce n'est qu'en 1967 que les deux Instituts Pasteur, celui de Tanger et celui de Casablanca, furent réunis pour constituer **l'Institut Pasteur du Maroc (IPM)** par Décret Royal (N° 176-66 du 14 Rabia I 1387/23 Juin 1967). Après avoir connu des difficultés dans les années 60 et 70, vers la fin des années 80 une restructuration de l'Institut Pasteur du Maroc fut décidée par son Conseil d'Administration avec comme objectif d'assumer les trois missions principales de l'Institut : la recherche, l'amélioration de la Santé Publique et l'enseignement. Enfin, après avoir cessé de fonctionner pendant plusieurs années, l'établissement de Tanger a été rénové pour réouvrir depuis Octobre 1995.

Activités de département d'Hygiène Alimentaire et Environnementale

Dans le cadre de la politique sanitaire nationale, l'Institut Pasteur du Maroc constitue l'un des organismes de référence en matière biologique sanitaire. A ce titre, il a pour missions de :

- Développer l'expertise, l'appui scientifique et technique et entreprendre des recherches dans les domaines de la biologie sanitaire ;
- Proposer les normes en matière de biologie sanitaire et assurer toute mission de contrôle qualité ;
- Développer les systèmes de vigilances relatives à la santé humaine ;
- Participer à la formation du personnel médical, paramédical et scientifique dans les domaines relevant de ses compétences et assurer la diffusion de l'information en rapport avec ses compétences ;

- Promouvoir et développer la coopération nationale et internationale en matière de biologie et de vigilance.

Liste des abréviations

AFNOR : Association française de normalisation

Ag : Antigène

Eric : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence

LPS : *Lipopolysaccharide*

PCR : Polymerase Chain Reaction

TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collective

TTSS: Type III Secretion System

SPI: *Salmonella* Pathogenicity Island

VCS : Vacuole contenant *Salmonella*

Introduction générale

Depuis de nombreuses années, *Salmonella* constitue la cause majeure des infections du tractus digestif humain, liées à la consommation de denrées alimentaires d'origine animales. Parmi ces denrées, les produits de viande de volailles et, en particulier, les oeufs sont fortement impliqués. Les volailles ont constitué un réservoir naturel des salmonelles. Ils peuvent héberger ces bactéries au niveau de leur tube digestif. Malgré les efforts des producteurs, le taux de contamination de la volaille vivante par *Salmonella* reste toujours très élevé.

Le sérotype enteritidis est actuellement le plus répandu dans le secteur avicole, mais la plupart n'ont pas d'hôte préférentiel et peuvent infecter aussi bien l'homme que l'animal.

Salmonella enteritidis est un pathogène commun de nombreuses espèces de mammifères et de poules. Avant les années 1980, *Salmonella enteritidis* a été rarement isolé à partir de volailles (Faddoul et boursiers, 1966,. Snoeyenbos et al, 1969), et la plupart des isolats ont été provenus des aliments contaminés (Williams, 1981). Cependant, l'incidence de *Salmonella enteritidis* dans les troupeaux de volailles a été augmentée dans plusieurs pays (Dreesen et al, 1992). Parallèlement, une augmentation spectaculaire du nombre d'intoxication alimentaire due à *Salmonella enteritidis* chez l'homme a été rapportée (Duguid et North, 1991).

L'animal, le plus souvent porteur asymptomatique, constitue un réservoir pour les salmonelles et les productions animales, viandes et oeufs en particulier, sont des vecteurs de la contamination. Chez un animal porteur sain, les salmonelles sont généralement hébergées au niveau du tube digestif et font l'objet d'une excrétion fécale intermittente. Elles peuvent aussi migrer vers certains organes. Chez la poule pondeuse, il a été décrit une colonisation des ovaires, de la rate et du foie par l'espèce Salmonelle, phénomène à l'origine de la transmission verticale de l'infection salmonellique. (Bornert G., 2000).

Des études épidémiologiques ont attribuée l'apparition de l'intoxication alimentaire causée par *Salmonella enteritidis* à la consommation d'oeufs contaminés ou de produits d'oeufs (Hedberg

et al, 1993). Ainsi, *Salmonella enteritidis* est devenu le pathogène le plus grave pour l'homme et l'industrie de volaille.

Il est donc important d'analyser ces organismes dans les poulets pour la prévention et l'élimination d'une intoxication alimentaire. La plupart des infections à *Salmonella* chez les volailles proviennent de l'ingestion de ces microorganismes qui passent par la voie alimentaire, où ils peuvent interagir avec la surface muqueuse de plaques de Peyer, adhérer et pénétrer dans les cellules épithéliales intestinales. Après avoir procédé à travers le mur intestinal et dans des tissus profonds, certaines *Salmonella* peuvent envahir, survivre et se multiplier dans le système réticulo-endothélial, et diffuser à d'autres tissus, entraînant de graves maladies systémiques (Barrow *et al.*, 1987). Certains rapports concernant les facteurs de virulence associés à *Salmonella* ont été publiés (D'Aoust, 1991; Finlay et Falkow, 1988). Ces facteurs de virulence sont nécessaires pour permettre à la bactérie d'envahir, de coloniser, de survivre et de se multiplier dans les cellules.

Durant ce stage effectué au sein du laboratoire interne du diagnostic vétérinaire de la société ELALF à Fès et le laboratoire de Microbiologie et Sécurité à l'Institut Pasteur du Maroc à Casablanca, l'objectif de notre étude a été d'évaluer la contamination par *Salmonella spp* dans la filière avicole pour estimer la prévalence de l'infection par cette bactérie.

Un volet analytique portant sur l'exploration des facteurs de risques potentiels de la contamination par *Salmonella spp* a été mené afin de déterminer les risques de contamination liés à cette bactérie et d'instaurer des mesures nécessaires à la prévention contre la transmission de la bactérie dans les élevages et leur environnement.

Nous avons également essayé de préciser la nature de cette contamination, en déterminant les sérotypes, les antibiotypes, mais aussi les profils génotypiques des souches isolées par la technique de réaction de polymérisation en chaîne (eric-PCR).

I. Les Salmonelles

1. Historique

Selon Le Minor et al. (1994), le bacille a été observé pour la première fois en 1880 par un médecin allemand du nom d'Eberth. L'observation s'est faite sur des sections de rate et de nœuds lymphatiques mésentériques d'un patient mort de typhoïde. Le bacille a été ensuite cultivé en 1884 par Gaffky.

En 1886, Salmon et Smith isolèrent l'actuelle *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotype choleraesuis, autrefois appelée «Bacterium Sui- pestifer » à partir d'un porc atteint de « Hog cholera» (Le Minor et al., 1994 ; Yan et al., 2003).

En 1896 Widal a mis en évidence la diversité antigénique des souches de salmonelles. A ce jour on a isolé plus de 2800 sérotypes de salmonelles.

Depuis les premières observations rapportées par Eberth jusqu'à nos jours, le genre *Salmonella* n'a pas cessé de présenter une importance considérable dans les domaines vétérinaires et sur le plan 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 (Bornert, 2000).

Dans un passé proche, les souches de salmonelles isolées de différents hôtes et différentes conditions cliniques étaient considérées comme différentes espèces et les bactériologistes les appelaient aux noms des pathologies qu'elles provoquent ou au nom de l'espèce animale dont le bacille provenait, c'est ainsi qu'on a : *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella abortusovis* , *Salmonella typhimurium*..., puis sont arrivés les noms des lieux où ces germes ont été découverts: *Salmonella panama*, *Salmonella montevideo*, *Salmonella london*...etc (Le Minor et al., 1994).

2. Eléments de taxonomie et règles de nomenclature

Le genre *Salmonella*, qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, est phylogénétiquement proche des genres *Escherichia* et *Citrobacter* et phénotypiquement proche de genre *Hafnia*.

La taxonomie se base aussi sur l'espèce génomique, qui est définie maintenant comme un groupe de souches reliées par un taux d'hybridation A.D.N. - A.D.N. supérieur à 70 % avec une instabilité thermique des hybrides inférieure à 5 °C (Wayne *et al.*, 1987). Ces hybridations ont montré qu'il n'y avait que deux espèces génomiques dans le genre *Salmonella* : *Salmonella enterica* (espèce habituelle) et *Salmonella bongori* (espèce rare) (Yan *et al.*, 2003), *Salmonella enterica* était subdivisée en six sous espèces: *Salmonella enterica subsp.enterica*, *Salmonella enterica subsp.salamae*, *Salmonella enterica subsp.arizonae*, *Salmonella enterica subsp.diarizonae*, *Salmonella enterica subsp.houtenae* et *Salmonella enterica subsp.indica*.

En plus de cette subdivision en espèces et en sous-espèces, à l'heure actuelle, plus de 2800 sérotypes sont reconnus officiellement. Ceux-ci résultent des multiples combinaisons des antigènes somatiques O, de nature polysaccharidique, des antigènes flagellaires H, de nature protéique et, enfin, capsulaires (Vi). Le type de classement en fonction des antigènes O et H porte le nom de schéma de Kauffmann-White (Grimont *et al.*, 2000).

3. Habitat

Le réservoir des Salmonelles ubiquistes est très large et de nombreux animaux (mammifères, oiseaux, reptiles, poissons, insectes) sont susceptibles d'héberger ces bactéries.

Elles peuvent se retrouver dans le milieu extérieur (terre, eau, aliments pour animaux) ou dans les aliments destinés à l'homme et proviennent en très grande majorité d'une contamination fécale ou elles peuvent persister quelque temps et même s'y multiplier suite à des conditions favorables. En effet elles peuvent survivre de 4 à 9 mois (selon la température: 4 à 20 °C)

dans le sol ou en eau d'étang, pendant plus d'un an dans les poussières, jusqu'à 28 mois dans les fientes sèches de volailles, jusqu'à 5 ans dans le duvet de couvoirs et jusqu'à 13 mois sur des carcasses de poulets congelés à - 21 °C (Euzeby 1997). Mais, le principal réservoir est constitué par l'intestin des vertébrés.

Ainsi tous les animaux sont des porteurs potentiels de salmonelles dans leur tube digestif, qui sont toutes virtuellement dangereuses et leur diffusion dans l'environnement est très importante, on parle de cycle des salmonelles (Bornert 2000).

Chez les poulets, leur lieu d'élection est constitué par le caecum, ce qui explique leur diffusion dans les fientes caecales. Les animaux porteurs sains excrètent de façon intermittente les salmonelles à raison de 10 à 10⁷ bactéries par gramme de fèces (Humbert 1998).

Comme toutes les bactéries à coloration Gram-négative, l'enveloppe des salmonelles est constituée de 3 éléments : la membrane cytoplasmique et la membrane externe étant séparées par un espace périplasmique constitué de peptidoglycanes. Cette dernière structure confère à la bactérie sa forme et sa rigidité et lui permet de résister à une pression osmotique relativement élevée dans l'environnement (Rycroft, 2000).

4. Caractères cultureux et biochimiques

Les salmonelles sont des bactéries germes mésophiles de type aéro-anaérobie facultatif qui se présentent sous forme de bacilles gram négatif, de dimensions moyennes de 0,5µ sur 3 µ, jamais sporulés, et parfois encapsulés. La mobilité de ces bactéries est assurée par des flagelles péritriches (à l'exception de *S. Gallinarum* qui n'en possède pas), peu exigeantes d'un point de vue nutritionnel qui peuvent se pousser facilement dans un milieu ordinaire à base d'extrait de viande. Leur développement est optimal pour des températures proches de la température corporelle des animaux à sang chaud, 35 à 37°C, et un pH de 6,5 à 7,5. Leur multiplication reste assurée pour des températures de 6,7 à 41°C. Le large spectre de températures (-20 à 60°C) et de pH (4,1 à 9) auxquels elles sont capables de survivre, ainsi que leur capacité à résister à de aw (activité de l'eau) de 0,94 en font des bactéries extrêmement résistantes aux conditions environnementales même difficiles (congélation) et expliquent leur caractère ubiquiste.

Pour les caractéristiques biochimiques, les salmonelles sont capables de réduire le nitrate en nitrite, de se contenter de citrate comme source de carbone et de fermenter le glucose avec ou

sans production de gaz. Autres caractères permettant l'identification biochimique du genre *Salmonella* sont l'absence d'uréase et de tryptophane désaminase, l'absence de production d'indole et d'acétoïne (test de Voges-Proskauer négatif), l'absence de fermentation du lactose, du saccharose, de l'inositol, de l'amygdaline, de l'adonitol et du 2-cétogluconate, la production d'H₂S à partir du thiosulfate (présence d'une thiosulfate réductase), et la décarboxylation fréquente de la lysine et de l'ornithine. (Korsak, 2004).

Les deux espèces du genre *Salmonella* peuvent être différenciées par leurs caractères biochimiques : *Salmonella bongori* ne fermente pas le sorbitol, contrairement à *Salmonella choleraesuis*, et elle se cultive sur un milieu contenant du KCN alors que la plupart des souches de *Salmonella choleraesuis* ne se cultive pas sur ce milieu.

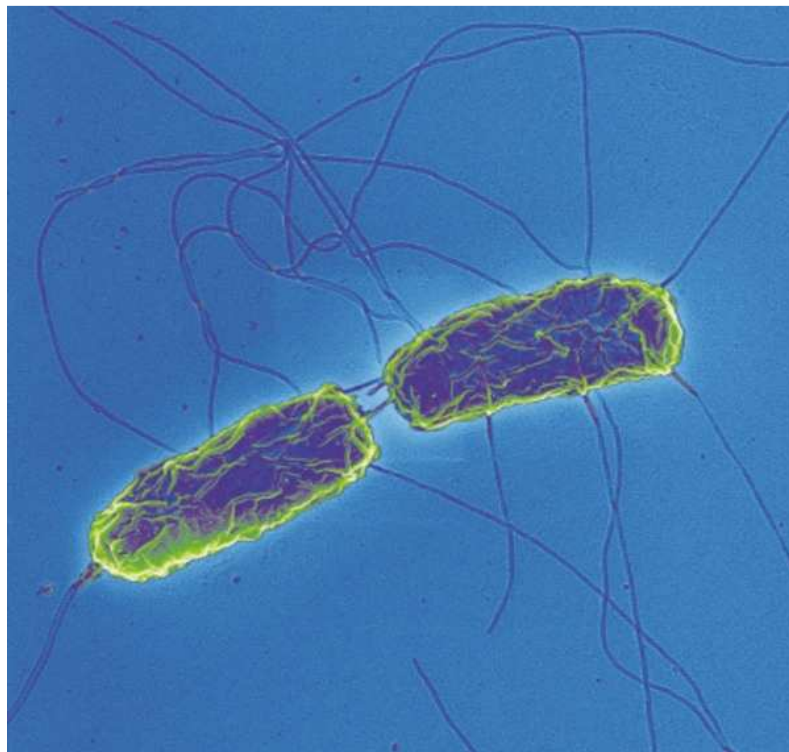


Figure 1: *Salmonella enterica*

www.medecinesciences.org

Tableau1 : Caractéristiques biochimiques différentielles des espèces et sous espèces du genre *Salmonella* (Grimont, 2000).

Caractères biochimiques	<i>Salmonella enterica</i>						<i>Salmonella bongori</i>
	Subsp. enterica	Subsp. salamae	Subsp. arizonae	Subsp. diarizonae	Subsp. houtenae	Subsp. indica	
O.N.P.G.	-	-	+	+	-	v	+
Gélatinase (36 °C)	-	+	+	+	+	+	-
culture sur milieu KCN	-	-	-	-	+	-	+
Dulcitol fermentation	+	+	-	-	-	v	+
Malonate (utilisation)	-	+	+	+	-	-	-
Sorbitol fermentation	+	+	+	+	+	+	-
Bêta-glucuronidase	v	v	-	+	-	v	-
Alphaglutamyl transférase	v	+	-	+	-	+	+
Lyse par le phage 01.	+	+	-	+	-	+	+

v: variable ou plus tardivement; +: plus de 90 % des souches positives; -: moins de 10 % des souches positives.

5. Caractéristiques antigéniques

Il existe plus de 2800 sérovars de *Salmonella* qui se différencient par la nature de leurs antigènes. L'identification précise d'une *Salmonella* consiste donc à déterminer sa formule antigénique. Comme toutes les entérobactéries, les Salmonelles peuvent posséder trois types d'antigènes ayant un intérêt diagnostique. On distingue des antigènes somatiques (O), des antigènes flagellaires (H) et des antigènes de surface. Les antigènes O ont un chiffre arabe (1

à 67) et les antigènes H sont représentés par une lettre pour la phase 1 et un nombre ou une lettre pour la phase 2.

L'identification du sérotype est réalisée en se reportant au tableau de Kauffmann et white qui donne la formule antigénique des sérotypes répertoriés. (Grandsart, 1998)

5.1. Antigène somatique O (Ag O)

Les antigènes O sont des antigènes de la paroi qui sont portés par les chaînes spécifiques du lipopolysaccharide (LPS). L'antigène O possède des propriétés immunisantes, c'est un complexe contenant une protéine, un polysaccharide et un composé phospholipidique. On distingue 67 facteurs O selon la nature des sucres entrant dans la constitution des unités oligosaccharidiques du polysaccharide (Humbert *et al.*, 1998).

5.2. Antigène flagellaire (Ag H)

C'est un polymère de flagelline (protéine de structure des flagelles). Cet antigène est thermolabile, détruit par la chaleur à 100° C, par l'action de l'alcool et par les ferments protéolytiques. La grande majorité des sérovars possèdent deux systèmes génétiques et peut exprimer alternativement deux spécificités différentes pour leur antigène flagellaire. On dit que les antigènes flagellaires de *Salmonella* sont diphasiques (Humbert *et al.*, 1998).

5.3. L'antigène de virulence (Ag Vi)

C'est un antigène de l'enveloppe, il a été identifié chez trois types de sérovars : Typhi, Paratyphi C et Dublin mais toutes les souches de ces sérovars ne possèdent pas forcément cet antigène (Humbert *et al.*, 1998).

Cet antigène est considéré comme un antigène de surface (Dumas, 1958), il est distinct de l'antigène somatique et de l'antigène flagellaire. Son présence rend les germes inagglutinables par les anticorps O. Il ne se développe pas si les cultures sont effectuées au dessous de 25°C et au dessus de 40°C. Un chauffage à 100°C le détruit et les germes deviennent agglutinables par les anticorps O. Il est de nature glucidolipidopolypeptidique.

Tableau2: Formules antigéniques de quelques sérovars de salmonelles isolées des volailles (Euzeby, 1997)

SÉROVARS	ANTIGÈNES O	ANTIGÈNE H	
		Phase 1	Phase 2
Groupe B (O:4) <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Salmonella Saintpaul</i>	1,4, [5],12 1,4,12,27	i e,h	1,2 1,2
Groupe C1 (O :6,7) <i>Salmonella infantis</i> <i>Salmonella montevideo</i>	6,7 6,7	r g,m,s	1,5 -
Groupe C2 (O :6,8) <i>Salmonella hadar</i> <i>Salmonella newport</i>	6,8 6,8	z10 e,h	e,n,x 1,2
Groupe D2 (O :9,12) <i>Salmonella enteritidis</i> <i>Salmonella gallinarum-pullorum</i>	1,9,12 1,9,12	g,m -	- -

6. Résistance et sensibilité aux agents physiques et chimiques

Les salmonelles se multiplient dans une large plage de température, entre 5 °C et 47 °C avec un optimum de 37 °C (Le Boucher et al.1997). En effet, elles peuvent survivre à des températures très basses, alors que des alternances congélation-décongélation partielle, appliquées à un aliment contaminé peuvent, par effet mécanique, détruire une proportion non négligeable des salmonelles présentes. Mais les dégâts mécaniques infligés aux aliments sont considérables, et incompatibles avec leur utilisation ultérieure (Doyle et al.1990).

Beaucoup de facteurs affectent la destruction des salmonelles par la chaleur, un de ces facteurs est la souche, pour l'exemple *Salmonella senftenberg* résiste 10 à 12 fois plus que le

temps moyen de résistance de *Salmonella*. Spp. (Bell 2002). La composition de l'aliment intervient aussi, en effet la valeur D (Temps de réduction décimale) à 60 °C est de 0,27 minutes pour des œufs entiers contaminés par *Salmonella typhimurium*, en leur ajoutant 1 % de saccharose, la valeur D double et devient 0,6 minutes.

L'activité de l'eau dans l'aliment et l'humidité de l'environnement interviennent dans l'inactivation des salmonelles par la chaleur, pour l'exemple *Salmonella* est 650 fois plus résistante à la chaleur dans le blanc d'œuf séché (en poudre) que dans des œufs à l'état liquide (Bell, 2002). Les salmonelles évoluent assez bien à des pH entre 4 et 9, le pH optimum étant de 7 (Grimont, 2000), mais là aussi tout dépend de la souche, de la température d'incubation, de l'activité de l'eau (qui doit être comprise entre 0,945 et 0,999), du nombre d'organismes présents et de la composition de l'aliment (Bell, 2002).

Le potentiel d'oxydo-réduction est aussi important, bien que *Salmonella* peut croître aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose, la croissance est ralentie et parfois inhibée par le potentiel d'oxydoréduction en dessous de – 30 mV (Doyle *et al.*, 1990).

Les salmonelles sont peu sensibles au sel (NaCl), elles ont été isolées de saumures à 3,2 % (Peiffer 1999), leur développement est limité par les compétitions consécutives à la croissance d'autres flores. Elles sont sensibles au crésyl et aux désinfectants courants en élevage: glutaraldéhydes associés aux ammoniums quaternaires à 1 ou 2 % mais aussi aux vapeurs de formaldéhyde, utilisés pour la fumigation des oeufs (Peiffer, 1999).

Par ailleurs, les salmonelles sont capables de survivre dans les effluents d'élevage (fumier, lisier), les eaux, les rongeurs, les animaux porteurs et l'homme mais résistantes de quelques semaines à quelques mois dans le milieu extérieur en général (Peiffer, 1999).

7. Résistance aux antibiotiques

Chez les animaux, les agents antimicrobiens désignés pour le traitement des maladies sont parfois utilisés de façon anarchique, sans diagnostic précis, en doses insuffisantes ou en surdosage, qui peut engendrer une résistance antimicrobienne chez ces animaux. L'antibiorésistance est l'un des problèmes majeurs de santé en médecine humaine et animale, elle est aussi reconnue par l'O.M.S., comme un problème émergent de santé publique, de fait que le phénomène est d'autant plus important qu'il concerne des germes pathogènes pouvant

être transmis à l'homme. Le monde bactérien s'est avéré capable de s'adapter aux antibiotiques et il est remarquable que les bactéries isolées d'infections humaines et animales progressivement et de plus en plus fréquemment résistaient aux antibiotiques successivement apparus. (Elgroud *et al.*, 2008).

A tout instant, une pression de sélection est imposée aux populations bactériennes et les antibiotiques contribuent à cette pression, c'est l'exemple des tétracyclines qui sont les plus utilisées et continuent à être utilisés comme additifs alimentaires dans certaines parties du monde (Elgroud *et al.*, 2008).

L'antibiorésistance des salmonelles réduit l'efficacité thérapeutique et prophylactique des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire et pose un problème à l'hygiéniste, car ces bactéries résistantes peuvent être transmises à l'homme (Elgroud *et al.*, 2008).

8. Pouvoir pathogène

La pathogénie des infections à salmonelles a été particulièrement étudiée, et si des zones d'ombres subsistent, les grandes étapes sont désormais assez bien connues.

On peut distinguer d'un point de vue pathologique:

- Les salmonelles majeures (adaptées à l'homme) comme la *Salmonella thyphi* responsable à la fièvre typhoïde mais aussi *Salmonella paratyphi* A, B et C (surtout B) responsable à la fièvre paratyphoïde (Euzéby, 1997). Ces fièvres sont graves, souvent mortelles si elles ne sont pas traitées; c'est l'antigène somatique (Ag O) qui est la cause du syndrome typhique par choc endotoxique.

- Les salmonelles mineures dites aussi ubiquitaires ou ubiquistes et plus souvent non typhoïdiques: toutes les salmonelles sont potentiellement pathogènes mais la gravité de l'affection provoquée est en fonction de la souche et de la quantité de bactéries ingérées. Ce sont toutes les autres salmonelles qui provoquent des affections variées en pathologie animale et des gastro-entérites infectieuses en pathologie humaine, parfois des septicémies chez les immunodéprimés, les jeunes enfants, les vieillards, les malades chroniques et les femmes enceintes. Ce sont les agents des T.I.A.C. (Toxi-Infections Alimentaires Collectives), qui sont les plus à craindre, la contamination a toujours lieu par voie digestive, l'invasion de

l'organisme se fait par un processus entéro-invasif. Des localisations organiques diverses ont été décrites. En général, les salmonelles peuvent entraîner selon Carlier (2001) :

- soit un portage sain, strictement limité au tube digestif, avec une excrétion de salmonelles allant de moins de 10^5 à 10^7 germes par gramme de fèces. L'excrétion fécale peut être intermittente, on parle 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 ou elles sont capables de survivre sans se multiplier (bactériémie).

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

A la suite d'une multiplication importante dans le tube digestif, d'une quantité initiale faible, la multiplication survient suite à des perturbations ou déséquilibres de l'écosystème digestif par un stress ou par une pathologie intercurrente, dans ce dernier cas, l'ingestion des salmonelles peut être très antérieure à l'expression de la pathologie elle-même (Humbert, 1998).

Certains sérovars ubiquistes sont très spécifiques de l'hôte, exemples : *S. abortus equi* et *S. abortus ovis*, qui provoquent des tableaux cliniques très particuliers tel que les avortements ou un syndrome de fièvre entérique chez la volaille pour *S. pullorum gallinarum* (Humbert, 1998). La virulence des souches semble être due à de nombreux facteurs, les uns sont liés à la souche tels les pili ou fimbriae, le rôle des flagelles, la structure du 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'autres sont plutôt liés à l'hôte comme la dose infectante, la voie d'inoculation et l'état immunologique de l'individu (Murray, 1991), 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 Rhen *et al.*, (1992), rapportent que le pouvoir pathogène d'une bactérie correspond à l'association d'un pouvoir invasif et d'un pouvoir toxique, dépendants de bases moléculaires plus ou moins bien définies.

8.1. Pouvoir invasif

Les différences dans le pouvoir invasif entre différentes souches et même entre différents phagotypes sont souvent associées à plusieurs facteurs, comprenant la capacité des souches à se multiplier et coloniser la région iléo-caecale du tube digestif mais aussi à une quantité importante de bactéries dans la lumière intestinale. La virulence est exercée par l'Ag O du L.P.S. qui participe toujours à la phase initiale de l'invasion.

La localisation de germe aux organes internes tel que le foie et la rate, s'explique par la richesse de ces organes en tissu réticulo-endothélial (les cellules phagocytaires captent les salmonelles à partir du sang (Carroll *et al.*, 2004). L'acidité du pH de l'estomac est déjà un stress important pour les bactéries et nécessite l'expression de certains gènes de résistance contre l'acidité, malgré cela, seul 1 % de l'inoculum va survivre et qu'en plus durant l'infection 80% des bactéries qui survivent à l'acidité de l'estomac, va être évacué avec les fécès dans les 6 à 10 heures post-infectieuses et approximativement 15% vont atteindre la lumière intestinale du caecum et le gros intestin et seulement 5% vont arriver à pénétrer la paroi intestinale et parvenir au tissu lymphoïde (Baumle *et al.*, 2000).

Les protéines flagellaires de surface et les organes adhésifs semblent avoir un rôle moins important (Rhen *et al.* 1992). La virulence est aussi associée aux systèmes de régulation, la mise en œuvre de ce circuit de régulation aboutit à la transcription d'une cascade de gènes participant à la virulence.

8.2. Pouvoir toxique

Selon des travaux réalisés, trois types de toxines ont été associées 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, l'installation d'un collapsus cardio-vasculaire et dans certains cas l'installation d'un état de choc pouvant aboutir à la mort. L'action toxique est supportée par 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 et serait responsable de l'augmentation du taux intracellulaire d'A.M.P. (Adénosine Mono Phosphate) cyclique et l'accumulation des fluides (Rhen *et al.*, 1992).

II. Manifestations humaines des Salmonelloses : les TIAC

Un foyer de Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC) est défini, selon l'Organisation mondiale de la Santé, par la survenue d'au moins deux cas groupés, d'une symptomatologie similaire, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire. (Haeghebaert, 2001)

Les toxi-infections salmonelliques se déclarent 12 à 24 heures après l'ingestion des aliments contaminés et se caractérisent par les symptômes suivants: Une diarrhée constante (10 à 15 selles par jour), fétide et liquide parfois muco-sanglante, les douleurs abdominales peuvent évoquer de façon trompeuse une urgence chirurgicale. La fièvre est fréquente souvent élevée à plus de 39 °C, accompagnée de frissons et de malaise général. La soif et l'anorexie signent une déshydratation inquiétante chez les vieillards ou les très jeunes enfants.

L'évolution est en règle générale spontanément favorable en trois à cinq jours sans aucun traitement antibiotique. Selon l'expression clinique on distingue:

- Les formes atténuées : maladies peu ou pas symptomatiques qui se limitent à quelques selles diarrhéiques mais d'intérêt épidémiologique car il y a excrétion de salmonelles dans les selles et donc possibilité de contamination de l'entourage.

- Les formes très graves : Elles sont pseudo-cholériques avec fréquence de selles et déshydratation secondaire. Elles peuvent être responsables d'une certaine mortalité (1 %) (Carlier *et al.*, 2001), chez les jeunes enfants ou les vieillards.

- Les formes trompeuses : dites pseudo-chirurgicales, car elles sont sporadiques et en absence de données anamnétiques, elles présentent un tableau pseudo appendiculaire avec défense abdominale fébrile nécessitant le recours à un chirurgien.

III. La pathogenèse de l'infection à *Salmonella* chez les volailles et les œufs

1. Les sources de contamination

Les exploitations de volailles peuvent s'infecter par différentes voies. On distingue de manière générale la voie horizontale et la voie verticale.

1.1 Contamination horizontale

La contamination horizontale est possible pour tous les sérovars et elle est favorisée par la résistance des *Salmonelles* ubiquistes dans le milieu extérieur. Elle peut se réaliser sur un mode horizontal direct entre animaux sains et animaux infectés ou sur un mode horizontal indirect par l'intermédiaire des aliments, de la poussière, du matériel d'élevage et des bâtiments.

Plusieurs facteurs peuvent intervenir dans la transmission horizontale. Tout d'abord, la persistance de l'infection dans les bâtiments d'élevage et dans les couvoirs joue certainement un grand rôle (Gradel et Rattenborg, 2003). Les rats et les souris peuvent être porteurs de l'infection et contaminer les bâtiments et les aliments. En effet, il a été démontré que les souris capturées dans les environs d'un bâtiment hébergeant des poules pondeuses infectées, étaient 4 fois plus souvent trouvées positives pour *Salmonella* que les souris capturées aux alentours d'un bâtiment hébergeant des poules pondeuses non infectées.

Une étude a montré que dans 14 bâtiments pour poussins à l'engrais, les coléoptères hébergeaient la même souche de *Salmonella* que les poussins (Skov *et al.*, 2004). Il a également été démontré que les moustiques et les vers de farine dans les élevages de volaille peuvent héberger des *Salmonella*. Quand on relâche des coléoptères contaminés par *Salmonella* dans une chambre contenant des poussins sensibles, ces derniers sont infectés endéans les 4 jours.

L'eau de boisson et les aliments constituent également d'importantes sources de contamination pour la volaille. Les abreuvoirs sont facilement contaminés par les becs des poussins, leurs pattes et les fientes et les aliments sont souvent contaminés durant le stockage et la préparation.

Les personnes qui entrent dans les poulaillers mais également des matériaux introduit dans des bâtiments peuvent être porteurs de *Salmonella*. Finalement, il faut tenir compte du fait que seuls quelques poussins positifs dans un lot de plusieurs milliers sont suffisants pour contaminer l'ensemble du lot. De plus, les poussins ont tendance à picorer dans la litière et dans les fèces, ce qui facilite la dissémination de l'infection.

1.2. Contamination verticale

Contrairement aux autres *Salmonella* qui ne sont retrouvées qu'en contamination de surface de la coquille de l'œuf, *Salmonella enteritidis* peut être isolée dans le contenu d'un œuf intact. Des études américaines et françaises ont démontré la transmission de la bactérie de la poule à l'œuf par voie ovarienne, donc la contamination de l'œuf fécondé, lors du passage de la bactérie des parentales aux poussins.

2. Contamination chez les volailles

La plupart des bactéries appartenant à l'espèce *Salmonella* peuvent coloniser un large spectre d'hôtes. Néanmoins, certains sérotypes sont adaptés à un spectre d'hôtes plus restreint, ce qui signifie qu'ils ont acquis une série de propriétés génétiques qui leur permettent de coloniser de manière préférentielle et persistante ce type d'hôtes. Certains sérotypes sont même exclusivement associés à un seul hôte, comme par exemple *S. gallinarum* chez la volaille. Ces sérotypes induisent souvent une pathologie sévère, voire létale. Dans les pays industrialisés, les sérotypes *enteritidis* et *typhimurium* sont prédominants. Ces sérotypes n'ont pas de spécificités d'espèces, et leur épidémiologie est complexe. (Uzzau *et al.*, 2000).

En général, la pathogenèse débute avec l'ingestion de la bactérie par voie orale. Les bactéries passent dans l'intestin et s'attachent aux cellules épithéliales. Après cette phase d'attachement, la bactérie peut envahir les cellules épithéliales. Ensuite, après la phase intestinale, il y a une phase systémique au cours de laquelle les bactéries peuvent survivre et persister dans les macrophages (figure 1). Pour ces différents processus la bactérie possède une série de gènes de virulence, qui sont regroupés sur le génome dans des îlots de pathogénicité.

2.1 La phase intestinale

Salmonella est tout à fait capable de survivre à l'acidité de l'estomac et peut donc passer dans l'intestin (Van Immerseel *et al.*, 2005). Les caeca constituent le site le plus important pour la colonisation intestinale chez la volaille. Les bactéries s'attachent à la paroi caecale par des interactions de type récepteur-ligand. Les fimbriae de la bactérie et les résidus de type mannosyl dans le mucus et sur les cellules épithéliales sont impliqués (Van Immerseel *et al.*, 2005). L'invasion des cellules épithéliales constitue une étape cruciale dans la pathogenèse. Au moment où la bactérie s'attache à la cellule épithéliale du caecum, elle injecte une série de

protéines bactériennes dans la cellule de l'hôte par le biais du système de sécrétion de type 3 (type III secretion system, TTSS). Ces protéines sont codées par l'îlot de pathogénicité numéro 1 (*Salmonella* pathogenicity island, SPI-1) (Van Immerseel *et al.*, 2005). Ce système de sécrétion de type 3 est constitué d'une sorte d' « aiguille » sur la membrane externe de la bactérie dont la fonction est d'injecter des protéines de la bactérie dans la cellule eucaryote. Le SPI-1 de *Salmonella* est un élément assez large (43 kb) sur le chromosome de la bactérie qui code pour toute une série de protéines, non seulement des protéines structurales nécessaires pour former l'appareil du TTSS, mais aussi des protéines régulatrices et des protéines qui sont injectées à travers l'« aiguille » dans la cellule de l'hôte. Ces protéines bactériennes injectées interagissent avec les protéines de la cellule de l'hôte. Leur effet principal est une réorganisation du squelette de la cellule épithéliale qui induit la formation de projections du protoplasme cellulaire (ruffles) qui entourent la bactérie. A la suite de ce processus qui est activé et contrôlé par les protéines de la bactérie injectées dans la cellule, la bactérie se retrouve dans une vacuole à l'intérieur de la cellule. Tout ceci constitue le processus d'invasion. Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, on estime que la bactérie est capable de réprimer le processus normal d'apoptose de la cellule (processus de mort cellulaire programmé). Ce phénomène génère un environnement dans lequel la bactérie peut se multiplier tranquillement à l'abri du système immunitaire de l'hôte (Van Immerseel *et al.*, 2005).

Les protéines codées par le SPI-1 sont également impliquées dans l'attraction des cellules immunitaires de l'hôte vers la paroi intestinale. Après une infection expérimentale, on retrouve, endéans les 24 heures, de nombreux granulocytes hétérophiles, macrophages, lymphocytes T et lymphocytes B dans la paroi intestinale (Van Immerseel *et al.*, 2005). Les macrophages peuvent ingérer les bactéries qui passent à travers la muqueuse caecale, ce qui constitue le début de la phase systémique de l'infection.

2.2 La phase systémique

Les bactéries sont ingérées par les macrophages par la phagocytose. *Salmonella* peut survivre et se multiplier dans les macrophages. Ces derniers peuvent passer dans le sang et disséminer vers les organes tels que le foie et la rate, où on les retrouve en abondance (Barrow, 1999). La bactérie se trouve dans une vacuole du cytoplasme du macrophage dont sa multiplication de à l'intérieur des macrophages est sous le contrôle du système de sécrétion de type 3 (TTSS) codé par l'îlot de pathogénicité 2 (SPI-2). Ce TTSS SPI-2 a également la structure d'une

«aiguille » par laquelle des protéines de la bactérie sont injectées à travers la membrane de la vacuole (Van Immerseel *et al.*, 2005).

Les *Salmonella* disposent d'une batterie de mécanismes qui leur permettent de survivre à l'intérieur des macrophages. Après la phagocytose, la bactérie reste à l'intérieur d'une vacuole (vacuole contenant des *Salmonella*, VCS). Normalement, quand les macrophages internalisent une bactérie, la vacuole contenant la bactérie va fusionner avec le lysosome, qui contient des substances toxiques pour la bactérie. L'effet des protéines du TTSS SPI-2 est justement d'inhiber cette fusion entre la VCS et le lysosome.

Outre les enzymes des lysosomes, le macrophage dispose encore d'autres systèmes très performants pour tuer les bactéries, systèmes qui induisent, notamment, la production d'oxygène réactif et d'oxyde nitrique. La NADPH oxydase des phagocytes est effectivement une arme très efficace dans la lutte du macrophage contre les bactéries. Ce complexe enzymatique catalyse la réduction d'oxygène en superoxyde qui a un puissant effet antibactérien.

Dans les macrophages non-activés, la compartimentation du NADPH-oxydase entre une sous-unité liée aux membranes et une autre située dans le cytosol, assure qu'il n'y ait pas de production de radicaux toxiques. Après la stimulation du macrophage, les différentes sous-unités vont fusionner et former le complexe enzymatique actif (Vazquez et Fang, 2001). *Salmonella* dispose d'une stratégie pour éviter ou inhiber la production de ce complexe enzymatique car elle contient des superoxydes dismutases, des catalases et des anti-oxydants. De plus, *Salmonella* peut bloquer la migration des vésicules contenant la NADPH oxydase vers le VCS. Ce dernier phénomène est également sous le contrôle du TTSS SPI-2. Enfin *Salmonella* dispose également d'outils permettant de manipuler la viabilité des macrophages en sa faveur. Par un mécanisme encore inconnu. La bactérie semble être capable de sentir le niveau d'activation du macrophage et de modifier le mode d'induction de la mort cellulaire selon ses besoins (nécrose, apoptose). En effet, la nécrose mène à une perte de l'intégrité de la membrane cellulaire et au relâchement du contenu cellulaire, ce qui attire les cellules immunitaires. Dans la phase initiale de l'infection, au niveau de l'intestin, quand les premiers macrophages sont attirés, la bactérie induit la mort cellulaire par nécrose, ce qui attire encore plus de macrophages (Van Immerseel *et al.*, 2005). Une fois que l'infection systémique s'est établie, la mort rapide de la cellule hôte constituerait un désavantage pour la bactérie. A ce stade, la bactérie demeure dans une niche intracellulaire et retarde la mort cellulaire afin

d'avoir plus de temps pour se multiplier dans la cellule hôte et atteindre d'autres organes et tissus de l'hôte. La mort tardive de la cellule hôte se produirait par apoptose, ce qui n'induit pas d'inflammation nuisible à la bactérie (Van Immerseel *et al.*, 2005).

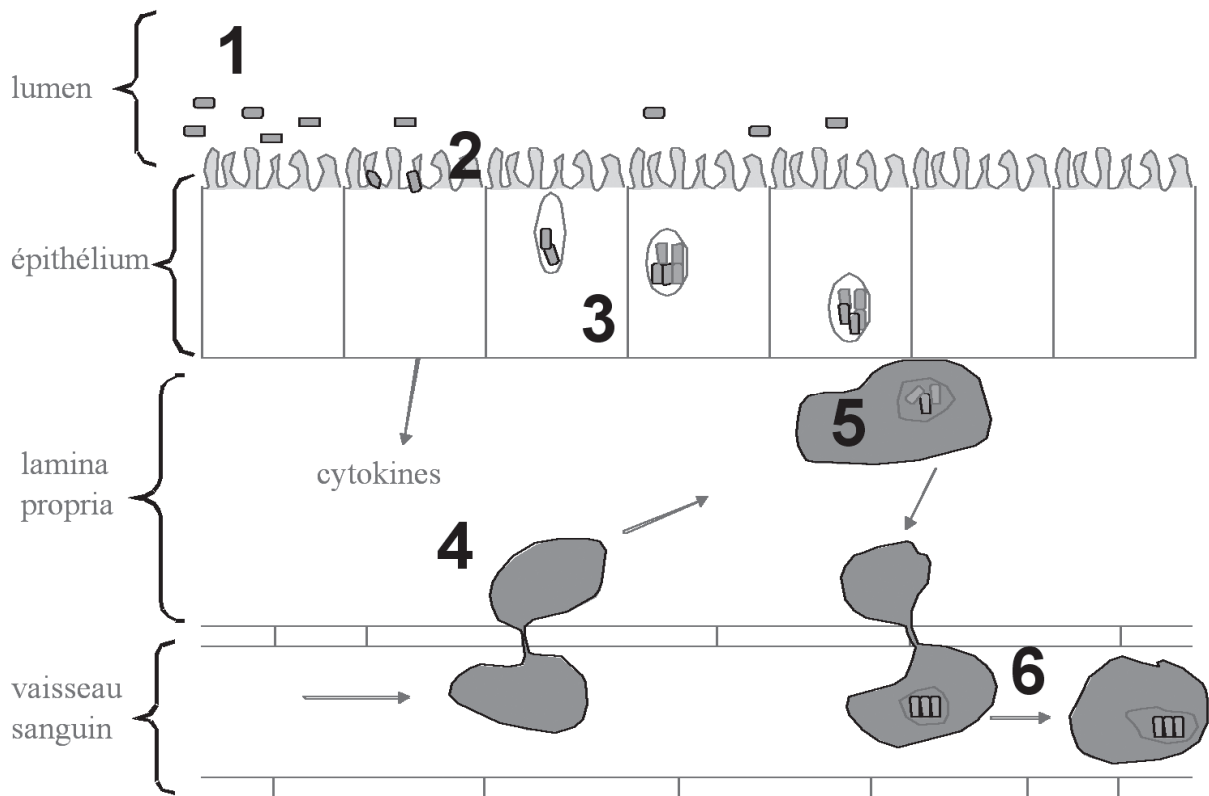


Figure 2 : Pathogénèse d'une infection à *Salmonella*

- 1) après ingestion orale, les bactéries passent par l'estomac pour arriver dans la lumière intestinale ;
- 2) les bactéries s'attachent aux cellules épithéliales et induisent une modification des filaments d'actine de la cellule ;
- 3) ceci donne lieu à une internalisation de la bactérie dans la cellule épithéliale ; *Salmonella* est capable de se multiplier à l'intérieur de la cellule eucaryote ;
- 4) des macrophages vont migrer des vaisseaux sanguins vers la paroi intestinale et font partie d'une réaction inflammatoire ;
- 5) ces macrophages peuvent phagocyter les bactéries. *Salmonella* dispose de mécanismes qui permettent à la bactérie de survivre et même de se multiplier à l'intérieur des macrophages ;
- 6) les macrophages infectés peuvent passer dans le sang et se disperser vers d'autres organes, tels que la rate et le foie. Ceci constitue la phase systémique de l'infection.

2.3 Symptômes

L'infection par les sérotypes ubiquitaires chez la volaille est surtout associée à la maladie des très jeunes oiseaux. Les signes de sévères infections chez les poussins sont généralement similaires à ceux observés chez les autres salmonelloses aviaires (pullorose et typhose) ou ayant de très étroites analogies avec des signes de maladies septicémiques (Shivaprassad, 2003). La contamination des oeufs par les salmonelles peut mener à un niveau très élevé de

mortalité embryonnaire et une mort rapide des poussins nouvellement éclos, avant l'observation de signes cliniques (Gast, 2003). Les signes de la maladie sont rarement observés après les deux premières semaines de la vie.

La maladie clinique à sérotypes ubiquitaires n'est normalement pas associée aux volailles adultes mais certaines salmonelles comme *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhimurium* qui sont douées d'un pouvoir invasif et passent dans le système lymphoïde grâce aux macrophages, dans le foie et la rate puis dans le sang et envahissent les organes (ovaires et oviductes) peuvent être responsables de somnolence avec yeux clos, d'anorexie, de retards de croissance, de chutes de ponte, entérites, hépatites et parfois des malformations. Les animaux très affectés présentent une diarrhée liquide profuse. La mortalité est généralement faible mais peut atteindre 10% des animaux malades (Humbert, 1998; Carlier, et al.2001).

Dans la plupart des cas, les volailles sont des porteurs sains ou la maladie évolue sous forme chronique et les salmonelles sont excrétées de façon intermittente.

2.4 Lésions

Chez les très jeunes poussins, il y a développement d'une septicémie rapide qui peut causer une très forte mortalité avec peu ou pas de lésions. Quand le cours de la maladie est plus long ou infection à certains sérotypes, on a parfois l'apparition de sévères entérites accompagnées de foyers nécrotiques de la muqueuse de l'intestin grêle. Les caecae, la rate et le foie sont congestionnés (foie bronzé après oxydation à l'air) et tuméfiés avec des suffusions hémorragiques ou des foyers nécrotiques. Les reins sont parfois tuméfiés et congestionnés. On peut également observer des péricardites, des omphalites, des lésions génitales dégénératives et des inflammations pulmonaires, des ovaires et des oviductes (Gast, 2003).

2.5 Influence de l'âge des animaux

Dans les conditions naturelles, les poussins couvés par les poules sont rapidement colonisés par les flores maternelles qui s'opposent à la colonisation par des germes exogènes dont les salmonelles. En élevage intensif, la colonisation de l'intestin des poussins est impossible du fait de la séparation physique totale des générations et les poussins sont particulièrement sensibles. Le nettoyage et la désinfection régulière des couvoirs et des bâtiments d'élevage ne

permettent pas d'assurer cette transmission des flores autochtones et le poussin nouvellement éclos peut être infecté par des doses très faibles de salmonelles. (Benson et Keller, 1998)

Cette ségrégation entre les générations est favorable pour éviter la transmission d'éventuels germes pathogènes entre ascendants et descendants à condition d'effectuer une désinfection des œufs mis à couver et de respecter une hygiène sanitaire stricte dans les couvoirs. Si ces conditions ne sont pas respectées, il peut se produire une fausse transmission verticale due à une pénétration directe à travers la coquille souillée par les fèces.

3. Contamination de l'œuf

La contamination de l'œuf par *Salmonella enteritidis* est possible à travers la coquille quand l'œuf est contaminé par des matières fécales (Van Immerseel *et al.*, 2005).

Il est également possible que la contamination ait lieu directement dans le jaune d'œuf, le blanc d'œuf, la membrane interne de la coquille ou la coquille même avant la ponte de l'œuf, suite à l'infection du système de reproduction de la poule (Timoney *et al.*, 1989) .

3.1 La contamination de la surface de l'œuf et la pénétration à travers la coquille.

La présence de *Salmonella* sur la surface extérieure de la coquille de l'œuf et la contamination du contenu de l'œuf présente une menace pour la santé publique. La surface peut être contaminée soit dans la partie distale de l'oviducte, soit par le biais d'une contamination fécale.

Plusieurs recherches ont démontré la possibilité d'une pénétration à travers la coquille de l'œuf dans des conditions de laboratoire avec différents sérotypes de *Salmonella*, comme par exemple, *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhimurium* (Berrang *et al.*, 1999), Ce qui peut expliquer que le contenu de l'œuf pouvait être contaminé immédiatement après la ponte par des bactéries passant à travers les pores ou des fissures dans la coquille.

Le niveau de contamination varie selon plusieurs facteurs : le surpeuplement conduit à une forte production de matières fécales ainsi qu'à une augmentation de la température d'ambiance des locaux favorable à la multiplication microbienne, la mauvaise hygiène des

locaux et du matériel qui favorise la persistance des salmonelles dans les poussières, l'air ambiant et au niveau des surfaces de ponte.

3.2 Contamination de l'œuf pendant sa formation.

Les poules atteintes d'infections des ovaires ou des oviductes par *Salmonella enteritidis* (souvent sans signes cliniques) vont contaminer les milieux internes de l'œuf avant la formation de la coquille.

Salmonella enteritidis a été isolé principalement dans le jaune ou l'albumine d'environ 10% des œufs durant les 2 premières semaines suivant l'inoculation expérimental oral, ce qui suggère la possibilité de l'infection par *Salmonella enteritidis* transovarienne (Timoney *et al.*, 1989). La capacité de l'infection transovarienne a été également démontrée par l'isolement des salmonelles à partir du jaune et / ou de l'albumine d'œufs pondus par des poules contaminées par *Salmonella enteritidis* (Shivaprasad *et al.*, 1990). Les modifications pathologiques macroscopiques observées dans l'ovaire et l'oviducte de la poule pondeuse ou reproductrice ont également indiqué la possibilité d'une transmission transovarienne de *Salmonella enteritidis* chez les volailles.

Le jaune ou l'albumine est probablement contaminés quand l'œuf pondu par une poule infectée passe de l'ovaire par l'oviducte avant d'être couverts par la coquille. En outre, le fait que l'albumine était plus fréquemment contaminés que le jaune a suggéré que certains œufs ont été infectés dans le péritoine ou l'oviducte (Shivaprasad *et al.*, 1990.).

La différence dans la proportion des œufs contenant des salmonelles peut dépendre de la la taille des troupeaux examinés, car une proportion importante et petite a été observée respectivement dans des petits et des grands troupeaux (Duguid et North, 1991). Les Salmonelles ont été isolées à un nombre faible à partir des œufs pondus par des poules infectées par *Salmonella enteritidis*. Le système complexe des barrières membranaires, les composants antibactériens dans l'albumine et la teneur en grande quantité des anticorps dans le vitellus peut expliquer la présence d'un petit nombre seulement de bactéries dans l'œuf (Suzuki, 1994).

Il reste néanmoins difficile de faire la distinction entre une contamination pendant la formation de l'œuf ou après la ponte de celui-ci. Dans le cas des œufs fécondés, une

contamination de la membrane interne de la coquille peut mener à la situation que le poussin ne sera contaminé que tardivement et, parfois même, au moment de l'éclosion.

IV. Méthodes de détection et de caractérisation

1. Techniques classiques de détection

Les micro-organismes pathogènes dans les aliments, dans l'environnement ou bien dans les matières fécales sont généralement présents en petit nombre et peuvent entrer en concurrence avec une flore saprophyte, abondante dans certaines matrices alimentaires. Etant donné les conditions de traitement et de conservation des aliments, les bactéries peuvent être stressées. Pour isoler les bactéries, l'analyse microbiologique classique des aliments nécessite donc plusieurs étapes successives ce qui entraîne un temps de réponse relativement important (Waltman, 2000).

La première phase consiste en une revivification grâce à la réalisation d'une suspension-mère de pré-enrichissement, dans laquelle l'échantillon est généralement dilué au dixième. Le diluant est généralement constitué par de l'eau peptonnée tamponnée.

Le préenrichissement 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 (D'aoust, 1989).

La deuxième étape consiste à un enrichissement des salmonelles. La sélectivité du bouillon 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. Trois types de milieux d'enrichissement peut être utilisés : le bouillon Muller-Kauffmann au tétrathionate, le bouillon sélénite-cystine et le Rappaport-Vassiliadis.

Le bouillon Muller-Kauffmann au tétrathionate décrit en premier temps par Muller en 1923 et modifié par Kauffmann en 1935. La sélectivité de ce milieu est assurée grâce à la présence de sels biliaires et le vert brillant qui inhibent principalement le développement des microorganismes à Gram-positif, et à la production extemporanée de tétrathionate, résultant de l'action de la solution iodo-iodurée sur le thiosulfate de sodium, qui provoque l'inhibition des coliformes et de la plupart des bactéries intestinales.

Le bouillon sélénite-cystine développé par Leifson en 1936, est un autre milieu d'enrichissement. Son teneur en sélénite permet d'assurer l'inhibition des microorganismes autres que les salmonelles et notamment des coliformes et des entérocoques. Les *Pseudomonas* et les *Proteus* ne sont pas totalement inhibés.

Le bouillon Rappaport-Vassiliadis décrit par Rappaport en 1956 puis modifié par Vassiliadis en 1979 est utilisé comme un milieu d'enrichissement grâce à la forte concentration en chlorure de magnésium ainsi que la présence de vert malachite qui ralentissent la croissance des germes autres que les salmonelles.

Les méthodes prévoient ensuite un isolement, qui consiste en un étalement sur boîtes de Pétri, contenant également des milieux sélectifs. Cela permet de visualiser les colonies caractéristiques, dont le nombre aura été considérablement augmenté durant les phases précédentes. Ces milieux doivent permettre au personnel de laboratoire une distinction facile entre salmonelles et non-salmonelles. En 2000, Waltman rapporte qu'il existe plus d'une quinzaine de formules différentes de milieux mais indique, toutefois, que le «vert brillant» (VB) et le «xylose lysine tergitol-4» (XLT4) sont les plus performants pour les viandes de volailles et les échantillons d'environnement provenant d'exploitations avicoles. Un autre point important à signaler est l'existence chez la volaille, dans certains cas, de souches de *Salmonella gallinarum* ne produisant pas de H₂S, ce qui peut compliquer la reconnaissance des colonies sur un milieu d'isolement. En effet, la distinction entre les colonies se base sur la propriété de production de sulfure d'hydrogène par les salmonelles qui apparaissent alors comme des colonies munies d'un centre noir comme par exemple sur la gélose SS qui est décrite par Leifson en 1935. La sélection de ce milieu est basé sur le degré d'inhibition des microorganismes Gram positifs et des Enterobacteriaceae autres que *Salmonella* et *Shigella* qu'elle inhibe en raison de sa teneur en sels biliaires, en vert brillant et en citrates.

La gélose au vert brillant décrite par Kristensen et al. en 1925 est aussi utilisée pour sélectionner les salmonelles. Ce milieu contient le lactose, le saccharose et le rouge de phénol à la base du système de différenciation, qui exclue les fermentant du lactose et/ou du saccharose (ex. *E.coli*), tandis que les salmonelles ne produisent pas d'acide à partir de ces sucres. Le vert brillant est l'agent sélectif qui inhibe les flores présentes.

L'étape de confirmation, qui suit l'isolement, consiste en la sélection d'une ou plusieurs colonies caractéristiques en vue de leur purification. L'identification biochimique et

sérologique se base sur le comportement de *Salmonella* vis-à-vis des galeries destinées à leur caractérisation.

1.1.La méthode horizontale de référence ISO 6579

La norme NF EN ISO 6579 est la méthode horizontale de référence pour la détection de *Salmonella* spp. Dans une denrée alimentaire, mais également dans des échantillons d'environnement collectés dans les entreprises agro-alimentaires (Association Française de Normalisation, 2002).

Cette méthode est basée sur quatre étapes : le pré-enrichissement, l'enrichissement, l'isolement et enfin l'identification.

- ✓ 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 (D'aoust, 1989).
- ✓ Au cours de l'enrichissement, la sélectivité du bouillon 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. La norme exige l'utilisation de deux milieux d'enrichissement, le Rappaport Vassiliadis Soja et le bouillon Muller Kauffmann tétrathionate novobiocine.
- ✓ L'étape de l'isolement consiste à faire un étalement à partir des cultures d'enrichissement sur deux milieux d'isolement sélectifs pour *Salmonella*. Généralement, La gélose XLD (Xylose Lysine Désoxycholate) et une autre gélose au choix.
- ✓ L'identification biochimique et sérologique des colonies précédemment isolées et présentant des caractéristiques de *Salmonella* par des galeries et des sérums spécifiques.

La figure 3 présente les différentes étapes pour la détection de *Salmonella* selon la méthode normalisée ISO 6579.

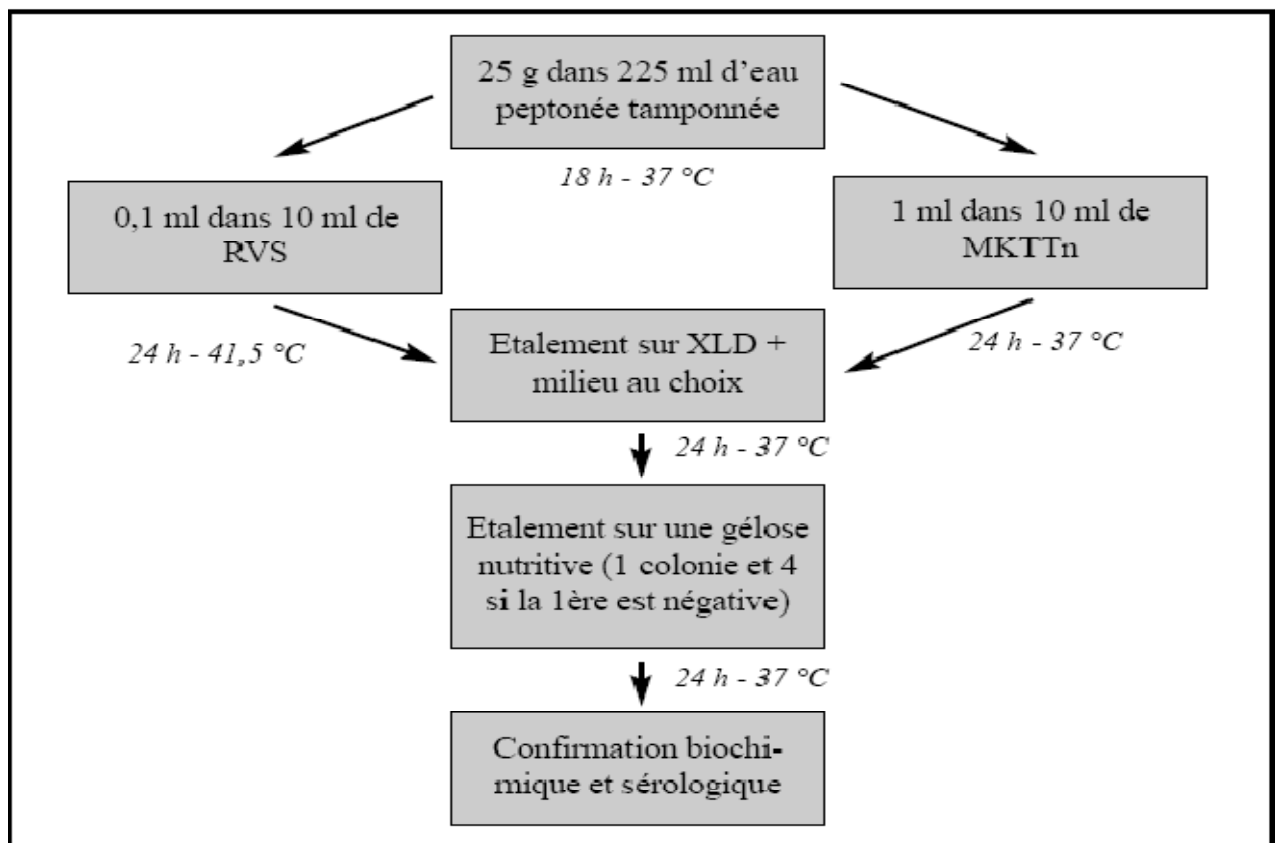


Figure 3 : Détection de *Salmonella* spp. selon la méthode normalisée ISO 6579 (2002)

1.1.En santé animale (NF U47-100, NF U47-101) :

D'autres méthodes standardisées et validées AFNOR, sont utilisées en santé animale pour l'isolement et l'identification des salmonelles ou pour la recherche de sérovar(s) particulier(s) dans l'environnement des productions animales, c'est le cas de la N.F U 47-100 : Février 2005, et la N.FU 47-101 : Février 2005, utilisées respectivement pour la détection des salmonelles dans l'environnement des productions animales et chez les oiseaux.

Les techniques de recherches varient en fonction de l'origine du prélèvement. Si les Salmonelles sont dans un état physiologique altéré et confrontées à une flore associée

importante, 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. Ces méthodes comportent essentiellement quatre étapes :

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

V. Mesures de prévention et de contrôle

1. Mesures à prendre au niveau de la production

Toute une série de mesures de prévention et de traitement sont disponibles à l'heure actuelle chez la volaille.

La première mesure est de n'introduire que des poussins indemnes dans les bâtiments, ce qui implique que les parentales et les grands parentales soient indemnes de *Salmonella* afin d'éviter la transmission verticale (Van Immerseel et al., 2005).

La mesure préventive la plus répandue est sans doute la vaccination. La vaccination est certainement efficace pour les poules pondeuses, tandis que pour les poulets à l'engraissement, l'utilité de la vaccination peut être mis en doute, vu la courte durée de vie de ces animaux. On trouve sur le marché des vaccins atténués et inactivés qui permettent de réduire l'excrétion et la circulation de *Salmonella* (Holt *et al.*, 2003). Ces vaccins ont été

développés avec des méthodes plutôt empiriques et il manque encore des données scientifiques pour savoir si ceux-ci sont capables de réduire également le taux de contamination des œufs. Les développements récents en génétique et en biologie moléculaire permettent de construire des souches mutées de *Salmonella* qui ne persistent pas dans les tissus de l'hôte tout en induisant une protection maximale. La vaccination des parentales et des poules pondeuses est sans aucun doute une mesure importante de prévention et de contrôle qui permet de réduire le niveau de contamination de l'ensemble du secteur de la volaille.

L'efficacité de la médication par les antibiotiques pour traiter et prévenir les infections à salmonelles ubiquitaires est le sujet d'importants débats, en effet l'utilisation des antibiotiques a montré l'efficacité pour contrôler l'évolution des salmonelles mais l'utilisation anarchique est souvent à l'origine de graves problèmes de résistance bactérienne et ainsi d'une plus grande dissémination pendant des temps plus allongés de la part des volailles. Les antibiotiques les plus utilisés sont les sulfamides, l'enrofloxacin, la streptomycine, la gentamicine, les tétracyclines et la fluméquine (Elgroud *et al.*, 2008).

A côté de ces traitements, on retrouve également sur le marché une gamme impressionnante d'additifs alimentaires anti-*Salmonella* utilisés chez la volaille et grâce auxquels une réduction du niveau de contamination de *Salmonella* est espérée. Ces produits sont destinés à réduire l'excrétion fécale et à réduire aussi la colonisation du tractus digestif. Cette réduction de l'excrétion fécale amènera une diminution des taux de contamination de l'environnement et par conséquent le risque de contamination horizontale devrait diminuer.

Des mesures hygiéniques doivent nécessairement être prises simultanément, de sorte que l'hygiène et les additifs puissent agir de concert sur les taux de contamination de l'environnement. Ces produits sont généralement surtout utiles pour les poussins et pour les jeunes animaux. Pour beaucoup d'additifs alimentaires, peu de données scientifiques prouvant leur efficacité sont toutefois disponibles. Tout ceci rend le choix des produits à utiliser difficile pour les éleveurs. A l'heure actuelle, on emploie souvent des préparations à base d'acides. L'acidification de l'eau de boisson consiste à supplémenter l'eau de boisson avec un 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 pour avoir un effet également dans les caeca. Les études réalisées, ont utilisé un mélange stabilisé d'acide organique et de peroxyde d'hydrogène, cette stabilisation est fondamentale dans le cadre de la lutte contre les

salmonelles. 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. Donc but de la supplémentation n'est pas d'éliminer toutes les salmonelles, mais de les empêcher de se développer en agissant le plus tôt possible et de maintenir cette population de salmonelles en dessous d'un seuil d'excrétion et donc d'empêcher la contamination du lot entier (Van Immerseel *et al.*, 2005).

Parmi les additifs anti-*Salmonella* disponibles sur le marché, on retrouve également des prébiotiques. Par définition, les prébiotiques sont des ingrédients des aliments non-digestibles qui ont un effet favorable par la stimulation sélective de la croissance ou de l'activité d'un nombre restreint d'espèces bactériennes déjà présentes dans l'intestin (Gibson et Roberfroid, 1995). La flore intestinale peut transformer ces prébiotiques par fermentation en acides gras volatiles, ce qui peut conduire à une modification de l'ensemble de la flore. Les fructo-oligosaccharides sont, par exemple, des prébiotiques qui stimulent les bifidobactéries et qui stimulent également la production d'acide butyrique. Chez la volaille, on sait depuis bon nombre d'années que supplémenter la ration avec des fructo-oligosaccharides permet de réduire la colonisation intestinale par *Salmonella* (Bailey *et al.*, 1991). Les manno-oligosaccharides sont un autre exemple de prébiotique qui, après administration par l'aliment, peut réduire le niveau de colonisation par *Salmonella*. Ce dernier manifeste son effet par l'inhibition de l'adhésion de *Salmonella* à la cellule épithéliale. *Salmonella* s'attache à la cellule le plus souvent par l'intermédiaire de fimbriae de type 1, qui peuvent s'attacher sur des résidus mannose au niveau de la cellule intestinale (Spring *et al.*, 2000). Les probiotiques constituent encore une autre classe d'additifs employés contre les Salmonelles. Par définition, les probiotiques sont des micro-organismes vivants inclus dans les aliments qui ont un effet favorable sur l'hôte par une amélioration de l'équilibre de la flore intestinale (Fuller, 1989).

Toutes les mesures mentionnées ci dessus seraient vaines si on n'appliquait pas en même temps des pratiques hygiéniques dans les exploitations. Le nettoyage et la désinfection après chaque lot, l'application d'un système d'entrée et de sortie des volailles dans les locaux en une seule fois (all in-all out) et le contrôle régulier des exploitations sont des mesures complémentaires, essentielles pour garantir le succès des vaccinations et des autres mesures citées.

Un programme de lutte contre les *Salmonella* doit également nécessairement inclure des mesures contre les rongeurs et les insectes en tant que vecteurs des salmonelles. On peut également faire des décontaminations physiques ou chimiques de l'eau de boisson et des aliments. L'acidification de l'eau de boisson est une mesure de décontamination qui peut être prise dans les fermes, tandis que l'irradiation et la pasteurisation des aliments sont des mesures à prendre par les firmes d'aliments.

2. Mesures à prendre au niveau de la commercialisation et la consommation

L'objectif d'un programme de lutte contre *Salmonella* est la prévention de la maladie chez l'homme. Etant donné que la grande majorité des cas humains provient de la consommation d'œufs contaminés, il est impératif de prendre toutes les mesures visant une réduction des taux de contamination des œufs. Refroidir les œufs et maintenir une chaîne de froid évite la multiplication des *Salmonella* éventuellement présentes dans les œufs. Il est étonnant de voir qu'une mesure si simple et efficace n'est toujours pas respectée ni dans les grands magasins, ni dans les cuisines. Des campagnes d'information telles que celles mises en œuvre par l'AFSCA (Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire, 2004) et l'introduction de certaines obligations dans la chaîne de commercialisation pourraient éviter beaucoup de problèmes. Pour les personnes âgées, les bébés et les personnes immunodéprimées, des précautions particulières devraient être prises.

I. Echantillonnage

Un total de 134 prélèvements ont été analysés pour la recherche de Salmonelles provenant de quatre sites d'élevage avicoles (A, B, C, et D) et de deux couvoirs (1 et 2) d'un client de la société EL ALF (les sites sont situés à la région de Fès Meknès et les couvoirs à la région de khémisset). Les prélèvements se répartissent comme suit :

- ❖ 21 lots (15 poussins par lot) à partir des poussins d'un jour ;
- ❖ 13 prélèvements à partir des œufs non éclos (5 œufs par lots) ;
- ❖ 05 prélèvements à partir des poulets reproducteurs ;
- ❖ 10 prélèvements à partir des écouvillons cloacaux ;
- ❖ 85 prélèvements à partir des chiffonnettes stériles pour contrôle microbiologique des surfaces (couvoir 1: 40 chiffonnettes, couvoir 2: 19 chiffonnettes et site B: 26 chiffonnettes).

Les différents échantillons ont été soumis à l'analyse de salmonelles, aux laboratoires de bactériologie de EL ALF à Fès de la période allant de 15 janvier au 7 mai 2011 et au laboratoire de microbiologie de département de Sécurité Alimentaire et Environnement à l'Institut Pasteur du Maroc à Casablanca pour la période de 9 au 31 mai 2011.

Les prélèvements sont acheminés au laboratoire de la société EL ALF par le service après vente suite à des problèmes observés chez les élevages.

Les résultats d'analyses sont représentés à titre ANONYME pour assurer la confidentialité des résultats.

II. Mode opératoire

L'analyse bactériologique peut être effectuée à partir d'échantillons de poulets (écouvillons cloacaux, organes et oeufs), de poussin (organes) ou les échantillons environnementaux (poussières, litière...).

1. Prélèvements

1.1.Prélèvement à partir de surface

Le niveau de contamination est évalué en réalisant un frottis de surface à l'aide d'une chiffonnette imbibée dans un volume de 10 ml d'une solution de neutralisant de désinfectant récupérée dans un flacon stérile contenant 90 ml d'eau peptoneé tamponnée (prélèvements réalisés après nettoyage/ désinfection au niveau des couvoirs et dans les bâtiments d'élevage par exemple).

1.2.Prélèvement des organes

Après la réception des poussins nouveau-nés (15 poussins par lot) ou des cadavres de poulets reproducteurs, on a réalisé une autopsie pour prélever les organes (foie, intestin, cœur, rate sac vitellin pour les poussins) dans des boîtes de Pétri stériles, qui vont être par la suite broyées et mélangées afin de subir la recherche microbiologique de *Salmonella*.

1.3.Prélèvement à partir des œufs non éclos

Des échantillons ont été prélevés à partir de contenus d'œufs destinés à l'éclosion contenant ou non des embryons. Les prélèvements sont mis dans des boîtes de pétri stériles avant l'évaluation bactériologique.

1.4.Prélèvement au niveau de cloaque de la poule

Des écouvillons cloacaux (5 écouvillons par bâtiment au minimum) ont été réalisés pour vérifier l'excrétion de façon intermittente des salmonelles et donc la possibilité d'une contamination verticale de l'œuf par la mère.

2. Méthodes d'analyse

2.1 Analyses bactériologiques

La recherche et l'isolement de *Salmonella* dans les différents échantillons provenant à partir des prélèvements de la production avicole se déroule principalement en quatre étapes :

- Pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée.
- Enrichissement en 2 milieux sélectifs au choix, liquides : Bouillon de Rappaport-Vassiliadis (RV), Bouillon au tétrathionate (Muller-Kauffmann).

- Isolement sur au moins un milieu sélectif solide (de préférence deux milieu sélectifs), on a utilisé la gélose SS (Salmonella-shigella), et le vert brillant (VB).

- Identification biochimique et sérologique des colonies précédemment isolées et présentant des caractéristiques de *Salmonella spp.*

- **Pré-enrichissement**

Les échantillons ont été pré-enrichis au 1/10 avec de l'eau peptonnée tamponnée,

Une prise d'essai (10 g) des organes prélevés à partir des poussins d'un jour ou des cadavres de poulets est directement mise dans 90 ml d'eau peptonnée tamponnée, broyée et homogénéisée puis placée à l'étuve à 37°C pendant 18 à 20 heures. Ceci permet aux salmonelles (éventuellement présentes) de se multiplier en abondance, elles deviennent ainsi facilement détectables par la suite. Le préenrichissement est effectué aussi pour les prélèvements de surface par les chiffonnettes, les prélèvements cloacaux ont subi directement un enrichissement.

- **Enrichissement**

Dans 10 ml de bouillon de Rappaport de Vassiliadis contenus dans chaque tube à vis stérile, nous mettons 0,1 ml de subculture ou un volume de 1 ml de cette dernière dans 10 ml de bouillon de Muller kauffmann à l'aide d'une pipette stérile. Ces deux bouillons sont ensuite incubés à l'étuve pendant un temps de 18 à 24 à une température respectivement de 42°C et 37°C.

La sélectivité du bouillon et de la température d'incubation relativement élevée entraînent l'élimination d'une grande partie de la flore d'accompagnement et favorisent la croissance des salmonelles.

- **Isolement**

Deux géloses sélectives ont été utilisées : les géloses SS (Salmonella- Shigella) et VB (Vert brillant). Elles sontensemencées par technique de stries d'épuisement à partir d'un même bouillon d'enrichissement et mis en incubation à l'étuve 37°C.

Après 24 heures, les colonies isolées sur les géloses présentant les caractéristiques macroscopiques des salmonelles (colonies incolores à centre noir sur SS et colonies incolores à roses entourées d'une zone rouge dans le milieu VB).

- **L'identification**

L'identification des souches de salmonelles fait appel à une sélection biochimiques des isolats analysés, en fonction des réactions biochimiques déterminantes, et à une identification sérologique.

Pour faire une identification des salmonelles, nous avons réalisé un repiquage de deux ou trois colonies suspectes, sur la gélose sélective (milieu VB ou SS), puis les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 h dans le but d'obtenir des souches pures.

❖ L'identification par la galerie classique

La souche de *Salmonella spp.* peut être confondue avec certaines Entérobactéries, de par la similitude de certains de leurs caractères biochimiques. Ce sont *Citrobacter*, *Edwardsiella tarda*, *Proteus vulgaris* et *mirabilis*.

Pour éliminer donc ces souches proches des salmonelles des tests de présomption sont effectuées, dans le but d'identifier les caractères de genre des *Salmonella spp.*

Pour effectuer cette identification du genre, nous avons ensemencé une mini galerie de 5 milieux d'identification, à savoir : le milieu urée-indole, le milieu Kligler-Hajna, le milieu citrate de simmons, le milieu lysine fer et le milieu mannitol-mobilité.

Le milieu urée-indole (orange)

On a ensemencé une colonie suspecte avec une souche pure, prélevée sur le milieu VB ou SS. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, une lecture est faite.

La couleur du milieu reste inchangé pour les souches suspectes, et sont dites uréase négative (non productrices d'uréase). Dans le cas contraire, il vire au rose.

Pour la mise en évidence de la production d'indole, nous avons ajouté quelques gouttes du réactif de Kovacs dans les tubes du milieu urée-indole. La dégradation du tryptophane est marquée par l'apparition d'un anneau jaune, pour les salmonelles qui sont dites indole négatif. Dans le cas contraire, nous avons un anneau rouge.

Le milieu Kligler-Hajna (rouge)

On a ensemencé ce milieu par piqûre centrale dans le culot et par stries d'épuisement au niveau de la pente, avec une colonie présentant des caractéristiques suspectes de salmonelle. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 heures.

En cas de la présence de Salmonella, le culot vire au jaune avec une pente de couleur inchangée (rouge).

La présence de thiosulfate de sodium et de Fer III dans ce milieu permet d'apprécier la capacité de ces bactéries à produire de l'H₂S à partir du thiosulfate. Cette production est matérialisée par la formation à la limite du culot et de la pente d'un précipité noir de sulfure de fer.

Le milieu citrate de Simmons (vert)

La pente est ensemencée par une strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une colonie suspecte de la culture pure. L'incubation des tubes est faite à 37°C pendant 24 heures.

Les salmonelles peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone ce qui induit à un virage de l'indicateur de pH au bleu.

Milieu Lysine fer (violet)

L'ensemencement au niveau de ce milieu par la souche étudiée est effectué par piqûre centrale dans le culot et par stries d'épuisement au niveau de la pente.

Milieu enrichi en lysine, il permet une étude de l'attaque des constituants en aérobiose et en anaébiose.

- ✓ En aérobiose, il peut y avoir production de LDA (lysine désaminase). Les cétoacides avec les sels de fer donnent une coloration rouge vineux à la surface de la pente.
- ✓ En anaébiose, le glucose fermenté acidifie le milieu. Dans ce cas la lysine décarboxylase est activée et il y'a production de la cadavérine qui réalcalinise le milieu.
- ✓ Il peut y avoir production d'H₂S révélé par la formation de sulfure noir.

Les salmonelles sont généralement LDC⁺ et LDA⁻ qui est traduit lors de la lecture par une couleur violette au niveau de la pente et du culot qui reste inchangée.

Milieu mannitol-mobilité (rouge)

On a ensemencé ce milieu par une colonie suspecte par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit puis on l'a incubé 24 heures dans une température de 37°C.

Ce milieu nous permet l'étude de la dégradation du mannitol qui est un produit de dégradation du mannose et aussi la mobilité de certaines bactéries qui peuvent se déplacer dans la gélose molle.

Généralement, *Salmonella* est mobile (sauf *S. gallinarum pullorum*), capable de dégrader le mannitol et donc la lecture présente un virage de la couleur du milieu vers le jaune.

2.2 L'antibiogramme

2.2.1 principe

La sensibilité des souches aux différents agents antibactériens a été déterminée par la technique de diffusion sur gélose Mueller-Hinton

On a réalisé ce test afin d'évaluer la sensibilité de *Salmonella* spp. aux antibiotiques. On a utilisé les 13 antibiotiques suivants: AM : Ampicilline (10 µg), , CF : Céfalocone (30 µg), CTX : Cefotaxime (30 µg), SSS : Sulfamides (200 µg), S : Streptomycine (10 µI), TE : Tétracycline (30 µI), NA : Acide nalidixique (30 µg), OFX : Ofloxacine (5 µg), S : Streptomycine, TMP : Triméthoprime/sulfaméthoxale (5 µg), GEN : Gentamicine (510 µg) , TTC : *ticarcilline*-acide clavulanique, CRO : Ceftriaxone (30 µg), AN : Amikacine (30 µg).

2.2.2 Protocole

Après une culture bactérienne de 18 à 24 h sur gélose Trypticaseine-soja (TCS) à 37 °C, on a préparé une suspension de deux colonies dans 5 ml d'eau distillée stérile, l'ensemencement est réalisé ensuite sur des boîtes de pétri contenant la gélose par écouvillonnage puis laisser sécher quelques minutes à la température ambiante.

Les disques des antibiotiques ont été déposés dans les boîtes inoculées. Après 24 h d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition ont été mesurées et interprétées.

2.2.3 Interprétation des résultats

La culture bactérienne s'arrête lorsqu'elle rencontre une concentration égale à sa CMI (concentration minimale inhibitrice).

La mesure du diamètre reflète donc la valeur de la CMI de l'antibiotique. Ces valeurs sont interprétées en fonction des abaques.

2.3 Le sérotypage

2.3.1 Principe

Le sérotypage a été effectué par agglutination sur lame à l'aide d'une culture fraîche des salmonelles et des sérums appropriés. Il a d'abord été vérifié que les isolats n'étaient pas auto agglutinables, en observant qu'aucune agglutination n'apparaissait en les mélangeant à une goutte d'eau physiologique.

Les sérotypes étaient déterminés en utilisant d'abord les sérums O polyvalents ou sérums 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 (figure 4).

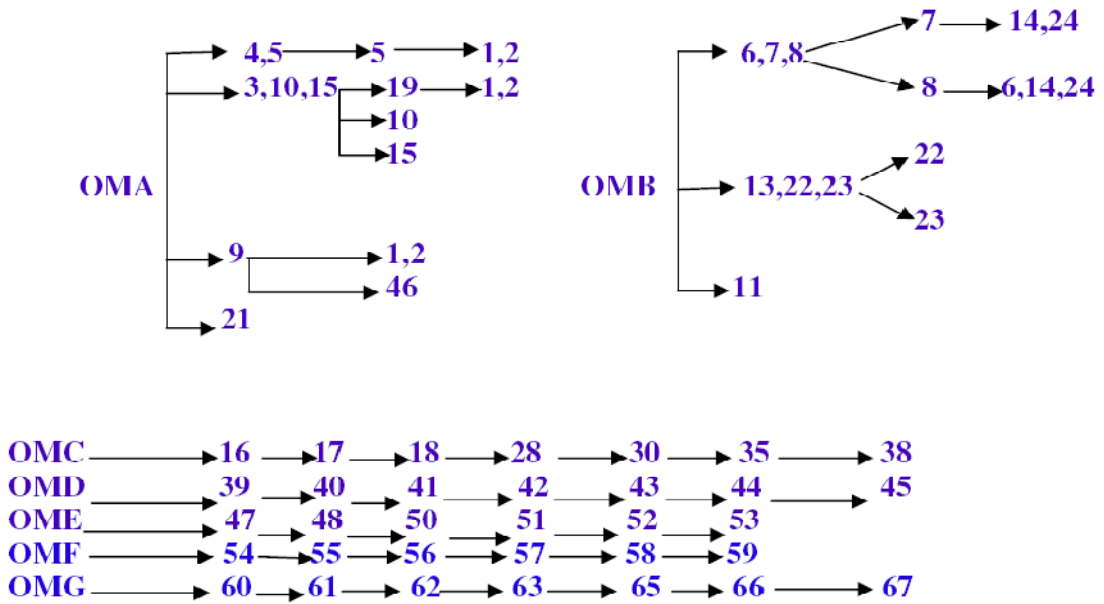
En pratique, les sérums polyvalents OMA et OMB permettent de déterminer 99 % des souches de *Salmonella*. L'utilisation des sérums monovalents anti-O permet de préciser le groupe auquel appartient la salmonelle.

2.3.2 Protocole

Pour détecter les sérotypes de souches de *Salmonella*, on prend des colonies caractéristiques sur milieu sélectif gélosé TCS sur une lame propre et sèche, on dépose une goutte du sérum à tester et à l'aide d'une anse, on prélève une suspension de colonie et on la dépose à proximité du dépôt de l'immun-sérum.

On mélange à l'aide de l'anse, on incline la lame d'avant en arrière et on observe l'agglutination. Il a d'abord été vérifié que les isolats n'étaient pas auto agglutinables, en observant qu'aucune agglutination n'apparaissait en les mélangeant à une goutte d'eau physiologique.

Ag . SOMATIQUES



Ag . FLAGELLAIRES

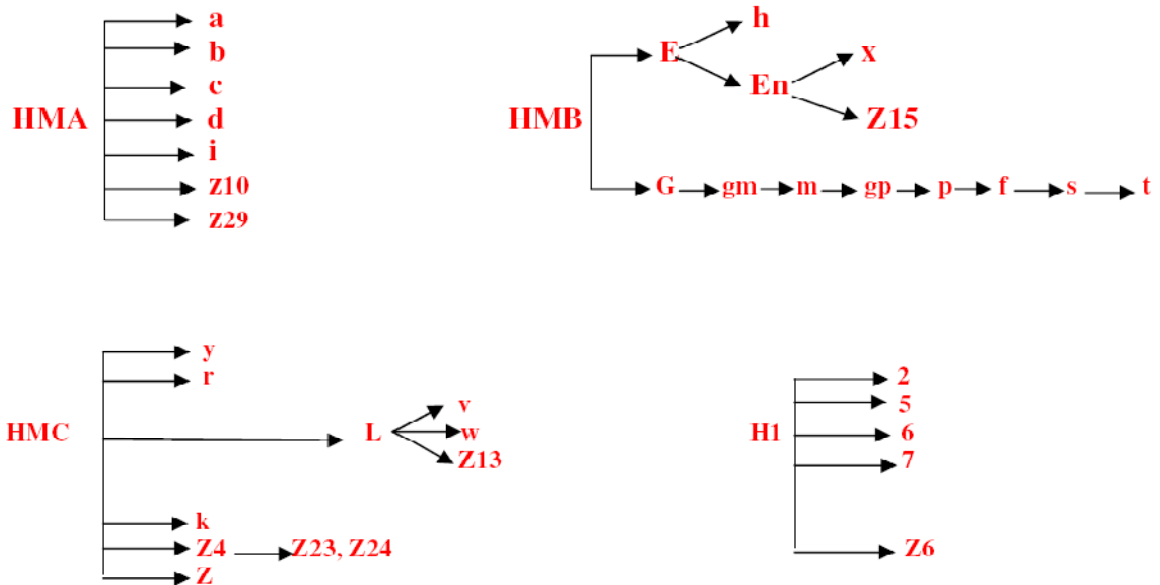


Figure 4 : Schéma de test de sérotypage.

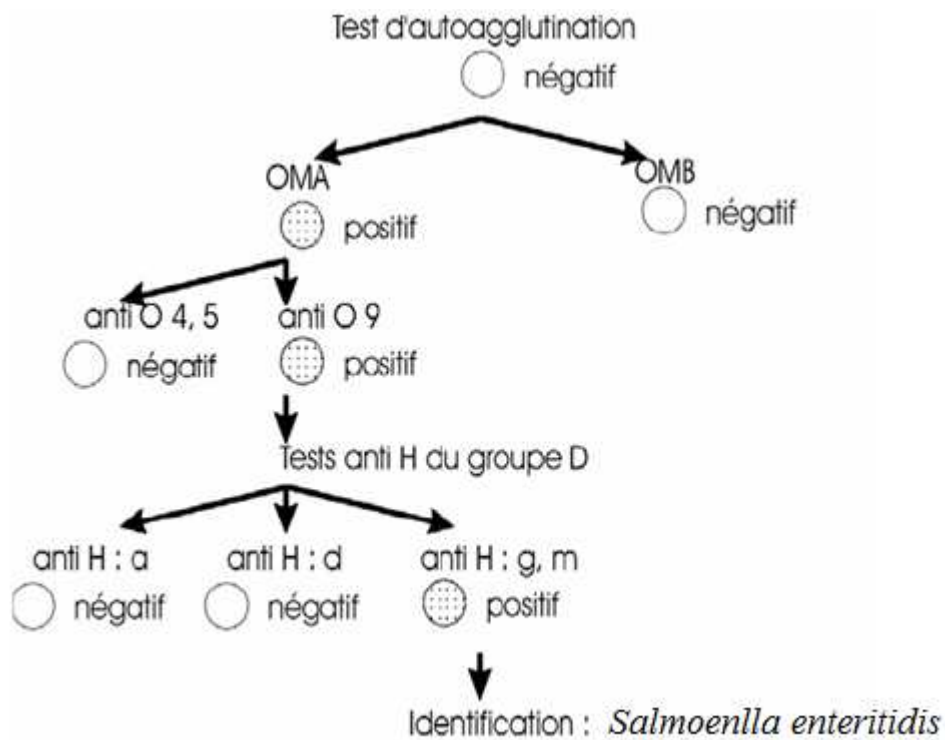


Figure 5 : Exemple pour sérotypage de *Salmonella enteritidis*.

2.4 Réaction de polymérisation en chaîne (P.C.R.)

2.4.1 Principe

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier in vitro de manière importante, cyclique et spécifique d'un fragment d'ADN, grâce à une ADN polymérase (Taq polymérase : *Thermus aquaticus* polymérase) thermostable, en présence d'amorces spécifiques et de nucléotides.

Pour ce faire, une série de réactions permettant la réplique d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant.

Une PCR se déroule en trois étapes principales :

❖ Première phase : dénaturation

A cette température, les liaisons faibles qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN.

❖ Seconde phase : hybridation

L'hybridation des amorces sur l'ADN repose sur le principe de l'assemblage des bases complémentaires.

❖ Troisième phase : élongation (extension des amorces)

Les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice. La polymérisation se fait par ajout successif des désoxyribonucléotides (présents dans le mélange en large excès). Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice.

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur. La réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures (2 à 5 heures pour une PCR de 30 cycles).

2.4.2 Protocole :

La PCR a été réalisée avec l'amorce ERIC2, 5/AAGTAAGTGAC TGGGGT GAGCG3 / (Dalla Costa *et al.*, 1998)

Les réactions ont été effectuées simultanément sur tous les isolats dans un thermocycleur avec le protocole suivant :

La technique PCR consiste à extraire l'ADN bactérien par ébullition en effectuant un choc thermique. La souche bactérienne isolée sur un milieu solide TCS est prélevée puis mise dans 50µl d'eau stérile et portée à ébullition à 100°C pendant 10 minutes. La solution est ensuite centrifugée pendant 10 minutes à 12000 rpm et le surnageant contenant l'ADN est récupéré.

Pour un seul échantillon, la réaction PCR est effectuée dans un volume final de 25 µl mélange constitué de :

❖ ADN matrice / bactérie	5 µl
❖ Amorce ERIC2	1,5 µl
❖ Taq polymérase	0,45 µl
❖ Mélange de dNTP	1 µl
❖ MgCl ₂	0,75 µl

❖ Tampon PCR	2,50 µl
❖ DMSO	2,50 µl
❖ BSA	0,50 µl
❖ Eau distillée stérile	11,25 µl.

Une dénaturation initiale a été effectuée à 94 ° C pendant 7 min, suivie de 30 cycles d'amplification (dénaturation à 94°C pendant une minute, un recuit à 50°C pendant une minute, et l'extension à 65°C pendant 8 minutes) se terminant par une extension finale à 65°C pendant 16 min.

2.5 Electrophorèse

2.5.1 Principe

L'électrophorèse de l'ADN est une technique de biologie moléculaire qui permet de séparer des fragments d'ADN de différentes tailles en les faisant migrer dans un gel d'agarose en les soumettant à un courant électrique.

2.5.2 Protocole

- ❖ Une quantité de 0.9 g d'agarose est introduit dans 30ml de tampon TAE (50%) et chauffé jusqu'à dissolution de l'agarose (la solution doit devenir limpide),
- ❖ Laisser refroidir à 45°C environ,
- ❖ Placer les joints fournis avec la cuve pour fermer le support de gel et positionner le peigne à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support.
- ❖ Couler lentement le gel sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne.
- ❖ Laisser refroidir, enlever le peigne.
- ❖ Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.
- ❖ Immerger le gel dans le moule d'électrophorèse par le tampon TAE 0,5x
- ❖ Placer le support avec le gel chargé dans la cuve d'électrophorèse en positionnant les puits du côté de la cathode (pôle noir).
- ❖ Par la suite on prend les échantillons d'ADN
- ❖ On mélange le colorant de charge et l'ADN sur un morceau de parafilm et prélever le mélange avec une micropipette réglée sur 14 µl en changeant de cône à chaque prélèvement.

- ❖ Remplir les puits en faisant attention de ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette.
- ❖ Fermer la cuve, brancher les fils et mettre sous tension.
- ❖ Laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel
- ❖ Couper l'alimentation, débrancher les connexions et récupérer le gel dans son support et le placer sous les rayons UV pour visualiser les différentes bandes.

Une échelle d'ADN de 50 pb a été utilisée comme un marqueur de taille moléculaire.

Les gels ont été photographiés sur un transilluminateur 392-nm de longueur d'onde. Les modèles qui diffèrent par une ou plusieurs bandes d'ADN ont été considérés comme type différent.

2.6 Extraction de plasmide

2.6.1 Principe

La détermination du nombre et de la taille des plasmides nécessite d'extraire l'ADN plasmidique, les séparer par électrophorèse sur gel d'agarose et de les révéler après coloration au bromure d'éthidium (BET).

Les plasmides hébergés par les salmonelles codent en particulier pour des propriétés de résistance aux antibiotiques ou pour des facteurs contribuant à la virulence de la souche.

2.6.2 Protocole

L'extraction de l'ADN plasmidique est réalisée par la méthode rapide de Kado et Liu modifiée, de toutes les souches de *Salmonella enteritidis* isolées, à partir des cultures fraîches sur gélose nutritive TCS.

Cette méthode permet une extraction rapide et spécifique des plasmides de petites et moyennes tailles en utilisant deux solutions.

La première solution a pour objectif de séparer les bactéries et la deuxième c'est de faire lyser la paroi bactérienne, en gardant le plasmide tout entier.

Solution 1 : cell suspension buffer

Contient du Tris (tamponne le pH) et de l'EDTA. L'EDTA chélate les cations métalliques divalents (majoritairement le calcium et le magnésium), ce qui déstabilise la membrane bactérienne, et inactive les DNases.

Constitution :

- ✓ 1 ml de Tris (50 mM) pH : 8
- ✓ 40 µl de l'EDTA (0,5 mM)
- ✓ 18,60 ml d'eau distillée

Solution 2 : solution de lyse

Cette solution contient de la soude (NaOH 2 M) ainsi que du SDS, qui est un détergent. Les parois bactériennes sont fragilisées à pH basique (pH=12,5). De plus, à pH basique, les deux brins de l'ADN se séparent. Le chromosome bactérien, très fragile, se linéarise en grands fragments, mais les deux brins des plasmides, beaucoup plus petits, restent circulaires et donc demeurent associés.

Constitution :

- ✓ 1 ml de Tris (1mM)
- ✓ 3 ml SDS (20%)
- ✓ 15 ml d'eau distillée
- ✓ 1 ml de NaOH (2 M)

On a suivi ces étapes pour extraire l'ADN plasmidique à partir de nos souches de *Salmonella enteritidis* :

- ❖ Mettre dans un tube eppendorf 50 µl de la solution 1 ;
- ❖ Déposer une charge bactérienne importante, puis vortexer le mélange ;
- ❖ Ajouter 100µl de la solution S2 ;
- ❖ Une incubation est nécessaire de mélange de 30 à 40 min à 56°C ;
- ❖ Après l'incubation, un volume de 100 µl de phénol-chloroforme est ajouté sur le mélange pour assurer la précipitation des protéines ;
- ❖ Les préparations sont ensuite centrifugées à 12000 tours pendant 20 min
- ❖ Après la centrifugation, les solutions sont prêtes à l'emploi. En isolant alors 80 µl de surnageant ;
- ❖ En ajoutant 10 µl de bleu de bromophénol pour faire colorer le surnageant.

Les plasmides ont été résolus par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,75 % dans le tampon TAE 0,5x à 42 mA (80 Volts) pendant 1 heure à température ambiante, visualisés par

une coloration au Bromure d'Ethidium à 0,4 µg/mL et photographiés par le système GelDoc1000 (Bio-Rad).

Pour l'estimation de la taille moléculaire, les souches de référence *Escherichia coli* VA517 et RP4 d'une taille de 54 bp sont utilisées comme marqueur de poids moléculaire.

RESULTATS

I. Evaluation de la contamination des élevages et leur environnement par *Salmonella*

Au cours de cette étude, les analyses bactériologiques effectuées au sein de laboratoire interne du diagnostic vétérinaire de la société ELALF ont montré la détection de l'espèce *Salmonella* dans 19 échantillons parmi les 134 analysés.

Cette contamination est révélée au niveau de trois sites (A, B et C) parmi les quatre évalués et aussi au niveau des deux couvoirs de localisation anonyme d'un client de la société EL ALF. Ce résultat représente une prévalence de 14,17% du total des échantillons analysés.

1. Evaluation de la contamination des surfaces

Dans cette partie, on a évalué la présence de salmonelle au niveau des surfaces dans les sites suivants :

Couvoir1 et 2 situé à la région de Khémisset et au niveau du site A de l'élevage de poules.

Plus de 16 zones ont été étudiées au niveau de ces sites. La détection de *Salmonella* sur les surfaces est faite par la technique de prélèvement à l'aide des chiffonnettes stériles. Les résultats obtenus sont donnés par le tableau3. On a montré que *Salmonella* est majoritairement absente sur la grande partie des surfaces évaluées. La présence de *Salmonella* a été détectée dans :

- ✓ Le couvoir1 au niveau de salle d'éclosion 1, salle d'éclosion 2, camion de transport de poussin après le lavage et aussi avant la désinfection de ce camion.
- ✓ Le couvoir 2 au niveau de la salle de réception, la salle de fumigation et la salle de stock des œufs à couvrir.
- ✓ Le site A dans le bâtiment 1 (magasin), le bâtiment 6 et aussi dans la salle de stock OAC.

2. Evaluation de la contamination par *Salmonella* dans les poussins d'un jour

La recherche de *Salmonella* chez les poussins d'un jour est effectuée sur 21 lots dont chaque lot contient un ensemble de 15 poussins provenant de 4 sites (4 lots de site A, 9 lots de site B, 3 lots de site C et 5 lots de site D).

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 4 qui a montré la présence de *Salmonella* dans 6 lots au niveau de :

- ✓ Site A : seulement pour le premier prélèvement.
- ✓ Site B : 3 derniers prélèvements.
- ✓ Site C : 2 derniers prélèvements.

Le site D ne présente aucune contamination des poussins par les salmonelles.

3. Evaluation de la contamination par *Salmonella* dans les œufs non éclos

L'examen bactériologique pour la recherche de *Salmonella* au niveau des œufs destinés à l'éclosion est réalisé sur 13 œufs provenant de 3 sites (4 œufs à partir de site A et de site B et 5 œufs à partir de site D).

Les résultats obtenus sont donnés par le tableau 5, montrant l'absence de *Salmonella* dans la majorité des prélèvements à l'exception de dernier lot de site B.

4. Evaluation de la présence de *Salmonella* dans les excréments de poules.

Les salmonelles peuvent être excrétées dans les selles de poules, c'est pour cela qu'on a réalisé des prélèvements à partir des écouvillons cloacaux stériles (5 écouvillons) afin de vérifier la présence de la bactérie à ce niveau.

Le tableau 6 représente les résultats obtenus au cours des analyses bactériologiques effectuées et qui montrent la détection de *Salmonella* seulement au niveau de premier prélèvement à partir de site A (n=2) et son absence dans le site B (n=3) et le site D (n=5).

5. Evaluation de la contamination par *Salmonella* chez les poules

La recherche bactériologique des Salmonelles au niveau des organes prélevés par 5 lots des cadavres de poulets (5 cadavres par lot) de 4 sites (un lot provenant de site A, B, C, et 2 lots à partir de site D).

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 7 dont on a constaté une contamination par *Salmonella* uniquement dans le site B.

II. Interprétation des résultats de la contamination des élevages par *Salmonella*

Les voies de l'infection par *Salmonella* peuvent être soit par :

- ✓ Une voie de transmission verticale par la mère contaminée vers les constituants de l'œuf puis vers les poussins.
- ✓ Une voie de transmission horizontale via différentes sources de contamination comme les personnes, l'aliment, les rongeurs, etc...

1. Site A

L'évaluation de l'état sanitaire de poules de ce site en faisant des prélèvements cloacaux a montré l'excrétion de *Salmonella* par ces poules, donc elles sont des porteuses de la bactérie.

La contamination de la mère peut influencer la qualité sanitaire des œufs et des poussins.

Ainsi, la détection de *Salmonella* au niveau de 3 zones (bâtiment 1 (magasin), bâtiment 6 et salle de stock OAC) lors de contrôle de la qualité hygiénique de site A impose le risque d'une contamination horizontale des élevages et aussi des œufs.

La contamination des poussins révélée lors du premier prélèvement peut être d'origine verticale à travers la mère contaminée, mais cette proposition ne peut pas être estimée à 100% puisque les œufs au niveau de ce site n'ont présenté aucune colonisation par *Salmonella*.

La probabilité d'une contamination horizontale est aussi possible qui devrait être vérifiée par la réalisation des prélèvements des surfaces à l'aide des chiffonnettes durant la période de contamination.

On a remarqué dans les derniers prélèvements une absence de contamination chez les poussins et les poules. On peut alors dire que le traitement par des antibiotiques utilisés par le vétérinaire de la société était efficace.

2. Site B

L'évaluation bactériologique de poules de site B a détecté la présence de *Salmonella*, ce qui peut engendrer un risque sur la descendance issue de poules de ce site.

Donc on peut estimer que le pourcentage de la contamination chez les poussins et au niveau des œufs par la voie transovarienne (verticale) par une mère porteuse de la bactérie est très élevé dans ce cas.

La transmission horizontale est aussi possible qu'elle devrait être jugée par la réalisation de contrôle régulier de l'ambiance d'élevage.

3. Site C

On remarque dans ce site, l'absence de *Salmonella* lors de la recherche bactériologique effectuée chez les poulets. Tandis que chez les poussins, on a détecté la présence de la bactérie.

Cette contamination peut être justifiée par une transmission horizontale de la bactérie à travers des surfaces ou des couvoirs présentant une qualité hygiénique médiocre.

4. Site D

Au niveau de site D, on a montré l'absence de *Salmonella* dans tous les prélèvements issus des poules, des poussins et des œufs. Ces résultats peuvent nous donner une idée générale sur l'état hygiénique et sanitaire concernant ce site.

La bonne conformité de ce site peut être le bilan du respect des bonnes pratiques et des conditions de l'hygiène tout au long de la chaîne de production avicole.

Tableau 3 : Evaluation de la présence de *Salmonella* au niveau du Couvoir-1 (A), du couvoir-2 (B) et de la ferme de reproduction : Site A (C)

Table A	Recherche de <i>Salmonella</i>			
Site De Prélèvement	Lieu de prélèvement	26/01/2011	16/03/2011	Conclusion
Couvoir 1	-Salle d'incubation1	Négatif	Négatif	L'évaluation de vide sanitaire montre en 1 ^{er} prélèvement la présence de <i>Salmonella</i> au niveau de surfaces contrôlées de quatre endroits, ce qui montre que le nettoyage et/ou la désinfection de ces lieux n'étaient pas efficaces. Tandis que pour le 2 ^{ème} prélèvement, le contrôle de la qualité sanitaire des surfaces montre que les procédures de nettoyage/désinfection ont été efficaces.
	- Salle d'incubation2	Négatif	Négatif	
	- Salle d'incubation3	Négatif	Négatif	
	- Salle d'incubation4	Négatif	Négatif	
	-Salle de triage OAC	Négatif	Négatif	
	-Salle de réception OAC	Négatif	Négatif	
	-Salle de fumigation OAC	Négatif	Négatif	
	-Salle de stockage OAC	Négatif	Négatif	
	-Salle de stockage P1J	Négatif	Négatif	
	-Salle de triage P1J	Négatif	Négatif	
	-Salle d'éclosion1	Positif	Négatif	
	-Salle d'éclosion2	Positif	Négatif	
	-Salle d'expédition P1J	Négatif	Négatif	
	-Salle de transfert	Négatif	Négatif	
	-Couloir1	Négatif	Négatif	
	-Couloir2	Négatif	Négatif	
	-Entrée air	Négatif	Négatif	
	-Salle de lavage	Négatif	Négatif	
	-Camion poussin lavé	Positif	Négatif	
	-Camion poussin avant désinfection	Positif	Négatif	

Table B		Recherche de <i>Salmonella</i>	
Site de prélèvement	Lieu de prélèvement	09/02/2011 Résultat	Conclusion
Covoit 2	-Salle d'incubation1	Négatif	L'évaluation de vide sanitaire montre la détection de <i>Salmonella</i> au niveau de surfaces contrôlées de trois endroits. Généralement, les lieux détectés positifs pour la contamination par <i>Salmonella</i> présentent un risque de contamination des œufs à couver (OAC). Cette contamination peut être causée par un mauvais respect des procédures de nettoyage et/ou de désinfection de ces lieux.
	- Salle d'incubation2	Négatif	
	-Salle de triage OAC	Négatif	
	-Salle de réception OAC	Positif	
	-Salle de fumigation OAC	Positif	
	-Salle de stock OAC	Positif	
	-Salle de stock PIJ	Négatif	
	-Salle d'expédition PIJ	Négatif	
	-Salle de stock2	Négatif	
	-Salle de fumigation cartons.	Négatif	
	-Salle de fumigation chariots.	Négatif	
	-Salle de triage PIJ	Négatif	
	-Salle de transfert	Négatif	
	-Couloir1	Négatif	
	-Couloir2	Négatif	
	-Entrée air	Négatif	
	-Salle de lavage	Négatif	
-Camion poussins lavé	Négatif		
-Camion poussin avant désinfection	Négatif		

Table C		Recherche de <i>Salmonella</i>	
Site de prélèvement	Lieux de prélèvement	Résultat	Conclusion
Site A 21/04/2011	-Bâtiment 1 (x2) -Bâtiment 1 mag -Bâtiment 2 (x2) -Bâtiment 2 mag -Bâtiment 3 -Bâtiment 3 mag -Bâtiment 4(x2) -Bâtiment 4 mag -Bâtiment 5 -Bâtiment 5 mag -Bâtiment 6 -Bâtiment 6 mag -Salle de stock OAC	-Négatif -Positif -Négatif -Négatif -Négatif -Négatif -Négatif -Négatif -Négatif -Négatif -Positif -Négatif -Positif	La détection de la contamination par <i>Salmonella</i> au niveau de trois endroits pour ce site indique que les procédures de nettoyage et/ou désinfection n'ont pas été efficaces.
Site A 28/04/2011	-Bâtiment 1 (x2) -Bâtiment 1 mag -Bâtiment 2 -Bâtiment 2 mag -Bâtiment 6 (x2) -Bâtiment 6 mag -Salle de stock OAC	Négatif pour tous les prélèvements.	L'absence de <i>Salmonella</i> au niveau des surfaces contrôlées lors de 2 ^{ème} prélèvement montre que les procédures de nettoyage et de désinfection se sont déroulées dans les bonnes conditions.

Tableau 4: Evaluation de la contamination des poussins nouveau-nés par *Salmonella* au niveau de sites A,B (A), C et D (B).

Table A		Recherche de <i>Salmonella</i>	
Site de prélèvement	Date de prélèvement	Résultat	Conclusion
Site A	17/01/2011	Présence de <i>Salmonella</i>	L'absence de <i>Salmonella</i> dans les trois derniers prélèvements montre que le traitement par les antibiotiques était efficace.
	07/02/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	09/02/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	21/02/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
Site B	17/01/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	Une contamination a été constaté au niveau de septième prélèvement et qui a persisté dans les prélèvements qui suivent. On peut dire que la bactérie dans ce cas résiste au traitement ou aussi la source de contamination n'est pas bien gérée (soit une contamination verticale par la mère vers le poussin ou bien une contamination horizontale à travers les surfaces, les personnes ...)
	07/02/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	09/02/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	21/02/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	07/03/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	21/03/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	28/03/2011	Présence de <i>Salmonella</i>	
	04/04/2011	Présence de <i>Salmonella</i>	
02/05/2011	Présence de <i>Salmonella</i>		

Table B		Recherche de <i>Salmonella</i>	
Site de prélèvement	Date de prélèvement	Résultat	Conclusion
Site C	21/03/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	On peut estimer la même conclusion pour le site C que pour le site B.
	04/04/2011	Présence de <i>Salmonella</i>	
	02/05/2011	Présence de <i>Salmonella</i>	
Site D	20/01/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	Au niveau de site D, on remarque l'absence de la contamination des poussins par <i>Salmonella</i> , donc on peut considérer que ce site est d'une bonne qualité hygiénique (source de transmission horizontale) et que la mère n'est pas une porteuse de la bactérie (source de transmission verticale).
	07/02/2011		
	21/02/2011		
	04/04/2011		
	02/05/2011		

Tableau 5 : Evaluation de la colonisation des œufs par *Salmonella* au niveau des sites A,B (A), et D (B).

Table A	Recherche de <i>Salmonella</i>		
Site de prélèvement	Date de prélèvement	Résultat	Conclusion
Site A	19/01/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	-Pas de transmission verticale par la mère vers les œufs. - Pas de transmission horizontale.
	26/01/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	07/02/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	09/02/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
Site B	19/01/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	Le dernier prélèvement montre une contamination par <i>Salmonella</i> . La contamination peut venir soit d'une voie verticale ou horizontale. Les poussins de ce site seront forcément contaminés.
	26/01/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	23/02/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	04/04/2011	Présence de <i>Salmonella</i>	

Table B	Recherche de <i>Salmonella</i>		
Site de prélèvement	Date de prélèvement	Résultat	Conclusion
Site D	19/01/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	Pas de transmission verticale par la mère vers les œufs. Pas de transmission horizontale.
	26/01/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	09/02/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	23/02/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	09/03/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	

Tableau 6 : Résultats de la détection de *Salmonella* au niveau des prélèvements cloacaux chez les poulets *Salmonella* au niveau de sites A,B (A), et D (B) .

Table A		Recherche de <i>Salmonella</i>	
Site de prélèvement	Date de prélèvement	Résultat	Conclusion
Site A	19/01/2011	Présence de <i>Salmonella</i>	Les écouvillons cloacaux pourraient indiquer un portage salmonellique important chez les poules de 1 ^{er} prélèvement. On peut estimer l'efficacité de traitement à partir de 2 ^{ème} prélèvement.
	26/01/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
Site B	19/01/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	La non détection de <i>Salmonella</i> au niveau de prélèvements cloacaux dans ce site permet de juger que les poulets ne sont pas des porteurs de la bactérie.
	26/01/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	23/02/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	

Table B		Recherche de <i>Salmonella</i>	
Site de prélèvement	Date de prélèvement	Résultat	Conclusion
Site D	19/01/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	La même conclusion que le site B.
	26/01/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	09/02/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	23/02/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	
	09/03/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	

Tableau 7 : Détection de *Salmonella* chez les poulets au niveau des 4 sites de reproduction (A, B, C et D).

Site de prélèvement	Date de prélèvement	Résultat	Conclusion
Site A	18/01/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	Pas de possibilité de la contamination des œufs et des poussins verticalement (pour cette période).
Site B	20/04/2011	Présence de <i>Salmonella</i>	Les œufs et les poussins issus des poulets de ce site sont forcément contaminés.
Site C	31/03/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	La contamination par voie verticale n'est pas établie à ce stade.
Site D	02/04/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	La même conclusion que le site C.
	04/05/2011	Absence de <i>Salmonella</i>	

Tableau 8 : Différents échantillons positifs.

N° de l'échantillon	Type	Site de prélèvement	Date de prélèvement
1	chiffonnettes	Salle d'éclosion 1 (couvoir 1)	26/01/2011
2	chiffonnettes	Salle d'éclosion 2 (couvoir 1)	26/01/2011
3	chiffonnettes	Camion de poussin lavé (couvoir 1)	26/01/2011
4	chiffonnettes	Camion de poussin avant désinfection (couvoir 1)	26/01/2011
5	chiffonnettes	Salle de reception OAC (couvoir 2)	09/02/2011
6	chiffonnettes	Salle de fumigation OAC (couvoir 2)	09/02/2011
7	chiffonnettes	Salle de stock OAC (couvoir 2)	09/02/2011
8	chiffonnettes	Bâtiment 1 (site A)	21/04/2011
9	chiffonnettes	Bâtiment 6 (site A)	21/04/2011
10	chiffonnettes	Salle de stock. OAC (site A)	21/04/2011
11	poussins	Site A	17/01/2011
12	poussins	Site B	28/03/2011
13	poussins	Site B	04/04/2011
14	poussins	Site B	02/05/2011
15	poussins	Site C	04/04/2011
16	poussins	Site C	02/05/2011
17	Œufs	Site B	04/04/2011
18	Ecouvillons	Site A	19/01/2011
19	poulets	Site B	20/04/2011

III. Etude phénotypique

1. L'antibiogramme

Ce test nous a permis de vérifier la sensibilité aux antibiotiques de nos 19 isolats détectés positifs pour *Salmonella* dans 2 couvoirs et 3 sites (A, B, et C). (Tableau 8)

La détermination du phénotype de résistance a été obtenue par la méthode de diffusion sur la gélose Muller Hinton vis-à-vis des 13 antibiotiques testés, par la comparaison entre le diamètre d'inhibition obtenu pour chaque antibiotique avec des diamètres critiques définis par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. (Tableaux 9 et 10)

Les isolats de *Salmonella* obtenus ont été phénotypiquement proches, résistants dans leur ensemble à 100 % (n=19) à l'acide nalidixique et le sulfamide, 79% (n=15) à l'ampicilline, 47% (n=9) à la ticarcilline-acide clavulanique, 16% à la tétracycline et 10,5% (n=2) à triméthoprime/sulfaméthoxale.(Tableau 11)

2. Sérotypage

On a détecté le même sérotype pour tous les échantillons estimés *Salmonella* positif. Les tests ont révélé la présence des antigènes O9, H: g,m. Ceci indique que les espèces analysées sont des *Salmonella enteritidis* avec une prévalence de 100%.

IV. Etude génétique

1. PCR

L'amplification génique des souches de *Salmonella* pour 9 échantillons (un échantillon est sélectionné de chaque site), utilisant l'amorce sens unique Eric 2, avec les conditions déjà décrite dans la partie matériel et méthode. Les produits de PCR visualisés par une électrophorèse sur gel d'agarose à mis en évidence au sien de ce sérotype un seul profil identique de 3 bandes de taille allant de 250 à environ 450 pb (figure 6).

2. Recherche de plasmide

Toutes les *Salmonella enteritidis* isolées au cours de cette étude (n=19) ont fait l'objet d'une analyse du contenu plasmidique utilisant la méthode rapide décrite par Kado et Liu en 1981). Les résultats ont montré que la totalité des échantillons porte un seul plasmide de taille 54 kbp (figures 7 e 8). La figure 7 représente l'électrophorèse en gel d'agarose pour 9 échantillons (sélection d'un échantillon de chaque site).

Tableau 9 : Diamètres de l'inhibition de la croissance de *Salmonella* vis-à-vis des différents antibiotiques.

Echantillon	TE	NA	OFX	S	TMP	GEN	SSS	TCC	CRO	CTX	CF	AM	AN
1	23	0	25	19	18	25	0	18	34	24	14	15	22
2	19	0	23	22	23	29	0	17	28	21	13	12	25
3	0	0	27	17	0	29	0	21	31	24	12	12	25
4	0	0	22	16	0	27	0	19	29	26	12	10	21
5	20	0	25	15	20	25	0	18	30	19	13	11	25
6	21	0	25	16	22	26	0	17	31	22	13	12	24
7	20	0	27	15	20	27	0	16	29	19	14	14	25
8	20	0	24	17	19	29	0	18	32	23	12	14	27
9	20	0	25	15	20	27	0	16	29	19	14	14	25
10	19	0	26	20	19	27	0	14	25	16	12	10	17
11	20	0	24	17	22	28	0	15	29	26	13	10	21
12	19	0	25	19	19	31	0	18	30	17	10	09	22
13	16	0	28	18	21	26	0	14	25	24	10	12	19
14	18	0	27	22	17	38	0	17	35	21	14	12	25
15	0	0	28	16	0	29	0	19	29	25	12	10	21
16	22	0	29	16	21	29	0	19	31	30	12	08	20
17	20	0	28	18	20	30	0	19	31	29	12	10	22
18	22	0	25	21	19	31	0	18	28	25	13	13	24
19	19	0	27	20	19	30	0	15	27	29	12	09	17

Tableau 10 : Diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques.

Agent antimicrobien	Code du disque	R = mm ou moins	I = mm étendu	S = mm ou plus
Ampicilline	AM	13	14-18	19
Céfaloine	CF	11	12-17	18
Cefotaxime	CTX	14	15-20	21
Sulfamide	SSS	11	12-16	17
Streptomycine	S	11	12-14	15
Tétracycline	Te	16	17-18	19
Acide nalidixique	NA	14	15-19	20
Ofloxacine	OFX	21	22-24	25
Gentamycine	GEN	15	16-17	18
Triméthoprim/sulfaméthoxale	TMP	09	10-15	16
<i>Ticarcilline</i> -acide clavulanique	TTC	17	18-21	22
Ceftriaxone	CRO	14	15-20	21
Amikacine	AN	14	15-16	17

Tableau 11 : Profil de sensibilité aux antibiotiques des *Salmonella enteritidis* isolées.

Echantillon	Profil de résistance	Echantillon	Profil de résistance
1	NA, SSS	11	NA, SSS, TTC, AM
2	NA, SSS, TTC, AM	12	NA, SSS, AM
3	NA, SSS, TE, AM	13	NA, SSS, TTC, AM
4	NA, SSS, TE, AM	14	NA, SSS, TTC, AM
5	NA, SSS, AM	15	NA, SSS, TE, TMP, AM
6	NA, SSS, TTC, AM	16	NA, SSS, AM
7	NA, SSS, TTC	17	NA, SSS, AM
8	NA, SSS	18	NA, SSS, AM
9	NA, SSS, TTC	19	NA, SSS, TTC, AM
10	NA, SSS, TTC, AM	-	-

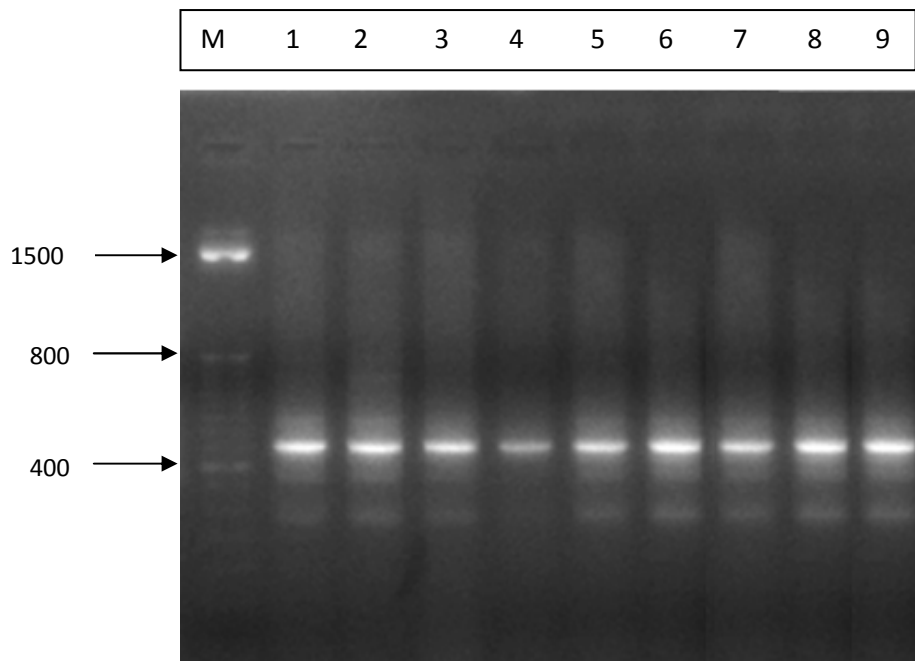


Figure 6 : Electrophorèse en gel d'agarose à 1 % des produits de PCR obtenue on utilisant l'amorce ERIC 2.
M : Marqueur de poids moléculaire 50 bp.
1 : chiffonnette couvoir 1 2 : chiffonnettes couvoir 2 3 : chiffonnettes site A 4 : poussins site A 5 : poussins site B
6 : poussins site C 7 : œusf site B 8 : écouvillons site A 9 : poules site B

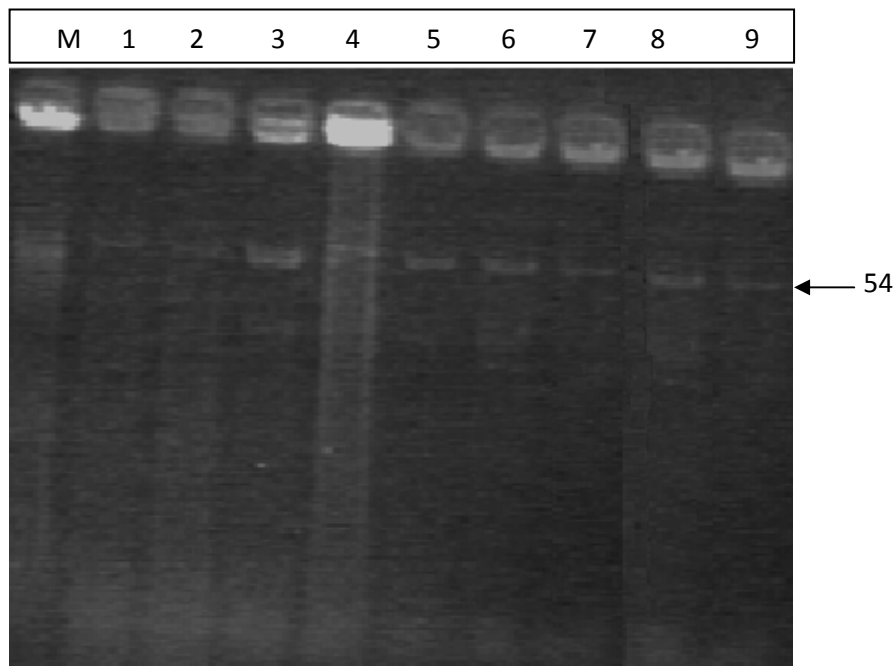


Figure 7 : Electrophorèse en gel d'agarose à 0,75 % des plasmides obtenue par extraction rapide de Kado et Liu.

Marqueur de poids moléculaire M : *Escherichia coli* VA517.
1 : chiffonnette couvoir 1 2 : chiffonnettes couvoir 2 3 : chiffonnettes site A 4 : poussins site A 5 : poussins site B
6 : poussins site C 7 : œusf site B 8 : écouvillons site A 9 : poules site B

Discussion

Les infections humaines à *Salmonella enterica* sérotype *enteritidis* continue d'être un problème de santé publique à travers le monde comme il est le sérovar le plus fréquemment signalé associé à des gastro-entérites.

Les salmonelloses humaines causées par ce sérotype est dans la majorité des cas, ont été en raison de la manipulation des aliments insalubres et consommation d'œufs crus ou mal cuits et de la volaille produits. Malgré les efforts déployés par la santé publique pertinente autorités pour améliorer la salubrité des aliments, des cas sporadiques ou éclosions d'intoxication alimentaire se produisent encore en grande population, domaines de restauration alimentaire, en particulier dans les établissements, usines et écoles.

Ces dix dernières années, *Salmonella enteritidis* occupe le deuxième rang des Salmonelloses humaines, alors qu'elle occupe les cinq premiers rangs de ces souches isolées de différentes denrées alimentaires à l'échelle mondiale.

Au cours de ce travail qui consiste à faire une évaluation du degré de contamination de la filière avicole pour les sites étudiés par *Salmonella*, les sérotypes circulant et l'étude de la résistance de cette bactérie vis-à-vis de certains antibiotiques, les résultats obtenus ont montré qu'environ 14,17 % des échantillons (19/134) analysés ont été détectés positifs pour la *Salmonella*.

Notre étude a confirmé la prédominance totale de sérotype *Salmonella enteritidis* dans tous les échantillons positifs.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus lors d'une étude faite en Malaisie par Rusul et al, en 1996, pour déduire la prévalence de *Salmonella* dans les poulets de chair dans les commerces, les usines de transformation et des fermes dont *Salmonella* a été isolé chez 14 des 98 (14,3%) des échantillons du contenu intestinal des poulets. Des échantillons prélevés à partir de litière dans les fermes de poulets de chair et reproducteurs avec une prévalence de 20%. Le sérotype prédominant était *Salmonella enteritidis*.

Dans une étude conduite entre 1998 et 2002 à l'Institut Pasteur d'Alger, sur 51826 prélèvements de la filière volaille, 232 souches ont été isolées durant les 5 années de collecte

des données. Parmi les souches recueillies, 48% appartenait au sérotype *Salmonella enteritidis*.

Cependant, des enquêtes nationales à Canada en 1994, ont montré une faible prévalence de *Salmonella enteritidis* dans les troupeaux de volailles : *Salmonella enteritidis* a été isolé dans des échantillons environnementaux de 2,7% des troupeaux de poudeuses et de 3% des élevages de poulets de chair. La prévalence globale de *Salmonella enteritidis* œufs contaminés à partir de deux troupeaux de poules infectées a été inférieure à 0,06%. (Poppe, 1994)

De même des études réalisées à l'Institut Pasteur à Casablanca sur des carcasses de poulets de chair collectées en différents locaux commerciaux et de supermarchés ont montrées des prévalences de 1,5% pour *Salmonella enteritidis* (Cohen *et al.*, 2007).

Une étude réalisée par ELGROUD en 2008 en Algérie sur l'évaluation de la contamination du poulet de chair par les salmonelles a confirmé la détection de *Salmonella enteritidis* avec un taux faible de contamination estimé à 4% et une prédominance de *Salmonella hadar* (36%).

D'après ces études, il paraît que la prévalence au niveau de la chaire de poulets ne dépasse pas 5%. Alors que les fortes prévalences sont généralement liées à une analyse d'échantillons contenant des matières fécales.

Les outils moléculaires utilisés au cours de notre étude sur ces souches de *Salmonella enterica* sérotype enteritidis ont confirmé qu'il s'agit d'un même clone apparenté génotypiquement disséminé dans tous les endroits examinés.

Plusieurs moyens de lutte ont été envisagés en cas d'une contamination par *Salmonella*, notamment l'antibiothérapie. Cependant, l'efficacité de tels traitements se trouve actuellement limitée par la capacité de certaines souches de *Salmonella* à résister aux antibiotiques.

Selon nos résultats, toutes les souches de *Salmonella enteritidis* isolées au cours de cette étude ont présenté une résistance commune à l'acide nalidixique et le sulfamide (n=19), tandis que 79% (n=15) des isolats ont été résistants à l'ampicilline, 47% (n=9) à la ticarcilline-acide clavulanique, 16% à la tétracycline et seulement 2 isolats étaient résistants au triméthoprime/sulfaméthoxale (10,5%). D'après ces résultats, les antibiotiques qu'on peut utiliser en antibiothérapie sont ceux qui ne représentent aucune résistance remarquable au cours du test d'antibiogramme qu'on a réalisé, comme par exemple : la gentamicine, la streptomycine, Ceftriaxone, etc...

Cette importante proportion d'isolats résistants à l'acide nalidixique, n'est pas très surprenante, au regard de l'augmentation importante des résistances à cette molécule observée dans beaucoup de pays au cours de ces dernières années (Aerestrup *et al.*, 2007).

Cette antibiorésistance peut être expliquée par l'acquisition par *Salmonella* des gènes plasmidiques de résistance, ou encore par l'apparition des mutations qui induisent une résistance spécifique à certaines familles d'antibiotiques ou des multirésistances à plusieurs familles d'antibiotiques.

Le plasmide isolé de ces *Salmonella enterica* sérotype *enteritidis* est de taille d'environ 54 kb, il peut être probablement impliqué dans la résistance aux antibiotiques ou dans la virulence de ces souches.

Une étude des profils plasmidiques et de la résistance aux antibiotiques a été réalisée en Belgique sur des souches de *Salmonella enteritidis* de différentes sources (coprocultures humaines, poulets, denrées alimentaires à base de poulet, autres animaux). La majorité des souches (80% d'origine humaine, 71% d'origine non-humaine) contiennent un seul plasmide de 56 kb. Chez les autres souches, un éventail de profils plasmidiques a été décelé, comprenant presque toujours le plasmide de 56 kb (YDE, 1998).

La prévalence de la contamination des élevages avicoles par *Salmonella enteritidis*, met en évidence l'importance d'une très large surveillance de l'industrie avicole, pour le respect des normes d'élevage, particulièrement les mesures d'hygiène individuelles et collectives.

Et comme la majorité des souches de salmonelles résistantes aux antibiotiques sont toujours associées à des infections graves, il serait capital d'accentuer la surveillance de l'utilisation des antibiotiques, notamment en filière avicole, dans le but de prévenir l'augmentation des résistances aux molécules récentes.

Conclusion et perspectives

Cette étude effectuée au sein du laboratoire bactériologique de la société EL ALF et le laboratoire de microbiologie et sécurité alimentaire à l'Institut Pasteur nous a permis d'obtenir une image précise de la situation de la filière avicole pour les différents sites étudiés au regard du risque de la contamination par *Salmonella*.

Elle nous renseigne sur le sérotype le prédominant qu'il est isolé dans tous les prélèvements analysés et qu'il s'agit de sérovar *S. enteritidis*, à savoir sa capacité pour se transmettre, soit verticalement par la voie ovarienne, donc la contamination de l'œuf fécondé et ensuite les poussins après l'éclosion ; Soit horizontalement par l'intermédiaire de la poussière, du matériel ou des bâtiments.

La possibilité d'une transmission horizontale est plus fréquemment remarquée au niveau du site A (détection de la contamination chez les poules de reproduction et chez les poussins nouveau-nés, tandis que les œufs ont été indemnes).

La transmission verticale est le plus probablement observée chez l'élevage du site B qui peut être produite suite à l'infection du système de reproduction de la poule et par conséquent, la contamination de la descendance (œufs et poussins).

Afin de réduire et maîtriser la contamination de la filière avicole par les salmonelles, il faut respecter des règles sanitaires et d'hygiène pour les volailles et le secteur avicole.

La possibilité de contaminer les animaux par l'aliment doit être prise en compte et les mesures pour les élevages de reproduction, des échantillons d'aliments composés doivent être prélevés à chaque livraison et conservés pendant la durée d'élevage du troupeau dans des conditions satisfaisantes permettant la recherche d'une contamination par *Salmonella*.

La contamination des couvoirs et des fermes avicoles par *Salmonella* doit faire l'objet d'une décontamination qui consistera en l'élimination de l'agent infectieux des unités concernées en suivant les bonnes pratiques et les procédures d'hygiène, en plus d'une désinfection permanente d'ambiance d'élevage. La qualité de ces procédures doit être régulièrement vérifiée par des contrôles visuels une fois par semaine et contrôle bactériologique des surfaces une fois par quinzaine au moins.

La gestion des déchets et effluents d'élevage doit respecter les prescriptions du code de l'environnement, et du code de la santé publique. Les enlèvements et épandages des effluents d'élevage sont gérés de manière à ne pas constituer un risque de contamination des troupeaux avoisinants par *Salmonella*.

Pour les œufs à couvrir, la désinfection doit être faite sur place et puis les œufs doivent être stockés rapidement après la ponte dans un local spécial. Ils seront transportés vers le couvoir par un véhicule et du matériel propres et désinfectés. Le véhicule sera réservé à cet usage.

En perspectives, il est important de mettre en priorité :

- ✓ La réalisation des investigations sur la contamination par *Salmonella*, particulièrement *Salmonella enteritidis* à grande échelle dans les diverses filières avicoles au Maroc, afin d'obtenir des informations écologiques et épidémiologiques concernant cette bactérie et d'évaluer les risques liés à sa présence.
- ✓ Comparer ces souches avec d'autres isolées chez les Humains pour une traçabilité épidémiologique utilisant les outils moléculaires (PFGE, MLVA, MLST..)
- ✓ Etudier le support génétique de la résistance de *Salmonella* aviaire aux antibiotiques et aussi leurs gènes de virulence.

Références

- Barrow P.A., Huggins M.B., kovell M.A. and Simpson J.M., 1987. Observations on the pathogenesis of experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens. Res. Vet. Sci. 42, 194-199.
- Baumler A.J., Tsolis R.M. et Heffron F., 2000. Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic bases in: *Salmonella* in domestic animals.eds. Wray, C. And Wray, A. CAB International, U.K. 57-71.
- Bell C. et Kyriakides A., 2002. *Salmonella* in: Foodborne Pathogens. Hazards, risk analysis and control. Woodhead Publishing Limited.: 307-334.
- Benson C.E., Keller L. H., 1998, Characterization of chicken infection with *Salmonella enterica* serovar enteritidis, In : *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Humans and Animals Epidemiology, Pathogenesis and Control edited by A.M. Saeed, *et al*, 464 p.
- Berrang M.E., Frank J.F., Buhr R.J., Bailey J.S., Cox N.A. 1999, Eggshell membrane structure and penetration by *Salmonella typhimurium*. *J. Food Protect.*, 62, 73-76.
- Bornet G., 2000. Le poulet sans salmonelles : Mythe ou réalité? Rev.med.vet.151, 12 : 1083-1094.
- Carlier V. et Lagrange P., 2001. *Salmonella* , service d'information alimentaire,H.C.S. International.Paris. p 84.
- Carroll P., La Ragione R.M., Sayers A.R., et Woodward M.J., 2004. The O-antigen of *S.enterica* sertype Enteritidis PT 4 : A significant factor in gastrointestinal colonisation of young but not newly hatched chicks. *Vet. Microbiol.*102 : 73-85.
- Cohen N., Ennaji H., Boucherif B., Hassar M., and Karib H. 2007, Comparative study of microbiological Quality of Raw poultry meat at various seasons and for different slaughtering process in Casablanca (Maroc) *J. Appl. Poultry Res.* 16 : 502-508
- D'Aoust J.-Y., 1991. Pathogenicity of foodborne *Salmonella* . *Int. J. Food Microbiol.* 12, 17-40.

Doyle P. et Cliver D.O., 1990. *Salmonella* in foodborne diseases. Ed. Academic press : 185-204.

Duguid J.P and North R.A.E., 1991. Egg and *Salmonella* food-poisoning: an evaluation. J. Med. Microbiol. 34, 65-72.

Elgroud R., Zerdoumi F., Benazzouz M., Bouzitouna-Bentchouala C., Granier S.A., Fremy S., Brisabois A., Dufour B. and Millemann Y., 2008. Characteristics of *Salmonella* contamination of broilers and slaughterhouses in the region of Constantine (Algeria) Zoonose and Public Health Online publication.

Euzeby J.P., 1997. Les salmonelles et les salmonelloses aviaires dues aux sérovars ubiquistes, *Revue Méd. Vét.*, 148, 1, 61-76

Faddoul G.P. and Fellows G.W., 1966. A five-year survey of the incidence of *Salmonella* e in avian species. Avian Dis. 10, 296-304.

Fuller R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl.Bacteriol.*, **66**, 365-378.

Gast R.K., 2003. *Salmonella* : Paratyphoid infections. In : Diseases of poultry, 11th ed., chap.16. Iowa state press, Blackburn publishing compagny.

Gradel K.O., Rattenborg E., 2003. Aquestionnaire-based retrospective field study of persistence of *Salmonella typhimurium* in Danish broiler houses. *Prev. Vet. Med.*, 56, 267-284.

Grandsart C., 1998. Les facteurs de virulence des salmonelles : Étude bibliographique. *Th. Méd. Vèt.* Alfort

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.

Haeghebaert S., Le Querrec F., Bouvet P., Gallay A., Espie E. et Vaillant V., 2002. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. N° 50/2002, pp : 1-10.

Hedberg C.W., David M.J., White K.E., MacDonald K.L. and Osterholm M.T., 1993. Role of egg consumption in sporadic *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* infections in Minnesota. J. Infect. Dis. 167, 107-111.

Helmuth R., 2000. Antibiotic Resistance in *Salmonella* .In : *Salmonella* in Domestic Animals, edited by Wray,C. And Wray,A. CABI publishing.London,UK.pp:89-106.

Holt P.S., Gast R.K., Kelly-Aehle S., 2003, Use of a live attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine to protect hens against *Salmonella enteritidis* infection while undergoing molt. *Avian Dis.*, 47, 656-661.

Humbert F., 1998. Les Salmonelloses. dans Manuel de Bactériologie Alimentaire,ed. Polytechnica. Paris.

Kauffmann F., 1935. Weitere Erfahrungen mit dem kombinierten Anreicherungsverfahren für *Salmonella* bazillen. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheit, 117 : 26-32

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

Kristensen M., Lester V., and Jurgens A., 1925. On the use of trypsinized casein, bromthymol blue, brom cresol purple, phenol red and brilliant green for bacteriological nutrient media. Brit. J. Exp. Pathol. 6 : 291.

Leifson E., 1935. New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. J. Pathol. and Bacteriol. 40 : 581-599.

Leifson E., 1936. New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (*Salmonella*) bacilli. American journal of hygiene, 24 : 423-432.

Le Minor L., 1994. The genus *Salmonella* . In: The procaryotes.Ballows and all.Springer, New York : 2760-2774.

Müller L., 1923. Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacille typhique et des paratyphiques. Comptes Rendus de la Société de Biologie, 89 : 434-437.

Murray C.J., 1991. Salmonella in the environment. Rev. sci. tech. O.I.E. 10 (3): 765-785.

Peiffer B., 1999. Salmonelloses et fièvres typhoïdes. [Http://www.listehygiene.org/SALMON.html](http://www.listehygiene.org/SALMON.html) pages: 1-17.

Poppe C., 1994. *Salmonella enteritidis* in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 21, Issues 1-2, p 1-5.

Rappaport F., Konforti N., and Navon B., 1956. A new enrichment medium for certain *Salmonella* e. *Journal of Clinical Pathology*, 9 : 261-266.

Reeves M.W., Evins G.M., Heiba A.A., Pleikeytis B.D. et Farmer J.J., 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *Salmonella* e as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb.nov. *Journal of clinical microbiology* 27,313-320.

Rhen M., Taira S., Koski P., Hurme R., Rikonen P. et Makela P.H., 1992. Virulence factors of *Salmonella* . In:*Salmonella* and Salmonellosis,Saint Brieuç,Guivarch,103-112.

Rusul G., Jamal Khair, Son Radu, C. T. Cheah, R. Md. Yassin, 1996. Prevalence of *Salmonella* in broilers at retail outlets, processing plants and farms in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 33, Issues 2-3,Pages 183-194

Rycroft A.N., 2000. Structure,function and synthesis of surface polysacharids in *Salmonella* in domestic animals. CAB international,eds. Wray,C. and Wray,A. : 19-33.

Shivaprasad H.L., Timoney J.F., Morales S., Lucio, B., et Baker, R.C., 1990, Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens. I. Studies on egg *transmission*, clinical signs, fecal shedding, and serologic responses. *Avian Dis.*, 34, 548-557.

Shivaprasad H.L., 2003. Pullorum disease and fowl typhoid. In : Diseases of poultry.11th ed. eds.Saif,Y.M. et col. Iowa state press. USA.: 567-582.

Shoko Suzuki, 1994. Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 21 89-105.

Skov M.N., Spencer A.G., Hald B., Petersen L., Nauerby B., Carstensen B., et Madsen M., 2004. The role of litter beetles as potential reservoir for *Salmonella enterica* and thermophilic *Campylobacter* spp. Between broiler flocks. *Avian Dis.*, 48, 9-18.

Snoeyenbos G.H., Smyser C.F., and Van Roekel H., 1969. *Salmonella* infections of the ovary and peritoneum of chickens. *Avian Dis.* 13, 668-670.

Timoney J.F., Shivaprasad H.L., Baker R.C., Rowe B., 1989. Egg transmission after infection of hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Vet. Rec.*, 125, 600-601.

Uzzau S., Brown D.J., Wallis T., Rubino S., Leori G., Bernard S., Casadesús J., Platt D.J. Olsen J.E. 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol.Infect.*, , 125, 229-255.

Van Immerseel F., De Buck J., Boyen F., Pasmans F., Bertrand S., Collard J.M., Saegerman C., Hooyberchs J., Haesebrouck F., et Ducatelle R., 2005. *Salmonella* dans la viande de volaille et dans les œufs : Un danger pour le consommateur qui demande la mise en place d'un programme de lutte efficace. *Ann.Méd.Vét.*149,34-48.

Vassiliadis P., Kalapothaki V., Trichopoulos D., Papadakis J.A., and Serie C.H., 1979. Recent experience on the use of modified Rappaport's medium (R 10/43°C) for the isolation of *Salmonella* . Quality assurance and quality control of microbiological culture media. Dr Janet E.L. Corry. London, 141-145.

Vazquez-torres A., Fang F.C., 2001. *Salmonella* evasion of the NADPH phagocyte oxidase. *Microbes Infect.* 3, 1313-1320.

Waltman W., 2000. Methods for the cultural isolation of *Salmonella* . In: Wray C., Wray A. (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing : Oxon, 355-372.

Wayne L.G., Brenner D.G., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackbrandt E., Starr M.P. et Trüper H.G., 1987. Report of the ad-hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International journal of systematic Bacteriology* 37,463-464.

Williams J.E., 1981. *Salmonella* s in poultry feeds: a worldwide review. Part 1. *World Poultry Sci. J.* 37, 16-19.

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.

YDE M., 1998. Typing and antibiotic susceptibility of *Salmonella enteritidis* isolates, vol. 56, n°1-2, p. 39-52.

La norme NF EN ISO 6579. 2002, Association Française de Normalisation.

La norme NF U47-100, NF U47-101. 2002, Association Française de Normalisation.

www.medicinesciences.org

Annexes

Gélose au vert brillant et au rouge de phénol

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....	10,0 g
- Extrait de viande	5,0 g
- Extrait autolytique de levure.....	3,0 g
- Lactose	10,0 g
- Saccharose	10,0 g
- Phosphate disodique	1,0 g
- Phosphate monosodique	0,6 g
- Rouge de phénol.....	90,0 mg
- Vert brillant.....	5,0 mg
- Agar agar bactériologique.....	14,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 6,9 ± 0,2

Gélose *Salmonella* -*Shigella*

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pancréatique de viande	5,0 g
- Extrait de viande	5,0 g
- Lactose	10,0 g
- Sels biliaires.....	8,5 g
- Citrate de sodium.....	10,0 g
- Thiosulfate de sodium.....	8,5 g
- Citrate ferrique ammoniacal	1,0 g
- Rouge neutre	25,0 mg
- Vert brillant.....	0,33 mg
- Agar agar bactériologique.....	15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.

Bouillon Müller Kauffmann au tétrathionate

Pour 1 litre d'eau purifiée :

- Tryptone.....	8,6 g
- Extrait de viande	4,3 g
- Sels biliaires.....	4,78 g
- Chlorure de sodium.....	2,6 g
- Carbonate de calcium	38,7 g
- Thiosulfate de sodium anhydre.....	30,45 g
- Vert brillant.....	9,6 mg

Bouillon Rappaport Vassiliadis

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone papaïnique de soja4,50 g
- Chlorure de sodium7,20 g
- Phosphate monopotassique1,26 g
- Phosphate dipotassique0,18 g
- Chlorure de magnésium anhydre13,40 g
- Vert malachite (oxalate).....36,0 mg

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 5,2 ± 0,2.

Gélose Mueller Hinton

Pour 1 litre de milieu :

- Hydrolysât acide de caséine17,5 g
- Infusion de viande.....2,0 g
- Amidon soluble1,5 g
- Agar agar bactériologique.....17,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,2.

Milieu Hajna-Kligler

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....20,0 g
- Extrait autolytique de levure.....3,0 g
- Extrait de viande3,0 g
- Glucose.....1,0 g
- Lactose10,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Thiosulfate de sodium.....0,5 g
- Citrate ferrique ammoniacal0,5 g
- Rouge de phénol.....25,0 mg
- Agar agar bactériologique.....15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2.

Milieu Mannitole-mobilité.

Pour 1 litre de milieu :

- Citrate de sodium.....1,0 g
- bleu de bromothymol.....0,08 g
- chlorure de sodium.....5,0 g
- sulfate de magnésium0,2 g
- -hydrogénophosphate de potassium.....1,0 g
- dihydrogénophosphate d'ammonium.....1,0 g
- Agar agar bactériologique.....15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2

Milieu Lysine de fer

- Peptone de gélatine.....5,0 g
- Extrait de levure3,0 g
- L-lysine.....10,0 g
- glucose.....1,0 g
- Citrate de fer iii ammoniacal0,5 g
- bromocrésol pourpre20,0 mg
- Thiosulfate de sodium.....40,0 mg
- Agar13,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $6,7 \pm 0,2$.

Milieu Mannitol-mobilité

Pour 1 litre de milieu

- hydrolysats tryptique de caséine:.....10,0 g
- mannitol:.....7,5 g
- rouge de phénol:.....0,4 mg
- nitrate de potassium:.....1,0 g
- agar:.....3,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $6,7 \pm 0,2$.

Eau peptonée tamponnée

Pour 1 litre de milieu

- Peptone.....10,00 g
- Chlorure de sodium.....5,00 g
- Phosphate disodique anhydre3,56 g
- Phosphate monopotassique1,50 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,0 \pm 0,2$.



Résumé

Le présent travail porte sur le contrôle de la qualité sanitaire et hygiénique dans la filière avicole afin d'estimer la contamination de ce secteur par les salmonelles et particulièrement par *Salmonella enteritidis*, la plus commune chez la volaille. Cette bactérie emprunte deux voies de transmission, horizontale et verticale. Par sa transmission verticale dans les œufs, Ce sérotype constitue la cause principale de la pandémie de salmonellose non-typhoïde qui est observée chez l'homme.

Pour réaliser ce travail, un total de 134 échantillons a été prélevé à partir de 4 sites d'élevage situés dans la région Fès-Meknès et 2 couvoirs à la région Khémisset et ont été soumis à la recherche de la contamination par les salmonelles. Les recherches réalisées ont permis de détecter *Salmonella* dans 14,17% des échantillons analysés dont *Salmonella enteritidis* est le sérotype détecté dans tous les prélèvements. Les résultats ont montré la résistance des souches de *Salmonella enteritidis* aux antibiotiques dont 6 profils de résistances ont été révélés.

L'étude génotypique effectuée sur ces souches a confirmé qu'il s'agit d'un même clone pour tous les échantillons positifs.

La contamination des élevages avicole par *Salmonella enteritidis*, met en évidence l'importance d'une très large surveillance de secteur avicole, pour le respect des normes d'élevage et des bonnes pratiques de la sécurité sanitaire et hygiénique.

Mots clés : *Salmonella enteritidis* –salmonellose – filière avicole – transmission verticale_ transmission horizontale_ résistance aux antibiotiques.