

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE CONSTANTINE 1

**INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION  
ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES  
I.N.A.T.A-A.**



N° d'ordre :

N° de série :

## Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat en Sciences

Spécialité : Sciences Alimentaires

*Caractérisation phénotypique et moléculaire des salmonelles  
isolées à partir des aliments et d'origine humaine  
responsables de gastro-entérites*

Présentée par : **BOUKOUCHA MOURAD**

Le : 02 /12 /2014

Devant le jury composé de :

<b>Président</b>	BENTCHOUALA CHAFIA	Professeur	(Université de Constantine3)
<b>Rapporteur</b>	RAMDANI NADJIA	Professeur	(Université d'Alger1)
<b>Examineur</b>	SAHLI FARIDA	Professeur	(Université de Setif1)
<b>Examineur</b>	KHALIFA FODIL	Professeur	(Université de Constantine3)
<b>Examineur</b>	KHARROUB KARIMA	Professeur	(Université de Constantine1)
<b>Examineur</b>	AMOURACHE LEILA	MCA	(Université de Constantine1)

**Année universitaire : 2014-2015**

صلى الله عليه وسلم

# Remerciement

Nous tenons à remercier en premier lieu « **Allah** » le tout puissant de nous avoir donné le courage ainsi que la volonté pour préparer ce travail.

Je tiens à témoigner mes plus sincères remerciements aux membres du jury Qui m'ont fait le grand honneur de bien vouloir accepter de participer à l'évaluation de mon travail de thèse.

<b>Mme le Pr Bentchouala Chafia</b>	Président
<b>Mme le Pr. Ramdani-Bouguessa Nadjia</b>	Directeur de thèse
<b>Mme le Pr. Kharroub karima</b>	Examineur
<b>Mme le Dr. Amourache Leila</b>	Examineur
<b>Mme le Pr. Sahli Farida</b>	Examineur
<b>Me le Pr. Khalifa Fodil</b>	Examineur

A Madame le Pr. **Ramdani-Bouguessa Nadjia**, mon directeur de thèse, personnalité pleine de gentillesse qui a pris ses temps pour m'avoir encadré, orienté et aidé dans les moments difficiles pour la réalisation de cette thèse, Merci pour ta disponibilité, malgré tes nombreuses occupations, j'adresse ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

A tout le personnel du Service de microbiologie du centre hospitalo-universitaire **Mustafa Bacha (CHU) Alger, laboratoire d'hygiène Tébessa**, les membres de laboratoire **Genoscreen Lille (France)**. Sans oublier l'apport de l'enseignant chercheur **Mr Taha Menasria**. A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de thèse, j'adresse mes sincères remerciements.

A **mes parents Ahmed et Mamina**, pour le soutien qu'ils ont su m'apporter. Que ce travail soit pour eux un témoignage de ma profonde reconnaissance et de toute mon affection.

A **ma femme**, Qui m'a toujours aidé à surmonter les difficultés de ma vie avec beaucoup de courage et de patience. Que cette thèse soit le témoignage de mon Affection.

Et bien sûr, à mon petit bout de chou, **Mohamed Nazim**, pour tout le bonheur qu'il met dans ma vie.

# Table des Matières

---

**Remerciements**

**Table des matières**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste des annexes**

	<b>Page</b>
<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>Chapitre I : Notions générales sur les salmonelles</b>	
I.1. Historique	5
I.2. Taxonomie et règles de nomenclature	5
I.3. Caractéristiques bactériologiques	7
I.3.1. Caractéristiques biochimiques et culturaux	7
I.3.2. Caractéristiques structurales et fonctionnelles	8
I.3.2.1. Lipopolysaccharide (LPS)	8
I.3.2.2. Capsule (enveloppe)	9
I.3.2.3. Flagelles	9
I.3.2.4. Fimbriae ou pili	10
I.3.2.5. Adhésines non fimbriaires	11
I.3.2.6. Chromosome et autres entités génétiques	11
I.3.2.6.1. Chromosome	11
I.3.2.6.2. Autres entités génétiques non chromosomiques	11
I.4. Pathogénie et virulence des salmonelles	14
<b>Chapitre II : Épidémiologie des salmonelles et salmonelloses</b>	
II.1. Habitat et réservoir	17
II.2. Sources et facteurs favorisant la contamination	17
II.3. Les salmonelloses	19
II.3.1. Salmonelloses animales	20
II.3.2. Salmonelloses humaines	20
II.3.2.1. Salmonelloses systémiques (fièvres typhoïdes et paratyphoïdes)	21
II.3.2.2. Gastro-entérites à <i>Salmonella</i> (Salmonelloses non typhiques)	21

II.3.3. Salmonelloses végétales	22
II.4. Évolution de la sensibilité des salmonelles aux antibiotiques	22
<b>Chapitre III : Techniques d'isolement et de caractérisation des salmonelles</b>	
III .1. Techniques d'isolement des salmonelles à partir des aliments	26
III. 2. Techniques de caractérisation phénotypiques et moléculaires	27
III.2.1. Techniques phénotypiques	27
III.2.2. Techniques moléculaires.	29

## **PARTTIE II : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE**

### **1. Diversité sérotypiques, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques des Salmonelles**

<b>1.1 Introduction</b>	35
<b>1.2 Matériel et Méthodes</b>	36
1.2.1 Échantillonnage	36
1.2.1.1. Origine alimentaire	36
a. Fréquence, rythme et modalités de prélèvements	36
b. Transport et acheminement des échantillons	37
c. Isolement et identification préliminaire des salmonelles	37
1.2.1.2. Origine humaine	39
1.2.3. Sérotypage	39
1.2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	39
1.2.5. Antibiogramme sur milieu solide (diffusion des disques)	41
1.2.6. Caractérisation biochimiques des souches	44
1.2.7. Analyse des données	45
<b>1.3. Résultats</b>	46
1.3.1. Isolement et identification préliminaire des isolats	46
1.3.1.1. Origine alimentaire	46
1.3.1.2. Origine humaine	47
1.3.2. Diversité sérotypiques et sensibilité aux antibiotiques (CMI)	47
1.3.2.1. Sérotypage des salmonelles	47
1.3.2.1.1. Origine alimentaire	47
1.3.2.1.2. Origine humaine	49
1.3.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	51
1.3.2.2.1. Origine alimentaire	51

1.3.2.2.2. Origine humaine	55
1.3.3. Diversité biochimiques et sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)	62
1.3.3.1. Étude biochimique détaillée	62
1.3.3.1.1. Origine alimentaire	62
1.3.3.1.2. Origine humaine	65
1.3.3.2. Étude de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)	69
1.3.3.2.1. Origine alimentaire	69
1.3.3.2.2. Origine humaine	75
<b>1.4. Discussion</b>	<b>80</b>
1.4.1. Diversité serotypiques des salmonelles et sensibilité aux antibiotiques (CMI).	80
1.4.2. Diversité biochimique des Salmonelles et sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme sur milieu solide).	84
<b>2. Diversité génétique (Moléculaire) des Salmonelles</b>	
<b>2.1. Introduction</b>	<b>89</b>
<b>2.2. Matériel et méthodes</b>	<b>90</b>
2.2.1. Origine des souches	90
2.2.2. Étude moléculaire par séquençage de l'ADNr16S	92
2.2.3. Étude moléculaire par MLST	93
2.2.4. Étude moléculaire par MLVA	97
2.2.5. Analyse des données	101
<b>2.3. Résultats</b>	<b>103</b>
2.3.1. Étude moléculaire par séquençage de l'ADNr16S	103
2.3.2. Étude moléculaire par MLST	113
2.3.3. Étude moléculaire par MLVA	115
<b>2.4. Discussion</b>	<b>117</b>

<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	121
<b>Références bibliographiques</b>	124
<b>Annexe 1</b>	142
<b>Annexe 2</b>	151
<b>Annexe 3</b>	165
<b>Abstract</b>	
<b>Résumé</b>	



## Liste des Figures

Figure	Titre	Page
01	<i>Salmonella</i> Typhimurium " en rouge", sur une culture de cellules humaine.	8
02	Observation en microscopie électronique de <i>Salmonella</i> Typhi en cours de division, montrant les flagelles et les fimbriae. Chaque bactérie mesure environ 0.9 µm.	10
03	Aspect des colonies de <i>Salmonella</i> .spp isolée sur milieu Hektoen (origine alimentaire).	46
04	Aspect des colonies de <i>Salmonella</i> .spp isolée sur milieu Hektoen (origine humaine).	47
05	Pourcentage de différents sérotypes de <i>Salmonella</i> (origine alimentaire).	49
06	Pourcentage de différents sérotypes de <i>Salmonella</i> (origine humaine).	50
07	Dendrogramme représentatif de la similarité de profil des CMI des souches de <i>salmonella</i> (origine alimentaire).	53
08	Dendrogramme représentatif de la similarité de profil des CMI des souches de <i>salmonella</i> (origine humaine).	59
09	Galerie d'identification biochimique d'une souche appartenant au groupe C <sub>A</sub> 1 (origine alimentaire).	63
10	Galerie d'identification biochimique d'une souche appartenant au groupe C <sub>A</sub> 2 (origine alimentaire).	63
11	Galerie d'identification biochimique d'une souche appartenant au groupe C <sub>A</sub> 3 (origine alimentaire).	63
12	Dendrogramme représentatif de la similarité des caractéristiques biochimiques des isolats (origine alimentaire).	64
13	Galerie d'identification biochimique d'une souche appartenant au groupe C <sub>H</sub> 1 (origine humaine).	66
14	Galerie d'identification biochimique d'une souche appartenant au groupe C <sub>H</sub> 2 (origine humaine).	66

15	Galerie d'identification biochimique d'une souche appartenant au groupe C <sub>H</sub> 3 (origine humaine).	66
16	Galerie d'identification biochimique d'une souche appartenant au groupe C <sub>H</sub> 4 (origine humaine).	67
17	Dendrogramme représentatif de la similarité des caractéristiques biochimiques des isolats (origine humaine).	68
18	Pourcentage des isolats des salmonelles sensibles et résistantes aux antibiotiques testés (origine alimentaire).	69
19	Variabilité de l'activité antibactérienne enregistrée avec les trois antibiotiques (OFX, CIP, SXT).	71
20	Variation des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques (acide nalidixique, ofloxacine, ciprofloxacine) par rapport à la souche de référence (100% d'activité) (origine alimentaire).	72
21	Variation des diamètres de triméthoprime/sulfaméthoxazol par rapport à la souche de référence (100% d'activité) (origine alimentaire).	73
22	Dendrogramme représentatif de la similarité des profils des zones d'inhibitions des salmonelles enregistrés avec la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques (origine alimentaire).	74
23	Pourcentage des souches sensibles et résistantes aux antibiotiques testés (origine humaine).	76
24	Variation des diamètres des antibiotiques (acide nalidixique, ofloxacine, ciprofloxacine) par rapport à la souche de référence (100% d'activité) (origine humaine).	77
25	Variation des diamètres des antibiotiques (triméthoprime/sulfaméthoxazol) par rapport à la souche de référence (100% d'activité) (origine humaine).	77
26	Dendrogramme représentatif de la similarité des profils des zones d'inhibitions des salmonelles enregistrés avec la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques (origine humaine).	79
27	Arbre décisionnel pour la caractérisation moléculaire des salmonelles.	91

28	Schéma de la séquence de l'ADNr 16S avec la position des amorces et les régions couvertes par les séquences 1 et 2 amplifiées.	93
29	Exemple de la détermination de numéro caractéristique de l'allèle correspondante au marqueur ( <b>aroC</b> ) en utilisant la base de données MLST Database at UoW, University of WARWICK.	96
30	Exemple de lecture du profil allélique, séquencetype et complexe clonal correspondant à l'ensemble des souches testées.	97
31	Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 1 affiliée au genre <i>Salmonella</i> . La barre représente 2 substitutions par 1000 nucléotides.	105
32	Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 2 affiliée au genre <i>Salmonella</i> . La barre représente 2 substitutions par 1000 nucléotides.	106
33	Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 3 affiliée au genre <i>Salmonella</i> . La barre représente 2 substitutions par 1000 nucléotides.	107
34	Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 4 affiliée au genre <i>Salmonella</i> . La barre représente 2 substitutions par 1000 nucléotides.	108
35	Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 5 affiliée au genre <i>Salmonella</i> . La barre représente 2 substitutions par 1000 nucléotides.	109
36	Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 6 affiliée au genre <i>Salmonella</i> . La barre représente 1 substitution par 1000 nucléotides.	110
37	Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 7 affiliée au genre <i>Salmonella</i> . La barre représente 1 substitution par 1000 nucléotides.	111
38	Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 8 affiliée au genre <i>Salmonella</i> . La barre représente 1 substitution par 1000	112

nucléotides.

- 39 Analyse factorielle (AFC) de la distribution des marqueurs (MLST) 115  
suivant les différents isolats de *Salmonella*.

## Liste des Tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Caractères différentiels des espèces et sous-espèces du genre <i>Salmonella</i> .	6
02	Formules antigéniques de sérotypes de <i>Salmonella</i> fréquemment isolés selon le schéma de White-Kauffmann-Le minor.	7
03	Pourcentage de résistance à différents antibiotiques de souches humaines de salmonelles non-typhiques isolées lors d'études nationales aux États-Unis.	25
04	Valeurs critiques des Concentration minimales inhibitrice des salmonelles d'après European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2013). *: MICs d'après (CA-SFM, 2010).	41
05	Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour Entérobactéries selon la recommandation 2013 de l'EUCAST	44
06	Caractéristiques antigéniques (formule antigénique) des 37 souches de <i>Salmonella</i> d'origine alimentaire.	48
07	Caractéristiques antigéniques (formule antigénique) des 39 souches de <i>Salmonella</i> d'origine humaine.	50
08	Répartition des différents sérovars d'origine alimentaire (N= 37) en fonction de leur concentration minimales inhibitrice.	52
09	Origine et profils de résistance des salmonelles d'origine alimentaire.	55
10	Répartition des différents sérovars d'origine humaine en fonction de leur concentration minimales inhibitrice.	57
11	Origine et profils de résistance des salmonelles d'origine humaine.	61
12	Récapitulatif des principales caractéristiques biochimiques et d'antibioresistance des salmonelles choisis pour l'analyse moléculaire.	90
13	Amorces utilisées dans la technique MLST.	95
14	Différents marqueurs génétiques utilisés dans la technique MLST.	95
15	Caractéristiques et spécificités des marqueurs (MLVA) de <i>Salmonella</i> Enteritidis.	99

16	Séquences des amorces utilisées pour le typage par MLVA de <i>S. Enteritidis</i> .	99
17	Caractéristiques des marqueurs et Séquences des amorces utilisées pour le typage par MLVA de <i>Salmonella Gallinarum</i> .	101
18	Identification bactérienne obtenus après séquençage des régions hypervariables des régions V1-V2-V3-V4-V5 avec la base de données « LeBibi ».	103
19	Profils allélique, séquencetype et complexe clonal de six (06) souches de <i>Salmonella enterica</i> d'origine alimentaire et deux (02) d'origine humaine obtenue par la technique MLST utilisant sept (07) marqueurs.	113
20	Différents profils génétiques « MLVA » des souches de <i>Salmonella Enteritidis</i> et <i>Salmonella Gallinarum</i> d'origine alimentaire.	116

## Liste des Abréviations

<b>MLVA</b>	Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis. Analyse du polymorphisme de répétition en tandem.
<b>VNTR</b>	Variable Number of Tandem Repeat : Nombre variable de répétition en tandem.
<b>TR</b>	Tandem Repeat : Répétition en tandem.
<b>MLST</b>	Multiplex-Locus Sequence Typing : Typage par séquençage de loci.
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction : Amplification génique par réaction en chaîne.
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis. Électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant, dodécyl sulfate de sodium.
<b>REA</b>	Restrictive Enzyme Analysis : analyse par enzyme de restriction.
<b>RAPD</b>	Random Amplified Polymorphism DNA : Amplification aléatoire d'ADN Polymorphe.
<b>PCR-RFLP</b>	Polymerase Chain Reaction - Restrictive Fragment Length Polymorphism Amplification génique et polymorphisme de longueur des fragments de Restriction du produit
<b>AFLP</b>	Amplified Fragment Length Polymorphism : Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés.
<b>PFGE</b>	Pulse Field Gel Electrophoresis : Electrophorèse en champs pulsé.
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute.
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST.
<b>CA-SFM</b>	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
<b>MRA</b>	Multi Résistantes Aux Antibiotiques.
<b>CMI</b>	Concentration Minimal Inhibitrice.
<b>BLSE</b>	-Lactamases à Spectre Étendu.
<b>API 20E</b>	Analytical Profile Index 20 <i>Enterobacteria</i> .
<b>CAH</b>	Classification Ascendante Hiérarchique.
<b>C3G</b>	Céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> Génération

**DNA** DesoxyriboNucleic Acid : Acide désoxyribonucléique.

**CSSuTe** Chloramphenicol, streptomycine, sulfamide, tétracycline.

**ACKSSuTe** Ampiciline, chloramphenicol, kanamycine, streptomycine, sulfamide, Tétracycline

**ANOVA** Analysis Of Variance.

**ATB** Antibiotique.

**CAH** Classification Ascendante Hiérarchique.

**BET** Bromure d'Ethidium.

**OMS** Organisation Mondiale de la Santé.



# **Introduction Générale**

---

## Introduction générale

Les salmonelles sont l'une des premières causes de la contamination des aliments dans les pays non développés et industrialisés. Elles représentent une charge importante pour la santé publique et un coût considérable pour la société, la filière volaille est considérée comme une des sources majeure de la contamination humaine (EFSA, 2011 ; ECDC, 2011), via des denrées alimentaires consommés crus ou insuffisamment cuits : (viande de volaille, œuf et préparation à base d'œuf ovoproduits, charcuteries, etc ...) (Humphrey *et al.*, 1988 ; Cowden *et al.*, 1989 ; Humphrey, 1994; Schmid *et al.*, 1996; Hayes *et al.*, 1999).

La persistance des salmonelles tout au long de la chaîne de production alimentaire y compris la phase d'abattage (industrielle ou artisanale) suite à une ou plusieurs défaillances (mauvaise pratique d'éviscération et rinçage, traitement thermique ou ionisant déficient, échec d'autocontrôles bactériologiques, contamination croisée). D'un autre côté l'évolution du mode d'alimentation humain passant du familial au collectif ont contribué dans l'augmentation des cas de salmonelloses humaines non-typhiques dont la principale manifestation est gastro-intestinale (Weill, 2009). Cette dernière représente la deuxième cause de mortalité infantile, dans les pays en voie de développement. C'est la 2<sup>ème</sup> étiologie bactérienne derrière le « *Campylobacter* » de toxi-infections alimentaires, et la première cause d'hospitalisation et de mortalité d'origine alimentaire en Europe (Anonyme, 2010).

Une diversité de sérovars ont été isolés et identifiés dans plusieurs foyers de toxi-infections alimentaires, collectives ou sporadiques à travers le monde aussi bien à partir des aliments qu'à partir des coprocultures des malades admis pour une gastro-entérite, avec une prédominance de *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium (SCVMPH, 2003).

Le véritable problème de santé publique causé par les salmonelles non typhique a été amplifié par l'émergence des souches multi résistantes aux antibiotiques (MRA). Une situation alarmante signalée par l'organisation mondiale de la santé (OMS, 1997), suite à une utilisation abusive des agents antimicrobiens en médecine humaine et comme promoteur de croissance chez les animaux destinés à la consommation humaine.

À la fin des années 1980, la prévalence des souches résistantes aux antibiotiques allait connaître un essor considérable avec la dissémination internationale rapide de clone *Salmonella* Typhimurium lysotype DT104 (Threlfall *et al.*, 2000) appelé « Penta-résistant » car la majorité des souches était de phénotype ACSSuTe suite à l'intégration dans leur génome d'un îlot génomique de 43kb, le « *Salmonella* genomic Island » (SG11) (Boyd *et al.*, 2001). Ainsi les premières souches de *Salmonella* résistantes aux C3G (céphalosporine de troisième génération) sont apparues à la fin des années 1980 (Miriagou *et al.*, 2004 ; Arlet,

2006), situation compliquée par l'apparition, pendant les années 1990, d'une résistance touchant les quinolones et fluoroquinolones des souches d'origine humaine Nal<sup>R</sup> (acide nalidixique) accompagnée d'une sensibilité diminuée à la ciprofloxacine (CIP), et enfin l'apparition des souches résistantes franchement à cette dernière (CIP<sup>R</sup>) (Herikstedt *et al.*, 1997).

Un arsenal de techniques biologiques a été développé pour étudier la diversité phénotypique et moléculaire (génétique) de cette bactérie (Nath *et al.*, 2010), à savoir des techniques de biotypage réalisées en macro et en micro-galerie, sérotypage, antibiogramme standard et détermination de la CMI) et un ensemble de techniques de typage moléculaires plus discriminantes entre les souches de *S. enterica*; le **ribotypage** (Kim *et al.*, 2009), la réaction **ERIC-PCR** (Hulton *et al.*, 1991), le polymorphisme de taille de fragments amplifiés dans le génome (**AFLP**) (Lan & Ward, 2003), l'amplification aléatoire des séquences d'ADN (**RAPD**) (Nath *et al.*, 2010), l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (**PFGE**) pour la séparation de fragments (Refsum *et al.*, 2002), le polymorphisme de longueur de fragments de restriction après amplification génique (**PCR-RFLP**) (Koh-Luar *et al.*, 1996), le typage par détermination de la séquence nucléotidique de plusieurs gènes codant des fonctions essentielles à la bactérie (**MLST**) (Multi-Locus Sequence Typing) (Hughes *et al.*, 2010). Depuis 2003 la méthode de génotypage par (**MLVA**) (Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis) a montré une reproductibilité et une capacité discriminante considérablement plus élevée que la PFGE (Vergnaud & Pourcel, 2009).

À l'égard d'une telle évolution observée avec une diversité d'expression phénotypique structurelle et surtout métabolique qui reflète une multitude de support génétique chromosomique et extra-chromosomique mis en jeu. Une surveillance épidémiologique est devenue indispensable afin de visualiser et contrôler cette variabilité avec ces différents aspects (phénotypiques et génotypique), c'est ainsi différents systèmes de surveillance organisés généralement en réseaux nationales et internationales ont été installés. Qui ont pour mission d'étudier la distribution des sérovars, suivre l'évolution de la résistance aux antibiotiques à différents niveaux (de l'animale à l'homme) afin de mieux adapter les moyens de lutte et de prévention (Weill, 2009).

En Algérie les laboratoires membres de réseau de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques ont déclaré à travers le bilan 2010, un total de 197 isolats de *Salmonella* non typhoïdiques et de 23 isolats de *Salmonella* typhoïdiques isolés en médecine humaine. Les salmonelles non typhoïdiques se répartissent en différents sérovars dominés par *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium avec une fréquence de 22.84% et 14.21%

respectivement. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des différentes *Salmonella* non typhoïdiques a montré des résistances acquises de différents antibiotiques (Ampicilline, Amoxicilline+Acide clavulonique, Céphalosporine de troisième génération, l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine) (RNSSA, 2012).

L'évolution continue de cette bactérie dans le temps a été appréciée sur le plan structurelle et métabolique afin de persister devant les moyens de lutte antibactériens exogène (les antibiotiques, les désinfectants) et endogènes représentés par les moyens physiologiques et immunitaires de l'hôte et enfin des changements métaboliques ont été observés dans certains environnements pour assurer une adaptation (Thomson *et al.*, 2008 ; Holt *et al.*, 2009).

Dans le but de participer dans l'évaluation de la diversité de cette bactérie dans notre région et notre pays et vu le manque de travaux réalisés surtout sur les aliments destinés à la consommation vecteurs des salmonelloses humaines et maillon central entre l'animale producteur et l'homme consommateur, notre étude a été proposée et qui a eu pour objectifs :

- **Sur le plan phénotypique**

- Étudier la diversité des sérovars de *Salmonella* non typhique contaminants des aliments destinés à la consommation.
- Évaluer leur sensibilité aux antibiotiques ; identifier des éventuelles émergences de résistances.

En Utilisant des techniques de caractérisation : biochimiques (système miniaturisé API20E), antigénique (sérotypage par agglutination sur lame), étude de la sensibilité aux antibiotiques par deux techniques (antibiogramme standard sur milieu solide et la détermination de la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide).

- **Sur le plan moléculaire**

- Analyser la diversité génétique en déterminant la parenté phylogénétique entre les différents isolats caractérisés phénotypiquement.
- Déterminer le polymorphisme génétique des sérotypes et l'association de la variabilité phénotypique et moléculaire.

A cet effet, un ensemble de techniques de typage moléculaire ont été choisies : **le ribotypage** qui consiste en une analyse des séquences d'ADN des gènes codant l'ARNr 16S, outil taxonomique qui permet d'identifier et de classer les bactéries du genre à travers l'espèce et parfois jusqu'à la sous-espèce. **MLST**, méthode basée sur l'analyse de la séquence des gènes dits « gènes de ménage » dont l'expression est responsable du métabolisme de la cellule. Les gènes séquencés ont la particularité d'être indépendants des gènes de virulence de l'agent pathogène et de sa résistance

aux antibiotiques. Les marqueurs génétiques sur lesquels repose cette technique sont stables et évoluent lentement, ce qui rend cette dernière actuellement une méthode centrale pour l'épidémiologie descriptive pour définir des complexes clonaux et les suivre à l'échelle planétaire (biosurveillance), bénéficiant de la disponibilité de nombreuses bases de données.

- La technique **MLVA** c'est la succession de motifs répétés ou répétition en tandem «Tandem Répétition» (TR) dans une séquence codante ou non, qui est prise en considération. Le nombre de (TR) est très variable et polymorphe, certaines bactéries possèdent beaucoup de (TR), d'autres en ont moins, d'où l'appellation «Variable Number of Tandem Repeat» (VNTR). Cette technique exploite comme source de polymorphisme la variation du nombre de motifs dans les répétitions en tandem. Les schémas MLVA pour certains sérotypes sont déjà établis pour d'autres ils sont en cours, ces répétitions en tandem polymorphes sont nécessaires à l'adaptation des bactéries à leur environnement par action sur la fonction d'une protéine variation antigénique, interaction avec d'autres bactéries, interaction avec la cellule cible, régulation de l'expression d'un gène. Composante principale à considérer et à adapter au besoin épidémiologique d'intervention en raison de l'évolution rapide de ces marqueurs, et leur discrimination élevée.

- **Sur le plan comparatif**

Cette étude phénotypique et moléculaire des souches de *Salmonella* isolées à partir des aliments a été réalisée avec une approche comparative et complémentaire face à des souches d'origine humaine isolées à partir des malades atteints de gastroentérites dans la même période dans le but de :

- Visualiser les caractères biochimiques communs et différentiels des souches de deux origines.
- Comparer, la sensibilité des souches de deux origines alimentaires et humaine aux antibiotiques et déduire les niveaux d'acquisition des différents mécanismes de résistance.
- Comparer, le polymorphisme (génétique) des souches de deux origines alimentaire et humaine de différents biotypes et antibiotypes.

# Partie I

---

## **Synthèse bibliographique**

# Chapitre I

---

## Notions Générales sur les Salmonelles

## I.1. Historique

Le premier bacille de *Salmonella* agent de la fièvre typhoïde fut observé en 1880 par Eberth dans des coupes de rate et de ganglions lymphatiques. La culture *in vitro* de cette bactérie fut mise au point par Gaffky en 1884 (Le Minor & Véron, 1989). La caractérisation de la fièvre typhoïde datant du 19<sup>ème</sup> siècle, Louis nomma cette maladie contagieuse ainsi en 1829, et Pettenkoffer mit en évidence le rôle de l'eau de boisson dans sa dissémination en 1868. Par la suite, en 1886, Salmon et Smith ont découvert chez des porcs un organisme qui est maintenant connu sous le nom de *Salmonella choleraesuis* (Griffith *et al.*, 2006). Ils pensaient alors qu'ils venaient d'isoler l'organisme causant la fièvre porcine (cholera du porc). En 1896 Widal a mis en évidence la diversité antigénique des souches de *Salmonella* à l'aide d'un nouveau test qu'il a appelé sérodiagnostique de Widal (Grimont & Bouvet, 2000).

## I.2. Taxonomie et règles de nomenclature

Les bases taxonomiques et de nomenclature des salmonelles ont subi sans cesse une évolution dans le temps. L'avènement de la taxonomie moléculaire allait donner une base objective à la classification. Les hybridations génomiques ADN-ADN et l'analyse comparative des gènes codant pour les ARN ribosomiaux ont mis en évidence 02 espèces génomiques dans le genre *Salmonella* : *S. enterica* espèce habituelle et *S. bongori* (Grimont *et al.*, 2000 ; Popoff *et al.*, 2004). La première espèce est elle-même subdivisée en 6 sous-espèces : *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* et *indica*, différenciées entre elles par des caractéristiques biochimiques (**Tableau 01**).

Avant que la taxonomie des *Salmonella* ne soit établie sur des bases moléculaires, les sous-espèces étaient considérées comme des sous-genres et les sérovars comme des espèces. On avait ainsi les sous-genres I (*S. enterica* subsp. *enterica*), II (*S. enterica* subsp. *salamae*), III (ancien genre *Arizona* ; subdivisé en IIIa (sérotypes monophasiques), *S. enterica* subsp. *arizonae*, et IIIb (sérotypes diphasiques), *S. enterica* subsp. *diarizonae*), IV (*S. enterica* subsp. *houtenae*), V (*S. bongori*), et VI (*S. enterica* subsp. *indica*) (Grimont *et al.*, 2000).

La manière d'appeler les sérovars a subi une évolution dans le temps et afin de standardiser la nomenclature et éviter des causes éventuelles de confusion et passer des dénominations à tort qui indiquaient un syndrome (*S. typhi*) ou une parenté (*S. paratyphi* A, B, C). Un syndrome et une spécificité d'hôte (*S. abortusovis*, *S. abortus-equi*) une origine géographique (*S. london*, *S. panama*, *S. tel-el-kebir*). Un consensus international semble se dégager afin d'accepter des règles de nomenclature. Au Congrès International de Microbiologie de Moscou, il a été décidé que les noms composés seraient désormais condensés en noms simples (*S. typhimurium*, *S.*



*choleraesuis*, *S. teitelkebir*), conservés les noms anciennement attribuées aux sérovars, de la sous-espèce *enterica* qui représentent plus de 99,5 % des souches isolées. Ils ne doivent plus être écrits en italique. La première lettre doit être une majuscule (caractères pleins) : *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotype Typhimurium. Le nom de la sous-espèce (subsp. *enterica*) peut ne pas être mentionné parce que seuls les sérovars de la sous-espèce *enterica* ont un nom. Les sérovars des autres sous-espèces de *S. enterica* et ceux de *S. bongori* sont désignés uniquement par leur formule antigénique, exemple *S. enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium, ou *S. enterica* sérovar Typhimurium, ou *Salmonella* ser. Typhimurium. On connaît 2579 sérotypes (ou sérovar) et la liste n'est pas close, classés sur la base de la diversité du lipopolysaccharide (LPS=antigène somatique O) et des antigènes flagellaires H suivant un schéma appelé schéma de White-Kauffmann-LeMinor (**Tableau 02**), mis à jour depuis 1934 successivement par F. Kauffmann, L. Le Minor, M.Y. Popoff, Patrick A.D. Grimont et F.-X. Weill jusqu'à nos jours (Patrick *et al.*, 2007 ; Popoff, 2007).

**Tableau 1.** Caractères différentiels des espèces et sous-espèces du genre *Salmonella* (Le Minor *et al.*, 1982 ; Le Minor *et al.*, 1986)

Espèce	<i>S. enterica</i>					<i>S. bongori</i>	
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
<b>Sous-espèce</b>							
<b>Caractères</b>							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gélatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Culture sur KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-tartrate(a)	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
glutamyltransférase	+	+	-	+	+	+	+
β-glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucate	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	-(75%)	+(75%)	-	d	-
Lyse par le phageO1	+	+	-	+	-	+	d
Total des sérovars	1531	505	99	336	73	13	22

(a) = *d*-tartrate.

(\*) = Typhimurium d, Dublin -.

+ = 90 % ou plus de résultats positifs.

- = 90 % ou plus de résultats négatifs.

d = résultats différents suivant les sérovars de la sous-espèce considérée.

**Tableau 2.** Formules antigéniques de sérotypes de *Salmonella* fréquemment isolés selon le schéma de White- Kauffmann-Le minor (Patrick *et al.*, 2007)

Groupe	Sérotype	Ag O	Ag H1	Ag H2	Autres
<b>Groupe O : 2 (A)</b>	Paratyphi A	<u>1</u> , 2,12	A	[1,5]	
<b>Groupe O : 4 (B)</b>	Heidelberg	<u>1</u> , 4, [5], 12	R	1,2	
	Paratyphi B	1, 4, [5], 12	B	1,2	[z5], [z33]
	Derby	<u>1</u> ,4, [5], 12	f, g	[1,2]	
	Agona	<u>1</u> ,4, [5], 12	f, g, s	[1,2]	[z27], [z45]
	Typhimurium	<u>1</u> , 4, [5], 12	I	1,2	
<b>Groupe O : 7 (C1)</b>	Livingstone	6, 7, <u>14</u>	D	l, w	
	Virchow	6, 7, <u>14</u>	R	1,2	
	Mbandaka	6, 7, <u>14</u>	z10	e, n, z15	[z37], [z45]
<b>Groupe O : 8 (C2-C3)</b>	Newport	6,8, <u>20</u>	e, h	1,2	[z67], [z78]
	Kentucky	8, <u>20</u>	I	z6	
	Albany	8, <u>20</u>	z4, z24		[z45]
	Hadar	6,8	z10	e, n, x	
<b>Groupe O : 9 (D1)</b>	Typhi	9,12[Vi]	D		[z66]
	Enteritidis	<u>1</u> ,9, 12	g, m		
	Dublin	<u>1</u> , 9,12[Vi]	g, p		
	Gallinarum	<u>1</u> , 9, 12	-	-	

- Ag O : antigène somatique,

- Ag H1 : antigène flagellaire phase 1

- Ag H2 : antigène flagellaire phase 2

- : Facteurs O (souligné) dont la présence est liée à la conversion bactériophagique

[ ] : Facteur O (non souligné) ou H qui peut être absent et dont la présence n'est pas liée à la conversion bactériophagique.

### I.3. Caractéristiques bactériologiques

#### I.3.1. Caractéristiques biochimiques et culturels

Le genre *Salmonella* qui appartient à la famille des entérobactéries est caractérisé par des bacilles à Gram négatif de 2 à 5 µm de longueur et de 0,7 à 1,5 µm de largeur (Korsak *et al.*, 2004). Ils sont non sporulés et en général mobiles à ciliature péritriche (*Salmonella* Gallinarum est toujours immobile). Les salmonelles possèdent une nitrate réductase et leur culture ne donne pas de réaction d'oxydase. Elles sont capables de fermenter le glucose avec ou sans production de gaz et sont aéro-anaérobies facultatives (LeMinor, 1984). Au sein de la famille des entérobactéries, les 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, l'absence de fermentation du lactose, du saccharose, de l'inositol, de

l'amygdaline, de l'adonitol et du 2-cétogluconate, la présence d'une thiosulfate réductase, la décarboxylation fréquente de la lysine et de l'ornithine et la capacité fréquente de croître sur milieu au citrate de Simmons (Korsak *et al.*, 2004). Les caractères biochimiques permettent de différencier les espèces et les sous-espèces. *Salmonella* est une bactérie mésophile, son optimum de croissance est proche de la température corporelle des animaux à sang chaud (35-43°C). La limite de croissance inférieure se situe aux environs de 5°C ; il est toutefois généralement admis que la plupart des sérotypes ne croissent qu'à partir de 7°C (ICMSF, 1996 ; SCVMPH, 2003). Les salmonelles supportent une gamme de pH allant de 4,5 à 9 avec un optimum entre 6,5 et 7,5 (Grimont, 2000). Ces bactéries se cultivent sur des milieux ordinaires à base d'extraits de viande. La plupart des salmonelles peuvent être cultivées sur milieu minimum, sans facteur de croissance. Cependant, quelques sérotypes présentant une spécificité d'hôtes tels que *S. Gallinarum*, Typhi ou Paratyphi A sont auxotrophes pour certains facteurs de croissance à un pH voisin de la neutralité et à une température optimale de croissance de 37°C. Les colonies sont généralement rondes, lisses (ou Smooth : S) à bords réguliers et ont un diamètre de 2 à 3 mm. Après repiquage en bouillon, elles donnent des cultures homogènes mais il arrive exceptionnellement que des cultures de salmonelles soient isolées sous forme rugueuse (ou Rough : R).



**Figure 1.** *Salmonella* Typhimurium" en rouge", sur une culture de cellules humaine (Madigan & Martinko, 2007).

### I.3.2. Caractéristiques structurelles et fonctionnelles

#### I.3.2.1. Lipopolysaccharide (LPS)

Les salmonelles synthétisent un lipopolysaccharide (appelé LPS) ou antigène somatique (O) ou endotoxine pour évoquer ses propriétés antigéniques et toxiques ces derniers qui ne sont exprimées qu'après la lyse de la bactérie. Le LPS est une macromolécule

représente le composant majoritaire (105 à 106 molécules par cellules), elle induit une multitude d'effets biologiques parmi lesquels ont une place importante dans la pathogenèse des infections, élément essentiel du maintien de l'intégrité de la bactérie et agit comme une barrière contre l'entrée des petites molécules. Il est hautement immunogène avec pour conséquence la production d'anticorps spécifiques dirigés contre les épitopes glycosylés. Au moins 30 gènes situés aux loci *rfa*, *rfb* et *rfc* sont requis pour la synthèse du LPS (Kihlstrom & Edebo 1976 ; Nevola *et al.*, 1987). Les protéines exprimées par les gènes sont des antigènes somatiques thermostables et alcoolostables qui sont composés de complexes glucido-lipido-protéiques constitué de 03 régions qui sont de l'intérieur vers l'extérieur : le lipide A, le noyau ou core, et le polysaccharide spécifique.

### I.3.2.2. Capsule (enveloppe)

La capsule des salmonelles est polyosidique polymérisée. Les oses constitutifs sont très variés les plus fréquemment rencontrés sont les hexoses neutres, les 6-désoxyhexoses, les polyols, les acides uroniques et les sucres aminés. On peut y trouver associés des groupements phosphate, formate, pyruvate et succinate, L'antigène Vi est l'un des plus importants du point de vue du diagnostic dans le genre *Salmonella*. L'antigène Vi est un polysaccharide exprimé par la très grande majorité des souches de *Salmonella* Typhi, plus rarement par des souches de *Salmonella* Paratyphi C, et exceptionnellement, par des souches de *Salmonella* Dublin (Virlogeux & Popoff, 1996).

### I.3.2.3. Flagelles

Les flagelles sont des appendices qui permettent à la bactérie de se mouvoir ou «nager». Le flagelle a été également associé à l'adhésion et l'invasion des muqueuses en agissant comme une adhésine composé de trois régions : le corps basal, le crochet et le filament (Chilcott & Hughes, 2000).

- ✓ **Le filament** : de forme hélicoïdale, de grande longueur (10µm), comprenant plusieurs tours de spires et totalement rigide. Chez la plupart des espèces, il est composé de sous unités protéiniques formant une seule protéine, la flagelline de 54 kDa, les régions C- et N-terminales qui sont responsables de l'assemblage et du transport sont hautement conservées. La région centrale est au contraire hautement polymorphique et donne aux différents flagelles les propriétés antigéniques spécifiques de la molécule de flagelline, cette dernière est codée par le gène *fliC* (Chilcott & Hughes, 2000).
- ✓ **Crochet (une partie coudée)** : Le crochet est très court (60 nm), présente la même architecture générale que le filament mais contrairement à lui, il est très flexible car il

doit transmettre le mouvement de rotation d'un moteur dont l'axe est perpendiculaire à la surface cellulaire, est essentiellement constitué par une protéine de 42 kDa codée par le gène *flgE* (Macnab, 2004).

- ✓ **Le corpuscule basal** : il traverse l'intégralité de la paroi bactérienne, correspond à la zone d'insertion du flagelle dans le corps cellulaire pouvant effectuer un mouvement de rotation grâce à l'hydrolyse de l'ATP, sa structure est complexe et qui comporte une hétérogénéité protéique. La spécificité antigénique (H) est thermolabile, la composition en acides aminés et la structure primaire déterminent la spécificité de nombreux antigènes H caractéristique des différents sérovars (Simon *et al.*, 1980). Les antigènes flagellaires H de *Salmonella* sont typiquement diphasiques. La grande majorité des sérotypes peuvent exprimer alternativement deux spécificités pour leur antigène flagellaire. En effet il existe 2 systèmes génétiques codant pour 2 formes antigéniques différentes de flagelles (Simon *et al.*, 1980). Une bactérie exprime soit l'une, soit l'autre de ces formes, appelées phase I et phase II, ce qui permet à cette bactérie d'échapper à la réponse immunitaire.

#### I.3.2.4. Fimbriae ou pili

Des organelles très abondantes à la surface des bactéries (100 à 1000 par bactérie), ils sont formés par un grand nombre de protéines identiques appelées fimbrines pouvant avoir 2 aspects : soit des bâtonnets rigides de 5 à 7 nm de diamètre soit des filaments flexibles de 2 à 3 nm de diamètre. Les mieux caractérisés sont : les fimbriae de type 1, les fimbriae polaires longs, les fimbriae agrégatifs minces dont les gènes codants sont chromosomiques et les fimbriae présents sur le plasmide de virulence (McClelland *et al.*, 2001). Ils contribuent à la colonisation intestinale, impliqués dans l'adhésion aux plaques de Peyer, d'augmenter son taux de survie dans des conditions hostiles telles que lors du passage dans l'estomac (Darwin & Miller, 1999).



**Figure 2.** Observation en microscopie électronique de *Salmonella Typhi* en cours de division, montrant les flagelles et les fimbriae. Chaque bactérie mesure environ 0.9µm (Madigan & Martinko, 2007).

### **I.3.2.5 Adhésines non fimbriaires**

Trois adhésines ont été identifiées : MisL, ShdA, et SiiE, (Dorsey *et al.*, 2005; Kingsley *et al.*, 2002; Morgan *et al.*, 2007) de nature protéique impliqués dans les interactions bactéries/cellules en liant la fibronectine pour les deux adhésines MisL, ShdA, ainsi que pour l'adhésine SiE il a été montré que cette protéine géante induit l'adhésion de *Salmonella* aux cellules épithéliales polarisées mais pas aux cellules non polarisées (Gerlach *et al.*, 2007).

### **I.3.2.6. Chromosome et autres entités génétiques de *Salmonella***

#### **I.3.2.6.1. Chromosome**

La taille du chromosome de *Salmonella* varie d'un sérotype à l'autre, elle est comprise entre 4,5 et 4,9 Mbp (méga-paires de base). Les séquences ADN des différents sérotypes sont relativement proches. En effet, la différence en nucléotides des gènes orthologues est comprise entre 3,8 et 4,6%, l'étude de l'évolution des génomes des différents sérotypes indiquent que les sérotypes étroitement adaptés à un hôte tels que *S. Gallinarum* et *Typhi* descendent des sérotypes ubiquistes tels que *S. Enteritidis* et *Typhimurium* et que leurs génomes ont subi d'importantes dégradations, principalement des délétions et la formation de pseudogènes (Holt *et al.*, 2009; Thomson *et al.*, 2008). Ce sont les sérotypes qui présentent une spécificité d'hôte qui subissent des réarrangements dynamiques dans le temps touchant l'ordre et l'expression de gènes démontre par des études génomiques comparatives et qui sont associé à un mode de vie spécifique.

#### **I.3.2.6.2 Autres entités génétiques non chromosomiques**

Ces supports génétiques sont une source de variation génétique avec des inversions, des délétions ou des inactivations/activations de gènes, comme ils peuvent véhiculer un grand nombre de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, mais aussi dans le métabolisme ou encore la pathogénicité.

##### **a. Intégrons-cassettes de gènes**

Les cassettes de gènes existent sous forme circulaire et sont constituées uniquement d'un gène et d'un site *attC* impliqué dans la recombinaison avec l'intégrons, grâce à un système de recombinaison site spécifique. Les cassettes de gènes sont intégrées et exprimées par l'intégrons, plusieurs centaines de cassettes de gène ont été décrites chez les salmonelles, elles sont responsables de résistances à différentes familles d'antibiotiques comme les - lactamines, les aminosides, les phénicolés et le triméthoprim (Recchia & Hall, 1995). Aminoglycoside adényl transférase gène cassettes type A (*aadA1*, *aadA2* and *aadA5*), qui confèrent la résistance à la streptomycine et au spectinomycine ; Aminoglycoside adényltransférase type B (*aadB*), confère la résistance au gentamicine, kanamycine et la

tobramycine ; Dihydrofolate réductase gène cassettes (dfrA1 et dfrA17), confère la résistance au triméthoprim ; -lactamase gène blaPSE-1, confère la résistance à l'ampicilline ; Chloramphenicol acetyltransférase (catB3), confère une résistance au chloramphénicol; la streptothricine acetyltransferase (sat1), confères la résistance au streptothricine, ces derniers associées aux intégrons de classe I qui sont les plus répandus (Recchia & Hall, 1995 ; Ashraf *et al.*, 2005). D'autres apportent diverses fonctions comme des toxines, ou des éléments de pathogénicité ou de métabolismes (Fluit & Schmitz, 2004).

#### **b. Plasmides**

Les plasmides sont les principaux éléments de la bactérie impliqués dans les transferts horizontaux, sont les premiers dont le transfert conjugatif a été mis en évidence. Ces éléments circulaires d'une taille variable (quelques kb à plusieurs centaines de kb). Ils sont présents en nombre de copies variables, (Novick, 1987). Les informations génétiques qu'ils véhiculent sont rarement indispensables à la vie de la cellule. Cependant, ces informations génétiques procurent souvent un avantage pour la survie de la bactérie, allant de la résistance aux produits toxiques (antibiotiques, métaux lourds) à des capacités métaboliques accrues, en passant par une augmentation de la virulence (Bennett, 2008). Les plasmides peuvent alors être dits de virulence ou de résistance selon les fonctions qu'ils apportent à la bactérie.

Les plasmides les mieux décrits sont ceux de virulence spécifique de haut poids moléculaire (50 à 100 kb) présents chez les sérovars Enteritidis, Typhimurium, Dublin, Choleraesuis, Gallinarum, Pullorum et Abortusovis (Van Asten & Van Dijk, 2005). Parmi les gènes présents sur le plasmide de virulence, l'opéron *spvRABCD* (*Salmonella plasmid virulence*) une souche de *Salmonella* n'exprimant plus cet opéron ne provoque plus de cytopathologie chez les macrophages (Libby *et al.*, 2000). Le plasmide de virulence de *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* porte également le gène *rck* codant une protéine de la membrane externe cette protéine a été associée à la résistance de *Salmonella* au complément du sérum. *Salmonella* peut posséder d'autres plasmides de haut poids moléculaire qui transfèrent de la résistance aux antimicrobiens et ainsi contribuent à disséminer des gènes dans la population bactérienne. Une fusion des gènes de résistance et de virulence sur un seul plasmide a été décrit avec *S. Typhimurium* ou le gène de virulence *spvCD* plasmidique de groupe d'incompatibilité IncFIC ainsi que les déterminants de la résistance de phénotype ACSSuT (résistance à ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine, sulfamides et la tétracycline) (Llanes *et al.*, 1999), cette association est également observée avec *Salmonella* [4, 5,12 : i -] variant monophasique du sérotype Typhimurium (Guerra *et al.*, 2001).

### c. Les îlots génomiques

#### c. 1. *Salmonella* génomique Island SGI1

L'îlot SGI1 est le premier îlot génomique de multi-résistance identifié chez *Salmonella* dont la mobilité a été démontrée (Mulvey *et al.*, 2006). Sa découverte fait suite à une épidémie de salmonelloses qui toucha les bovins et l'homme au Royaume-Uni à la fin des années 1980. Cette épidémie était due à une souche de *S. Typhimurium* de lysotype DT104 penta-résistante aux antibiotiques, qui se propagea au monde entier au cours des années 1990 par diffusion épidémique clonale (Threlfall, 2000). DT104 devient alors le lysotype de *Typhimurium* majoritairement impliqué dans les salmonelloses humaines (Helms *et al.*, 2005). La diffusion de ce clone a conduit à s'intéresser aux mécanismes moléculaires à l'origine du phénotype de résistance ACSSuT qu'il véhicule. Les gènes responsables de ces résistances ont été tous identifiés au sein d'une région de 13 kb constituée d'un intégrons complexe nommé In104, apparenté aux intégrons du groupe In4 (Briggs & Fratamico, 1999; Arcangioli *et al.*, 1999). *Salmonella* Genomic Island 1, d'une taille approximative de 43 kb, est constitué de 44 cadres ouverts de lecture (ORF: open reading frame) qui ont été nommés de S001 à S044 .

#### c. 2. Îlots de pathogénicité

Ils ont été acquis par transfert horizontal et de ce fait présentent un pourcentage en G+C (Guanine et Cytosine) différent du reste du chromosome. De plus, ils sont souvent flanqués de structures mobiles de type transposons, séquences répétées inversées ou intégrons et proches d'un gène codant pour un ARNt (Dobrindt *et al.*, 2004 ). Les îlots regroupant des gènes contribuant à la virulence de *Salmonella* sont appelés (SPI) pour *Salmonella* Pathogenicity Islands. Ces îlots de pathogénicité contiennent des gènes qui participent à un même phénotype de virulence. Chez *Salmonella*, plus de 20 îlots de pathogénicité ont été identifiés jusqu'à maintenant et leur taille varie de 10 à 100 kb (Dobrindt *et al.*, 2004). Parmi ceux-ci :

- **L'îlot SPI-1** : Code notamment le système de sécrétion de type III (TTSS-1) qui joue un rôle central dans la pénétration de *Salmonella* dans les cellules non phagocytaires cet îlot est présent chez *S. bongori* et dans toutes les sous-espèces de *S. enterica* (Hensel, 2004).
- **L'îlot SPI-2** : Elle code des protéines impliquées dans la biosynthèse d'un deuxième TTSS, le TTSS-2, qui est essentiel pour la survie et la multiplication intracellulaire de *Salmonella* chez l'espèce *S. enterica* mais pas chez l'espèce *S. bongori*.



- **L'îlot SPI-3** : Impliquée dans la croissance bactérienne en milieu carencé en ions  $Mg^{2+}$ , permet la survie intracellulaire de la bactérie dans les macrophages et dans la persistance systémique (Blanc-Potard & Groisman, 1997).
- **L'îlot SPI-4** : Codant les composants d'un système de sécrétion de type I intervient dans la capacité de *S. Typhimurium* à coloniser l'intestin du bovin mais pas celui du poulet (Lawley *et al.*, 2006).
- **L'îlot SPI-5** : Impliqués dans l'inflammation intestinale et notamment la sécrétion de fluide et le recrutement des neutrophiles (Galyov *et al.*, 1997).
- **L'îlot SPI-7** : porte les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'antigène Vi, (Hensel, 2004). Cet îlot est spécifique de *S. Typhi*. Il est toute fois présent chez *S. Dublin* et *S. Paratyphi C*, L'antigène Vi de *S. Typhi* confère diverses propriétés de résistance à la bactérie : résistance au stress oxydatif, à l'opsonisation et à l'effet bactéricide du complément. Il a été montré récemment que l'antigène Vi inhibe la réponse inflammatoire précoce en diminuant la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales intestinales (Sharma & Qadri, 2004).

#### I.4. Pathogénie et virulence des salmonelles

La transmission de *Salmonella* se fait majoritairement par la voie oro-fécale après ingestion d'aliments contaminés. Une fois ingérées, les salmonelles vont gagner l'intestin, la colonisation intestinale par *Salmonella* intervient majoritairement au niveau de l'ileum (Galan, 1996). La préférence de *Salmonella* pour coloniser la partie plus inférieure de l'intestin, est expliquée par la concentration en sels biliaires, connus pour inhiber l'invasion cellulaire des salmonelles, étant particulièrement importante dans la partie proximale du petit intestin (Prouty & Gunn, 2000). Après attachement aux cellules épithéliales intestinales, différentes portes d'entrée permettent la colonisation du tractus intestinal : les cellules M, les entérocytes et les phagocytes CD18+, ces dernières permettent aux salmonelles de franchir la barrière intestinale (Cossart & Sansonetti, 2004). Les bactéries sont ensuite phagocytées par les macrophages de la « lamina propria » qui constituent une niche privilégiée pour sa persistance. Les bactéries sont alors transportées jusqu'aux ganglions mésentériques sous-jacents (Neutra, 1998). L'infection peut rester localisée et entraîner une pathologie de type gastroentérite. Dans ce cas, l'invasion cellulaire induit la mise en place d'une réponse inflammatoire, caractérisé notamment par la production d'IL-8, un chemoattractant pour les granulocytes, qui conduit à l'afflux massif de neutrophiles et d'exsudat au niveau de la muqueuse intestinale qui participerait activement à la destruction de l'épithélium intestinal, la

formation d'œdème et la sécrétion de fluide au niveau de la muqueuse intestinale (McCormick *et al.*, 1998). Dans le cas des infections de type systémique, des monocytes et non des neutrophiles s'infiltrent massivement dans les tissus intestinaux, n'entraînant pas de destruction de l'épithélium, les salmonelles prises en charge par les macrophages, développent une niche intracellulaire, dans laquelle elles survivent. Véhiculées par les macrophages, elles gagnent les ganglions mésentériques puis la circulation sanguine sous forme libre où elles provoquent une bactériémie, disséminent dans l'organisme hôte et colonisent rapidement le foie et la rate et notamment les macrophages de ces organes profonds. Les cellules infectées par *Salmonella* se trouvent principalement en clusters qui forment différents foci individualisés entourés de tissus normaux (Richter-Dahlfors *et al.*, 1997).

*Salmonella* dispose d'un arsenal de facteurs de virulence jouant un rôle à différentes étapes du processus infectieux. Pour interagir avec la cellule hôte, les salmonelles vont mettre en jeu des facteurs d'attachement, de pénétration et de survie intracellulaire, les facteurs de virulence rassemblent ceux non spécifiques aux sérovars pathogènes représentés par : le lipopolysaccharide (LPS), les fimbriae ou pili et le flagelle, et ceux dit spécifiques aux sérotypes pathogènes dont le support génétique essentiel est constitué par des îlots de pathogénicité, toute fois des plasmides de virulence et des phages ont montrés un rôle dans cette virulence (Hacker & Kaper, 2000).

Les facteurs de virulence non spécifiques jouent un rôle dans : l'attachement, la persistance et la colonisation intestinale et systémique, le franchissement du mucus. Une bonne internalisation par les macrophages dans la cavité péritonéale. Ces rôles dans la virulence étudiés *in-vivo* sur des cultures cellulaires, et *in vitro* sur des modèles expérimentales animales est sujet à controverse mal connus.

La majeure contribution dans la virulence des salmonelles est liée aux différents outils et mécanismes de virulence codifiés par des îlots de pathogénicités constitués principalement par : les systèmes de sécrétion de type III (TTSS), des effecteurs sécrétés par les TTSS, des fimbriae, un système de captation du fer (Hensel, 2004). Les salmonelles disposent de deux TTSS, impliqués historiquement dans deux étapes distinctes du processus infectieux. Le TTSS-1 confère à la bactérie la capacité de pénétrer dans les cellules non phagocytaires et joue un rôle dans les interactions avec la barrière épithéliale intestinale et la réponse inflammatoire de l'hôte (Zhou & Galman, 2001). Le deuxième TTSS, le TTSS-2 permet à *Salmonella* de développer une infection systémique et de coloniser les organes profonds tels que la rate et le foie. Au niveau cellulaire, le TTSS-2 permet aux salmonelles de survivre dans

le phagosome des macrophages et dans la vacuole des cellules non phagocytaires (Hansen-Wester & Hensel, 2001).

# Chapitre II

---

**Épidémiologie des salmonelles et Salmonellose**

## II. 1. Habitat et réservoir

Les salmonelles, agents zoonotiques, dont le réservoir majeur est constitué par l'intestin des vertébrés, plusieurs espèces animales sont incluses et principalement : la filière aviaire, porcine, bovine ainsi que l'homme (Murray, 2000 ; Hanes, 2003). Les poissons et les oiseaux, les rongeurs et les insectes peuvent être aussi une source importante de *Salmonella* (Letellier *et al.*, 1999). La sous-espèce *Salmonella enterica* subsp. *enterica* est généralement isolée chez l'homme et les animaux à sang chaud, pour lesquels elles sont pathogènes. En revanche, chez les animaux à sang froid, il est fréquent de retrouver les sous-espèces *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *arizonae* ou *diarizonae* (Iveson *et al.*, 2009). Selon le spectre d'hôte 03 classes de salmonelles peuvent être individualisées : Les sérovars ubiquistes, qui sont les plus nombreux : Enteritidis, Typhimurium, Montevideo, Panama, Saintpaul... (Humbert, 1995). Les sérovars présentant un tropisme d'hôte plus restreint : *Salmonella Gallinarum* chez les volailles, *Salmonella Choleraesuis* et *Salmonella Typhisuis* chez les porcs, *Salmonella Abortusovis* chez les ovins, *Salmonella Dublin* chez les bovins (mais aussi chez l'homme), *Salmonella Abortuse* chez les chevaux. *Salmonella Abortusovis* chez les moutons et *Salmonella Arizona* chez les reptiles, et en fin les sérovars étroitement adaptés à l'homme : *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi A*, *Salmonella Paratyphi B* (parfois isolé de l'animal, notamment chez la volaille), *Salmonella Paratyphi C* et *Salmonella Sendai*, agents des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes (Bäumler *et al.*, 1998 ; Hu *et al.*, 2003). Suite à une contamination fécale, les salmonelles peuvent être trouvées dans l'environnement, ils peuvent en outre survivre pendant très longues périodes dans le milieu extérieur : de quelques jours à 9 mois dans les sols et en surface des matériaux de construction des bâtiments agricoles (bois, béton, acier, fer et brique), quelques mois dans les aliments secs non acidifiés, sur les tiges et les feuilles des végétaux ensilés et plus d'un an dans les poussières, le duvet et les matières fécales bovines (Korsak *et al.*, 2004). *Salmonella* est inactivée par la chaleur aussi bien que par le phénol, le chlore et les désinfectants à base d'iode. La survie de *Salmonella* est plus courte en présence d'un pH inférieur à cinq (Henry *et al.*, 1983).

## II.2. Sources et facteurs favorisant la contamination

### A. Chez l'animal

Les sources potentielles pour une infection à *Salmonella* sont très nombreuses, mais l'animal porteur serait la source majeure d'infection chez les animaux (Griffith *et al.*, 2006). Le manque d'hygiène au sites d'élevages, l'usage d'antibiotiques à large spectre, les animaux vecteurs (oiseaux, insectes, rongeurs et animaux domestiques et sauvages), les aliments

contaminés, l'eau, le personnel qui transporte du matériel contaminé sont des sources possibles d'infection.

La transmission est essentiellement oro-fecale (transmission horizontale) observé avec les filières porcines et aviaires, cette dernière avec la quelle on observe un autre mode de transmission dit vertical trans-ovarien et donc la contamination de l'œuf, lors du passage de la bactérie des parentales aux poussins suite a une contamination au niveau de l'appareil reproducteur (Shivaprasad *et al.*, 1990).

### **B. Chez l'homme**

L'homme s'infecte avec des salmonelles non-typhoïdes essentiellement par l'ingestion d'aliments contaminés. La plupart des cas de salmonellose chez l'homme sont sporadiques. Néanmoins, les épidémies à *Salmonella* ne sont pas rares, et celles-ci peuvent parfois toucher de nombreux individus (Van Immerseel *et al.*, 2005). Lors des différentes enquêtes relatives aux déclarations des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), les aliments impliqués sont principalement les œufs et les produits à base d'œufs crus ou ayant subi un traitement thermique insuffisant, les produits laitiers (lait cru ou faiblement thermisé), ainsi que les viandes (bovins, porcs et volailles). Cependant les cas décrits dans la littérature font état de nombreux autres aliments (végétaux, coquillages, etc. (Bean *et al.*, 1997), une voie de transmission importante est constituée par les œufs destinés à la consommation humaine, contaminés soit en surface de la coquille, soit au niveau du vitellus du fait du passage des bactéries, plus particulièrement *S. Enteritidis*, par la voie trans-ovarienne (Gast & Beard, 1990b ; Shivaprasad *et al.*, 1990). Au cours des opérations d'abattage des animaux, les carcasses peuvent être contaminées en surface par le contenu digestif pouvant héberger *Salmonella* spp. (CSAFSCA, 2005). Les végétaux, et notamment les graines germées peuvent également héberger des salmonelles (Westrell *et al.*, 2009), du fait, soit de l'utilisation de fertilisants ou d'eaux contaminés, soit de mauvaises pratiques de récolte et de préparation.

Les facteurs de risque d'apparition sont l'absence ou l'insuffisance de cuisson des plats à base d'œuf et de viande de volaille (Kimuraa *et al.*, 2004). Les conditions hygiéniques durant et après l'abattage ont certainement un impact sur ce type d'infection, à laquelle s'ajoute comme autres facteurs de risque pour les cas sporadiques de salmonellose chez l'homme on peut citer les voyages internationaux et la consommation de plats préparés dans des restaurants (Hayes *et al.*, 1999). Dans ce dernier cas, on considère que le risque est plus élevé parce que les aliments sont préparés en grandes quantités et à l'avance. Enfin un autre facteur de risque identifié pour les cas sporadiques d'infection à *Salmonella* chez les enfants était la

conservation des œufs pendant une période de plus de 2 semaines avant la consommation, en particulier, en période estivale (Delarocque *et al.*, 1998).

### II.3. Les salmonelloses

Chaque année le nombre de cas de gastro-entérites humaines causés par *Salmonella* dans le monde est de 93,8 millions, dont 155 000 cas mortels. L'origine alimentaire de ces maladies est suspectée pour 80,3 millions de ces cas (Majowicz *et al.*, 2010). Ces salmonelloses non-typhiques représentent une charge importante pour la santé publique et un coût considérable pour la société de nombreux pays. Le coût total des affections à salmonelles a été ainsi estimé aux États-Unis d'Amérique en 2006 à 2,5 milliards de dollars américains (<http://www.ers.usda.gov/data/foodborneillness/>, 2007). Le réseau de surveillance FoodNet a estimé ces infections pendant la période (1996-1999) à 1,4 million de cas annuels entraînant 168 000 visites chez le médecin, 15 000 hospitalisations et 400 décès (Voetsch *et al.*, 2004). Dans la même période en France, l'Institut de Veille Sanitaire (INVS) pour la période (1995-1999) faisait état de 32000 à 43000 cas annuels confirmés entraînant de 6000 à 10700 hospitalisations avec 100 à 560 décès (INVS, 2004) les bactéries du genre *Salmonella* sont l'un des principaux responsables de Toxi-infections Alimentaires Collectives (TIAC), En Europe, elle constitue la seconde infection zoonotique la plus fréquemment signalée chez l'homme et demeure la cause la plus fréquente d'épidémies d'origine alimentaire. Au niveau Européen, les sérotypes majoritairement retrouvés restent Enteritidis suivi par Typhimurium (EFSA, 2010), toute fois la prédominance du sérotype Enteritidis a tendance à diminuer depuis quelques années en Europe. En France, le sérotype Typhimurium est même majoritaire depuis quelques années selon le Centre National de Référence des *Salmonella* (CNR-Salm), expliqué par les moyens et les programmes de lutte et de prévention établis par les autorités des pays membres, concernant les autres sérotypes leurs prévalence est en augmentation, le sérotype 4,[5],12:i:-, considéré comme un variant monophasique du sérotype Typhimurium pourrait constituer une menace pour ces prochaines années puisque sa prévalence est en constante augmentation, prenant même la 3<sup>ème</sup> place des sérotypes isolés en France en 2008 (CNR-Salm), dans les pays en voie de développement, en l'absence de toute investigation microbiologique systématique faces a des gastroentérites et l'absence de déclaration des cas diagnostiqués a participé dans l'ambigüité et la sous-estimation de l'ampleur des salmonelloses humaines.

Dans les filières animales l'impact des salmonelloses se répercute à plusieurs niveaux de la production. Les pertes économiques sont dues à : la mort des animaux, la baisse de production de lait, les avortements et le coût des traitements. En 1977, une étude réalisée en Allemagne

estime à environ 60 millions de dollars les pertes économiques dues aux salmonelloses dans les filières animales. Au Danemark, les autorités ont mis en place depuis plusieurs années un programme de lutte contre les salmonelles dans la production d'animaux d'élevage, dont le coût annuel est évalué à 14,1 millions de dollars (Wegener *et al.*, 2003).

### II.3.1. Salmonelloses animales

Les salmonelles agents des salmonelloses cliniques chez le porc *Salmonella* Choleraesuis un sérotype qui provoque une pathologie dénommée la paratyphoïde, qui entraîne chez le porc soit une entérocolite pouvant s'accompagner de fièvre, de décoloration de la peau et de septicémie, soit un état de portage sain, chronique, qui peut durer jusqu'à 28 semaines, la transmission entre porcs s'opère par la voie féco-orale mais également par la voie intranasale, pouvant provoquer ainsi des pneumonies (Fedorka *et al.*, 2000). D'autres sérotypes peuvent atteindre le porc mais vont provoquer des pathologies mineures comme des diarrhées passagères. Le porc va s'en remettre très facilement et rapidement, mais le problème réside dans l'émergence d'un état de portage sain. Cet état semble la règle avec les salmonelles pouvant traverser la barrière d'espèce (ex : Typhimurium, Derby, Infantis) (Korsak *et al.*, 2004). Chez la volaille, le sérotype *S. Gallinarum* exclusivement associé à cette filière induit souvent une pathologie sévère, voire létale (Shivaprasad, 2000). Cependant, la plupart des sérotypes peuvent infecter toute une série d'hôtes différents et cause en général une gastro-entérite temporaire. Parmi ces derniers on retrouve *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* (Guardpetter, 2001). En plus un état de portage asymptomatique est observé avec cette filière. Chez les bovins, l'infection est aiguë et de forme septicémique. Les salmonelloses peuvent provoquer une fièvre élevée, des pneumonies, de l'arthrite et des entérites. La létalité est élevée chez les bovins adultes, la salmonellose correspond souvent à une infection secondaire qui s'ajoute à une autre maladie. Les symptômes sont une diarrhée abondante (Martel & Savey, 1992).

### II.3.2. Salmonelloses humaines

Chez l'homme, les salmonelloses sont majoritairement de deux types : les gastro-entérites et les infections systémiques (fièvres typhoïdes ou paratyphoïdes), qui sont respectivement causées par des salmonelles ubiquistes non spécifiques d'hôte essentiellement représentées par *S. Enteritidis*, et *S. Typhimurium* et par des sérotypes spécifiques strictement adaptés à l'homme, tel que *Salmonella Typhi* (*S. Typhi*) (SCVMPH, 2003; Hu & Kopecko, 2003).



### II.3.2.1. Salmonelloses systémiques (fièvres typhoïdes et paratyphoïdes)

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 21 millions de personnes chaque année, sont touchées par une fièvre typhoïde, due à une infection par *S. Typhi* qui est très répandue dans les pays en voie de développement en raison de mesures d'hygiène très insuffisantes. Dans les pays développés, les cas sont généralement importés, via les voyageurs, les immigrants (Crump *et al.*, 2004). Les symptômes de la fièvre typhoïde en l'absence de traitement, incluent une forte fièvre, des maux de tête, une constipation ou une diarrhée et une hépato splénomégalie, il s'agit de la forme la plus grave des salmonelloses. Le réservoir strictement humain est entretenu par des personnes contaminées (malades, convalescents ou porteurs asymptomatiques) qui excrètent la bactérie via leurs selles ou leurs urines. La maladie se transmettant par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés par ces derniers, le taux de mortalité est inférieure à 1%, si les cas sont pris en charge de façon précoce et si l'antibiothérapie est initiée à temps et soutenue (Mermin *et al.*, 1999; Hu & Kopecko, 2003). Par contre, dans le cas contraire, le taux de mortalité peut avoisiner 10%, il peut atteindre 30% dans les régions endémiques comme c'est le cas en Asie, L'antibiothérapie peut être compliquée par l'émergence de souches multi résistantes et augmente ainsi la gravité de la maladie et l'incidence des fièvres typhoïdes. Les fièvres paratyphoïdes causées par les sérotypes *Salmonella* Paratyphi A, Paratyphi B ou Paratyphi C sont caractérisées par des symptômes similaires à ceux de la fièvre typhoïde mais moins sévères et un taux de mortalité plus faible (Mermin *et al.*, 1999).

### II.3.2.2. Gastro-entérites à *Salmonella* (Salmonelloses non spécifiques)

Les gastroentérites à *Salmonella* qui surviennent sous forme de cas isolés (sporadique) ou regroupés responsables des «Toxi-infections Alimentaires Collectives » (Weill, 2008). Qui se définissent par la survenue d'au moins deux cas groupés d'une symptomatologie similaire. Elles représentent une des causes principales de mortalité infantile dans les pays en voie de développement. *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium sont les plus incriminées dans ces salmonelloses humaines (Delmas *et al.*, 2007 ; RASRBA, 2011), les principaux symptômes sont la fièvre, des douleurs abdominales, des nausées et une diarrhée parfois accompagnée de vomissements. Dans la plupart des cas, la maladie après une incubation d'une durée comprise souvent entre 10 et 24 h la maladie dure 3 à 5 jours et la plupart des malades guérissent sans traitement (INVS, 2004). Cependant, chez les personnes les plus sensibles comme les personnes âgées, les nourrissons et dans les cas où la bactérie rejoint la circulation sanguine, ne se limitant plus à une infection intestinale (Hohmann, 2001), une antibiothérapie peut être

requis, cette dernière doit tenir compte de l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques et avec plusieurs mécanismes de résistance (Ruiz *et al.*, 2004).

### II.3.3. Salmonelloses végétales

Au cours de ces dernières années beaucoup d'études ont été menées sur l'interaction des salmonelles avec le végétal, cette capacité de colonisation des plantes justifiée par une adhérence de la bactérie aux feuilles qui implique plusieurs structures présentes à la surface des bactéries: certains fimbriae, le LPS ou encore les flagelles (Westrell *et al.*, 2009). Les bactéries sont également capables de pénétrer et de se multiplier dans les plantes entre la paroi externe et les cellules végétales, toute fois une possibilité de localisation intracellulaire a été rapportée dans d'autres études chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* infectée au niveau des feuilles, on observe l'apparition d'un flétrissement, d'une chlorose, voir la mort de la feuille (Kroupitski *et al.*, 2009 ; Schikora *et al.*, 2008). Les capacités des salmonelles à coloniser les plantes varient en fonction des sérovars, de l'espèce végétale infectée et de l'époque de l'année. Les sérovars *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* et *S. Senftenberg* adhèrent fortement aux feuilles tandis que les sérotypes *S. Arizona*, ou *S. Heidelberg* n'adhèrent pas (Berger *et al.*, 2011 ; Golberg *et al.*, 2011).

### II.4. Évolution de la sensibilité des salmonelles aux antibiotiques

Les souches sauvages de *Salmonella* sont naturellement sensibles à tous les antibiotiques actifs sur les entérobactéries. Les molécules préconisées pour traiter les salmonelloses humaines étaient le chloramphénicol, l'ampicilline, ou l'association triméthoprime/sulfaméthoxazole. Cependant, les problèmes de résistance rencontrés contre ces molécules ont conduit à utiliser des antibiotiques plus récents, notamment les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) et les fluoroquinolones (Parry & Threlfall, 2008). Toute fois des résistances contre ces dernières molécules ont été déjà mises en évidence chez *Salmonella*. L'émergence des souches résistantes en médecine humaine et vétérinaire a été observée avec le développement de l'élevage intensif d'animaux et l'utilisation systématique des antibiotiques comme promoteur de croissance et à des fins thérapeutiques destinées à la consommation humaine était évoquée (Who, 2008).

Les cyclines et le chloramphénicol étaient les deux premières à être touchées par la résistance (Ramsey & Edwards, 1961 ; McWhorter *et al.*, 1963). Suivie par une acquisition graduelle de la résistance vis-à-vis de plusieurs molécules introduites dans la lutte contre les épidémies émergentes surtout chez les bovins résistance à la streptomycine [S] et aux sulfamides [Su] en 1963, puis résistances additionnelles à l'ampicilline [A], à la kanamycine [K] et aux

nitrofuranes en 1965. Les salmonelles résistantes aux antibiotiques ont été transmises à l'homme, par des contacts directs avec les bovins ou indirectes par l'intermédiaire de lait cru (Anderson, 1968). Aux États-Unis à partir de 1963, plusieurs épidémies de grande ampleur, liées à des produits commerciaux dérivés des œufs, avaient conduit le Centers for Disease Control (CDC) d'Atlanta à instauré une véritable surveillance microbiologique des salmonelloses non-typhiques (Cohen & Tauxe, 1986). L'étude de 1967 révélait une prévalence élevée de la multi-résistance, notamment pour le sérotype majoritaire Typhimurium (Schroeder *et al.*, 1968). Parmi les souches résistantes à plus de deux antibiotiques, le phénotype principal de résistance était **ASSuTe**. En 1977, le laboratoire central de la santé publique de Londres signalait l'apparition de deux lysotypes du sérotype Typhimurium, DT204 et DT193, responsables de nombreux cas d'infections bovines et humaines sur l'ensemble du territoire du Royaume-Uni de profil **CSSuTe** et **ACKSSuTe** respectivement (Threlfall *et al.*, 1978). La genèse de ces souches multirésistantes aux antibiotiques (MRA) était due à l'acquisition de plasmides de différents groupes d'incompatibilité porteurs de nouvelles résistances aux antibiotiques. À la fin des années 1980, la prévalence des souches résistantes aux antibiotiques allait connaître un essor considérable avec l'émergence et la dissémination internationale rapide d'un clone de *S. enterica* sérotype Typhimurium, individualisé sur la base de la lysotypie (lysotype DT104) (Threlfall, 2000). Ce clone a été appelé « penta résistant » car la majorité des souches était de phénotype **ACSSuTe**. Des études sur les mécanismes de résistance ont montré que les souches de ce clone avaient intégré dans son chromosome un îlot génomique de 43 kb, le *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) (Boyd *et al.*, 2001).

Les premières souches de *Salmonella* résistantes aux céphalosporines de troisième génération (C3G) sont apparues à la fin des années 1980 et dans la première moitié des années 1990 (Miriagou *et al.*, 2004; Arlet *et al.*, 2006). Ces observations succédées de la résistance aux quinolones et surtout les fluoroquinolones (FQ) qui ont été utilisées au cours des salmonelloses humaines et animales durant les années 1990, avec une augmentation de souches de *Salmonella* résistantes à l'acide nalidixique et une diminution de la sensibilité à la ciprofloxacine (Cip) et à l'apparition de souches résistantes à la ciprofloxacine (Herikstad *et al.*, 1997). L'apparition de résistance chez *Salmonella* pourrait conduire à des risques de voir se propager des épidémies dues à une souche multi-résistante aux antibiotiques y compris aux C3G et aux fluoroquinolones ce qui peut conduire à un échec thérapeutique.

Plusieurs cas isolés de salmonelloses dues à de telles souches ont été déjà mis en évidence au cours des dernières années ; à *S. Choleraesuis* en 2002 à Taiwan cette souche était résistante à

dix antibiotiques dont le triméthoprime, la ciprofloxacine et le ceftriaxone (C3G) (Chiu *et al.*, 2004). Tout cela rend la surveillance de la résistance aux antibiotiques à tous les niveaux, en élevage, en médecine humaine et passant par la chaîne de production alimentaire indispensable pour anticiper l'apparition de telles souches ou encore de nouveaux mécanismes de résistance (**Tableau3**).

En Algérie, Le réseau national de la surveillance de la sensibilité aux antibiotiques dans son 13<sup>ème</sup> rapport a déclaré l'isolement de 127 isolats de *Salmonella* non typhoïdiques en médecine humaine pendant la période allant de Janvier à Décembre 2011 avec une prédominance de *Salmonella* Enteritidis (38 isolats) et *Salmonella* Typhimurium (25 isolats) (RASRBA, 2011). L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a révélé 45,9% de résistance à l'ampicilline (AMP), 13,3% de résistance à l'amoxicilline + acide clavulanique (AMC), 7% de résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, 5,7 % pour la cefoxitine (FOX), 72,2 % pour l'acide nalidixique (NAL), 18,8% de résistance au ciprofloxacine (CIP). D'un autre côté en médecine vétérinaire une grande diversité de sérotypes isolés est signalée spécifiquement à partir de prélèvements aviaires avec une prédominance de : *Salmonella* Enteritidis (52% ; N=55), *Salmonella* Livingstone, *S. Gallinarum* et *Salmonella* spp. (6% ; N=24), *S. Heidelberg* (3% ; N=3), *S. Typhimurium* (4% ; N=4), *S. Seftenberg* (3% ; N=3) et *Salmonella* Bovis-morbificans (2% ; N=2). Avec ces derniers sérotypes une faible résistance de 5% et 3% respectivement à l'ampicilline et à l'amoxicilline + acide clavulanique a été notée. Une sensibilité vis-à-vis du céftiofur, céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération à usage strictement vétérinaire (100%), une résistance à la fluméquine (44%), à l'acide nalidixique (57%), une résistance à l'enrofloxacin (33%) et à la norfloxacine (1%), une faible résistance de l'ordre de 3% des différents sérotypes à cet antibiotique. Une résistance de 2% et de 38% au chloramphénicol et les nitrofuranes respectivement (RASRBA, 2011).

**Tableau 3.** Pourcentage de résistance à différents antibiotiques de souches humaines de salmonelles non-typhiques isolées lors d'études nationales aux États-Unis (d'après Ramsey & Edwards, 1961 ; McWhorter *et al.* 1963 ; Schroeder *et al.* 1968 ; Ryder *et al.* 1980 ; Riley *et al.* 1984 ; MacDonald *et al.* 1987).

A, ampicilline ; C, chloramphénicol ; S, streptomycine ; K, kanamycine ; Te, tétracycline ou chlortétracycline ; Sul, sulfathiazole; Sxt, sulfaméthoxazoletriméthoprimine; Nal, acide nalidixique ; -, non déterminé.

Année	Sérotype (nombre de souches)	Pourcentage des résistances							
		A	C	S	K	Te	Su	Sxt	Nal
1948	Typhimurium (100)	-	0	-	-	0	-	-	-
1956-1957	Typhimurium (100)	-	0	-	-	5	-	-	-
1959-1960	Tous sérotypes (308)	-	1	-	-	9.7	-	-	-
	Typhimurium (158)	-	1.9	-	-	13.9	-	-	-
1962	Tous sérotypes (329)	-	0.3	-	-	28.6	-	-	-
	Typhimurium (213)	-	0.4	-	-	38	-	-	-
1967	Tous sérotypes (400)	8	0	14.2	1.2	12.5	11.5	-	0
	Typhimurium (102)	25.5	0	34.3	2.9	31.4	26.4	-	0
1975	Tous sérotypes (754)	17.2	0.8	19.9	10.1	16.6	20.4	0.4	0.4
	Typhimurium (173)	42.8	0.6	46.8	35.8	46.2	46.2	1.2	0
1979-1980	Tous sérotypes (542)	8.7	0.7	12.6	3.7	8.7	8.3	0.2	0
	Typhimurium (239)	9.6	0.4	13	6.3	11.7	8.8	0	0
1984-1985	Tous sérotypes (485)	9	2	12.2	3.5	13	7	0.6	1.2

# Chapitre III

---

## Techniques d'Isolement et de Caractérisation Des Salmonelles

### III.1. Techniques d'isolement des salmonelles à partir des aliments

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. Pour isoler les bactéries, l'analyse microbiologique classique des aliments nécessite donc plusieurs étapes successives ce qui entraîne un temps de réponse relativement important (Varnam & Evans, 1996 ; Waltman, 2000). La première phase consiste en une revivification grâce à la réalisation d'une suspension-mère de pré-enrichissement, l'échantillon est généralement dilué au dixième (ex : 25 g d'aliment dans 225 ml de diluant). Le diluant est généralement constitué par de l'eau peptonnée tamponnée. La deuxième étape consiste en un enrichissement des salmonelles dit « Sélectif », plusieurs types de milieux d'enrichissement peuvent être utilisés : Muller-Kaufman tétrathionate (MKTT), sélénite (s), sélénite-cystine (SC) et Rappaport-Vassiliadis (RV). Ce dernier milieu d'enrichissement est souvent le plus approprié pour *Salmonella* étant donné son excellente sélectivité (Oboegbulem, 1993 ; Busse, 1995 ; Waltman, 2000).

Après cette première étape d'enrichissement vient l'étape d'isolement où il existe plusieurs formules différentes de milieux : le milieu Hecktoen (HK) et Salmonelles-Shigelles (SS) mais, toute fois le «*Brilliant Green Novobiocine*» (BGN) 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. Ces milieux doivent permettre au personnel de laboratoire une distinction facile entre salmonelles et non-salmonelles (Maddocks *et al.*, 2002).

Les méthodes de détection des salmonelles dans les aliments ou les environnements des ateliers agro-alimentaires sont nombreuses, certaines entités proposées par des instances internationales telles que l'ISO (Organisation internationale de Normalisation), des instances nationales comme la FDA (*Food and Drug Association* des États Unis d'Amérique et son *Bacteriological Analytical Manual*), l'AFNOR (Association française de Normalisation), le DIN (*Deutsches Institut für Normung*), le NEN (*Nederlands Europese norm Nederlands normalisatie instituut*), le NMKL (*Nordisk metodikkomitté för livsmedel*). La norme (NF /EN/ ISO 6579) constitue une des méthodes de référence horizontale pour la détection de *Salmonella* spp. Dans une denrée alimentaire, le sélénite-cystine a été remplacé par le milieu Muller Kauffmann tétrathionate novobiocine (MKTTn), le Rappaport Vassiliadis Soja (RVS) est utilisé à la place de la formule simple de RV. Le milieu d'isolement «xylose-lysine-deoxycholate» (XLD) conjointement avec un autre milieu au choix. Une autre norme

internationale (ISO 6785/2008) verticale est préconisée pour la recherche de *Salmonella* spp dans les laits et produits laitiers. Cependant en l'absence des méthodes de recherche verticale spécifique a chaque type d'aliments, les auteurs des études réalisées sur des carcasses et viandes de bovins, porcins et volaille utilisent le plus souvent des méthodes publiées dans des études scientifiques ou par l'autorité en charge de la sécurité alimentaire, telle que la « *Food Safety and Inspection* » correspondant au service d'inspection du département de l'agriculture des USA ou la *Health Protection Agency* au Royaume-Uni (Rho *et al.*, 2001 ; Eblen *et al.*, 2005).

### III.2. Techniques de caractérisation phénotypiques et moléculaires des salmonelles

L'importance des salmonelloses, associées aux conséquences économiques et en santé publique, a entraîné le développement de nombreuses méthodes phénotypiques et moléculaires pour la caractérisation des Salmonelles. Cette caractérisation s'appuie en premier lieu sur la détermination de biotype, sérotype, antibiotype et lysotype. Ces dernières sont des méthodes de suivie des tendances évolutives des sérotypes dans différentes filières (Anne, 2001). Le typage moléculaire est un des piliers de l'investigation des épidémies (épidémiologie d'intervention) (Desenclos, 2007), elle s'attache à identifier la source, le véhicule et le réservoir de l'agent infectieux, confirmer les cas épidémiques et les distinguer des cas sporadiques, elles sont donc des outils puissants applicables à la traçabilité bactérienne en médecine humaine et dans le secteur agro-alimentaire (Dodd, 1994). Elles sont un outil de biosurveillance et du suivi épidémiologique (épidémiologie descriptive), étude de la distribution des clones ou la mise en évidence de l'émergence (Struelens *et al.*, 1998). Les objectifs de la caractérisation bactérienne sont multiples et les techniques utilisées dépendent des objectifs à atteindre.

#### III.2.1. Techniques phénotypiques

##### A. La biotypie

Elle repose sur la mise en évidence des caractères biochimiques différentiels qui permettent de classer les souches selon leur activité métabolique par l'utilisation de sucre et/ou leur activité enzymatique. Ce marqueur est peu discriminant au-delà de l'espèce pour être utilisé seul. Il peut cependant être utile comme système d'alerte ou de surveillance pour repérer une souche. Lorsque ce caractère est inhabituel, cela peut être le cas des souches de Salmonelles présentant une fermentation du lactose, ou du saccharose, inositol ou bien ne produisant pas d'H<sub>2</sub>S, caractères inhabituels pour les Salmonelles (Poisson *et al.*, 1988). Les tests biochimiques peuvent être réalisées en macro-galerie et en micro-galerie commercialisées tel le système miniaturisé API 20 E (Analytical Profile Index, BioMérieux).



Tests biochimiques réalisés en macro-galerie

- Fermentation du Lactose, du Mannitol, du Dulcitol, du Rhamnose, du Xylose, du Mucate, du Citrate de Christensen, de l'Acétate de Trabulsi et du Glycérol.
- Production d'ortho-nitrophenyl- beta-D-galactopyranoside (ONPG), de Gaz/Glucose, de Gaz/Mannitol, de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S), et du tétrathionate réductase (TTR).
- Activité Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC), tryptophanase (Indole) et Beta-glucuronidase.
- Culture sur Citrate de simmons.

### B. Le sérotypage

Outil majeur pour la caractérisation des Salmonelles. Un schéma de sérotypage a été défini par Kauffmann et White, puis revu par Le Minor et Popoff (Patrick *et al.*, 2007 ; Popoff, 2007), il repose principalement sur la présence et la mise en évidence de facteurs antigéniques reliés aux antigènes somatiques «O» de type polysaccharidique, et flagellaires «H» (Tindall *et al.*, 2005). Le sérotypage des Salmonelles est un outil indispensable pour suivre l'évolution et les tendances spatio-temporelles des souches isolées dans différents secteurs. Certains sérotypes étant fortement associés à une filière. Le sérotype pourra donc être un outil d'investigation épidémiologique d'autant plus efficace, qu'il sera rare ou associé de façon quasi-exclusive à une filière ou à un type de production. Il nécessite l'emploi d'environ 200 antisérums (polyvalents et monovalents) polyclonaux absorbés, préparés chez le lapin. Le 1/3 des sérums est d'origine commerciale (principalement BioRad). Le sérotypage classique par agglutination reste le sérotypage de référence (ISO/TR 6579-3) et qui permet de différencier 2579 sérotypes (Grimont & Weill, 2007).

### C. L'antibiogramme

Aujourd'hui l'acquisition, chez *Salmonella*, de certains caractères de résistance donne la possibilité de suivre des clones uniquement par leur phénotype de résistance aux antibiotiques. C'est le cas par exemple pour *S. Typhimurium* du lysotype DT104 qui présente une résistance associée à cinq antibiotiques : Ampicilline, Streptomycine, Chloramphénicol, Tétracycline et Sulfamides phénotype (ASCTSu) (Davis *et al.*, 2002). Plusieurs techniques ont été développées pour visualiser les différents niveaux de sensibilité et les différents mécanismes de résistance telle que : L'**antibiogramme** par diffusion en milieu gélosé, la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par différentes méthodes en milieu solide, liquide et par bandelette E-test<sup>®</sup> (BioMérieux<sup>®</sup>), exécutés suivant des

recommandations des commissions nationales et internationales dont les plus célèbres sont ceux de clinical and laboratory standards institute (CLSI) et European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (RASRBA, 2011) .

#### **D. La lysotypie**

Elle est basée sur l'étude de la sensibilité ou de la résistance d'une souche à une série de bactériophages sélectionnés. De nombreux systèmes de lysotypie ont été élaborés, ils visaient à étudier de façon plus précise des souches appartenant à des sérotypes d'intérêt majeur soit par leur fréquence d'isolement (Typhimurium, Enteritidis), soit par leur pathogénicité (Typhi, Dublin) (Anderson *et al.*, 1977; Callow, 1959). Le nombre de bactériophages utilisés ainsi que le nombre des lysotypes identifiés sont très variables d'un sérotype à l'autre. Les principaux systèmes de lysotypie sont : le système de Felix et Callow pour Paratyphi B, système de Banker ou d'Anderson pour Paratyphi A, système de Colindale ou d'Anderson pour Typhimurium, système de Ward ou de Vieu pour Enteritidis et système de Vieu pour Dublin (Grimont, 1992).

### **III.2.2. Techniques moléculaires**

#### **A. Caractérisation des iso-enzymes**

Analyse des modifications dans la structure de la protéine (substitution d'acides aminés), qui est elle-même le reflet de mutations d'ADN au niveau des gènes de structures de ces protéines par électrophorèses en gel d'amidon ou d'acrylamide-agarose, électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant ou (SDS-PAGE) constitue une de ces techniques (Begum *et al.*, 2008). Les études ont porté essentiellement sur les enzymes (iso-fonctionnels) ou (iso-enzymes) pour lesquels une mutation n'altère pas la fonction enzymatique mais provoque une variation de migration électrophorétique. On peut ainsi, pour une souche donnée, obtenir une combinaison de variants pour l'ensemble des enzymes étudiés, appelée «Type Électrophorétique». Particulièrement étudiées pour les Salmonelles permettant de définir différents zymotypes (Selander *et al.*, 1986).

#### **B. Caractérisation génotypique des salmonelles**

##### **B.1. Profil plasmidique**

La détermination du nombre et de la taille des plasmides nécessite d'extraire l'ADN plasmidique, de les séparer par électrophorèse en agarose et de les révéler après coloration au bromure d'éthidium (BET), les profils plasmidiques ont été utilisés dans plusieurs enquêtes afin d'aider à caractériser des souches de même sérotype et d'origines divers (Borrego *et al.*, 1992 ; Martinetti , 1990), elle a permis de subdiviser des lysotypes chez Typhimurium et Enteritidis (Threlfall *et al.*, 1989 ; Threlfall *et al.*, 1990). D'autres types d'analyses plus

précises peuvent être réalisées comme la détermination du profil de restriction ; les méthodes employées sont alors très fortement identiques à celles utilisées pour l'ADN chromosomique et permettent d'obtenir un profil de restriction plasmidique. Cette analyse peut être intéressante pour la mise en évidence de gènes portés sur un plasmide et elle accroît la discrimination entre les souches et permet de mesurer le degré de parenté entre de plasmides de taille similaire (Yves Millemaan, 1998). Toutefois la détermination de profil plasmidique n'apparaît pas aussi intéressante que les autres méthodes de typage comme la lysotypie quand le nombre de plasmides est réduit (Poppe *et al.*, 1993) et dans le cas où les plasmides sont tellement fréquents dans une espèce qu'ils ne permettent plus de les subdiviser (Threlfall, 1994).

## **B.2. Étude de l'ADN chromosomique des salmonelles**

Les méthodes utilisent schématiquement deux types de technologie, l'amplification génique ou PCR (Polymérase Chain Réaction) et la restriction enzymatique, ces deux derniers pouvant parfois être combinés pour certaines caractérisations particulières.

### **B.2.1. Les techniques basées sur la PCR (Polymérase Chain Réaction)**

Les techniques PCR ont l'avantage d'être simples à mettre en œuvre et de permettre d'obtenir un résultat très rapidement. Après la phase d'extraction de l'ADN, la PCR est réalisée, suivie de l'électrophorèse des produits amplifiés et de la révélation de ces produits par coloration au bromure d'éthidium (BET), permettent de réaliser une amplification génomique de certaines séquences d'ADN, c'est ainsi plusieurs techniques ont été proposées telle :

#### **➤ La Technique RAPD « Random Amplification of Polymorphic DNA »**

C'est une méthode de typage très utilisée et nécessite une seule amorce choisie au hasard, formée d'environ une dizaine de nucléotides et s'hybridant à plusieurs endroits du génome. Les profils des produits amplifiés ainsi obtenus peuvent être caractéristiques de la souche et permettent une bonne discrimination au sein d'un sérotype donné (Hilton *et al.*, 1996). Elle a été largement utilisée dans la caractérisation et le diagnostic de l'infection par *Salmonella* (Tikoo *et al.*, 2001). RAPD a été décrite comme un procédé simple et rapide capable d'offrir des empreintes détaillées de la composition génomique de la bactérie (Welsch & McClelland, 1990), cette technique a prouvé son pouvoir discriminant puissant par rapport aux techniques phénotypiques pour la caractérisation de *Salmonella* Enteritidis de différentes origines (Betancor *et al.*, 2004).

Cependant la reproductibilité et la répétabilité de la méthode sont passables ce qui ne permet pas de l'utiliser pour un suivi de souches à long terme. En effet des profils RAPD différents

peuvent résulter de faibles variations portant sur la concentration des amorces, le nombre et les conditions des cycles d'amplification, la qualité et la concentration de la *Taq* polymérase (Ellsworth *et al.*, 1993 ; Meunie *et al.*, 1993).

➤ **La Technique MLST (Multilocus Sequence Typing)**

La technique MLST, développée en 1998 pour *N. meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998) du fait de la difficulté de comparer des résultats de MLEE (MultiLocus Enzyme Electrophoresis) (Caugant, 2002) est une méthode basée sur l'analyse de la séquence de 7 gènes dits « gènes de ménage » dont l'expression est indispensable et qui est responsable du métabolisme de la cellule. Les gènes séquencés ont la particularité d'être indépendants des gènes de virulence de l'agent pathogène et de sa résistance aux antibiotiques. Cette technique est utile pour des études épidémiologiques descriptives de biosurveillance, mais peut ne pas être assez discriminante pour des analyses en situation d'épidémie suite à l'évolution génétique lente de gènes de ménage (M'aidé *et al.*, 1998). L'intérêt et l'avantage de cette méthode est qu'elle est parfaitement reproductible quelque soit le laboratoire et elle permet l'établissement d'importantes bases de données répertoriant chaque séquençage (Chan *et al.*, 2001), et à laquelle des laboratoires du monde entier ont non seulement accès, mais peuvent également participer en partageant les séquences des souches qu'ils étudient.

Pour salmonella, la base de données MLST (MLST Database at UoW, University of WARWICK) ([mlst.warwick.ac.uk/mlst](http://mlst.warwick.ac.uk/mlst)) est une des bases qui ont permis la standardisation de cette technique MLST pour cette bactérie avec sept gènes de ménages choisies (*thrA*, *purE*, *sucA*, *hisD*, *aroC*, *hemD* et *dnaN*), amorces pour amplification et séquençage, d'un autre côté cette base de données offre les moyens de lecture d'interprétation des différentes séquences, détermination de profil allélique, sequencetype et ainsi le complexe clonal.

➤ **La Technique MLVA (Multilocus Vntr Analysis) (Variable Numbers Of Tandem Repeats)**

Les répétitions en tandem sont constituées par la répétition et dans un même sens les uns derrière les autres, de motifs d'ADN répétés, par opposition aux répétitions « dispersées » dont les unités répétées sont dispersées dans le génome, elles sont initialement décrite chez les eucaryotes, les séquences répétées en tandem (TR) forment des familles de répétitions souvent distinguées en deux grandes classes : les microsatellites et les minisatellites (Jeffreys, 1985). Les séquences répétées, intra ou inter-géniques sont différenciées par leur taille, de 1 à 9pb pour les microsatellites formés par glissement lors de la Réplication et plus de 9pb pour les

minisatellites formés lors de la réparation de cassures dans le double brin, d'origine répliquative (Vergnaud & Pourcel, 2009).

Certaines séquences répétées en tandem présentent un polymorphisme de répétitions intra-espèce. Ces séquences polymorphes, qu'elles soient de type micro ou minisatellites, sont appelées VNTRs pour (*Variable Number of Tandem Repeats*). Selon les génomes bactériens elles peuvent représenter de 2 à 10% de l'ensemble des répétitions en tandem (Denoeud & Vergnaud, 2004).

Les VNTRs sont des régions génomiques instables dont la mutation est médiée par plusieurs facteurs. La réponse à des stress environnementaux, est une des raisons de promouvoir cette forme de variabilité. Ces répétitions en tandem polymorphes sont nécessaires à l'adaptation des bactéries à leur environnement par action sur la fonction d'une protéine (variation antigénique, variation de phase, variation fonctionnelle, interaction avec d'autres bactéries, interaction avec la cellule cible, régulation de l'expression d'un gène) (Hood *et al.*, 1996 ; Madoff *et al.*, 1996).

Les VNTRs en raison de leur polymorphisme de longueur résultant de la variation du nombre de motifs ont conduit au développement des empreintes génétiques permettant l'identification humaine dans un premier temps (Jeffreys, 1985), et des bactéries dans un deuxième temps, dont les premiers travaux ont été effectués sur *Haemophilus influenzae* en 1997 (Van Belkum, 1997) et *Bacillus anthracis* (Jackson, 1997).

Depuis 2003, la méthode de génotypage par MLVA de *S. enterica* a été introduite (Lindstedt, 2003 ; Liu, 2003). Les avantages connus de cette technique sont les suivants : capacité de typage, reproductibilité, stabilité, concordance épidémiologique, ainsi que pouvoir de discrimination élevé en fonction des marqueurs et des sérotypes étudiés, (Vergnaud & Pourcel, 2009 ; Ramiisse *et al.*, 2004 ; Lindstedt *et al.*, 2003), ce pouvoir discriminant a été prouvé et vérifié dans plusieurs études comparatives entre cette technique moléculaire (MLVA) et d'autres telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et la lysotypie (Boxrud *et al.*, 2007 ; Ross & Heuzenroeder, 2009).

La technique MLVA exploite comme source de polymorphisme la variation du nombre de motifs dans les répétitions en tandem. L'amplification par PCR d'une collection de loci répétés en tandem, et la mesure de la taille des fragments amplifiés, permettent d'assigner à une souche une série de nombres correspondant au nombre d'unités répétées dans chaque locus (Vergnaud & Pourcel, 2009). Des schémas MLVA pour certains sérotypes sont déjà établis pour d'autres ils sont en cours.

### B.2.2. Les techniques basées sur la restriction enzymatique

Ces méthodes consistent à couper l'ADN extrait et purifié, avec une enzyme de restriction, permettant ainsi de produire un certain nombre de fragments d'ADN qui seront ensuite séparés par électrophorèse en gel d'agarose et révélés par coloration au BET, deux plus importantes et les plus largement utilisées sont le ribotypage et l'électrophorèse en champ pulsé ou PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis).

#### ➤ **Ribotypage :**

IL s'est développé suite à la REA « **Restriction Enzyme Analysis** » qui donnait un nombre de fragments trop important pour que les profils soient facilement interprétables ; génère une empreinte hautement reproductible et précise qui peut être utilisée pour classer les bactéries du genre à travers et au-delà du niveau de l'espèce. Il consiste à transférer les fragments d'ADN ayant migré sur une membrane de nylon et à révéler seulement une partie de ces fragments à l'aide d'une sonde spécifique, une des sondes les plus couramment utilisées étant la sonde codant pour les ARN ribosomiaux 16S et 23S de *Escherichia coli* ; elle permet donc de révéler les profils de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomiaux ou « ribotypes ». Le ribotypage a été appliqué à différents sérotypes de Salmonelles et son pouvoir discriminant est très variable d'un sérotype à un autre ; dans certains cas, il n'est pas possible de relier le ribotype obtenu à un sérotype donné (Selander *et al.*, 1990).

#### ➤ **Électrophorèse en Champ Pulsé ou (PFGE) (Pulsed Field Gel Electrophoresis)**

Elle utilise une endonucléase de restriction à faible fréquence de coupure permettant ainsi de produire un nombre de fragments directement exploitable pour l'interprétation des profils. Ces fragments d'ADN doivent alors migrer dans un champ électrique particulier permettant la migration de fragments de grosse taille de 30 à 2000kb (Schwartz & Cantor, 1984) par la technique d'électrophorèse dite CHEF (Clamped Homogenous Electric Field). La révélation des fragments se fait de façon classique avec le BET. Les enzymes de macrorestriction utilisées pour le PFGE des *Salmonella* sont XbaI, BlnI ou SpeI (Murase *et al.*, 1995). Cette technique a montré, de façon générale, un très bon pouvoir discriminant pour *Salmonella*, mais il existe des variations en fonction du sérotype étudié. C'est ainsi qu'il existe un bon polymorphisme par PFGE chez *S. Typhimurium* après digestion par XbaI alors que la même enzyme de restriction donne moins de diversité chez *S. Enteritidis*.

### B.2.3. Techniques de caractérisation moléculaires combinées (PCR-RFLP)

Utilise des techniques d'amplification géniques et de restriction enzymatique à la fois, dans le cas des Salmonelles, cette technique a été utilisée pour la caractérisation du gène

de la flagelline, permettant ainsi une approche moléculaire d'identification des antigènes flagellaire (H) dans le but de se substituer à la sérotypie ou de révéler une phase flagellaire antigéniquement non décelable. Les gènes de flagelline de certains sérotypes ont été amplifiés puis clivés par des endonucléases HhaI ou HphI. Des profils de restriction de gène de flagelline ont été obtenus pour les deux phases flagellaires, mais la diversité rencontrée dans ces profils ne correspondait pas de façon précise aux résultats de l'agglutination flagellaire (Dauga *et al.*, 1998).

# Partie II

---

## Étude Expérimentale



**[1] Diversité sérotypique, biochimiques et  
sensibilité aux antibiotiques des Salmonelles**

## **1.1. INTRODUCTION**

Afin d'évaluer l'évolution phénotypique des salmonelles, trois caractéristiques ont été explorées dans notre étude à savoir; caractéristiques antigéniques exprimés par la paroi et les flagelles, sensibilité aux antibiotiques et comportement biochimique, dont le but d'apprécier la diversité sérotypique de nos souches de *Salmonella* non typhiques contaminants les aliments ; (i) évaluer leurs sensibilité aux antibiotiques; (ii) identifier des éventuelles émergences de résistances; (iii) déterminer les mécanismes mis en jeu; (iv) déterminer la variabilité des caractéristiques biochimiques. En utilisant un ensemble de techniques de caractérisation : biochimiques (système miniaturisé API20E), antigénique (sérotypage par agglutination sur lame), étude de la sensibilité aux antibiotiques par deux techniques (antibiogramme standard sur milieu solide et la détermination de la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide). Une étude qui a été réalisée avec une approche comparative face à des salmonelles isolées à partir des coprocultures des malades atteints de gastroentérites à *Salmonella* non typhoïdiques.

## 1.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude a été étalée sur une période de cinq années (2007-2012) dans la région de Tébessa située à l'Est de l'Algérie en collaboration avec le laboratoire de microbiologie du Centre Hospitalo-universitaire (CHU, Alger centre) et le laboratoire d'hygiène de la wilaya de Tébessa et différents secteurs sanitaires, pour l'isolement et la caractérisation phénotypiques des salmonelles d'origine alimentaire et humaine. Toutefois l'analyse moléculaire a été réalisé au niveau de l'établissement de biologie moléculaire (plate forme microbiologie) Genoscreeng (Lille, France).

### 1.2.1 Échantillonnage

#### 1.2.1.1. Origine alimentaire

Des échantillons ont été prélevés à partir de deux niveaux de commercialisation constitués de **(i) Vente en gros** de la viande de volaille (poulet de chair) et de l'œuf de poule pondeuse, **(ii) Vente en détail** de la viande de volaille (poulet de chair) représentés par les boucheries et l'œuf de poule pondeuse. **Un troisième niveau (auxiliaire)** constitué des plats suspects d'être à l'origine des toxi-infections alimentaires collectives.

#### a. Fréquence, rythme d'échantillonnage et modalités de prélèvements

En l'absence de plans d'échantillonnage international standard des aliments cibles, et surtout dans notre contexte (investigation microbiologique), qui concerne des aliments d'origine animale, une bactérie spécifique (*Salmonella*) et un niveau de prélèvement qui est la commercialisation en gros et en détail. On a adapté un plan d'échantillonnage aléatoire le plus représentatif qui tient en compte des facteurs temporels et climatiques.

- **Vente en gros de poulet de chair et de l'œuf de poule pondeuse**

Notre échantillonnage a été effectué au niveau de la ville de Tébessa (chef de lieu). Cette opération a été réalisée en deux périodes estivale et hivernale. Les points de vente choisie pour échantillonnage des carcasses de poulet de chair ont été visités avec un rythme de (quatre points de vente/période/année), et les prélèvements ont été effectués avec une fréquence de (20 à 30 carcasses/ point de vente). Les carcasses prélevées selon la méthode officielle de prélèvements décrite dans la norme **(ISO 17604)** (Organisation internationale de normalisation, 2003d), Cette norme prévoit l'emploi de deux techniques ; destructives (avec utilisation d'un gabarit ou avec utilisation d'un emporte-pièce) et non destructives (avec écouvillon, chiffonnette ou éponge), en fonction du contexte de l'étude. Dans notre travail on a choisi la méthode non destructive par écouvillonnage, une fois l'écouvillon stérile humidifié à l'aide d'une solution nutritif (eau peptonée tamponnée), quatre zones de (10 cm<sup>2</sup>) de la

carcasse ont été frottées et l'écouvillon était plongé dans une solution nutritive (eau peptonée tamponnée) pour le décharger de l'ensemble de bactérie collecté.

Concernant l'œuf de poule pondeuse, les échantillons ont été prélevés (achat) à partir de quatre points de vente en gros chaque année avec un rythme de (deux sorties /période/année), et les prélèvements ont été effectués avec une fréquence de (30 œufs/point de vente/sortie).

- **Vente en détail de la viande de volaille et de l'œuf de poule**

On a procédé à l'achat des morceaux des découpes du poulet de chair, l'échantillonnage a été réalisé avec le rythme et la fréquence suivante (deux sorties /période /année), dans chaque sortie quatre boucheries ont été visités (achat de découpes représentées par (cuisses et thorax/boucherie), avec ce dernier type de prélèvement, la carcasse a été éliminée immédiatement dès l'arrivée au laboratoire.

Concernant l'œuf de poule pondeuse, on a procédé à un achat des œufs de poule pondeuse, l'échantillonnage, a été réalisé avec le rythme et la fréquence suivante (deux sorties /période /année) à partir de quatre points de ventes en détail, choisies aléatoirement à partir de l'ensemble total du lot en vente avec un ordre de 30 œufs /sortie /point de vente.

- **Troisième niveau (auxiliaire) :**

En l'absence d'investigation microbiologique systématique et de déclaration obligatoire des foyers de toxi-infections alimentaire collectives par les autorités responsables de la santé dans notre région, un nombre restreint d'échantillons constitué de plats suspects a été collecté et analysé pendant cette étude en collaboration avec le laboratoire d'hygiène de la wilaya, sachant qu'on n'a pas intervenu dans la collecte et l'acheminement de ces échantillons.

- b. Transport et acheminement des échantillons**

Hormis le troisième niveau, Les prélèvements sont acheminés au laboratoire dans un caisson isotherme, dont la température ne dépassant pas 4°C, ramenés au laboratoire et traités dans la même journée.

- c. Isolement et identification préliminaire des salmonelles**

La méthode d'analyse retenue était inspirée de deux méthodes, la technique Française de routine (NF V08-052) de mai 1997 et la méthode horizontale de référence (ISO 6579) de 2001. Ces deux dernières comportent trois étapes :

- **Pré-enrichissement**

- (i) En milieu non sélectif liquide : le pré-enrichissement a été réalisé *in situ* au niveau de site de prélèvement (**carcasse de poulet de chair**), dans un milieu nutritif (eau peptonée tamponnée (Institut Pasteur d'Algérie) mis en incubation à 37°C pendant 24 à 48 h.

- (ii) Quatre à six **œufs** assembles et qui ne doivent présenter aucune craquelure. Manipuler à l'aide d'une pince stérile. Déposer délicatement dans un sac stérile contenant 250 ml (d'eau peptonée tamponnée). Il s'agit d'un bain pour la coquille avec le diluant (les œufs sont retirés un à un après 30 minute). L'eau peptonée tamponnée est ensuite incubée à 37°C pendant 24 à 48 h.
- (iii) Après élimination immédiate de la carcasse et de la peau avec une pince stérile, 25 g **du muscle** (cuisse, thorax) après broyage et mis en suspension avec (250ml) d'eau peptonée tamponnée, homogénéisé au Stomacher (Seward, Angleterre) et mis en incubation à 37°C pendant 24h à 48 h.
- **Enrichissement** : (1 ml) du pré-enrichissement étaient respectivement transférés pour enrichissement, dans (20 ml) de bouillon Sélénite (SFB) (Institut Pasteur D'Algérie) simple concentration. Le milieu sélénite a été choisi pour l'enrichissement sélectif des salmonelles, et particulièrement il favorise la multiplication de *Salmonella* Gallinarum (hôte restreinte volaille), spécificité non observée avec d'autres milieux d'enrichissement sélectif des salmonelles. L'enrichissement est mis en incubation 24h à 37°C.
  - **Mise en culture** : (0,1 ml) de chaque tube a étéensemencé dans une boîte de gélose Hecktoen (HK) (Institut Pasteur d'Algérie) et étuvé à 37°C pendant 24 h à 48h. En l'absence de culture positive, un deuxième enrichissement est lancé en milieu sélénite double concentration pour une deuxième mise en culture. Le deuxième enrichissement est préconisé pour récupérer les salmonelles non révélées dans le premier enrichissement, nécessaire lors des fortes contaminations par les bactéries compétitives essentiellement entérobactéries observés avec cette catégorie d'échantillons dont l'origine est animale.
  - **Purification** : Les cultures avec des colonies suspectées (colonies à contours réguliers, vertes à nuances bleuâtres et à centres noirs et exceptionnellement sans centres noirs), ont été prélevées et réensemencées en gélose Hektoen (HK) et incubées à 37°C pendant 24h en vue de les purifier sur le même milieu de culture.
  - **Confirmation biochimique (tests préliminaires)** : consiste en la sélection d'une ou plusieurs colonies caractéristiques, chargée sur une pointe etensemencée en profondeur et en surface du milieu «Triple Sugar Iron» (TSI) (Institut Pasteur d'Algérie), gélose inclinée composée de citrate de fer, de lactose, saccharose et glucose. Après 24h d'incubation, les (TSI) caractéristiques suspects sont identifiés par d'autres tests

biochimiques clés, recherche de : UREASE, TDA, INDOL, ONPG. réalisées en galerie classiques.

#### **1.2.1.2. Origine humaine**

Dans la même période et en collaboration avec plusieurs laboratoires de microbiologie de la région (wilaya de Tébessa), 39 isolats de salmonelles non typhoïdiques isolées des coprocultures des malades atteints de gastro-entérite, hors épisodes d'intoxication alimentaire collective ont été collectés pendant la période (2007-2012). Dans le but d'effectuer une étude comparative entre les salmonelles de deux origines.

#### **1.2.3 Sérotypage**

Un sérotypage des différentes souches à l'aide d'antisérums polyvalents (mélanges anti O) (OMA) et (OMB) spécifiques de groupe et monovalents spécifiques d'espèce dirigés contre les antigènes (O) et (H) des salmonelles (BIO-RAD) (Annexe2) selon le schéma de « White-Kauffmann-LeMinor ». En pratique, les sérums polyvalents (OMA) et (OMB) permettent de déterminer (99 %) des souches de *Salmonella* par des tests d'agglutination sur lame. D'abord il a été vérifié que les isolats n'étaient pas en phase rugueuse (Rough : R.) ou auto-agglutinables, en observant qu'aucune agglutination n'apparaissait en les mélangeant à une goutte d'eau physiologique. Le sérotypage a été réalisé avec une culture fraîche de 24h obtenue sur Gélose Nutritif (GN) incliné (Institut Pasteur, Alger), la lecture des résultats a été effectuée suivant le tableau de « White-Kauffmann-le Minor » (Annexe2).

#### **1.2.4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

L'étude a été réalisée grâce au système automatisé (MicroScan Walkaway® plus), est un nouveau concept siemens qui intègre trois technologies colorimétrie, fluorescence et turbidimétrie pour l'identification biochimique des bactéries et la détermination de leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI) réalisés sur des microplaques contenant les substrats et des antibiotiques déshydratés. La mesure de la CMI par micro dilution en plaque permet l'obtention des microdilutions des antibiotiques choisies, inoculés par la suite de la bactérie. Les gammes de concentration des antibiotiques testées tiennent en considération des concentrations critiques correspondantes aux intervalles limitant la sensibilité et la résistance des souches bactériennes. Chaque série de test est validée par la mesure de la CMI de la souche de référence *E. coli* ATCC 25922.

Ce système permet l'incubation, l'addition de réactifs et la lecture automatisées des plaques pour les identifications et la détermination de la (CMI). L'interprétation est automatisée par l'intermédiaire du logiciel (Labpro®). L'inoculum peut être préparé à l'aide d'une pointe calibrée permettant de standardiser la densité de l'inoculum sans utiliser de turbidimètre

(système Prompt®). L'inoculation est facilitée par l'utilisation d'un dispositif de pipettage qui inocule les plaques en une étape (système RENOK®).

L'interprétation des CMI en phénotype sensible (S) ou (R) a été effectuée selon les valeurs seuils cliniques (Clinical Breakpoints) de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2013) à l'exception de certains seuils d'interprétation non déterminés par ce dernier et qui ont été tirés de la table du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2010). Dans un contexte d'épidémiologie-surveillance qui a pour objectif de détecter les souches bactériennes ayant acquis un mécanisme de résistance sans l'exprimer franchement, des seuils épidémiologiques (Epidemiological Cut-Off) définie par EUCAST ont été utilisés pour répartir les souches en : Souches sauvages et non sauvages (**Tableau 4**).

- **La liste des antibiotiques testés**

L'appréciation de la sensibilité aux antibiotiques des différents isolats de *Salmonella* d'origine alimentaire et humaine a été réalisée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques suivant : Ampicilline (AMP), Amoxicilline/acide clavunonique (AMC), Piperacilline (PIP), Cefazoline (CZO), Cefuroxime (CXM), Cefoxitine (FOX), Cefotaxime (CTX), Cefotaxime/acide clavunonique (CTC), Ceftazidime (CAZ), Ceftazidime/acide clavunonique (CZC), Cefepime (CF), Imipenème (IPM), Ertapénème (ERT), Aztreonam (ATM), Acide nalidixique (NAL), Norfloxacine (NOF), Ofloxacine (OFX), Ciprofloxacine (CIP), Tétracycline (TCY), Tigécycline (TGY), Nitrofurantoïne (NF), Triméthoprime/sulfaméthoxazole (SXT), Chloramphénicol (CHL), Colistine (COL), Amikacine (AMK), Gentamycine (GEN), Tobramycine (TOB).

**Tableau 4.** Valeurs critiques des Concentrations minimales inhibitrices des salmonelles d'après European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2013). \*: MICs d'après (CA-SFM, 2010).

Antibiotiques	Seuils épidémiologiques (mg/L)	Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)(mg/L)	
		Sensible	Résistant >
Ampicilline	8.0	8	8
Amoxicilline/Ac clavunalique	ND	8/2	8/2
Piperacilline	ND	8	16
Cefazoline*	ND	<b>8 CA-SFM</b>	<b>32 CA-SFM</b>
Cefoxitine*	8.0	<b>8 CA-SFM</b>	<b>32 CA-SFM</b>
Cefuroxime	16	8	8
Cefotaxime	0.5	1	2
Cefotaxime/Ac clavunalique	ND	-	-
Ceftazidime	2.0	1	4
Ceftazidime/Ac clavunalique	ND	-	-
Cefepime	ND	1	4
Imipeneme	1.0	2	8
Ertapeneme	0.064	0.5	1
Aztreoname	ND	1	4
Acide nalidixique*	16	<b>8 CA-SFM</b>	<b>16 CA-SFM</b>
Norofloxacin	ND	0.5	1
Ofloxacin	0.25	0.5	1
Ciprofloxacin	0.064	0.5	1
Amikacine	ND	8	16
Tobramycine	ND	2	4
Gentamycine	2.0	2	4
Tetracycline*	8.0	<b>4 CA-SFM</b>	<b>8 CA-SFM</b>
Tigécycline	1.0	1	2
Nutrofurantoine	ND	64	64
Trimethoprim /Sulfamethoxazole	1.0	<b>2/38 CA-SFM</b>	<b>4/76CA-SFM</b>
Chloramphénicols	16	8	8
Colistine	2.0	2	2

ND : non déterminée.

#### I.2.5. Antibiogramme sur milieu solide (diffusion des disques)

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée selon la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion des disques sur milieu solide suivant les recommandations EUCAST, en utilisant le milieu Mueller Hinton (MH) (annexe2) et une gamme d'antibiotique appartenant à différentes classes sous forme de disques imbibés de chaque molécule.



- **Milieu pour antibiogramme**

Il doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm et les géloses doivent être séchées avant l'emploi. Les boîtes préparées au laboratoire sont conservées à 8-10°C. Si elles sont conservées au delà de 7 jours, les conserver à 4-8°C en sachet plastique scellé.

- **Préparation de l'inoculum**

- ✓ A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine.
- ✓ l'anse a été bien déchargée dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- ✓ la suspension bactérienne a été bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mac Farland (MF) ou à une D.O. de 0,08 à 0,13 lue à 625 nm. Ce qui correspond à un inoculum d'environ  $1 \text{ à } 2 \times 10^8$  UFC/mL ajuste par un spectrophotomètre.

- **Ensemencement**

- ✓ un écouvillon stérile trempé dans l'inoculum.
- ✓ L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de les décharger au maximum.
- ✓ l'écouvillon a été frotté sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- ✓ l'opération a été répétée 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- ✓ Dans notre cas l'ensemencé plusieurs boîtes de Pétri, il était nécessaire de recharger l'écouvillon à chaque fois.
- ✓ L'inoculum bactérien doit être employé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation

- **Application des disques d'antibiotiques**

Après ensemencement par écouvillonnage les disques d'antibiotiques ont été déposés grâce à des applicateurs appropriés. Dans un délai de 15 minutes.

- **La liste des antibiotiques testés**

**Les -lactamines :** Amoxicilline (AMX) (30µg), Amoxicilline + acide clavulanique (AMC) (30 µg), Céfuroxime (CXM) (30 µg), Céftazidime (CAZ) (30µg), Céfoxitine (FOX) (30µg), Aztreonam (ATM) (30µg), Imipinem (IPM) (10µg).

**Les quinolones et fluoroquinolones :** Acide nalidixic (NA) (30µg), Ofloxacin (OFX) (5µg), Ciproflaxacin (CIP) (5µg).

**Les aminosides :** Gentamicine (GEN) (10µg), Tobramycine (TM) (10µg), Amikacine (AN) (30µg).

**Autres antibiotiques :** Sulfaméthoxazole+Triméthoprim (SXT) (25µg), Tétracycline (TE) (30µg), Colistine (CS) (10µg), Chloramphénicol (C) (30µg), Nitrofurantoïne (NIT) (300µg).

Les dix-huit antibiotiques utilisés ont été réparties en 4 boîtes pour chaque souche de la manière suivante :

- La **1<sup>ère</sup> boîte** : AMC au centre de la boîte entouré de CAZ, ATM et CXM.
- La **2<sup>ème</sup> boîte** : contient le CIP, OFX, NA et FOX.
- La **3<sup>ème</sup> boîte** : TM, AN, GEN, AMX et CS.
- La **4<sup>ème</sup> boîte** : SXT, NIT, IMI, C et TE.

• **Incubation et lecture des résultats**

Après incubation à 35±1°C en aérobiose 16 à 20 h , la lecture des résultats a été effectuée par mesure des diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotiques à l'aide d'un pied à coulisse suivie d'une interprétation et une catégorisation des souches sensible (**S**) ou résistante (**R**) grâce à une table qui offre des valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibitions pour entérobactéries selon la recommandation 2013 de l'EUCAST( version 2013) (**Tableau5**).

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été validée par une souche témoins de référence *E. coli* ATCC 25922.

**Tableau 5.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *entérobactéries* selon la recommandation 2013 de l'EUCAST

Antibiotiques testés	Code	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)	
			S	R <
<b>-lactamines</b>				
Amoxicilline	AMX	30 µg	14	14
Amoxicilline + Ac clavulanique	AMC	30 µg	17	17
Céfuroxime	CXM	30 µg	18	18
Céfoxitine	FOX	30 µg	19	19
Ceftazidime	CAZ	30 µg	22	19
Imipénème	IPM	10 µg	22	16
Aztreonam	ATM	30 µg	24	21
<b>Quinolones</b>				
Acide Nalidixique	NA	30 µg	20*	15*
Ciprofloxacine	CIP	5 µg	22	19
Ofloxacine	OFX	5 µg	22	19
<b>Aminosides</b>				
Amikacine	AN	30 µg	16	13
Gentamicine	GEN	10 µg	17	14
Tobramycine	TM	10 µg	17	14
<b>Autres</b>				
Nitrofurantoïne	NIT	300 µg	11	11
Cotrimoxasol	SXT	25 µg	16	13
Tétracycline	TE	30 µg	19*	17*
Chloramphénicol	C	30 µg	17	17
Colistin	CS	10 µg	15*	15*

(\*) Valeurs tirés du tableau de la recommandation 2010 du CA-SFM.

### I.2.6 Caractérisation biochimique des souches

La caractérisation biochimique détaillée des souches a été effectuée grâce à des galeries biochimiques Api 20 E (Analytical Profile Index, BioMérieux) qui représentent un système d'identification miniaturisé pour les *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif. Le test comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture sous forme d'un catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (**Annexe2**).

l'ensemble des caractéristiques biochimiques recherchés sont : Beta galactosidase (**ONPG**), Arginine dihydrolase (**ADH**), Lysine décarboxylase (**LDC**), Ornithine décarboxylase (**ODC**), utilisation du citrate (**CIT**), Production d'H<sub>2</sub>S (**H<sub>2</sub>S**), Uréase (**URE**), Tryptophane

désaminase (**TDA**), Production d'indole (**IND**), Production d'acétoïne (**VP**), Gélatinase (**GEL**), Fermentation/oxydation(Glucose) (**GLU**), Mannitol(**MAN**), Inositol (**INO**), Sorbitol (**SOR**), Rhamnose (**RHA**), Saccharose (**SAC**), Melibiose (**MEL**), Amygdaline (**AMY**), Arabinose (**ARA**).

### **1.2.7. Analyse des données**

Réalisés à l'aide du logiciel d'analyse et de traitements statistiques des données, package XL-Stat version 2013 pour Windows (ADDINSOFT, 2013).

Une Classification hiérarchique ascendante CAH a été effectuée pour permettre une construction de hiérarchies indicées des souches de salmonelles. On parle de classification hiérarchique, car chaque classe d'une partition est incluse dans une classe de la partition suivante.

Chaque niveau de hiérarchie représente une classe et que des individus appartiennent à ces classes. La construction d'une hiérarchie est liée à la connaissance d'une mesure de ressemblance entre groupes. Les indices utilisés sont principalement l'indice d'agrégation du lien minimum (cas euclidien), l'indice de l'augmentation d'inertie (legendre & legendre, 1998).

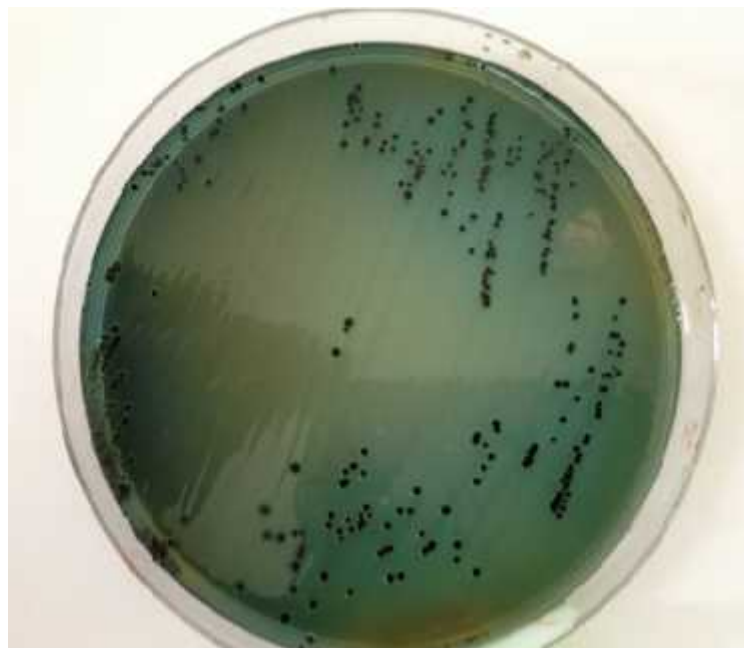
### **1.3. RÉSULTAS**

#### **1.3.1. Isolement et identification préliminaire des isolats**

##### **1.3.1.1. Origine alimentaire**

##### **a. Examen macroscopique des colonies après isolement sur Hektoen (HK).**

Un total de 37 souches ont été isolées et purifiées sur milieu Hektoen (HK). Les colonies sont apparues rondes, lisses (Smooth : S) à bords réguliers et un diamètre de 2 à 3 mm, vertes à nuances bleuâtres et à centres noirs, à l'exception de cinq isolats avec les quelles on n'a pas observé le centre noir suite à l'absence d'une production d'H<sub>2</sub>S, l'ensemble de nos isolats n'ont pas dégradés le lactose sur ce milieu sélectif (**Figure3**).



**Figure 3.** Aspect des colonies d'un isolat sur milieu Hektoen  
(Origine alimentaire)

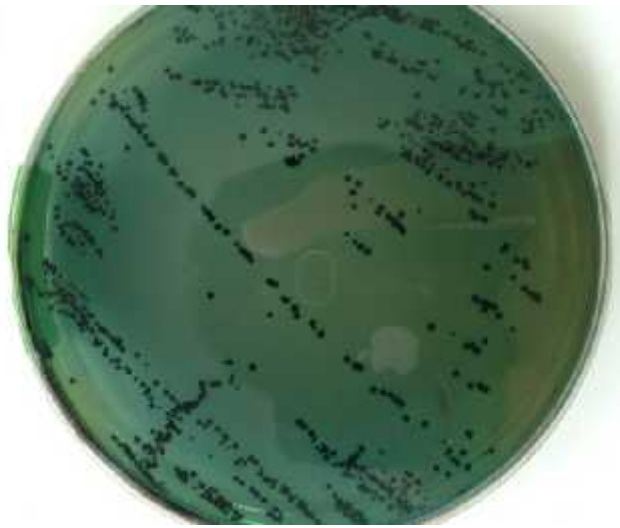
##### **b. Tests biochimiques préliminaires (tests clés) et miniaturisé (API20E)**

L'analyse de ces résultats a montré que les 37 isolats sont avérés oxydase négative, urease négative, ONPG négative, INDOL négative, TDA négative, (TSI) aspect évocateur (production du gaz, lactose négative, saccharose négative, glucose positive, H<sub>2</sub>S positive), à l'exception de cinq isolats qui n'ont pas développés une réaction H<sub>2</sub>S positive.

### **1.3.1.2. Origine humaine**

#### **a. Examen macroscopique des colonies après isolement sur Hektoen (HK).**

Un total de 39 souches a été collecté. Toute fois on a purifié ces isolats conservés en milieu (gélose nutritive profonde) sur milieu Hektoen (HK). Les colonies sont apparus rondes, lisses (Smooth : S) à bords réguliers et un diamètre de 2 à 3 mm, vertes à nuances bleuâtres et à centres noirs, l'ensemble de nos isolats n'ont pas dégradé le lactose sur ce milieu sélectif (**Figure4**).



**Figure4.** Aspects des colonies d'un isolat sur milieu Hecktoen  
(Origine humaine)

#### **b. Tests biochimiques préliminaires (tests clés)**

L'analyse de ces résultats a montré que tous les isolats sont avérés oxydase négative, urease négative, ONPG négative, INDOL négative, TDA négative, (TSI) aspect évocateur (production du gaz, lactose négative, glucose positive, H<sub>2</sub>S positive. à l'exception d'une seule souche qui apparait saccharose positive.

### **1.3.2. Diversité sérotypiques et sensibilité aux antibiotiques (CMI)**

#### **1.3.2.1. Sérotypage des salmonelles**

##### **2.3.3.2.1. Origine alimentaire**

Les différentes souches ont développés une agglutination avec le sérum polyvalent et monovalent correspondant, la formule antigénique a été éclaircie et les sérotypes ont été déduits (**Tableau6**).

**Tableau6.** Caractéristiques antigéniques (formule antigénique) des 37 souches de *Salmonella* d'origine alimentaire.

Serotype	Formule antigénique				Nombre d'isolats	Fréquence
	Ag O	Ag H1	AgH2	Autres		
S. Enteritidis	<u>1</u> ,9, 12	g,m	-		23	62.16%
S. Gallinarum	<u>1</u> ,9, 12	-	-		05	13.51%
S. Agona	<u>1</u> ,4,[5],12	f,g,s	[1,2]	[z27], [z45]	01	2.7%
S. Heidelberg	<u>1</u> ,4,[5],12	<sub>1</sub> r	1,2		03	8.10%
S. New Port	6,8, <u>20</u>	e,h	1,2	[z67], [z78]	01	2.7%
S. Infantis	6,7, <u>14</u>	r	1,5		01	2.7%
S. Virckow	6,7, <u>14</u>	r	1,2		01	2.7%
<i>Salmonella</i> Hadar	6,8	z10	e,n,x		01	2.7%

**Ag O** : antigène o somatique

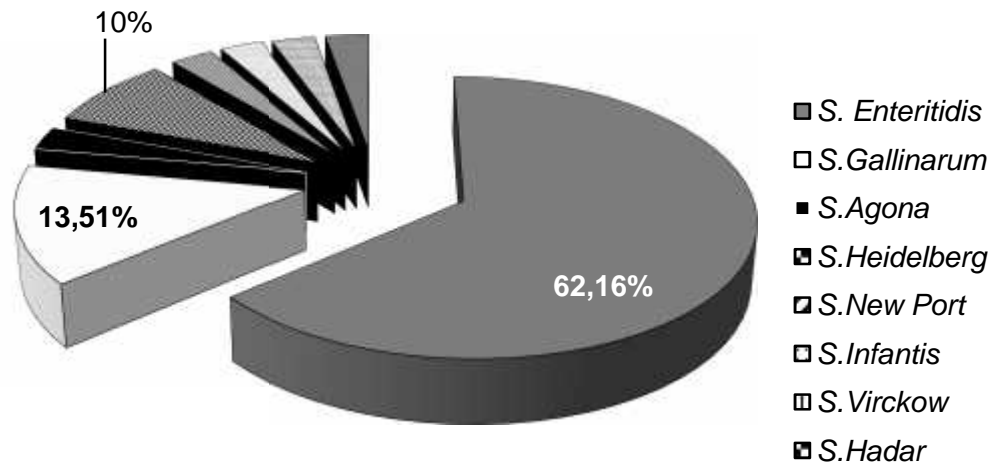
**Ag H1** : antigène flagellaire phase 1

**AgH2** : antigène flagellaire phase 2

- : Facteurs O (souligné) dont la présence est liée à la conversion bactériophagique

[ ] : Facteur O (non souligné) ou H qui peut être absent et dont la présence n'est pas liée à la conversion bactériophagique.

Parmi les 37 souches isolées, le sérotypage a permis de caractériser huit sérotypes, avec une prédominance de sérotype *Salmonella* Enteritidis 62.16% (23/37) a été notée. Le sérovar *Salmonella* Gallinarum a occupé le deuxième rang avec une fréquence de 13.51%, tandis que 21.61% (8/37) sont représentés par une variété de sérovar: *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* New Port, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Virckow, *Salmonella* Livingstone et *Salmonella* Hadar (**Figure5**).



**Figure 5.** Pourcentage de différents sérotypes de *Salmonella* (Origine alimentaire)

✓ **Fréquence d'isolement de différents sérotypes en fonction de type d'échantillon**

Le sérotype *Salmonella* Enteritidis a été isolé de différents types d'échantillons : carcasse, viande, plat cuisiné, coquille de l'œuf, avec ce dernier *S. Enteritidis* a été le seul sérotype isolé. Les sérotypes *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Gallinarum ont montré une prédominance nette d'isolement sur la carcasse de poulet de chair, accompagné d'un isolement en une seule fois de *Salmonella* Gallinarum et *Salmonella* Heidelberg dans la viande de poulet de chair. Les deux sérotypes *Salmonella* Agona et *Salmonella* New port ont été isolés à partir de la viande de poulet de chair (**Tableau7**).

**2.3.3.2.2. Origine humaine**

Les différentes souches ont développés une agglutination avec le sérum polyvalent et monovalent correspondants, la formule antigénique a été établie et les sérotypes sont identifiés à l'exception de cinq isolats qui n'ont pas agglutiné avec les sérums polyvalents (OMA) et (OMB) (**Tableau7**).



**Tableau 7.** Caractéristiques antigéniques (formule antigénique) des 39 souches de *Salmonella* d'origine humaine.

Sérotype	Formule antigénique			Nombre d'isolats	Fréquence
	Ag O	Ag H <sub>1</sub>	Ag H <sub>2</sub>		
<i>Salmonella</i> Enteritidis	<u>1</u> , 9, 12	g, m	-	21	<b>53.84%</b>
<i>Salmonella</i> Hadar	6,8	z10	e, n, x	02	<b>5.12%</b>
<i>Salmonella</i> Heidelberg	<u>1</u> ,4, [5], 12	r	1,2	04	<b>10.25%</b>
<i>Salmonella</i> Typhimerium	<u>1</u> , 4, [5], 12	I	1,2	06	<b>15.38%</b>
<i>Salmonella</i> Morbificans	6,8, <u>20</u>	r, [i]	1,5	01	<b>2.56%</b>
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	-	05	<b>12.82%</b>

**Ag O** : antigène o somatique

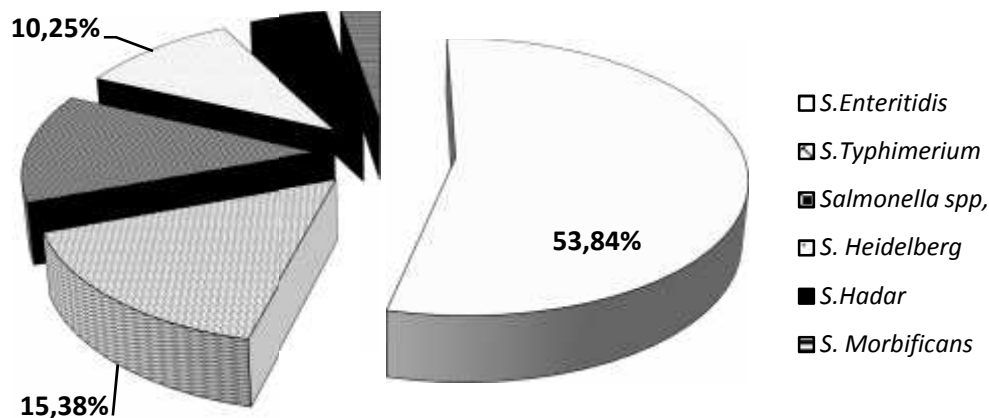
**Ag H1** : antigène flagellaire phase 1

**AgH2** : antigène flagellaire phase 2

- : Facteurs O (souligné) dont la présence est liée à la conversion bactériophagique

[ ] : Facteur O (non souligné) ou H qui peut être absent et dont la présence n'est pas liée à la conversion bactériophagique.

Le sérotypage des différents isolats collectés avec un total de 39 souches a permis d'individualiser plusieurs sérotypes, dont 53,84% (21/39) sont représentées par *Salmonella* Enteritidis, 12,82% (5/39) par *Salmonella* spp. 15,38% (6/39) représentées par *Salmonella* Typhimerium, 10,25% (4/39) *Salmonella* Heidelberg et 5,13% (3/39) a été partagé par d'autres sérovars *Salmonella* Morbificans, *Salmonella* Hadar (**Figure 6**).



**Figure 6.** Pourcentage de différents sérotypes de *Salmonella* (Origine humaine).

### **2.3.3.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Les salmonelles sont naturellement sensibles aux antibiotiques testés sur les entérobactéries, la répartition des souches d'origine alimentaires et d'origine humaine suivant les CMI enregistrées avec la gamme d'antibiotiques choisie sont présentées selon le contexte de prélèvement (**Tableau8, 10**).

#### **2.3.3.3.1. Origine alimentaire**

L'ensemble de sérovars de salmonelles non typhique 37/37 (100%) a montré une sensibilité entière à toute les B-lactamines, aux aminosides, trimethoprime/sulfamethoxazole (CMI<2mg/L), tétracycline (CMI<4mg/L), chloramphénicol (CMI<4mg/L). Toutefois 37/37 (100%) des souches ont présentés un phénotype non sauvage vis-à-vis l'imipénème, ertapenem, ofloxacine, ciprofloxacine, trimithoprime /sulfamithoxazole et des CMI limitées avec la colistine selon les valeurs seuils épidémiologiques définis par (EUCAST, 2013). D'un autre côté 17/37 (45.94%) des souches de différent sérotypes ont montré une résistance à haut niveau face à l'acide nalidixique (CMI>16mg/l), et l'ofloxacine CMI 4mg 32,43 % (12/37). Toutefois, l'ensemble des souches ont montré une sensibilité à la ciprofloxacine (CMI 0,5) (**Tableau 8**).

**Tableau 8.** Répartition des différents sérovars d'origine alimentaire (N= 37) en fonction de leur concentration minimales inhibitrice (CMI).

Antibiotiques	% des souches non sauvages	% des souches résistantes	CMI (mg/L)					
			0.500	1	2	4	8	16
Ampicilline	00	00	-	-	-	37	-	-
Amoxicilline/Ac clavunalique	-	-	-	-	-	37	-	-
Piperacilline	-	-	-	-	-	-	37	-
Cefazoline	-	-	-	-	-	-	-	37
Cefoxitine	00	00	-	-	-	-	37	-
Cefuroxime	00	00	-	-	-	-	37	-
Cefotaxime	00	00	-	37	-	-	-	-
Cefotaxime/Ac clavunalique	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceftazidime	00	00	-	37	-	-	-	-
Ceftazidime/Ac clavunalique	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefepime	-	-	-	-	-	37	-	-
Imipiném	100	00	-	-	-	37	-	-
Ertapéném	100	00	-	-	37	-	-	-
Aztreonam	-	-	-	-	-	37	-	-
Ac nalidixique	45,94	45,94	-	-	-	20	-	17
Norofloxacine	-	-	-	-	-	-	-	-
Ofloxacine	100	32,43	18	07	-	12	-	-
Ciprofloxacine	100	00	37	-	-	-	-	-
Amikacine	-	-	-	-	-	37	-	-
Gentamicine	00	00	-	-	37	-	-	-
Tobramycine	-	-	-	-	37	-	-	-
Tétracycline	00	00	-	-	-	37	-	-
Tigécycline	-	-	-	-	-	-	-	-
Nutrofurantoin	-	-	-	-	-	-	-	-
Triméthoprime/Sulfaméthoxazole	100	00	-	-	37	-	-	-
Chloramphénicol	00	00	-	-	-	-	37	-
Colistine	00	00	-	-	37	-	-	-

- : Résistance de l'ensemble des souches à la concentration correspondante

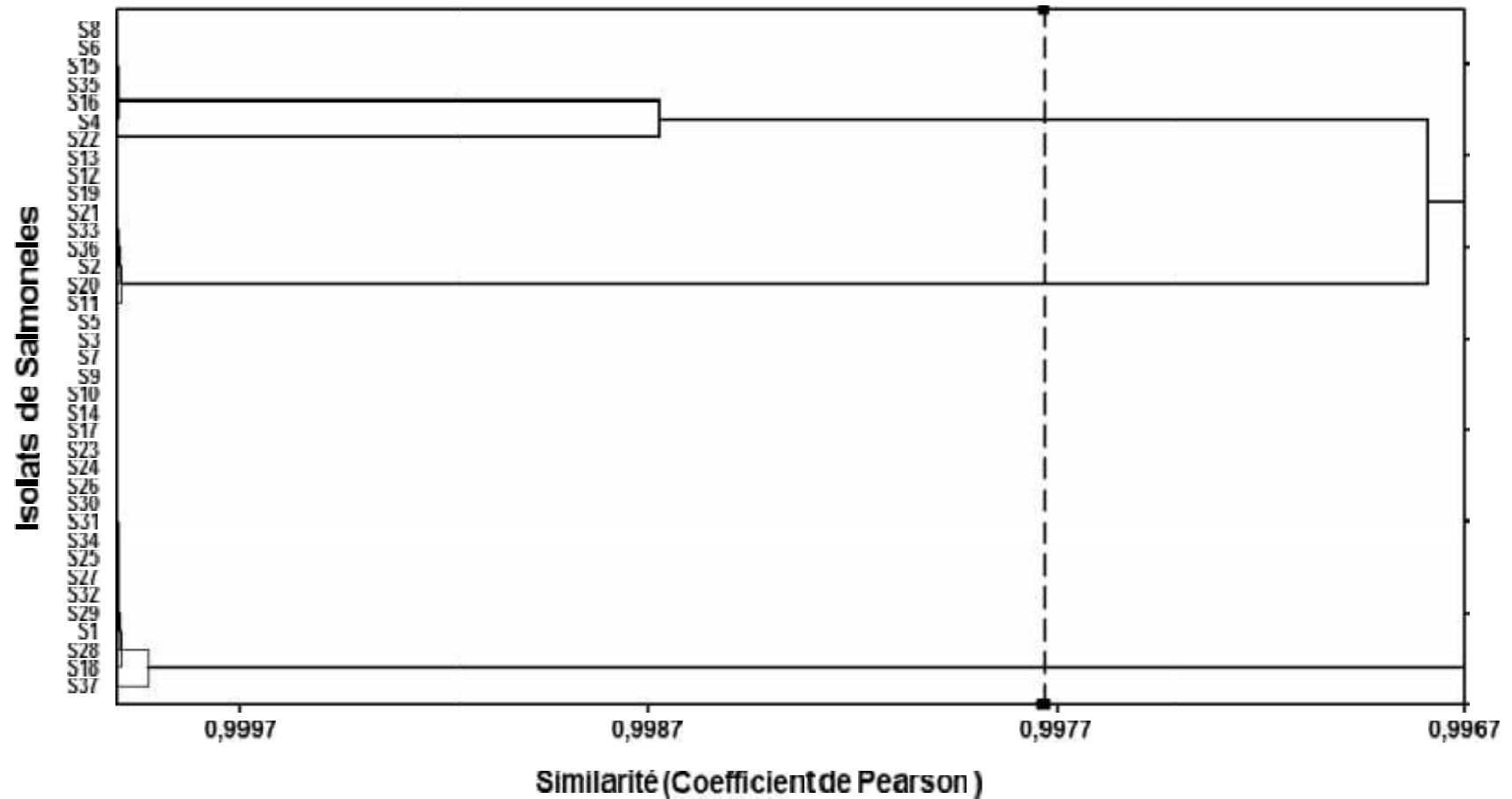
■ : Nombre de souches inhibées par la concentration correspondante

### A. Étude de la similarité des différents isolats

En recherchant les similarités entre les souches de salmonelles sélectionnées suivant les différents CMI obtenues, l'application d'une classification ascendante hiérarchique (CAH) tenant compte des distances euclidiennes et regroupant les relevés en fonction d'indice de similarité de Pearson ; a permis de tracer le dendrogramme de la CAH (**Figure 7**).

L'analyse des résultats obtenus a permis d'individualiser trois groupes distincts de sérovars de salmonelles différenciées entre elles par l'ampleur et le nombre d'antibiotiques touchées par cette élévation des CMI (profil CMI). **Classe 1** (souche1, souche3, souche5, souche7, souche9, souche10, souche14, souche17, souche18, souche23, souche24, souche25, souche26,

souche27, souche28, souche29, souche30, souche 31, souche32, souche34, souche37). **Classe 2** (souche2, souche11, souche12, souche13, souche19, souche20, souche21, souche33, souche36). **Classe 3** (souche4, souche6, souche8, souche15, souche16, souche22, souche35) **(Figure 7)**.



**Figure7.** Dendrogramme représentatif de la similarité de profil des CMI des souches de *salmonella* (origine alimentaire).

**C1** : souche1, souche3, souche5, souche7, souche9, souche10, souche14, souche17, souche18, souche23, souche24, souche25, souche26, souche27, souche28, souche29, souche30, souche 31, souche32, souche34, souche37. **C2** : souche2, souche11, souche12, souche13, souche19, souche20, souche21, souche33, souche36. **C3** : souche4, souche6, souche8, souche15, souche16, souche22, souche3.

## B. Profils de sensibilité aux antibiotiques

L'interprétation des résultats de la détermination de la (CMI) obtenus avec les différentes souches bactériennes de *salmonella* isolées à partir des aliments suivant la table fournit par (EUCAST) (**Tableau4**), a conduit à une détermination de plusieurs profils de sensibilité aux antibiotiques testés selon le sérotype (**Tableau 9**).

***Salmonella* Enteritidis** : Caractérisée par trois profils de sensibilité :

Profil 1 : sensible (S)

Profil 2 : résistance à l'acide nalidixique (NAL<sup>®</sup>)

Profil 3 : résistance à l'acide nalidixique et ofloxacine (NAL<sup>®</sup>, OFX<sup>®</sup>)

***Salmonella* Gallinarum** : Caractérisée par deux profils de sensibilité :

Profil 1 : résistance à l'acide nalidixique (NAL<sup>®</sup>)

Profil 2 : résistance à l'acide nalidixique et ofloxacine (NAL<sup>®</sup>, OFX<sup>®</sup>)

***Salmonella* Heidelberg** : caractérisée par deux profils de sensibilité

Profil 1 : sensible (S),

Profil 2 : résistance à l'acide nalidixique (NAL<sup>®</sup>)

***Salmonella* Infantis, *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* New port, *Salmonella* Virckow**

***Salmonella* Agona** : caractérisées par un seul profil 1 : sensible à tous les antibiotiques(S)

**Tableau 9.** Origine et profils de résistance des salmonelles d'origine alimentaire.  
OFX : ofloxacine, NAL : acide nalidixique (**Valeurs de CMI**).

Sérotype	Date de prélèvement	Nature	Profil de résistance
<b>S1</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	Carcasse	Sensible
<b>S3</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	Carcasse	Sensible
<b>S2</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	Viande	OFX ; NAL
<b>S4</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	Carcasse	OFX ; NAL
<b>S5</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2008	Œuf (coquille)	Sensible
<b>S7</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2008	Viande	Sensible
<b>S9</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2008	Carcasse	Sensible
<b>S10</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2008	Carcasse	Sensible
<b>S14</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2008	Carcasse	Sensible
<b>S8</b> <i>Salmonella</i> Gallinarum	2008	Carcasse	OFX ; NAL
<b>S30</b> <i>Salmonella</i> Agona	2009	Viande	Sensible
<b>S17</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	Œuf (coquille)	Sensible
<b>S16</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	Carcasse	OFX ; NAL
<b>S21</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	Viande	OFX ; NAL
<b>S23</b> <i>Salmonella</i> Heidelberg	2009	Carcasse	Sensible
<b>S13</b> <i>Salmonella</i> Gallinarum	2009	Carcasse	OFX ; NAL
<b>S29</b> <i>Salmonella</i> Livingstone	2009	Carcasse	Sensible
<b>S25</b> <i>Salmonella</i> New port	2009	Viande	Sensible
<b>S24</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2010	Viande	Sensible
<b>S32</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2010	Viande hachée	Sensible
<b>S28</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2010	Viande	Sensible
<b>S15</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2010	Œuf (coquille)	OFX ; NAL
<b>S33</b> <i>Salmonella</i> Gallinarum	2010	Carcasse	NAL
<b>S26</b> <i>Salmonella</i> Infantis	2010	Carcasse	Sensible
<b>S31</b> <i>Salmonella</i> Virckow	2010	Carcasse	Sensible
<b>S18</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Œuf(coquille)	Sensible
<b>S36</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Viande	NAL
<b>S6</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Carcasse	OFX ; NAL
<b>S11</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Viande	OFX ; NAL
<b>S20</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Œuf	OFX ; NAL
<b>S22</b> <i>Salmonella</i> Gallinarum	2011	Carcasse	NAL
<b>S34</b> <i>Salmonella</i> Gallinarum	2011	Viande	NAL
<b>S27</b> <i>Salmonella</i> Hadar	2011	Carcasse	Sensible
<b>S35</b> <i>Salmonella</i> Heidelberg	2011	Viande	NAL
<b>S37</b> <i>Salmonella</i> Heidelberg	2011	Carcasse	Sensible
<b>S12</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2012	Carcasse	OFX ; NAL
<b>S19</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis	2012	Carcasse	OFX ; NAL

#### 2.3.3.3.2. Origine humaine

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) a montré que, uniquement 10/39 souches (25,64%) présentent une sensibilité vis-à-vis de toutes les classes d'antibiotiques testés. D'un autre côté, 29 /39 (74,36%) des souches ont montré une résistance

au moins à un antibiotique et 28/39 (71,79%) des salmonelles isolés sont avérées multi résistantes. 10/39 (25,64%) ont montré une résistance isolée aux quinolones et fluoroquinolones testés avec différents niveaux de résistances vis-à-vis (acide nalidixique) >16mg/L, norofloxacin >4mg/L. Un phénotype non sauvage a été noté avec l'ofloxacin (CMI 0,5mg /L et 1mg/ml et) et la ciprofloxacine (CMI 0, 5mg/l) observé avec 39/39 (100%) des souches (**Tableau10**).

Tandis que 16 souches (41,02%) ont montré une résistance aux betalactamines avec différents mécanismes de résistance (aminopinicilline, cephalosporinase) (**AMP**) (**AMP; AMC**), (**AMP; CZO**), (**AMP; AMC; CZO**), (**AMP; AMC; CZO; PIP**). 03 souches ont montrées une betalactamase à spectre élargi (BLSE) responsable d'une résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) confirmée par une image de synergie entre les disques d'antibiotiques : AMC et CTX /CAZ, (**AMP; CZO; CTX; CAZ; CXM; CPM; ATM**), (**AMP; AMC; CZO; CPM; CT X; CAZ; CXM; ATM**) (**Tableau11**). Un phénotype non sauvage observé avec toutes les souches face à l'ertapénème (CMI 1mg/ml) et de cefotaxime (CMI 1mg/ml, 32mg /L) et des CMI limités face à la colistine (CMI 2mg/ml). Cette résistance aux betalactamines est croisée avec au moins un antibiotique des autres classes : tétracycline 10 /39 (25,64%) (CMI>8mg/L), triméthoprime /sulfaméthoxazole 6/38 (15,38%) (CMI>4/76mg/L), gentamycine 3/39 (7,69%) (CMI>8mg/L), nitrofurantoin 4 /39 (10,25%) (CMI>64mg/L), tobramycine 8/39 (20,51%) (CMI>8mg/L), chloramphénicol 6/39 (15,38%) (CMI>8mg/L) (**Tableau 10**).



**Tableau 10.** Répartition des différents serovars d'origine humaine en fonction de leur concentration minimales inhibitrice (CMI).

Antibiotiques	% des souches non sauvages	%des souches résistantes	Résistance >CMI (mg/L)							
			0.500	1	2	4	8	16	32	64
Ampicilline	38,46	38,46	-	-	-	-	24	15	-	-
Amoxicilline/Ac clavunaliq	-	20,51	-	-	-	-	31	8	-	-
Piperacilline	-	2,56	-	-	-	-	38	-	-	1
Cefazoline	-	00	-	-	-	-	33	6	-	-
Cefoxitine	00,0	00	-	-	-	-	39	-	-	-
Cefuroxime	7,69	7,69	-	-	-	30	6	3	-	-
Cefotaxime	100	7,69	-	36	-	-	-	-	3	-
Cefotaxime/Ac clavunaliq	-	-	39	-	-	-	-	-	-	-
Ceftazidime	7,69	7,69	-	36	-	-	1	2	-	-
Ceftazidime/Ac clavunaliq	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefepime	-	7,69	-	36	-	-	-	3	-	-
Imipinem	00	00	-	39	-	-	-	-	-	-
Ertapenem	100	00	27	12	-	-	-	-	-	-
Aztreonam	-	12,82	-	34	-	-	1	4	-	-
Ac nalidixique	46,15	46,15	-	-	-	-	-	21	-	-
Norofloxacine	-	46,15	21	8	-	10	-	-	-	-
Ofloxacine	100	46,15	21	18	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacine	100	00	39	-	-	-	-	-	-	-
Amikacine	-	00	-	-	-	-	39	-	-	-
Gentamicine	7,69	7,69	-	-	36	-	3	-	-	-
Tobramycine	-	20,51	-	-	31	-	8	-	-	-
Tetracycline	25,64	25,64	-	-	-	29	10	-	-	-
Tigecycline	2,56	2,56	-	38	1	-	-	-	-	-
Nutrofurantoin	-	10,25	-	-	-	-	-	-	35	4
Trimethprime/Sulfamethoxazole	10,25	10,25	-	-	33	6	-	-	-	-
Chloramphénicol	00	20,51	-	-	33	-	6	-	-	-
Colistine	00	00	-	-	39	-	-	-	-	-

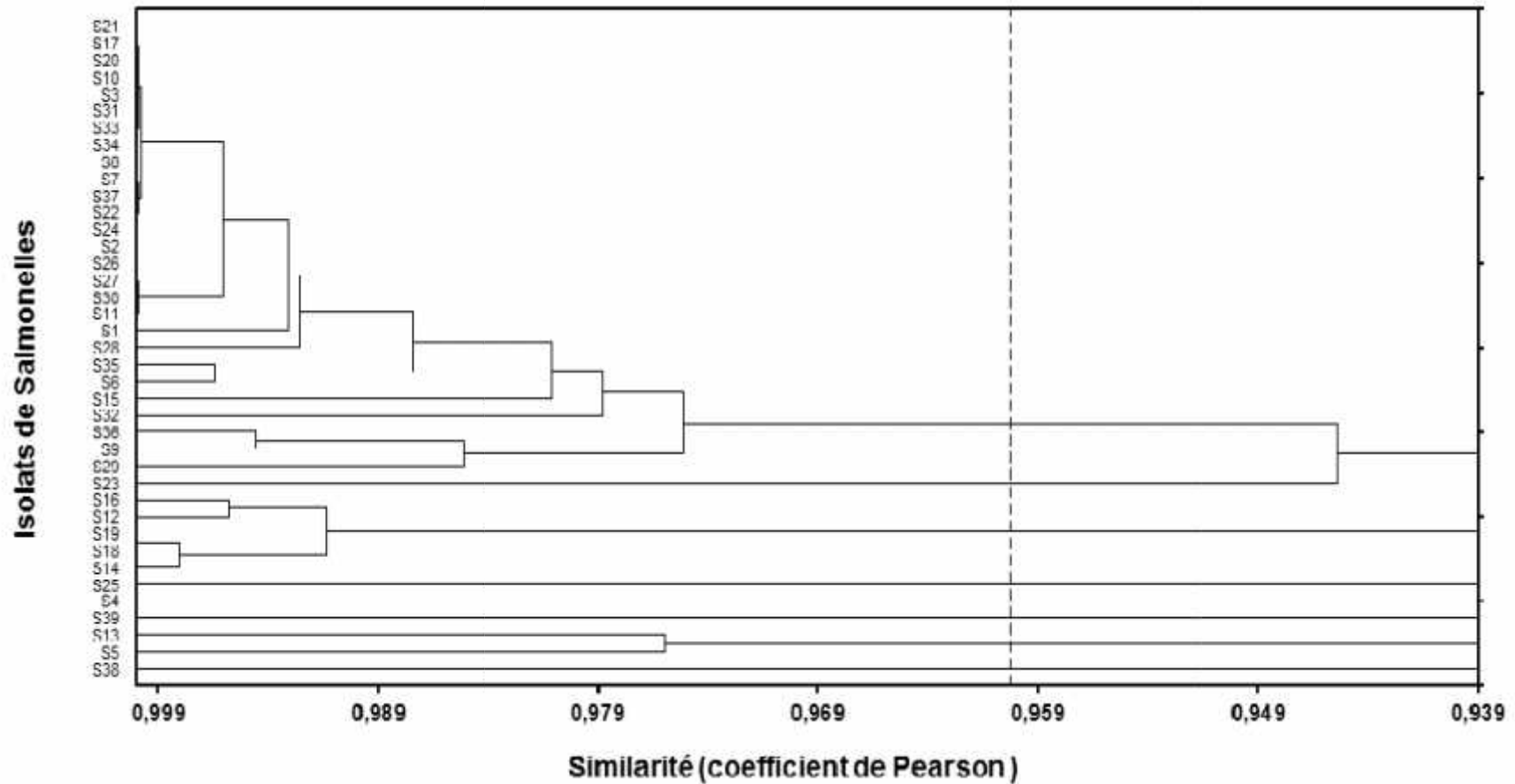
- : Résistance de l'ensemble des souches à la concentration correspondante

■ : Nombre de souches inhibées par la concentration correspondante

### A. Étude de la similarité des différents isolats

Cette diversité d'expression de la sensibilité envers les différentes classes d'antibiotiques a été éclaircie par l'analyse de la similarité (coefficient de Pearson) (CAH) qui a permis de répartir l'ensemble des souches isolées en (09) classes distinguées l'une de l'autre par l'ampleur et le nombre d'antibiotiques touchés par une élévation de la CMI appartenant à une classe données ou à un ensemble de classes d'antibiotiques à la fois. **Classe 1** (souche1, souche2, souche6, souche7, souche12, souche15, souche18, souche19, souche22, souche23, souche25, souche27, souche28, souche29, souche31, souche32, souche34, souche35,

souche36, souche38). **Classe 2** (souche3, souche8, souche9, souche10, souche13, souche17, souche30, souche37). **Classe 3** (souche4). **Classe 4** (souche5, souche39). **Classe 5** (souche14). **Classe 6** (souche16, souche20, souche21). **Classe 7** (souche24, souche40). **Classe 8** (souche26). **Classe 9** (souche33) (**Figure 8**).



**Figure 8.** Dendrogramme représentatif de la similarité de profil des CMI des souches de *Salmonella* (origine humaine)  
**C1 :** souche1, souche2, souche6, souche7, souche12, souche15, souche18, souche19, souche22, souche23, souche25, souche27, souche28, souche29, souche31, souche32, souche34, souche35, souche36, souche38. **C2 :** souche3, souche8, souche9, souche10, souche13, souche17, souche30, souche37. **C3 :** souche4. **C4 :** souche5, souche39. **C5 :** souche14. **C6 :** souche16, souche20, souche21. **C7 :** souche24, souche40. **C8 :** souche26. **C9 :** souche33.

## B. Profils de sensibilité aux antibiotiques

L'interprétation des résultats de la détermination de la (CMI) obtenus avec les différentes souches bactériennes de *Salmonella* d'origine humaine suivant la table fournit par (EUCAST) (**Tableau4**), a conduit à une détermination de plusieurs profils de sensibilité aux antibiotiques testés selon le serotype (**Tableau 11**).

***Salmonella Enteritidis***, caractérise par les profils suivants :

Profil 1: sensible (S)

Profil 2: NAL®, NOF®

Profil 3: NAL®, NOF®, TCY®

Profil 4: NA®L, NOF®, AMP®®

Profil 5: AMP®, AMC®, CHL®

Profil 6: NAL®, NO®F, AMP®, CHL®

Profil 7 : NAL®, NOF®, AMP®, CZO®, AMC®

***Salmonella Typhimerium***, caractérise par les profils suivants :

Profil 1: AMP®, AMC®, CHL®

Profil 2: AMP, ® CZO®, CTX®, CAZ, ® CXM®, CPM®, ATM®, GEN®, TOB®, SXT®

Profil 3 : AMP®, SXT®

***Salmonella Heidelberg***, caractérise par les profils suivants

Profil 1 : NAL®, NOF®

Profil 2 : AMP®, NAL®, NOF ®

***Salmonella Hadar*** caractérise par les profils suivants

Profil 1: AMP, ® CZO®, TCY®, NAL®, NOF ®

Profil 2: TCY®

***Salmonella spp.*** Caractérise par les profils suivants :

Profil 1: NAL®, NOF®, AMP, ® CZO®, AMC®, PIP®, OFX®, TCY®

Profil 2: AMP, ® AMC®, CHL®

Profil 3: AMP®, CZO®, ATM®, CAZ®, CXM®, CPE®, CTX®, GEN®, TOB®, TCY®

Profil 4: NAL®, NOF®, SXT®, TCY®

***Salmonella Morbificans***

Profil 1: sensible(S)

**Tableau 11.** Origine et profils de résistance des salmonelles d'origine humaine (AMP: Ampicilline, ATM: Aztreonam, CHL: Chloramphénicol, CPM: Cefepime, CTX: Cefotaxime, CXM: Cefuroxime, CZO: Cefazoline, GEN: Gentamicine, NAL: acide Nalidixique, NOF: Norfloxacine, OFX: Ofloxacine, PIP: piperacilline, SXT: Sulfamethoxazole/Trimethoprim, TCY: Tétracycline, TOB: Tobramycine)

Sérotype	Date de prélèvement	Nature	Profil de résistance
H19 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	Coproculture	Sensible
H20 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	/	Sensible
<i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	/	Sensible
H27 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	/	NAL, NOF
H29 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	/	NAL, NOF, AMP, CHL
H39 <i>Salmonella</i> Hadar	2007	/	AMP, CZO, TCY, NAL, NOF
H28 <i>Salmonella</i> Hadar	2007	/	TCY
H7 <i>Salmonella</i> Heidelberg	2007	/	NAL, NOF
H22 <i>Salmonella</i> Heidelberg	2007	/	NAL, NOF
H16 <i>Salmonella</i> Typhimurium	2007	/	AMP, AMC, CHL
H5 <i>Salmonella</i> Typhimurium	2007	/	AMP, CZO, CTX, CAZ, CXM, CPM, ATM, GEN, TOB, SXT
H30 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2008	Coproculture	NAL, NOF
H23 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2008	/	NAL, NOF, AMP, CZO, AMC
H2 <i>Salmonella</i> Heidelberg	2008	/	NAL, NOF,
H4 <i>Salmonella</i> spp.	2008	/	NAL, NOF, AMP, CZO, AMC, PIP, OFX, TCY
H14 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	Coproculture	Sensible
H1 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	/	Sensible
H18 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	/	NAL, NOF
H26 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	/	NAL, NOF
H25 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	/	NAL, NOF
H11 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	/	NAL, NOF
H6 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	/	NAL, NOF, TCY
H24 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	/	NAL, NOF, AMP
H15 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	/	AMP, AMC, CHL
H8 <i>Salmonella</i> Heidelberg	2009	/	AMP, NAL, NOF
H17 <i>Salmonella</i> Morbificans	2009	/	Sensible
H9 <i>Salmonella</i> spp.	2009	/	AMP, AMC, CHL
H13 <i>Salmonella</i> spp.	2009	/	AMP, AMC, CZO, CPM, CT X, CAZ, CXM, ATM, SXT, GEN
H10 <i>Salmonella</i> Typhimurium	2009	/	AMP, SXT
H3 <i>Salmonella</i> Typhimurium	2009	/	AMP, SXT
H12 <i>Salmonella</i> Typhimurium	2009	/	AMP, AMC, CHL
H32 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Coproculture	Sensible
H33 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	/	Sensible
H34 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	/	Sensible
H31 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	/	Sensible
H37 <i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	/	NAL, NOF
H35 <i>Salmonella</i> spp.	2011	/	NAL, NOF, SXT, TCY
H38 <i>Salmonella</i> spp.	2011	/	AMP, CZO, ATM, CAZ, CXM, CPE, CTX, GEN, TOB, TCY
H36 <i>Salmonella</i> Typhimurium	2011	/	AMP, AMC, CHL

### 1.3.3. Diversité biochimique et sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)

#### 1.3.3.1. Étude biochimiques détaillée (galerie API20E)

##### 1.3.3.1.1. Origine alimentaire

Caractérisation réalisée sur 32 isolats parmi un total de 37 isolats. La détermination des caractères biochimiques préconisés des différentes souches bactériennes isolées et sélectionnées a permis de déterminer l'appartenance de nos isolats au genre *Salmonella* spp, et l'appartenance de cinq souches de ce genre au sérotype *S.Gallinarum* avec ces caractéristiques biochimiques particulières (annexe2).

##### Étude de la similarité des isolats

Une fois la lecture des tests biochimiques effectuée, les souches sont identifiées et comparées entre eux par une étude statistique CAH (Classification Ascendante Hiérarchique) Des tableaux binaires ont été réalisés sur la base de positivité ou de la négativité des tests biochimiques chez les différents souches pour la détermination de la similarité entre eux suivant l'indice de jaccard et un dendrogramme qui illustre cette relation a été élaborée (**Figure12**).

Les 32 isolats d'origine alimentaire sont notés en ordonnée et regroupés en fonction de leur similitude, en abscisse les distances taxonomiques qui représentent la similarité entre les souches (**Figure12**).

Trois groupes d'isolats homogènes ont été individualisés : C<sub>A1</sub>, C<sub>A2</sub> et C<sub>A3</sub>.

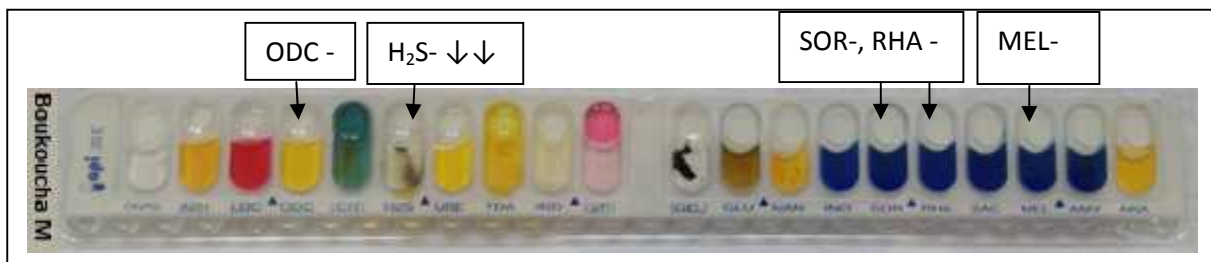
**Remarque** : la désignation des souches de *Salmonella* par la lettre (**S**) et l'ordre numérique de (**1 à 32**) sont indépendants de ceux attribués aux différents isolats dans l'étude de la **CMI**.

- **Le groupe C<sub>A1</sub>** est composé de 26 souches (S1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32). Ce groupe est assez homogène et toutes les souches ont donnés le même code de lecture pour la détermination du genre, **6704552** ce qui correspond à une excellente identification biochimique (*Salmonella* spp), ce groupe est caractérisé par la présence de l'enzyme Ornithine décarboxylase (ODC) et la fermentation des sucres : sorbitol (SOR), Rhamnose (RHA) et Melibiose (MEL) par rapport aux souches du groupe C<sub>A2</sub>, la fermentation du Melibiose seulement différencié les souches du groupe C<sub>A1</sub> des souches du groupe C<sub>A3</sub> (**Figure 9**).



**Figure 9.** Galerie d'identification biochimique d'une souche appartenant au groupe CA1 (origine alimentaire).

**Le groupe CA2** renferme 5 souches (S5, 6, 7, 8,17), ce groupe est homogène et toutes les souches ont fourni un code d'identification 6604102 qui correspond à *Salmonella* Gallinarum. Les souches de ce groupe sont caractérisées par l'absence de l'enzyme Ornithine décarboxylase (ODC) et l'incapacité de dégrader les sucres suivants : Sorbitol (SOR), Rhamnose (RHA) et Melibiose (MEL), avec absence de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) (**Figure 10**).

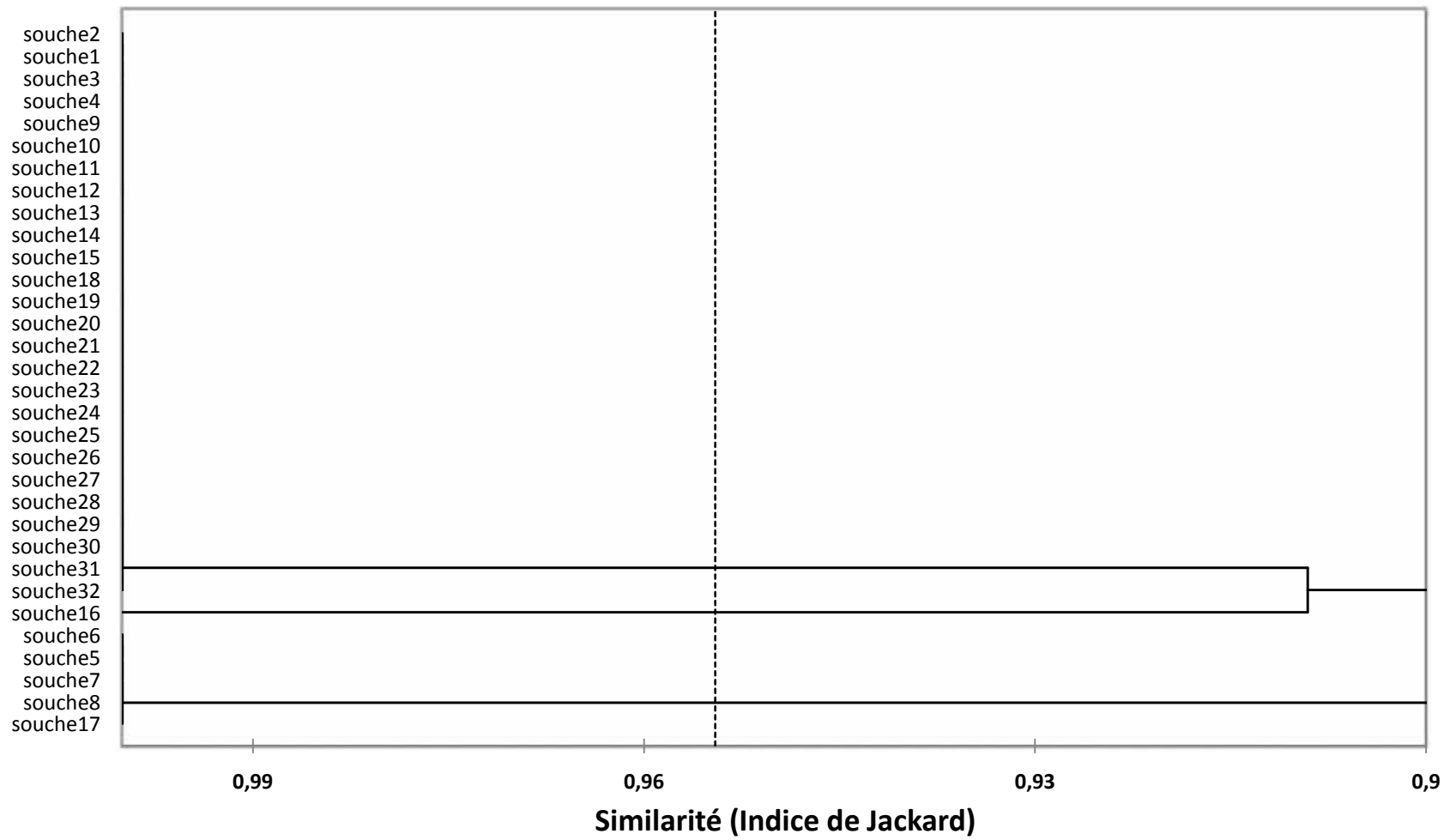


**Figure 10.** Galerie d'identification biochimique d'une souche appartenant au groupe CA2 (origine alimentaire).

- **Le groupe CA3** est composé d'une seule souche (S16), le code d'identification obtenue avec cette souche est 6704512 qui correspond à *Salmonella* spp. dont le caractère différentiel est l'incapacité de fermenter le Melibiose (MEL) à l'inverse des souches du groupe CA1, elle a une Ornithine décarboxylase (ODC) et elle dégrade le Sorbitol (SOR) et le Rhamnose (RHA) par rapport aux souches du groupe CA2 qui sont dépourvues de ces caractères (**Figure11**).



**Figure11.** Galerie d'identification biochimique d'une souche appartenant au groupe CA3 (origine alimentaire)



**Figure12.** Dendrogramme représentatif de la similarité des caractéristiques biochimiques des isolats d'origine alimentaire (CA1, CA2 et CA3).



### 1.3.3.1.2. Origine humaine

Une caractérisation réalisée sur 37 isolats parmi un total de 39 isolats. La détermination des caractères biochimiques préconisés des différentes souches microbiennes isolées et sélectionnées a permis de déterminer l'appartenance de nos isolats au genre *Salmonella* spp, (annexe2).

#### 📌 Étude de la similarité entre les différents isolats

Une fois la lecture des tests biochimiques effectuée, les souches sont identifiées et comparées entre elles (Classification Ascendante Hiérarchique) (CAH) de la même manière des souches d'origine alimentaire. Des tableaux binaires ont été réalisés sur la base de positivité ou de la négativité des tests biochimiques avec les différentes souches pour la détermination de la similarité entre eux suivant l'indice de jackard et un dendrogramme qui illustre cette relation a été élaboré.

Les 27 isolats d'origine humaine sont notés en ordonnée et regroupés en fonction de leur similitude, en abscisse les distances taxonomiques qui représentent la similarité entre les souches (**Figure 17**).

Quatre groupes d'isolats homogènes ont été individualisés : C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>, C<sub>H4</sub>

**Remarque** : la designation des souches de *Salmonella* par la lettre (**S**) et l'ordre numérique de (**1 à 27**) sont indépendants de ceux attribués aux différents isolats dans l'étude de la **CMI**.

- **Le groupe C<sub>H1</sub>** composé de 11 souches (S1, 2, 5, 6, 8, 9, 14, 17, 19, 20, 25). Le code d'identification biochimique de ce groupe est : 6704752 qui correspondent à *Salmonella* spp. Le caractère différentiel des souches de ce groupe réside dans leur aptitude à dégrader l'inositol (INO) qui est une caractéristique biochimique rare chez les salmonelles à l'inverse des souches du groupe C<sub>H2</sub> qui sont incapables de le dégrader. Elles sont capables de dégrader le melibiose (MEL) par rapport au groupe C<sub>H3</sub> qui ne le dégrade pas (**Figure13**).



**Figure13.** Galerie d'identification biochimique d'une souche appartenant au groupe C<sub>H1</sub> (origine humaine).

- **Le groupe C<sub>H2</sub>** est composé de 13 souches (S3, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 21, 22, 24, 26), le code d'identification 6704552, qui correspond à une excellente identification (*Salmonella* spp). Les souches de ce groupe sont incapables de dégrader l'inositol au contraire aux souches du groupe C<sub>H1</sub>, elles sont Melibiose positifs par rapport ou souches du groupe C<sub>H3</sub> qui sont melibiose négatifs (**Figure14**).



**Figure14.** Galerie d'identification biochimique d'une souche appartenant au groupe C<sub>H2</sub> (Origine humaine).

- **Le groupe C<sub>H3</sub>** est composé d'une seule souche (S4) dont le caractère différentiel est leur aptitude à dégrader le saccharose (SAC) caractéristique biochimique exceptionnelle et elle est incapable de dégrader le rhamnose (RHA). Le code d'identification de cette souche est 6704762 qui correspond à *Salmonella* spp. (**Figure15**).



**Figure15.** Galerie d'identification biochimique d'une souche appartenant au groupe C<sub>H3</sub> (origine humaine).

- **Le groupe C<sub>H4</sub>** est composé de deux souches (S23, S27), dont le code d'identification 6704712 correspond à *Salmonella* spp. Elles sont caractérisées par leurs incapacités de dégrader le melibiose (**Figure16**).



**Figure16.** Galerie d'identification biochimique d'une souche appartenant au groupe C<sub>H4</sub> (Origine humaine).

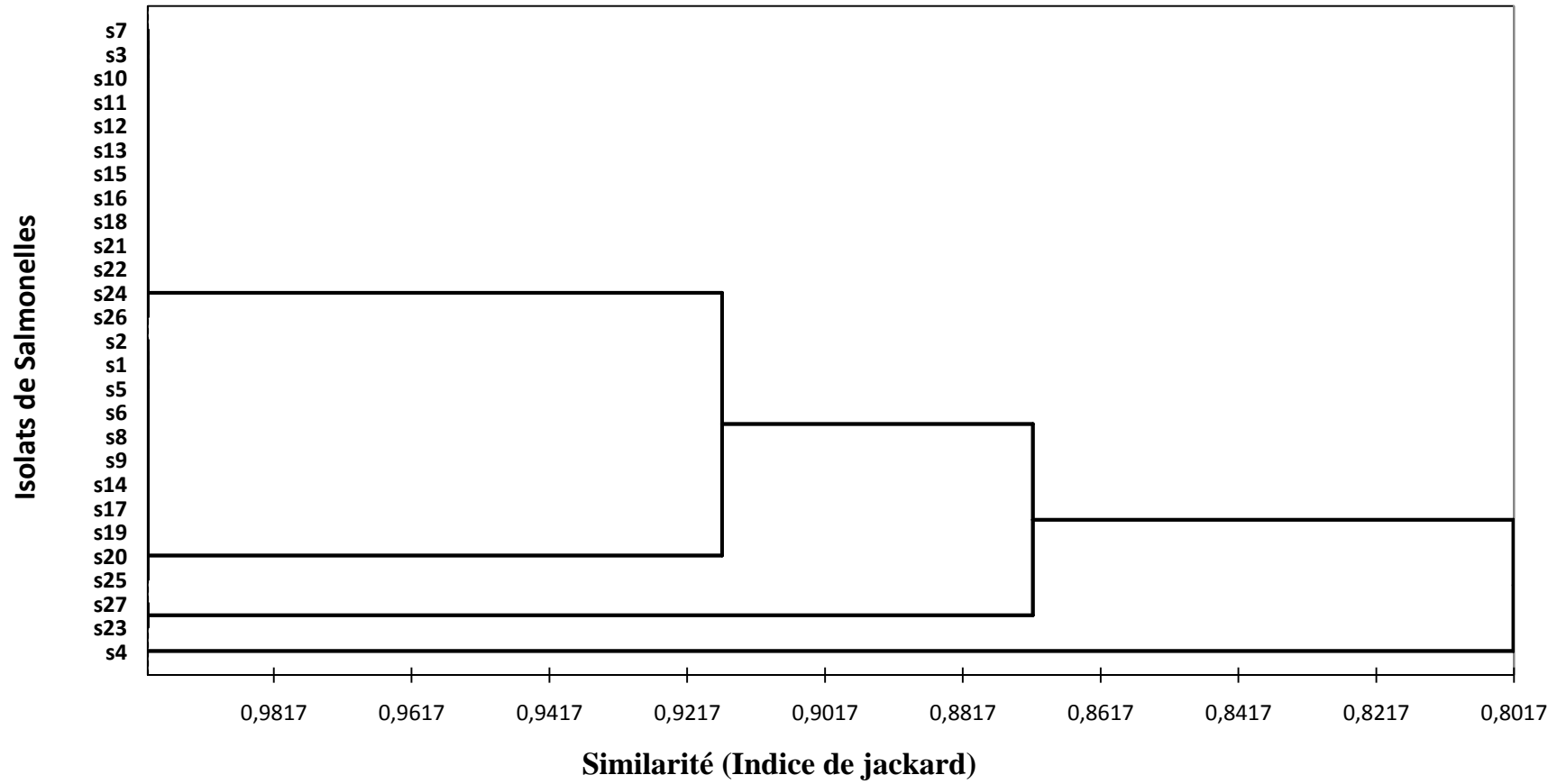
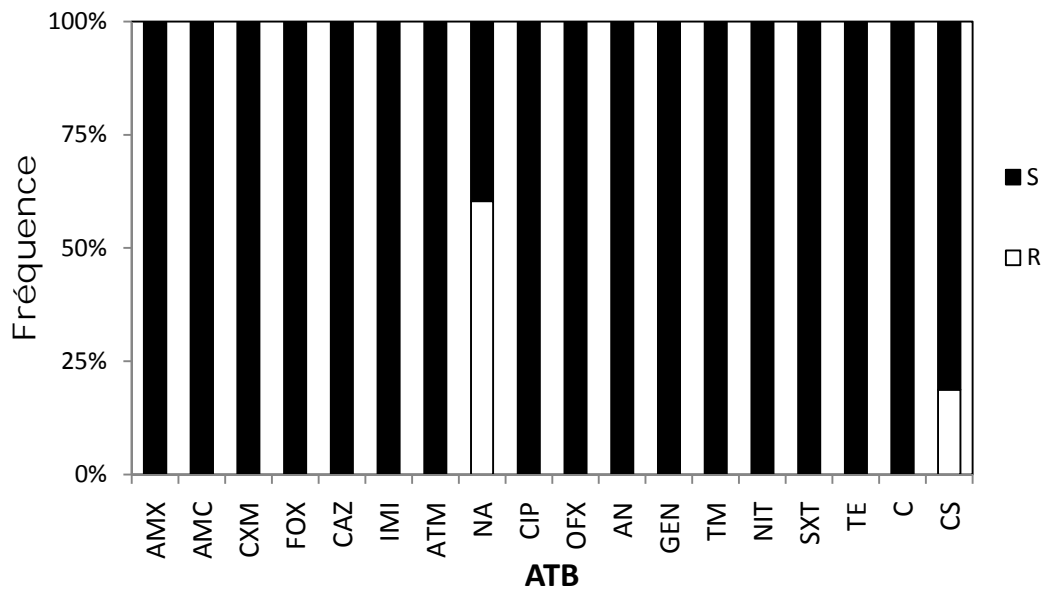


Figure17. Dendrogramme représentatif de la similarité des caractéristiques biochimiques des souches d'origine humaine (C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2, C<sub>H</sub>3, C<sub>H</sub>4).

### 1.3.3.2. Étude de la sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme)

#### 1.3.3.2.1. Origine alimentaire

Après avoir validé le test avec la lecture et l'interprétation des résultats de la souche témoins *E.coli* ATCC 25922, une mesure des diamètres d'inhibition a été effectuée autour des disques d'antibiotiques testés de l'ensemble de souches, l'interprétation des résultats a été faite grâce à la table fournit par (EUCAST) (**Tableau5**). Une résistance a été observé avec deux molécules : acide nalidixique (**NAL**) 19/32 (59.37%) et la colistine (**CS**) 6/32 (18.75%). La résistance à acide Nalidixique (**NAL**) a été exprimée avec des diamètres contact (R 6mm) et la résistance à la colistine (**CS**) a été exprimée avec des diamètres de 14 mm pour l'ensemble des souches résistantes à la colistine sachant que la valeur seuil est 15mm. Nos souches ont montré une sensibilité à toutes les autres molécules d'antibiotiques testés B-lactamines, Fluoroquinolones (ofloxacine, ciprofloxacine), Sulfamethoxazole /Trimetoprim, Tétracycline, Chloramphénicol, Nitrofurantoine, Aminositides (**Figure18**).



**Figure18.** Pourcentage des isolats de *Salmonelles* sensibles et résistantes aux antibiotiques testés (Origine alimentaire).

#### A. Activité antibactérienne des antibiotiques acide nalidixique, ofloxacine, ciprofloxacine et au cotrimoxazole

Une variation intéressante des diamètres autour des disques d'antibiotiques appartenant à la famille des quinolones (acide nalidixique, ofloxacine, ciprofloxacine) et au cotrimoxazole a été observée avec toutes les souches d'origine alimentaire, par rapport aux diamètres de la

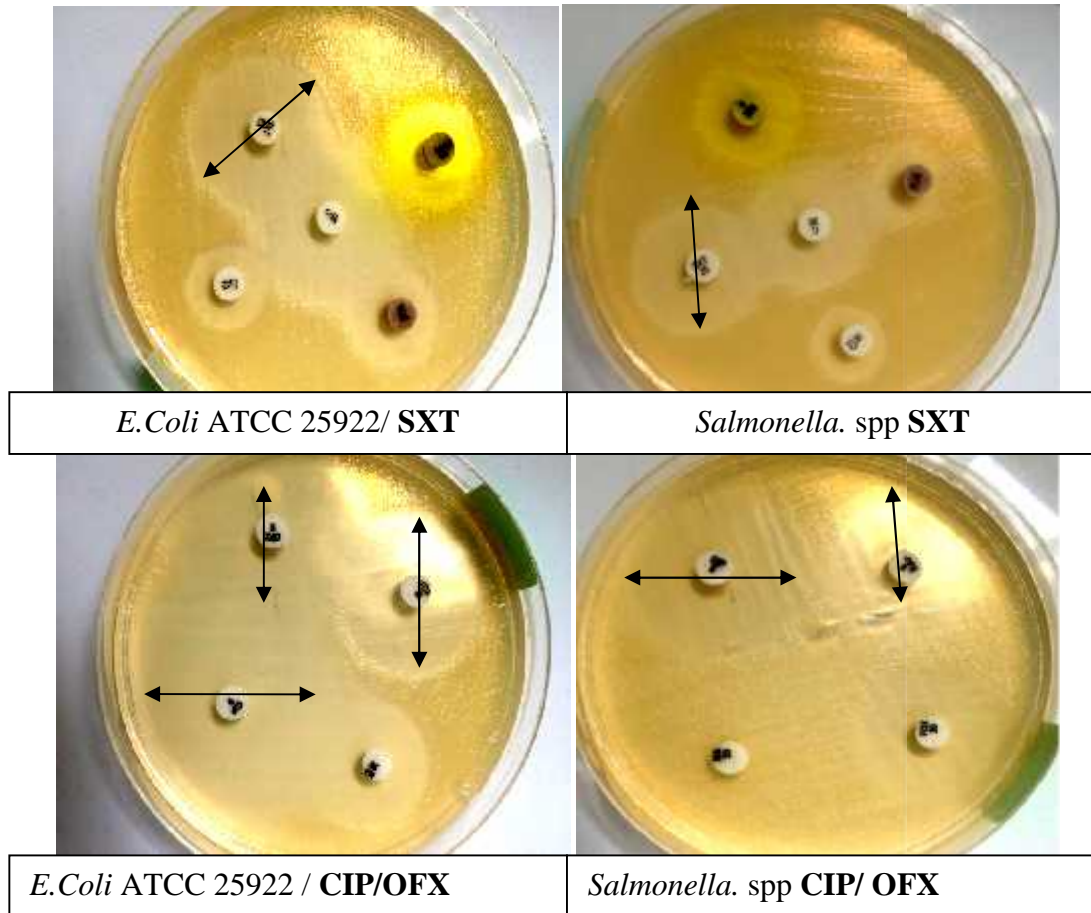
souche de référence *E.coli* ATCC 25922 avec la quelle un antibiotique montre 100% d'activité antibactérienne et des diamètres de zones d'inhibition maximales sont enregistrées.

**Acide nalidixique :** a présenté une activité antibactérienne < 25% avec 18 isolats de salmonella. Une activité antibactérienne entre 25% et 50% avec un isolat, une activité antibactérienne entre 50% et 75% avec deux isolats, une activité antibactérienne entre 75% et 100% avec 06 isolats, et une activité antibactérienne à 100% avec cinq isolats (**Figure 19,20**).

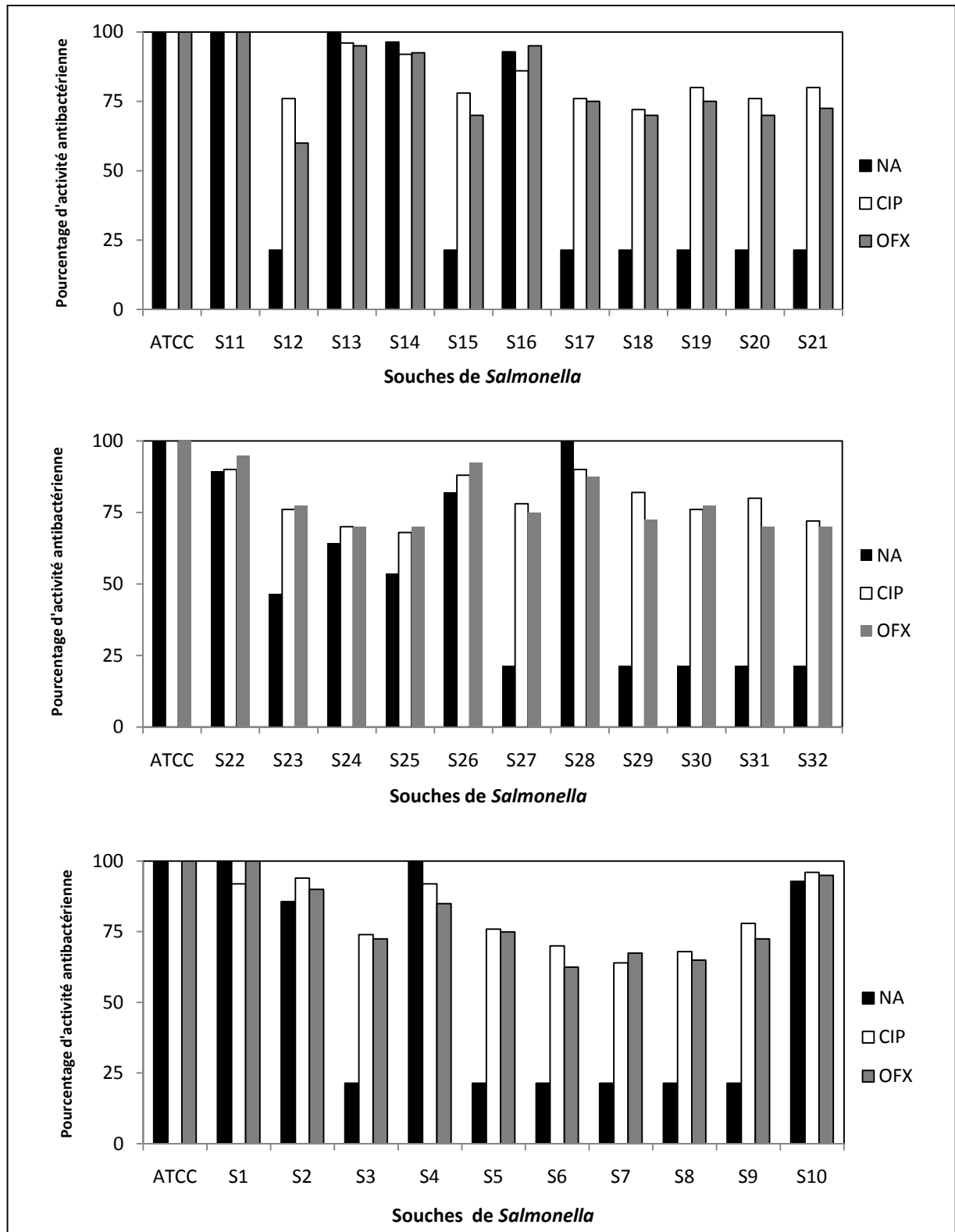
**Ofloxacin :** a présenté une activité antibactérienne entre 50% et 75% avec 20 souches, une activité antibactérienne entre 75% et 100% avec 10 souches, et une activité antibactérienne à 100% avec deux isolats (**Figure 19,20**).

**Ciprofloxacine :** a présenté une activité antibactérienne entre 50% et 75% avec 09 souches, activité antibactérienne entre 75% et 100% avec 22 souches, une activité antibactérienne à 100% avec une seule souche (**Figure 19,20**).

**Trimethoprim/Sulfamethoxazol :** activité antibactérienne entre 75% et 100% avec 27 souches, une activité antibactérienne à 100% avec 05 isolats (**Figure 19,21**).

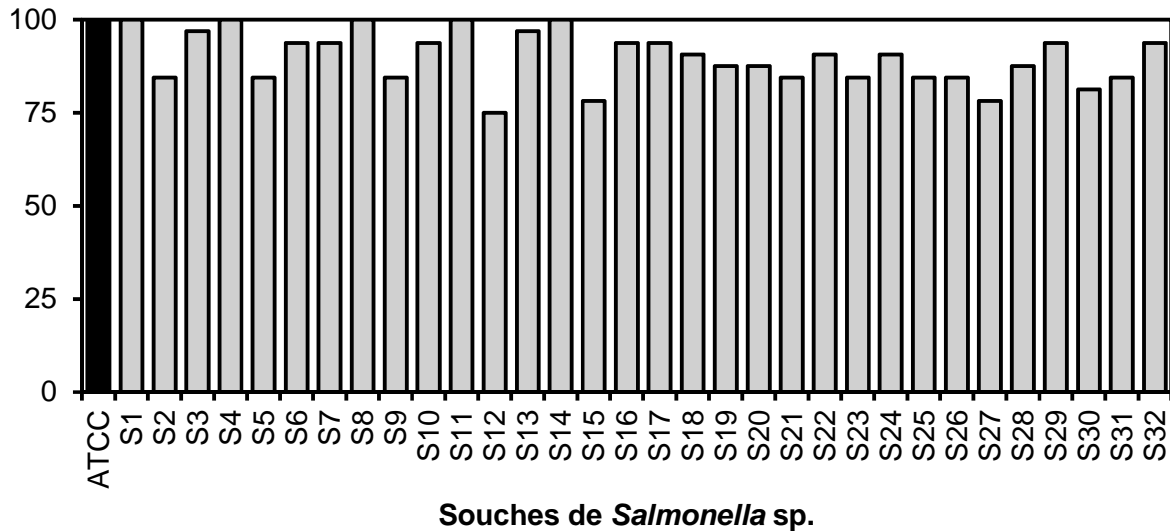


**Figure19.** Variabilité de l'activité antibactérienne enregistrée avec les trois antibiotiques (OFX, CIP, SXT).



**Figure20.** Variation des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques (Acide nalidixique, ofloxacine, ciprofloxacine) par rapport à la souche de référence (100% d'activité), (Origine alimentaire).





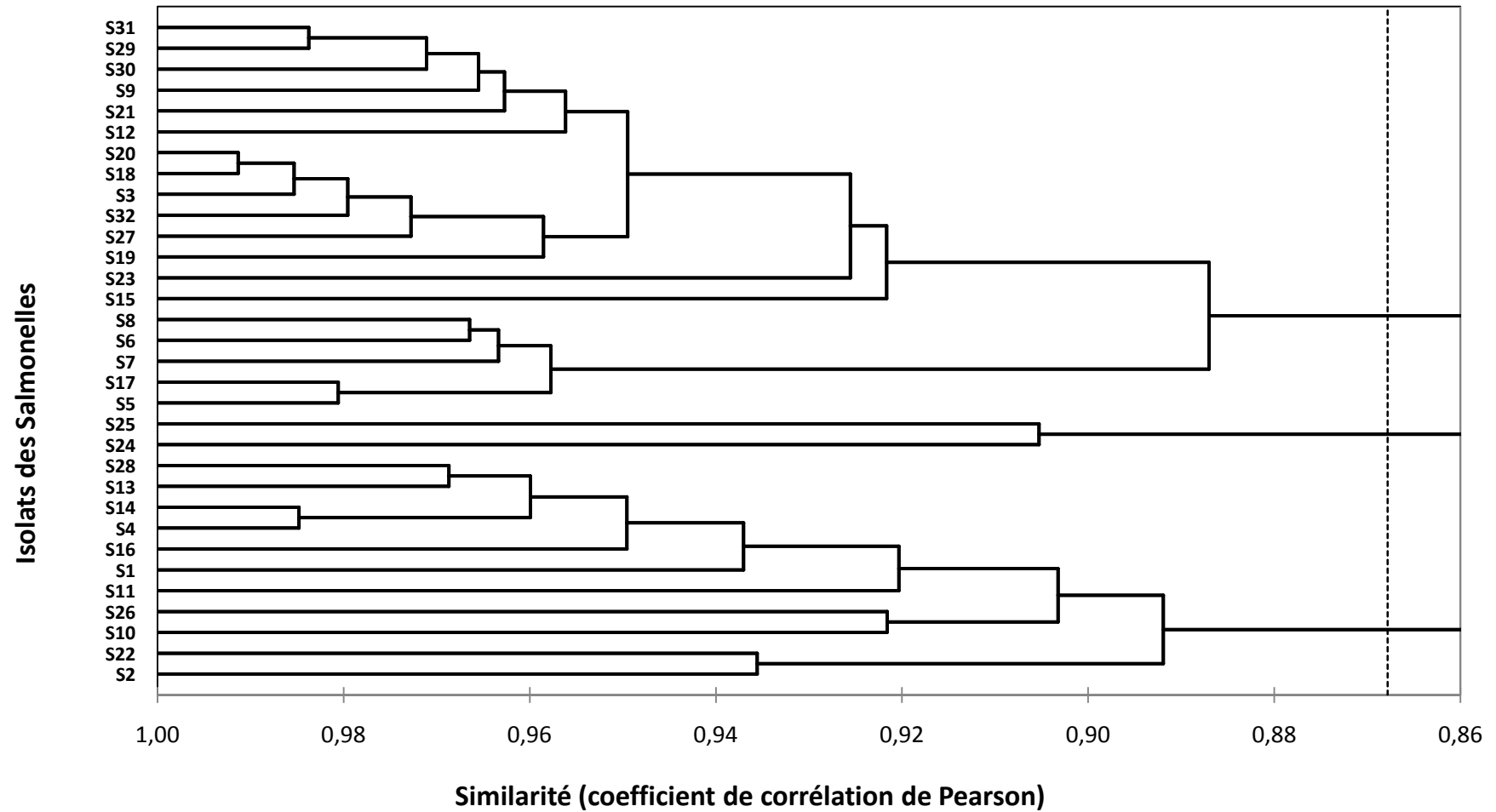
**Figure 21.** Variation des diamètres de triméthoprime/sulfaméthoxazole par rapport à la souche de référence (100% d'activité), (origine alimentaire).

### B. Étude de la similarité entre les différents isolats

Suite à la lecture et l'interprétation des antibiogrammes validés par la souche témoin *E. coli* ATCC 25922 suivant la table EUCAST, (2013). Les résultats des 32 isolats d'origine alimentaire ont été soumis à une analyse de CAH (Classification Ascendante Hiérarchique) pour visualiser la similarité des souches suivant le coefficient de Pearson et un dendrogramme qui illustre cette relation a été élaboré.

L'ensemble des isolats d'origine alimentaire sont regroupés en fonction des distances taxonomiques qui représentent la similarité entre les souches (**Figure 22**).

**Remarque :** la désignation des souches de *salmonella* par la lettre (S) et l'ordre numérique de (1 à 32) sont indépendants de ceux attribués aux différents isolats dans l'étude de la CMI.



**Figure22.** Dendrogramme représentatif de la similarité des profils des zones d'inhibitions des salmonelles enregistrés avec la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques (origine alimentaire) ( $C_A'1$ ,  $C_A'2$ ,  $C_A'3$ )

Trois groupes d'isolats homogènes ont été individualisés : C<sub>A</sub>'1, C<sub>A</sub>'2 et C<sub>A</sub>'3.

- **Le groupe C<sub>A</sub>'1** composé de 11 souches (S1, 2, 4, 10, 11, 13, 14, 16, 22, 26, 28) ce groupe est assez homogène caractérise par une sensibilité a toutes les antibiotiques.
- **Le groupe C<sub>A</sub>'2** regroupe 19 souches (S3, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 27, 29, 30, 31, 32). Les souches de ce groupe sont caractérisées par une résistance à l'acide nalidixique avec un diamètre 6 mm à la différence avec les souches du groupe C<sub>A</sub>'1 qui sont sensibles à cette molécule d'antibiotique.
- **Le groupe C<sub>A</sub>'3** composé de deux souches (S24, S25), caractérisées par leurs, résistance seule à la colistine avec des diamètres 14 mm.

#### **1.3.3.2.2. Origine humaine**

Après avoir validé le test avec la lecture et l'interprétation des résultats de la souche témoins *E.coli* ATCC 25922l, une mesure des diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotiques testés sur l'ensemble de souches, l'interprétation des résultats a été faite grâce a la table fournit par (EUCAST) (**Tableau5**).

Les souches d'origine humaine ont présentées une série de résistance vis avis de plusieurs molécules d'antibiotiques testés (**Figure 23**).

#### **Les betalactamines**

**Amoxicilline** : deux souches (11.11%) ont présentées une résistance face à cette molécule

**Amoxicilline + Ac clavulanique (AMC)** : trois souches (13.33%) ont presentes une résistance face à cette molécule.

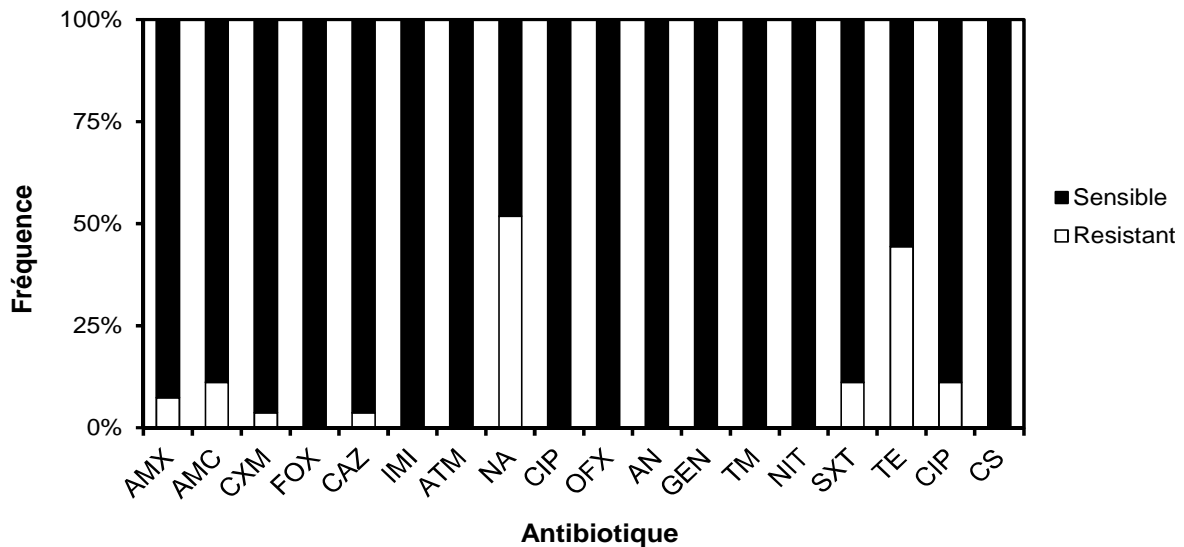
**Céfuroxime (CXM) et Ceftazidime (CAZ)** : une seule souche qui a exprime cette résistance au deux antibiotiques ce qui représente (3.70%).

#### **Quinolones**

**Acide Nalidixique (NAL)** : quatorze isolats ont exprimes cette résistance ce qui représente (51.85%).

**Trimethoprime/Sulfamethoxazol** : trois isolats (11.11%) ont exprimes cette résistance.

**Tétracycline** : douze isolats qui ont exprimes cette résistance ce qui correspond à (44.44 %).



**Figure23.** Pourcentage des souches sensibles et résistantes aux antibiotiques testés (origine humaine).

**A. Activité antibactérienne des antibiotiques acide nalidixique, ofloxacine, ciprofloxacine et au cotrimoxazole**

Une variation intéressante des diamètres autour des disques d'antibiotiques appartenant à la famille des quinolones (acide nalidixique, ofloxacine, ciprofloxacine) et cotrimoxazole a été observée avec toutes les souches d'origine alimentaire, par rapport aux diamètres de la souche de référence *E.coli* ATCC 25922I qui représente les diamètres maximales d'une souche sauvage (valide par test de control de qualité spécifique aux souches de référence sensible à toute les antibiotiques).

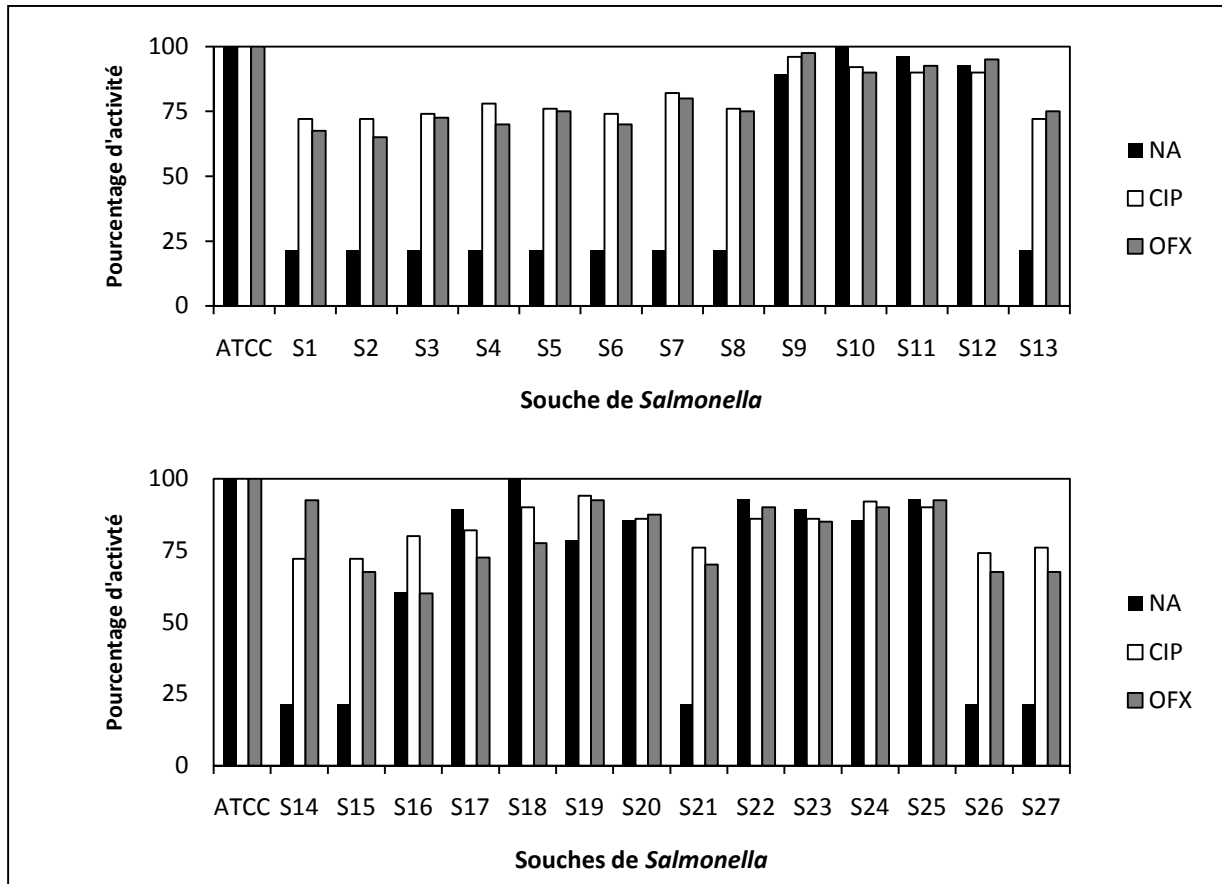
L'activité antibactérienne de ces antibiotiques a été évaluée par rapport à celle de la souche de référence *E.coli* ATCC 25922I avec la quelle les antibiotiques présentent (100% d'activité).

**Acide nalidixique :** l'activité antibactérienne a été variable, une activité < 25% avec quatorze souches, entre 50 % et 75% avec une seule souche, entre (75% et 100%), dix souches et (100%) d'activité antibactérienne avec uniquement deux isolats.

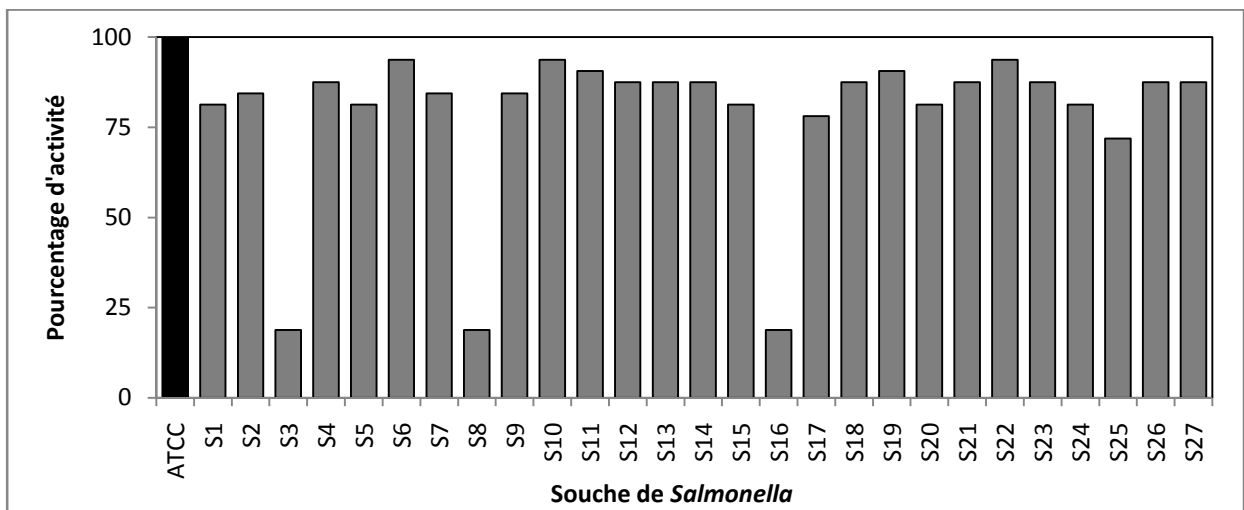
**Ofloxacine :** une activité antibactérienne entre (50% et 75%) quinze isolats, une activité entre (75% et 100%) douze isolats.

**Ciprofloxacine :** une activité antibactérienne entre 50% et 75% avec sept isolats et une activité entre (75% et 100%) avec vingt souches (**Figure24**).

**Triméthoprime/Sulfaméthoxazol** : a présenté une activité < 25% avec trois isolats, entre (50%, et 75%) avec une seule souche et entre (75 % et 100%) avec 23 souches (**Figure25**).



**Figure24.** Variation des diamètres des antibiotiques (Acide nalidixique, ofloxacine, ciprofloxacine) par rapport à la souche de référence (100% d'activité) (Origine humaine).

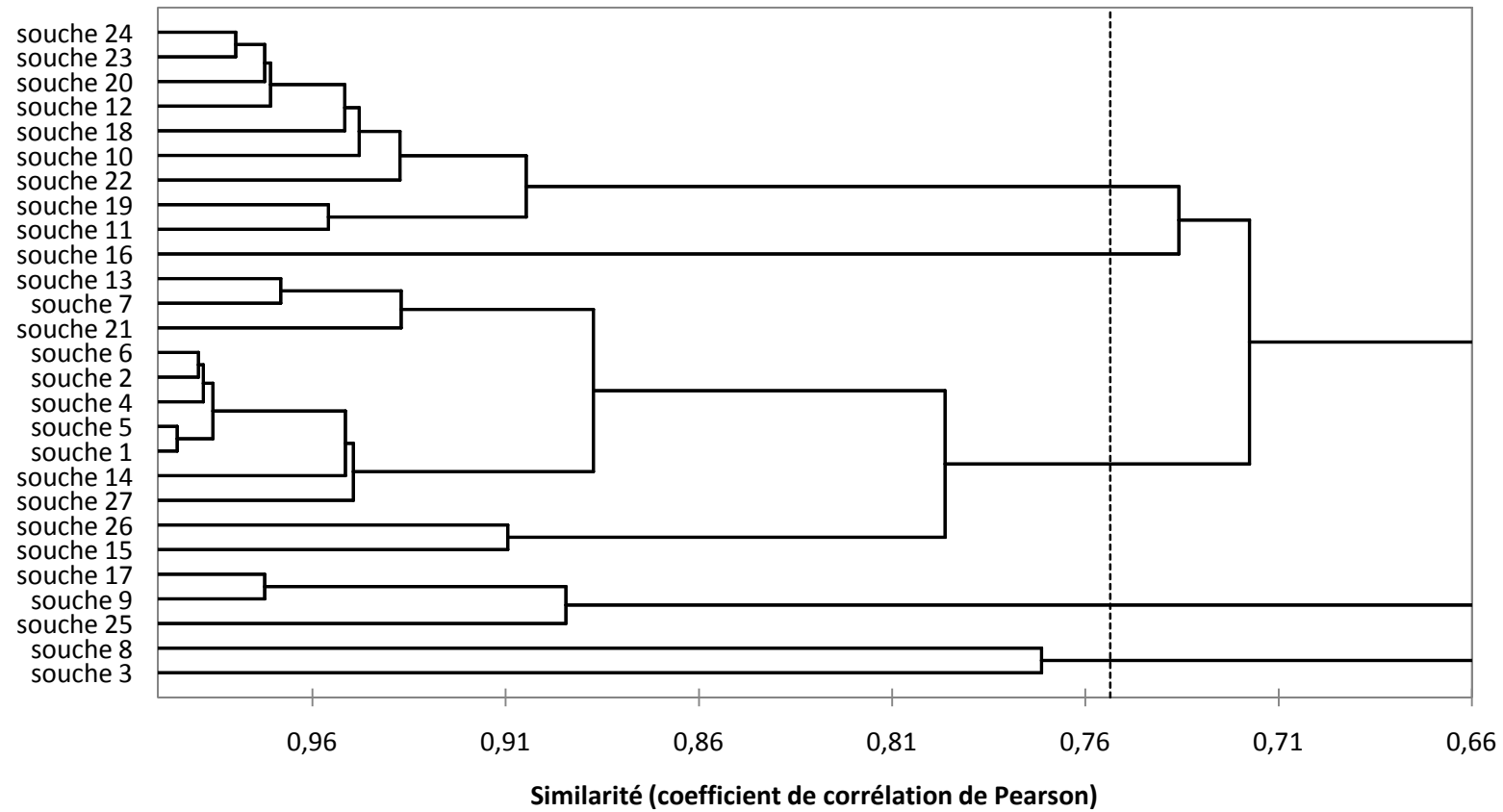


**Figure25.** Variation des diamètres des antibiotiques (triméthoprime/sulfaméthoxazol) par rapport à la souche de référence (100% d'activité) (Origine humaine).

## **B. Étude de la similarité entre les différents isolats**

Suite à la lecture et l'interprétation des antibiogrammes validés par la souche référence *E.coli* ATCC 25922 suivant la table EUCAST (version2013) (**Tableau 5**). Les résultats des 27 isolats d'origine humaine ont été soumis à une analyse CAH (Classification Ascendante Hiérarchique) pour visualiser la similarité des souches suivant le coefficient de pearson et un dendrogramme qui illustre cette relation a été élaboré et qui a permis d'individualiser cinq classes : C<sub>H</sub>'1, C<sub>H</sub>'2, C<sub>H</sub>'3, C<sub>H</sub>'4, C<sub>H</sub>'5(**Figure26**).

**Remarque** : la désignation des souches de salmonella par la lettre (**S**) et l'ordre numérique de (**1 à 27**) sont indépendants de ceux attribués aux différents isolats dans l'étude de la **CMI**.



**Figure26.** Dendrogramme représentatif de la similarité des profils des zones d'inhibitions des salmonelles enregistrés avec la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques (origine humaine) ( $C_H^1$ ,  $C_H^2$ ,  $C_H^3$ ,  $C_H^4$ ,  $C_H^5$ ).

- **Le groupe C<sub>H</sub>'1** composé de 12 souches (S1, 2, 4, 5, 6, 7, 13, 14, 15, 21, 26, 27). Les souches de ce groupe sont caractérisées par leurs résistances à l'acide nalidixique avec un diamètre 6 mm et un diamètre limite avec la colistine (15 mm) par rapport aux autres groupes, associée dans la majorité des cas à une résistance vis-à-vis la tétracycline.
- **Le groupe C<sub>H</sub>'2** composé de deux souches (S3, S8). Elles sont caractérisées par leurs résistances à l'amoxiciline, l'association amoxiciline + acide clavulanique à l'acide nalidixique (diamètres 6 mm) et au triméthoprime/sulfaméthoxazole
- **Le groupe C<sub>H</sub>'3** composé de trois souches (S9, 17, 25). Elles sont caractérisées par leurs résistances à la tétracycline et le chloramphénicol (diamètre 6) par rapport les souches des autres groupes qui sont sensibles à ces deux molécules d'antibiotiques.
- **Le groupe C<sub>H</sub>'4** composé de 9 souches (S10, 11, 12, 18, 19, 20, 22, 23, 24). Elles sont caractérisées par leurs sensibilités à la totalité des antibiotiques testés.
- **Le groupe C<sub>H</sub>'5** composé d'une seule souche (S16) caractérisée aussi par une résistance à la cotrimoxazole (6 mm) et la tétracycline (6 mm).

## 1.4. DISCUSSION

### 1.4.1. Diversité sérotypiques des salmonelles et sensibilité aux antibiotiques (CMI).

Les résultats obtenus de l'analyse sérotypique des souches de salmonelles d'origine alimentaire ont visualisé une prédominance de *Salmonella* Enteritidis suivie d'une diversité de sérotypes. La distribution hétérogène suggère que l'origine principale de la contamination est la flore intestinale de poulet de chair et de la poule pondeuse (Berends *et al.*, 1996 ; Hanes, 2003). Ceci témoigne des mauvaises pratiques d'hygiène surtout pendant l'abattage avec des procédés d'éviscération non adéquate, un rinçage artisanal collectif des poulets de chair et l'absence des nouvelles technologies d'élevage, d'abattage et de rinçage. À tout cela s'ajoute l'absence d'une politique de lutte contre le portage intestinal des salmonelles dans la filière aviaire et une réglementation de surveillance des élevages et toute au long de la chaîne alimentaire jusqu'au consommateur (de l'animal au consommateur)(Van Immerseel *et al.*, 2005; DEFRA, 2007).

Des résultats similaires ont été observés dans plusieurs pays de l'Europe possédant des systèmes de surveillance des salmonelles à différents niveaux. En Belgique, le plan de surveillance officiel concernant le secteur de transformation du poulet a permis d'estimer la prévalence à 1,4 % pour les carcasses et 13,3 % pour la viande de découpe de poulet (CSAFSCA, 2005) avec comme sérotype prédominant le sérotype *Salmonella* Enteritidis (CERVACH, 2006). En 2002, dans tous les pays européens, à l'exception des pays



scandinaves, on trouvait entre 10 à 15% des poulets en vente dans les boucheries contaminés par *Salmonella* Enteritidis était le sérotype le plus répandu aussi bien dans la viande (11,1% des sérotypes) que dans les unités de production (10,8%) (CE, 2005).

Après la ponte, il est possible que les œufs soient contaminés par *S. Enteritidis* à travers la coquille de l'œuf (contamination de l'œuf par des matières fécales) (Gast & Beard, 1990b ; Barrow & Lovell, 1991 ; Humphrey et al., 1991b). La plupart des infections par *Salmonella* Enteritidis d'origine alimentaire ont été associées à des œufs en coquille ou à des aliments contenant des œufs insuffisamment cuits (EFSA, 2007). La présence de *Salmonella* sur la surface extérieure de la coquille de l'œuf peut être un point de départ pour la contamination du contenu interne, ce qui présente une menace pour la santé publique. En Europe, *Salmonella* a été trouvée dans les œufs frais et les produits crus lors des étapes de transformation et de vente avec un taux de prévalence variant de 0 à 7,1 % selon le pays (EFSA, 2007). Dans notre étude sur l'œuf de poule pondeuse un seul sérotype a été isolé sur la coquille *Salmonella* Enteritidis à l'inverse des autres études où une multitude de sérotypes a été isolé y compris *S. Enteritidis* (de Louvois, 1993b ; Humphrey, 1994 ; Schutze et al., 1996), En effet, nos résultats sont comparables à ceux effectuée en Europe sur le contenu interne où ils ont trouvé une forte contamination avec une prédominance du sérotype *Salmonella* Enteritidis (De Buck et al., 2004b).

Concernant les sérovors isolés d'origine humaine, un constat similaire a été noté avec la prédominance de sérovar *Salmonella* Enteritidis suivie d'une diversité de sérovors principalement *Salmonella* Typhimurium. Des résultats similaires rapportés par le Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques, RASRBA, (2011) dans son (12<sup>ème</sup> rapport) où la dominance de deux sérotypes Enteritidis et Typhimurium en médecine humaine était claire. Les résultats notés avec cette étude concordent aussi avec d'autres études dans le monde où les deux sérovors sont incriminés dans les salmonelloses humaines. En 2002, dans l'ensemble de la Communauté Européens (CE) et la Norvège, 70% des cas de salmonellose humaine étaient due au sérotype Enteritidis et 17% au sérotype Typhimurium (CE, 2005). Aux Etats-unies les *Salmonella* Enteritidis ont été les plus fréquemment incriminées (24,7%) et Typhimurium (23,5%) (Glynn et al., 1998). Toutefois, ces dernières années une baisse globale relative annuelle des sérovors *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium a été rapporté en France, cette diminution s'explique par l'impact des mesures de maîtrise et de gestion appliquées ces dernières années en filière aviaire, d'un autre côté, d'autres sérovors sont en progression aussi bien chez l'homme qu'en filière aviaire

telle que les variants monophasiques de *Salmonella* Typhimurium S.I 1,4,5(5),12 :i :- (Harold *et al.*, 2010).

L'évaluation de la sensibilité des salmonelles d'origine alimentaire aux antibiotiques par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), a permis d'observer que certaines souches d'origine alimentaires ont montré une résistance aux quinolones et fluoroquinolones (acide nalidixique, ofloxacine) avec des niveaux et des profils variables, accompagnée d'une expression d'un phénotype non sauvage avec la ciprofloxacine. Cette situation reflète une utilisation à tort des molécules appartenant à cette classe comme promoteur de croissance dans la filière volaille (Weill , 2008), et en thérapie en médecine vétérinaire, situation qui a poussé l'OMS en 1998, a organisé une nouvelle consultation dont l'objet était l'impact en médecine humaine de l'utilisation des quinolones chez les animaux destinés à l'alimentation humaine suite à l'augmentation de souches de *Salmonella* résistantes à l'acide nalidixique (Nal) avec une diminution de la sensibilité à la ciprofloxacine (Who,1998). Les valeurs épidémiologiques élevés (phénotypes non sauvage) ont été observées aussi avec toutes les souches vis-à-vis de l'Ertapinème et de l'Imipènème et du Triméthoprim /Sulfométhoxazole, qui peuvent être expliqués par un début d'acquisition d'un mécanisme de résistance vis-à-vis de ces molécules et qui peuvent être induite par l'introduction des molécules appartenant à ces classes comme moyens thérapeutiques et prophylactiques dans ces filières, c'est ainsi le rôle de l'utilisation d'une C3G le Ceftiofur qui a obtenu une autorisation de mise sur le marché aux États-Unis en 1988 et elle a été évoquée par les auteurs américains pour expliquer l'émergence des souches *Salmonella* céphalosporinases (CMY-2) porteuse du gène bla cmy-2 identifié aux États-Unis chez les souches *Salmonella* Typhimurium et Newport (Carattoli *et al.*, 2002 ; Giles *et al.*, 2004) responsable de la résistance au ceftriaxone (CRO).

Nos résultats restent moins alarmantes que ceux observés dans d'autres pays de l'Europe où l'évolution de la résistance a touché plusieurs antibiotiques. C'est ainsi en France les données des années 2008-2009 de la surveillance active de la résistance des salmonelles aux antibiotiques dans le secteur (hygiène des aliments) (le plan des viandes de volaille ), ont montré que parmi les souches sur lesquelles une étude de la sensibilité a été effectuée une souche *Mbandaka* présente un phénotype multi-résistant au chloramphénicol, streptomycine et aux sulfamides, des sérovars Derby présentant un phénotype résistant à la tétracycline, aux sulfamides et à la streptomycine, deux souches Derby et Typhimurium présentant une pentarésistance de type ACSSuT (Ampicilline , Chloramphénicol, Streptomycine, Sulfamides, Tétracycline), une souche Bredney résistante à la Tétracycline, une souche de serotype

4,(5),12 :i :- présentant une résistance à la Streptomycine et aux Sulfamides (Harold *et al.*, 2010).

Cependant, pour les souches d'origine humaine et avec la même technique d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques (CMI), une variabilité de profils a marqué cette étude par rapport aux souches alimentaires où neuf classes ont été distinguées avec l'analyse hiérarchique ascendante (CAH) contrairement à trois classes observées avec les souches alimentaires. Ce qui traduit la variabilité des mécanismes de résistance et des supports génétiques mis en jeu (Doublet *et al.*, 2004 ; Welch *et al.*, 2007). Cette variabilité des profils est logiquement un cumule de l'utilisation aléatoire et anarchique des antibiotiques dans la filière animale à l'origine des différents aliments source de la contamination humaine sur lesquelles sont superposées l'utilisation a tort des antibiotiques en médecine humaine (Weill, 2008). Parmi les souches celles qui ont montré une même évolution de la sensibilité vis-à-vis des quinolones et fluoroquinolones (acide nalidixique, ofloxacin) que celles de souches d'origine alimentaires avec une expression plus franche de la résistance pour l'ofloxacin observée avec les souches alimentaires. Une attention doit être portée aux souches résistantes à l'acide nalidixique suite à l'échec thérapeutique avec les fluoroquinolones ou d'allongement de la durée de traitement rapportés chez les patients est observé avec les souches résistantes à l'acide nalidixique (CLSI, 2008), tout en présentant une sensibilité *in vitro* aux fluoroquinolones ce qui a conduit le comité européen (EUCAST) à interpréter toute souche de *salmonella* résistante à l'acide nalidixique comme résistante à toutes les fluoroquinolones (EUCAST, 2008).

Le comportement des salmonelles d'origine humaine envers l

es autres classes était différent des souches d'origines alimentaires, surtout avec les betalactamines où la constatation de différents profils suggère la mise en place par ces souches d'origine humaines des mécanismes de résistance divers surtout enzymatiques appartenant à différentes classes, avec une production probable de bêta-lactamases de type TEM-1, TEM-2, SHV-1, OXA-1 (ou OXA-30) ou PSE-1 (ou CARB-2) inactivant les aminopénicillines et les céphalosporines de première, et de deuxième génération. La résistance aux C3G est également due à la production de bêta-lactamases d'origine plasmidique. Elles appartiennent à trois grandes classes dont deux, celle des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) (classe A d'Ambler) (Bradford, 2001) et celle des céphalosporinases (ou céphamycinases) (classe C d'Ambler) (Philippon *et al.*, 2002).

Une résistance vis-à-vis d'autres molécules a été aussi exprimée chez certaines souches à la différence avec les souches d'origine alimentaire : nitrofurantoïne, chloramphenicol, tétracycline, aminosides triméthoprime /sulfaméthoxazol.

De tout cela, l'éventualité de l'existence de deux réservoirs bactériens distincts, l'homme et l'animal, est très probable contrairement aux études effectuées en Europe et au États Unies. Dans cette dernière, Cohen et Tauxe ont rapporté l'augmentation du nombre de cas d'infections humaines dues à ces souches résistantes, ayant pour origine les aliments d'origine animales. Ils concluaient que l'utilisation des antibiotiques en thérapie humaine ne jouait pas un rôle majeur dans l'émergence de cas des souches résistantes (Cohen & Tauxe, 1986).

#### **1.4.2. Diversité biochimique des *Salmonelles* et sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme sur milieu solide)**

##### **➤ Souches d'origine alimentaire**

L'analyse biochimique de l'ensemble des souches d'origine alimentaire a abouti à trois classes différentes entre elles essentiellement par la dégradation du sucre Melibiose (MEL), un test biochimique positif avec les souches du classe C<sub>A1</sub> (MEL+) et négatif avec les souches des deux classes C<sub>A2</sub> et C<sub>A3</sub> (MEL-). La classe C<sub>A1</sub> qui regroupe plus de (81%) des souches et la classe C<sub>A3</sub> qui est composée d'une seule souche (3.12%). Cette homogénéité métabolique caractéristique de la majorité des isolats regroupés dans les deux classes C<sub>A1</sub> (MEL+) et C<sub>A3</sub> (MEL-) traduit une stabilité génétique des salmonelles non hôte spécifique : *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Heidelberg (Holt *et al.*, 2009) dans le temps et dans plusieurs types d'échantillons alimentaire. Des résultats opposés ont été observés lors d'une étude au Maroc sur des salmonelles isolées à partir des aliments prélevés lors de contrôle microbiologique de routine, la majorité des souches ont présenté des profils biochimiques atypiques avec une atteinte de métabolisme des sucres et des acides amines (Inositol+, Rhamnose-, Arginine -, Nitroanidine proline+) (Rouahi *et al.*, 2000). La classe CA2 (15%) regroupe cinq souches avec un profil d'identification biochimique correspondant au sérotype *Salmonella* Gallinarum. Elles partagent avec la souche du classe C<sub>A3</sub> le caractère melibiose négative MEL-. Les souches de cette classe ont montré une absence de production de l'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S) par rapport aux souches des classes C<sub>A1</sub> et C<sub>A3</sub> au quelle s'ajoute l'incapacité de dégrader les sucres Sorbitol et le Rhamnose, ainsi que l'absence de l'activité enzymatique Ornithine décarboxylase ODC-. L'absence de ce dernier caractère dans la classe C<sub>A2</sub> a permis de déterminer l'espèce *Salmonella* Gallinarum par étude biochimique sans avoir passé par un sérotypage. Cette variabilité biochimique touchant plusieurs caractères biochimiques à la fois

ce qui témoigne l'intensité des réarrangements génétiques affectant les salmonelles hôte spécifiques (Holt *et al.*, 2009; Thomson *et al.*, 2008).

L'étude de la sensibilité des souches d'origine alimentaire vis-à-vis des antibiotiques avec la technique d'antibiogramme standard sur milieu solide a permis d'individualiser (03) classes différentes entre elles par leurs sensibilités et leurs résistances à la colistine et à l'acide nalidixique. D'un autre côté les différentes molécules appartenant à la classe des quinolones et fluoroquinolones (acide nalidixique, ofloxacin, ciprofloxacine) ont montré une activité antibactérienne variable qui n'a pas atteint (100%) qu'avec un nombre restreint d'isolats, cette grande variation appréciée visuellement sur milieu solide reflète les seuils épidémiologiques élevés (phénotypes non sauvages) observé avec la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

La résistance à l'acide nalidixique est probablement le résultat d'une modification au niveau du site de fixation de cet antibiotique sur l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Ces modifications sont dues à des mutations ponctuelles dans les gènes *gyrA*, *gyrB*, *parA*, *parC*, ou la présence additionnelle d'un mécanisme d'efflux (Piddock, 1999). Au cours des dernières années, plusieurs échecs de traitement avec les fluoroquinolones ont été signalés en raison d'une sensibilité réduite à la ciprofloxacine (Asna *et al.*, 2003 ; Threlfall & Ward, 2001). Les isolats de sensibilité diminuée à la ciprofloxacine semblent sensibles à des tests de diffusion de disques de routine (Asna *et al.*, 2003 ; Le Lostec *et al.*, 1997). L'application systématique de ces tests pour chaque souche n'est pas recommandée et la littérature suggère que la résistance à l'acide nalidixique peut être un indicateur de sensibilité diminuée à la ciprofloxacine (Asna *et al.*, 2003 ; Hakanen *et al.*, 1999; Kapil & Das 2002; Threlfall *et al.*, 2001).

Selon EUCAST (2013) une souche résistante à l'acide nalidixique doit être considérée résistante à l'ofloxacin et à la ciprofloxacine même si les diamètres de ces deux antibiotiques correspondent à une sensibilité. Cela est le résultat d'une résistance croisé entre l'acide nalidixique et les fluoroquinolones (EUCAST, 2008). Les mêmes résultats ont été signalés par le Centre Nationale de Référence de *Salmonella* (CNR) en France dans le rapport d'activité annuelle en 2011 après une étude effectuée sur 2490 souches isolées à partir des denrées alimentaires (Weill & Le Hello, 2011). Cette étude a montré que 11% des souches de *Salmonella* spp sont résistantes à l'acide nalidixique et cette résistance s'accompagne d'une sensibilité diminuée à la ciprofloxacine (CMI comprise entre 0,125 et 1 mg/l).

Une résistance à la colistine a été observée avec 18.75% (6/32) des souches avec un diamètre de 14 mm, toutefois 25% (8/32) des souches ont présenté des diamètres limités (15 mm)

autour du disque de colistine. Ces diamètres douteux nécessitent le passage à une mesure de la CMI pour confirmer la sensibilité ou la résistance de ces souches. Les résultats obtenus dans notre étude ont révélés une sensibilité de l'ensemble des isolats à cette molécule avec une CMI limite 2 mg /L.

Une sensibilité à tous les antibiotiques de la famille des -lactamine, Aminosides, Cotrimoxazole, Tetracycline et le Chloramphénicol a été observée avec 100% des souches. Une sensibilité face à la Nitrofurantoine a été observée avec 100% des souches avec une diminution remarquable dans les diamètres d'inhibition. Cette baisse est due à l'apparition des mécanismes de résistance mal exprimés à cet antibiotique, ces résultats sont comparables aux résultats d'une étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Salmonella* spp et *Escherichia coli* isolées de la viande de poulets de chair au Sénégal, qui a montré une apparition des mécanismes de résistance aux furanes qui se développent lentement avec une expression minimale (Aissatou, 2004).

La multitude et la diversité de comportement vis-à-vis des quinolones (acide nalidixique) et des fluoroquinolones (ofloxacin et ciprofloxacine), la colistine, nitrofurantoine et le cotrimoxazole, avec des résistances franches ou une diminution de la sensibilité traduits par des diamètres réduits par rapport à la souche de référence témoigne d'une utilisation anarchique et large de ces molécules en médecine vétérinaire à titre prophylactique et curatif. Une hypothèse prouvée par une enquête épidémiologique rétrospective qui a confirmé l'utilisation sans réglementations de ces antibiotiques.

#### ➤ **Souches d'origine humaine**

L'analyse biochimique de l'ensemble des souches d'origine humaine a abouti à (04) classes dont le profil numérique de l'identification biochimique correspond au genre *Salmonella*. Elles se différencient entre elles initialement par la dégradation du sucre Melibiose (MEL). L'ensemble des souches appartenant aux trois classes C<sub>H1</sub>, C<sub>H3</sub> et C<sub>H4</sub> ont été capables de dégrader le sucre inositol (INO+), ce caractère (INO+) inhabituel chez les salmonelles a été signalé lors d'une étude effectuée au Canada sur l'association de la dégradation de l'inositol avec la résistance aux antibiotiques chez des souches de *Salmonella* isolées durant 1983-1984 (John & Marsha, 1985). Cette étude a montré une dégradation de l'inositol chez les espèces *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Muenster sans production de gaz accompagné d'une résistance à la colistine.

La souche unique de la classe C<sub>H3</sub> partage le caractère Melibiose positive avec les souches des classes C<sub>H1</sub> et C<sub>H2</sub> et diffère des autres souches par leur susceptibilité de dégrader le saccharose (SAC+). Ce caractère (SAC+) qui est rare est inhabituel chez les salmonelles a

été signalé dans une étude effectuée sur dix souches de *Salmonella* Agona isolées au CHU d'Orléans de 1982 à 1984 (Poisson *et al.*, 1988). Ces souches ont montré une fermentation du saccharose (SAC+).

Ces caractères inositol (INO+) et saccharose (SAC+) absents chez les isolats alimentaires de cette étude, constituent un témoignage de l'impact des facteurs environnementaux sur les bactéries, et ce qui renforce l'hypothèse de la multitude de réservoir (Rocha *et al.*, 2002 ; Jordan *et al.*, 2003).

L'atypie des profils biochimiques enregistré avec les salmonelles d'origine humaines concernant le métabolisme des sucres Inositol et Saccharose, est probablement en rapport et de manière indirecte avec le mécanisme invasif des salmonelles (Eckmann *et al.*, 1997) et probablement le chimiotactisme en modifiant le métabolisme de l'un des substrats-clé (Rohwer *et al.*, 1998).

L'étude de la sensibilité des souches d'origine humaine vis-à-vis des antibiotiques avec cette technique de l'antibiogramme par diffusion des disques a abouti à cinq (5) classes différentes entre elles initialement par leurs sensibilités ou leurs résistances à l'acide nalidixique. Suite aux recommandations d'EUCAST (2013), une souche résistante à l'acide nalidixique doit être considérée résistante à l'ofloxacine et la ciprofloxacine même si les diamètres de ces deux antibiotiques correspondent à une souche sensible. Cela est le résultat d'une résistance croisée entre l'acide nalidixique et les fluoroquinolones. Les deux molécules ofloxacine et ciprofloxacine ont montré une activité antibactérienne variable comparable à celle observée avec les isolats alimentaires, la majorité des souches n'ont pas exprimés une activité à (100%).

Face aux  $\beta$ -lactamines, les souches S3, S8 et S25 ont montré une résistance avec des profils différents (AMX<sup>R</sup>, AMC<sup>R</sup>) pour les souches S3 et S25 suite à la production d'une aminopénicillinase et (AMX<sup>R</sup>, AMC<sup>R</sup>, CAZ<sup>R</sup>, ATM<sup>E</sup>) pour la souche S8 avec une suspicion d'une production d'une  $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE). Ces souches sont caractérisées également par une résistance à l'acide nalidixique et au cotrimoxazole. Ces résultats sont comparables aux résultats d'une étude du centre de référence de *Salmonella* qui ont mis en évidence une résistance à l'acide nalidixique et au cotrimoxazole accompagné d'une production enzymatique (BLSE) et la résistance par conséquent aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines chez des souches de *Salmonella* spp isolées lors d'une épidémie de gastro-entérites à cette bactérie (Weill & Le Hello, 2011).

Les souches appartenant à la classe 3 ont montré une résistance à la tétracycline et au chloramphénicol par rapport aux autres souches. La résistance à la tétracycline est le résultat

d'un mécanisme d'efflux et celle au chloramphénicol est due à la production d'enzymes (acétyl transférases) qui inactivent l'antibiotique en le rendant incapable de se fixer sur le ribosome (Nogrady *et al.*, 2005).

Une sensibilité à tous les antibiotiques testés a été observée avec les souches de la classe C4 (9/27) avec des diamètres proches et comparables de la souche de référence, cela est due probablement à l'absence total des mécanismes de résistance aux antibiotiques testés.

On a noté des diamètres limités (15 mm) avec la colistine chez la majorité des souches d'origine humaine 77.77% (21/27) à la différence aux souches d'origine alimentaire qui ont présenté ces diamètres douteux avec une minorité des souches. Ces diamètres douteux nécessitent le passage à une mesure de la CMI pour confirmer la sensibilité ou la résistance de ces souches conformément avec les recommandations EUCAST. Une conduite a été prise en considération lors d'une étude menée au Brésil sur la résistance à la colistine de 124 souches de *Salmonella enterica* et *Escherichia coli* isolées à partir des porcs (Adriano *et al.*, 2012), ils ont trouvé après un antibiogramme standard que 23.4% des souches (29/124) ont une sensibilité intermédiaire et 72.6% des souches étaient sensibles à la colistine (90/124), après la mesure de la CMI ils ont noté que 21% de ces souches (26/119) sont résistantes à la colistine, contrairement a nos souches qui ont été sensibles après mesure de la CMI.



## **[2] Diversité (Moléculaire) Génétique Des Salmonelles**

## **2.1. Introduction**

Dans notre étude, des salmonelles d'origine alimentaire de différents sérotypes, biotypes, antibiotypes et de différents échantillons alimentaires ont été analysés avec un ensemble de méthodes de typage moléculaires (génétique), **sequençage de l'ADNr16S** (ribotypage), **MLST** (*Multi-Locus Sequence Typing*), **MLVA** (*Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis*), dans le but de déterminer la parenté génétique, le polymorphisme génétique des sérotypes, l'association de la variabilité phénotypique et moléculaire et évaluer l'apport de chaque technique de caractérisation. Toutefois cette étude a été réalisée avec une approche comparative face à des salmonelles d'origine humaine.

## 2.2 Matériel et méthodes

### 2.2.1. Origine des souches

Huit souches appartenant à différents sérotypes, biotypes et antibiotypes, isolées aux différentes années de deux origines (06) isolats d'origine alimentaire et (02) souches d'origines humaine sélectionnées à partir des différents groupes déjà individualisés dans la première partie de caractérisation phénotypique des différents isolats (**Tableau12**).

**Tableau 12.** Récapitulatif des principales caractéristiques biochimiques et d'antibiorésistance des salmonelles choisis pour l'analyse moléculaire (H : Origine Humaine, A : Origine alimentaire, ® : résistante, P.C : poulet de chair).

Souches	Origine	Année	ODC	H <sub>2</sub> S	SOR	RHA	MEL	SAC	INO	ATB/RES
S1(A)	Carcasse (P.C)	2008	-	-	-	-	-	-	-	NAL®
S2(A)	Carcasse (P.C)	2009	-	-	-	-	-	-	-	NAL® OFX®
S3(A)	Viande (P.C)	2009	+	+	+	+	+	-	-	NAL® OFX®
S4(A)	Oeuf (coquille)	2008	+	+	+	+	+	-	-	NAL®
S5(A)	Carcasse (P.C)	2007	+	+	+	+	+	-	-	SENSIBLE
S6(H)	Coproculture	2011	-	+	+	-	+	-	-	NAL®, NOF®, SXT®, TCY®
S7(H)	Coproculture	2008	+	+	+	-	+	+	+	NAL®, NOR®
S8(A)	PLAT (Viande Hachée)	2010	+	+	+	+	+	-	-	NAL®

Les trois techniques moléculaires choisies ont été réalisées suivant un ordre permettant une analyse moléculaire de différents composants génétiques : l'ADNr16S, gènes de ménage et les séquences répétées en tandem (TR) (**Figure27**).

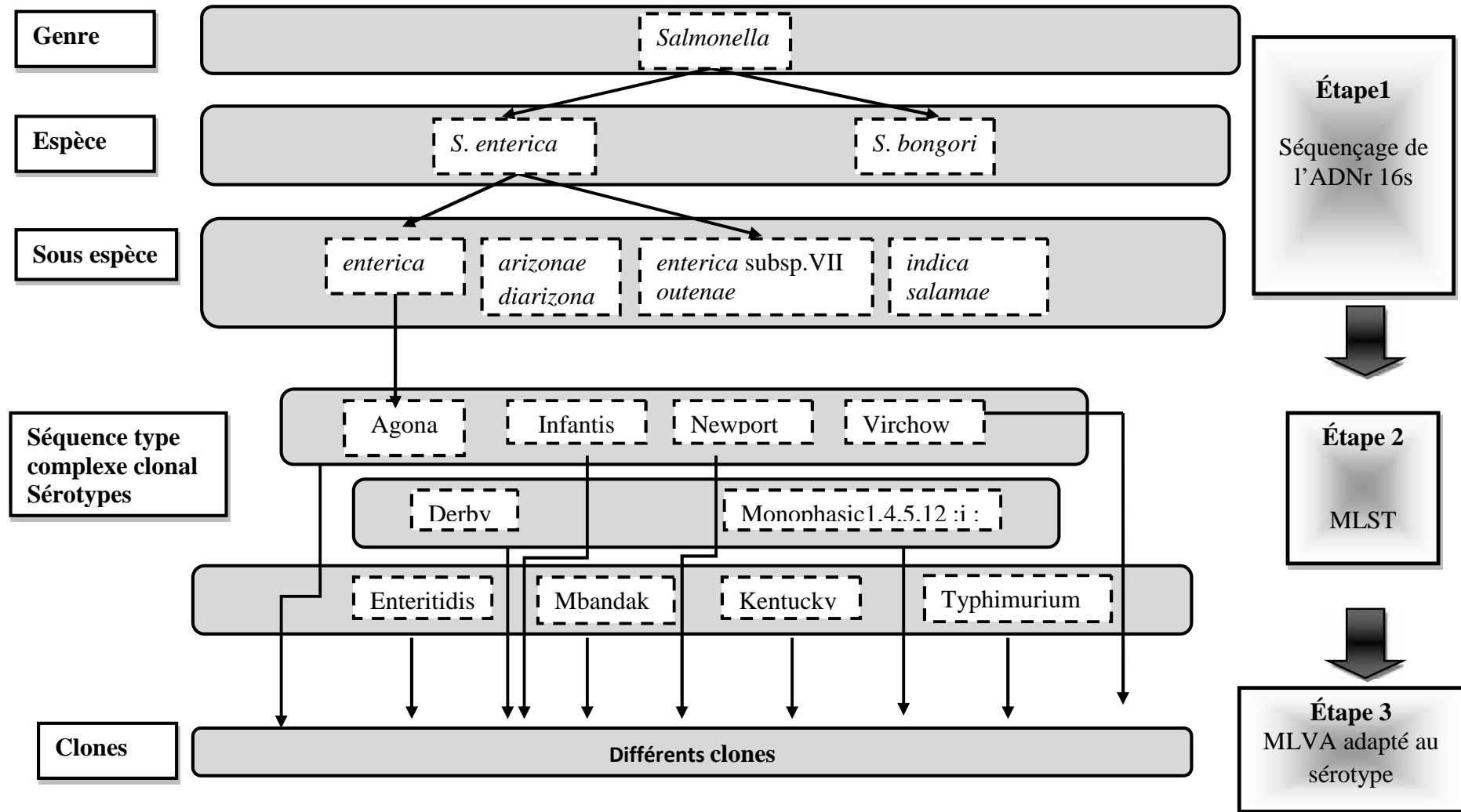


Figure 27. Arbre décisionnel pour la caractérisation moléculaire des salmonelles.

### 2.2.2. Étude moléculaire par séquençage de l'ADNr 16S du gène codant l'ARNr16S

Le gène ADNr 16S qui code pour l'ARNr 16S (ARN ribosomique 16S) est l'un des gènes les mieux conservés parmi les organismes procaryotes. Il a été choisi comme marqueur phylogénétique en constituant une base de comparaison efficace et fiable pour pouvoir comparer et différencier les bactéries entre elles. Il comporte des séquences internes très conservées à l'origine des amorces universelles pour l'amplification de l'ADNr 16S de la majorité des bactéries existantes et des séquences internes variables et hypervariables qui permettent de distinguer les espèces de bactéries entre elles et de les classer en fonction de leur phylogénie (Woese, 1987) (**Figure27**).

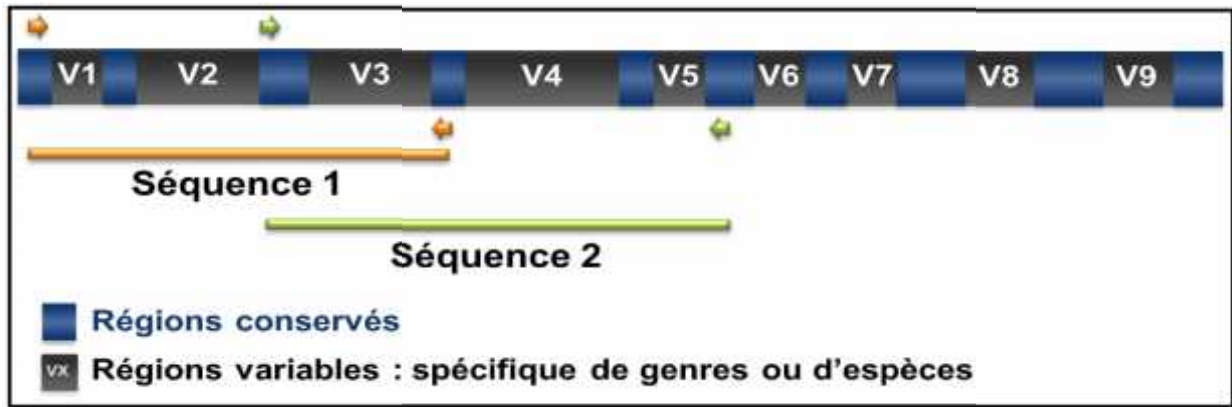
À ce jour, des milliers de séquences d'ARNr 16S ou du gène qui code pour (ARNr16S) sont à la disposition des scientifiques sur le réseau internet, dans des bases de données généralistes comme Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), LeBibi (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr>), ou des bases de données spécialisées comme le *ribosomal database project* (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu>) à l'Université du Michigan aux États-Unis, ou *the European ribosomal RNA database* à l'Université de Gand en Belgique (<http://www.psb.ugent.be/rRNA/index.html>).

#### ✓ Protocole opératoire séquençage de l'ADNr 16S du gène codant l'ARNr16S

Un des objectifs de notre travail est d'analyser après amplification une portion de l'ADNr 16S du gène codant l'ARNr16 contenant des régions hypervariables V1-V2-V3-V4-V5 (Séquence 1 et 2) spécifiques de genres ou d'espèces (**Figure28**). Une fois cette zone amplifiée, le séquençage des 2 brins d'ADN du produit obtenu est effectué, et les séquences sont assemblées à l'aide du logiciel Sequencher (Version 4.7) commercialisé par "Gene Codes Corporation". Les contigs sont ensuite comparés à la base de données «LeBibi» (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr>). Pour déterminer la «Séquences database» sur «Procaryota\_SSU-rDNA-16s\_TS\_Stringent », le «Nb seqs to align» à «50» et « Alignement » sur « FASTEST ».

Deux contrôles internes ont été utilisés pour valider les résultats :

Un contrôle négatif de PCR permet de valider l'absence d'une contamination du Mix et un ADN d' *E. coli* qui a été utilisé en parallèle (PCR et séquençage) comme contrôle positif interne de qualité.



**Figure28.** Schéma de la séquence de l'ADNr 16S avec la position des amorces et les régions couvertes par les séquences 1 et 2 amplifiées.

### 2.2.3 Étude moléculaire par MLST

Méthode basée sur l'analyse de la séquence de sept (07) gènes dits «gènes de ménage» dont l'expression est indispensable et qui est responsable du métabolisme de la cellule. Les gènes séquencés ont la particularité d'être indépendants des gènes de virulence de l'agent pathogène et de sa résistance aux antibiotiques. L'intérêt de cette méthode standard de séquençage est de permettre l'établissement d'importantes bases de données. Sept gènes de ménage ont été amplifiés par Polymérase Chain Reaction (PCR) puis séquencés. La combinaison d'allèles de ces sept marqueurs génétiques constitue un profil allélique qui correspond à une SéquenceType (ST). Les séquences assemblées sont comparées à la base de données MLST (MLST Database at UoW, University of WARWICK) ([mlst.warwick.ac.uk/mlst](http://mlst.warwick.ac.uk/mlst)) afin de déterminer le profil allélique, séquencetypes (ST), complexe clonal (CC) et le sérotype de nos isolats (**Figure27**).

#### ✓ Protocole opératoire MLST *Salmonella*

Le typage MLST a été réalisé en utilisant le protocole MLST décrit sur le site Web MLST (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica.html>). Les colonies de tous les isolats obtenus après incubation à 37° C pendant 18 à 24 heures mis dans 40 µl d'une solution tampon de lyse (50 µg/ml de protéinase K (Amresco, Solon, OH) en tampon TE (pH8), les cellules sont lysées par chauffage à 80° C pendant 10 minutes suivie par 55° C pendant 10 minutes dans un thermocycleur (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). La suspension définitive a été diluée 1/2 dans de l'eau stérile, centrifugé pour éliminer les débris cellulaires et transféré, dans un tube stérile.

L'amplification par PCR des 7 gènes de ménages a été effectuée comme suivant. Des paires d'amorces ont été utilisées pour amplifier l'ADN des gènes thrA, purE, sucA, hisD aroC, hemD et dnaN (**Tableau13, 14**). Toutes les réactions de PCR ont été effectuées en un volume de 50 µl contenant 1 µl de la matrice d'ADN, ADN polymérase Taq (Promega, Madison, Wisconsin) (1,25 U), 1 tampon X PCR (Promega), des amorces sens et antisens (0,1 µM) (IDT) et des DNTPs (200 µM) (Promega). Les réactions de PCR ont été effectuées dans un thermocycleur (Eppendorf) en utilisant les paramètres suivants 94°C pendant 30s ; suivi de 30 cycles à 95°C pendant 30 s ; 55°C 30s et 76°C pour 30s, avec une extension finale à 75°C pendant 2 min, 10 µl des produits PCR ont été chargés dans des gels d'agarose à 1 % dans 1 X TAE avec EZ One Vision (Amresco) pour une séparation électrophoretique des produits amplifiés à 100v en 1 X TAE pendant 60 minutes.

#### ✓ **Le séquençage des produits de PCR**

Tous les produits de PCR obtenus ci-dessus ont été purifiés et soumis au séquençage de la façon suivante. Le produit de PCR a été purifié de l'amorce d'amplification à l'aide du QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA) selon les instructions de fabricant. L'ADN purifié a été séquençé avec les amorces de séquençage pour chaque gène tel que décrit dans (**Tableau13**). Le Séquençage a été effectué sur un Applied Biosystems ADN Analyzer 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les données de séquence obtenues étaient importées dans DNASTar (Lasergene, Madison, WI), pour être alignées puis présentées sur le site de la base de données MLST (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>) pour attribuer un numéro pour l'allèle existant ou nouvel pour chaque gène de ménage, l'ensemble est enchaîné dans l'ordre aroC - DnaN - HEMD - hisD - Pure - SucA – thrA pour déterminer la sequencetype et le complexe clonal.

**Tableau13.** Amorces utilisées dans la technique MLST

([http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica\\_html](http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html))

Gene PCR Primers	Gene Sequencing Primers
thrA: F 5'-GTCACGGTGATCGATCCGGT-3'	thrA: sF 5'-ATCCCGGCCGATCACATGAT-3'
thrA: R 5'-CACGATATTGATATTAGCCCG-3'	thrA: sR 5'-CTCCAGCAGCCCCCTCTTCAG-3'
thrA: R1 5'-GTGCGCATACCGTCGCCGAC-3' (also Seq)	
purE: F 5'-ATGTCTTCCCGCAATAATCC-3'	purE: sF 5'-CGCATTATCCGGCGCGTGT-3'
purE: R 5'-TCATAGCGTCCCCCGGGATC-3'	purE: sF1 5'-CGCAATAATCCGGCGCGTGT-3'
purE: R1 5'-CGAGAACGCAAACCTTGCTTC-3'	purE: sR 5'-CGCGGATCGGGATTTTCAG-3'
	purE: sR1 5'-GAACGCAAACCTTGCTTCAT-3'
sucA: F 5'-AGCACCGAAGAGAAACGCTG-3'	sucA: sF 5'-AGCACCGAAGAGAAACGCTG-3'
sucA: R 5'-GGTTGTTGATAACGATACGTAC-3'	sucA: sR 5'-GGTTGTTGATAACGATACGTAC-3'
hisD: F 5'-GAAACGTTCCATCCGCGCAGAC-3'	hisD: sF 5'-GTCGGTCTGTATATCCCGG-3'
hisD: R 5'-CTGAACGGTATCCGTTTCTG-3'	hisD: sR 5'-GGTAATCGCATCCACCAATC-3'
aroC: F 5'-CCTGGCACCTCGCGTATAC-3'	aroC: sF 5'-GGCACCAGTATTGGCCTGCT-3'
aroC: R 5'-CCACACACGGATCGTGCG-3'	aroC: sR 5'-CATATGCGCCACAATGTGTTG-3'
hemD: F 5'-ATGAGTATTCTGATCACCCG-3'	hemD: sF 5'-GTGGCCTGGAGTTTCCACT-3'
hemD: F1 5'-GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG-3'	hemD: sF1 5'-ATTCTGATCACCCGCCCTC-3'
hemD: R 5'-ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA-3'	hemD: sR 5'-GACCAATAGCCGACAGCGTAG-3'
dnaN: F 5'-ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA-3'	dnaN: sF 5'-CCGATTCTCGGTAACCTGCT-3'
dnaN: R 5'-AATTTCTATTCGAGAGGATTGC-3'	dnaN: sR 5'-CCATCCACCAGCTTCGAGGT-3'
dnaN: R1 5'-CCGCGGAATTTCTATTCGAG-3' (also Seq)	

**Tableau 14.** Différents marqueurs génétiques utilisés dans la technique MLST

([http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica\\_html](http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html))

Locus	Fonction du gène
<b>thrA</b>	aspartokinase+homoserine dehydrogenase
<b>sucA</b>	alphaketoglutarate dehydrogenase
<b>purE</b>	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase
<b>hisD</b>	histidinol dehydrogenase
<b>hemD</b>	uroporphyrinogen III cosynthase
<b>dnaN</b>	DNA polymerase III beta subunit
<b>aroC</b>	chorismate synthase

✓ **Détermination des allèles, profils allélique et du complexe clonal**

La détermination des allèles et des profils a été réalisée sur le site MLST *Database* at UoW, University of WARWICK qui héberge les bases de données MLST et des outils d'analyse accessibles au public. Le résultat de la recherche attribue un numéro pour l'allèle à partir de la base de données possédant la séquence la plus proche de celle analysée



(Figure29). Une fois tous les allèles déterminés pour une souche, on peut soumettre le profil, ainsi que le numéro de la SéquenceType (ST) de la base de données correspondante au profil analysé, et enfin le complexe clonal (CC) ; les STs qui possèdent les mêmes allèles pour cinq des sept loci avec un autre isolat sont donc considérés comme appartenant au même complexe clonal (Figure30).



**Figure29.** Exemple de la détermination de numéro caractéristique de l'allèle correspondante au marqueur (**aroC**) en utilisant la base de donnée *MLST Database at UoW, University of WARWICK*.

ST	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA	ST Complex
<b>ST11</b>	5	2	3	7	6	6	11	4
<b>ST11</b>	5	2	3	7	6	6	11	4
<u>ST814</u>	233	2	3	7	6	6	11	4
<u>ST745</u>	214	2	3	7	6	6	11	4
<u>ST640</u>	5	2	3	7	6	11	11	4
<u>ST616</u>	5	2	130	7	6	6	11	4

ST	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA	ST Complex
<b>ST78</b>	5	2	42	7	31	6	11	4
<b>ST78</b>	5	2	42	7	31	6	11	4
<u>ST470</u>	5	2	3	7	31	6	11	4
<u>ST331</u>	122	2	42	7	31	6	11	4
<u>ST92</u>	5	2	3	7	31	41	11	4
<u>ST747</u>	5	2	147	7	31	41	11	4

ST	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA	ST Complex
<b>ST367</b>	14	112	43	123	118	115	120	37
<b>ST367</b>	14	112	43	123	118	115	120	37
<u>ST541</u>	14	162	43	123	118	115	120	37
<u>ST444</u>	14	112	43	123	118	147	120	37
<u>ST992</u>	14	2	43	88	6	2	181	
<u>ST1692</u>	14	107	43	156	64	151	87	

**Figure30.** Exemple de lecture du profil allélique, séquence type et complexe clonal correspondant à l'ensemble des souches testées (*MLST Database at UoW, University of WARWICK*).

#### 2.2.4. Étude moléculaire par MLVA

Elle exploite comme source de polymorphisme la variation du nombre de motifs dans les répétitions en tandem (VNTR), l'amplification par PCR d'une collection de loci répétés en tandem et la mesure de la taille des fragments amplifiés. Elles permettent d'assigner à une

souche une série de nombres correspondant aux unités répétées dans chaque locus (Vergnaud & Pourcel, 2009) (**Figure27**).

Des schémas MLVA pour certains sérotypes sont déjà établis pour d'autres ils sont en cours. Parmi les schémas MLVA qui ont été proposés sont ceux composés de (9) et (10) marqueurs (Malorny *et al.*, 2008 ; Boxrud *et al.*, 2007). Dans notre étude une méthode de typage MLVA normalisée pour *S. Enteritidis* ciblant cinq loci. Les (5) marqueurs sont respectivement (**SENTR7, SENTR5, SENTR6, SENTR4, SE3**) (**Tableau15**) (Hopkins *et al.*, 2011) et de (4) marqueurs pour *Salmonella Gallinarum* (**SGTR1, SGTR2, SGTR3, SGTR4**), (**Tableau17**) (Kang *et al.*, 2011).

#### ✓ **Protocole MLVA *salmonella* Enteritidis**

La souche de référence *Salmonella Enteritidis* NCTC 13349 lysotype 4 était la source des (TR) loci utilisés dans cette étude, identifiés en utilisant le programme Tandem Repeats Finder (version 4.0) (Benson, 1999). Les amorces ont été conçues en utilisant le programme DESIGNER 4.0 (Premier Biosoft, Palo Alto, CA).

Les amorces sens pour les loci SENTR4, SE-3 ont été marqués avec le colorant fluorescent VIC, SENTR5 et SENTR7 avec 6-FAM, SENTR6 avec NED (**Tableau16**). Les cinq loci ont été amplifiés en utilisant le PCR multiplex Kit (Qiagen, Royaume-Uni), 0,5 pmol d'amorce pour amplifier le loci SENTR4, 1 pmol d'amorces pour SENTR5, SENTR6 et SE-3, 0,5 pmol d'amorce ciblant SENTR7 et 1µl d'un lysat cellulaire préparé en émulsionnant une colonie de *Salmonella* cultivée pendant une nuit sur gélose Müller-Hinton (Oxoid GmbH, Wesel, Allemagne) à 37°C dans 100 µl d'eau distillée stérile portée à ébullition pendant 10 minutes. La PCR a été réalisée dans un Gene-Amp 9700 Cycler (Applied Biosystems). Les conditions étaient à 95°C pendant 15 min, suivie par 28 cycles à 94°C pendant 30s, 55°C pendant 90s et 72°C pendant 90s. Une élongation finale à 72°C pendant 10min a été utilisée. Les produits d'amplification ont été dilués 1/40 dans l'eau distillée stérile 1µl de cette dilution est mélangé avec 10µl Hi-Di formamide (Applied Biosystems, Royaume-Uni) et 0,5µl GeneScan1200 LIZ (Applied Biosystems) avant d'être soumise à l'électrophorèse capillaire en utilisant un polymère de POP7 ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). L'électrophorèse a été effectuée à 60° C pendant 45min, les données ont été importées dans un logiciel de pointe Scanner (Applied Biosystems) où chaque fragment été identifié selon la couleur et la taille. La désignation des profils était basée sur une chaîne de nombres d'allèles dans l'ordre de (SENTR7-SENTR5-SENTR6-SENTR4-SE3) montrant le nombre réel de répétitions à chaque locus.

**Tableau15.** Caractéristiques et spécificités des marqueurs (MLVA) de *Salmonella* Enteritidis (Malorny *et al.*, 2008).

Locus name (locus name in Boxrud <i>et al.</i> )	Repeat size (bp)	No. of repeats in strains		Gène / région
		NCTC 13349 <sup>a</sup>	07-2642 <sup>b</sup>	
SENTR4 (SE-1)	7	4.9	4.9	Putative bacteriophage tail protein, STY631a homologue
SENTR5 (SE-5)	6	10.0	10.0	yoh
SENTR6 (SE-2)	7	5.1	5.1	non-
SENTR7 (SE-9)	9	3.1	3.1	ush
SE-3 <sup>d</sup>	12	3.0	3.0	non-

a *S. Enteritidis* NCTC 13349

b number of repeats confirmed by DNA sequencing, DNA sequences identical to NCTC 13349.

c SENTR2 corresponds to Locus STTR7 in Lindstedt *et al.*

d adapted from Boxrud *et al.*

e repeat units consist of a 29 bp highly conserved 5'-sequence and a 32 bp variable 3'-sequence.

**Tableau16.** Séquences des amorces utilisées pour le typage par MLVA de *S. Enteritidis* (Hopkins *et al.*, 2011)

Locus	Primer	Dye-Sequence
SENTR4	SENTR4-F	<b>VIC</b> -GACCAACACTCTATGAACCAATG
	SENTR4-R	ACCAGGCAACTATTCGCTATC
SENTR5	SENTR5-F	<b>FAM</b> -CACCGCACAATCAGTGGAAAC
	SENTR5-R	GCGTTGAATATCGGCAGCATG
SENTR6	SENTR6-F	<b>NED</b> -ATGGACGGAGGCGATAGAC
	SENTR6-R	AGCTCACAATTTGCGTATTCG
SENTR7	SENTR7-F	<b>FAM</b> -ACGATCACCACGGTCACTTC
	SENTR7-R	CGGATAACAACAGGACGCTTC
SE-3	SE-3F	<b>VIC</b> -CAACAAAACAACAGCAGCAT
	SE-3R	GGGAAACGGTAATCAGAAAGT

### ✓ Protocole opératoire MLVA *Salmonella Gallinarum*

La souche de référence *Salmonella Gallinarum* 287/91 était la source des (TR) loci dans cette étude, identifiés en utilisant le programme Tandem Repeats Finder (version 4.0) (Benson, 1999). Les amorces ont été conçues pour chaque lieu de TR en utilisant le programme Primer3 (v0.4.0) (Rozen & Skaletsky, 2000).

La PCR a été réalisée dans un mélange réactionnel composé de 25 microlitre d'un tampon réactionnel (Promega, Madison, Wisconsin, États-Unis), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de chaque désoxynucléotide triphosphate (Promega), 400 nM de chaque amorce (Bioneer, Daejeon, Corée) pour quatre VNTRs sélectionnés pour le test MLVA conjuguée à un à fluorophore (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) (**Tableau17**), et 1 unité de Taq polymérase ADN (Promega). Quelques colonies de bactéries isolées sur des plaques d'agar, qui proviennent d'une seule colonie, ont été mis en suspension dans 100 ml de tampon TE dans un tube à centrifuger. La suspension cellulaire bouillie dans un bain d'eau pendant 5 min, puis centrifugés pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et utilisé en tant que matrice de PCR. Cette dernière comprenait une dénaturation initiale de 5 min à 94°C suivie de 30 cycles de 30 s à 94°C, 30 secondes à 62°C, et 30 s à 72°C avec une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2%. La taille des produits ont été estimés à l'aide d'un analyseur d'ADN ABI 3730xl (Applied Biosystems). Les fichiers de trace des 3730xl ABI ont été analysés à l'aide GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems). Si la différence de taille de l'allèle a été de plus de 2 pb, les allèles représentatifs ont été sélectionnés et séquencés pour confirmer la différence dans le nombre d'unités de répétition.

Pour le séquençage, la PCR individuelle a été réalisée sans un fluorophore tel que décrit ci-dessus. Les produits de PCR ont été ensuite séquences sur les deux brins (Macrogen). Les séquences ont été éditées et analysées avec le logiciel Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA). les allèles ont été nommés comme décrit précédemment (Larsson *et al.*, 2009). Les Profils MLVA ont été enregistrés en tant que données de caractères en utilisant des profils alléliques sur la base du nombre d'unités répétées (SGTR1 à SGTR4).

**Tableau17.** Caractéristiques des marqueurs et Séquences des amorces utilisées pour le typage par MLVA de *Salmonella* Gallinarum (Kang *et al.*, 2011).

Tandem repeat <sup>a</sup>	Consensus	Period size	bCopy number	Primer (5 3 )	Allele number	Gene/region
SGTR1	ACCCTCTT	8	4 to 20 (13)	<b>6-FAM</b> CGCCCGTTCG TTACTTTTAC GGTTCAACAG GTGGAACAGG	(X to 130)/ 8	Unknown
SGTR2	GCGGCGAAAGC GGCGGCGGAGG CGAAGAAGAAA GCGGATGCCGA G	45	10 to 11 (11)	<b>VIC-</b> GCAAAAGCAG GCTGAAGAAG AGATCGCCAA GCAGATCGT	(X to 103)/45	tolA
SGTR3	GTTGGTA	7	5.9 to 16.9 (8.9)	<b>NED-</b> CAGCCATCCA TACCAAGACC CTTTGGGCAG ATATCGGAAA	(X to 133)/7	Pseudo; phage tail protein
SGTR4	GTAGCGCCGCA GCCGCAGTATC AGCAGCCGCAA CAGCCG	39	4.3 to 8.1 (7.3)	<b>PET-</b> GTGTCATGCC CGAGTCAAC GGACGCTGTA ATGGACGACT	(X to 110)/39	ftsK

SGTR2 correspond au SE-10 (Boxrud *et al.* 2007) et SENTR1 (Malorny *et al.* 2008),  
SGTR3 correspond au SE-1 (Boxrud *et al.* 2007) et SENTR4 (Malorny *et al.* 2008),  
SGTR4 correspond au STTR7 (Lindstedt *et al.* 2004) et SENTR2 (Malorny *et al.*, 2008).

<sup>b</sup> Nombre de copies et taille des amplicons des SGTRs spécifiques au *salmonella* Gallinarum 287/91.

### 2.2.5. Analyse des données

Réalisés en partie à l'aide du logiciel d'analyse et de traitements statistiques des données, package XL-Stat version 2013 pour Windows (ADDINSOFT, 2013).

Une Analyse Factorielle des correspondances (AFC) (analyse multidimensionnelle) a été effectuée. Elle donne une représentation graphique de nuage de points projetés dans les plans formés par les axes pris deux à deux. Pour faire la correspondance entre les différentes souches sélectionnées (MLST) et les différents marqueurs choisis.

La technique de l'AFC est essentiellement utilisée pour des tableaux de données toutes comparables entre elles (si possible exprimées toutes dans la même unité, comme une monnaie, une dimension, une fréquence ou toute autre grandeur mesurable). L'AFC sert à déterminer et à hiérarchiser toutes les dépendances entre les lignes et les colonnes du tableau (Legendre & Legendre, 1998).

Nous avons réalisé une analyse phylogénétique en utilisant les séquences du gène AD N r16S. A cet effet, nous avons utilisé pour chaque souche les séquences obtenues lors de cette étude ainsi que d'autres obtenues à partir des bases de données (GeneBank) pour des souches cataloguées, et utilisées comme séquences guides. L'arbre phylogénétique a été établi en utilisant la méthode «Neighbor-Joining». C'est une méthode de distance, basée sur le nombre moyen de substitutions nucléotidiques entre des séquences prises deux à deux. Elle permet de trouver les paires de séquences les plus «Voisines» qui minimisent la somme des longueurs des branches à chaque étape de regroupement. Elle génère un arbre selon l'évolution minimale et donne de bons résultats pour des séquences proches. Elle traite toute les substitutions de manière équivalente, ce qui fait perdre des informations et ne peut être appliquée à des séquences très éloignées. C'est une méthode de distance qui sous estime le nombre de mutations car les substitutions simplement dénombrées et ne sont pas pondérées (Saitou & Nei, 1987).

## 2.3. RÉSULTATS

### 2.3.1 Étude moléculaire par séquençage l'ADNr 16S

L'ADNr 16S qui code pour les ARN ribosomale 16S des souches de Salmonelles ont été d'abord amplifiés par la technique de la PCR. Une électrophorèse des produits de la PCR est effectuée sur gel d'agarose. Les produits de la PCR purifiés des huit souches ont été séquencés et les séquences obtenues ont été comparées avec celles d'autres bactéries (genre *Salmonella*) de la base de données LeBibi.

L'analyse des séquences d'ADNr 16S de la banque des souches a indiqué que les isolats étaient apparentés à des organismes cultivés de la famille des *Enterobacteriaceae* provenant d'aliments et les êtres humains. Elles sont affiliées à (100%) à un seul genre (*Salmonella*), une seule espèce (*enterica*) et sous espèce (*enterica*) (**Tableau18**).

**Tableau18.** Identification bactérienne obtenus après séquençage des régions hypervariables V1-V2-V3-V4-V5 avec la base de données « LeBibi ».

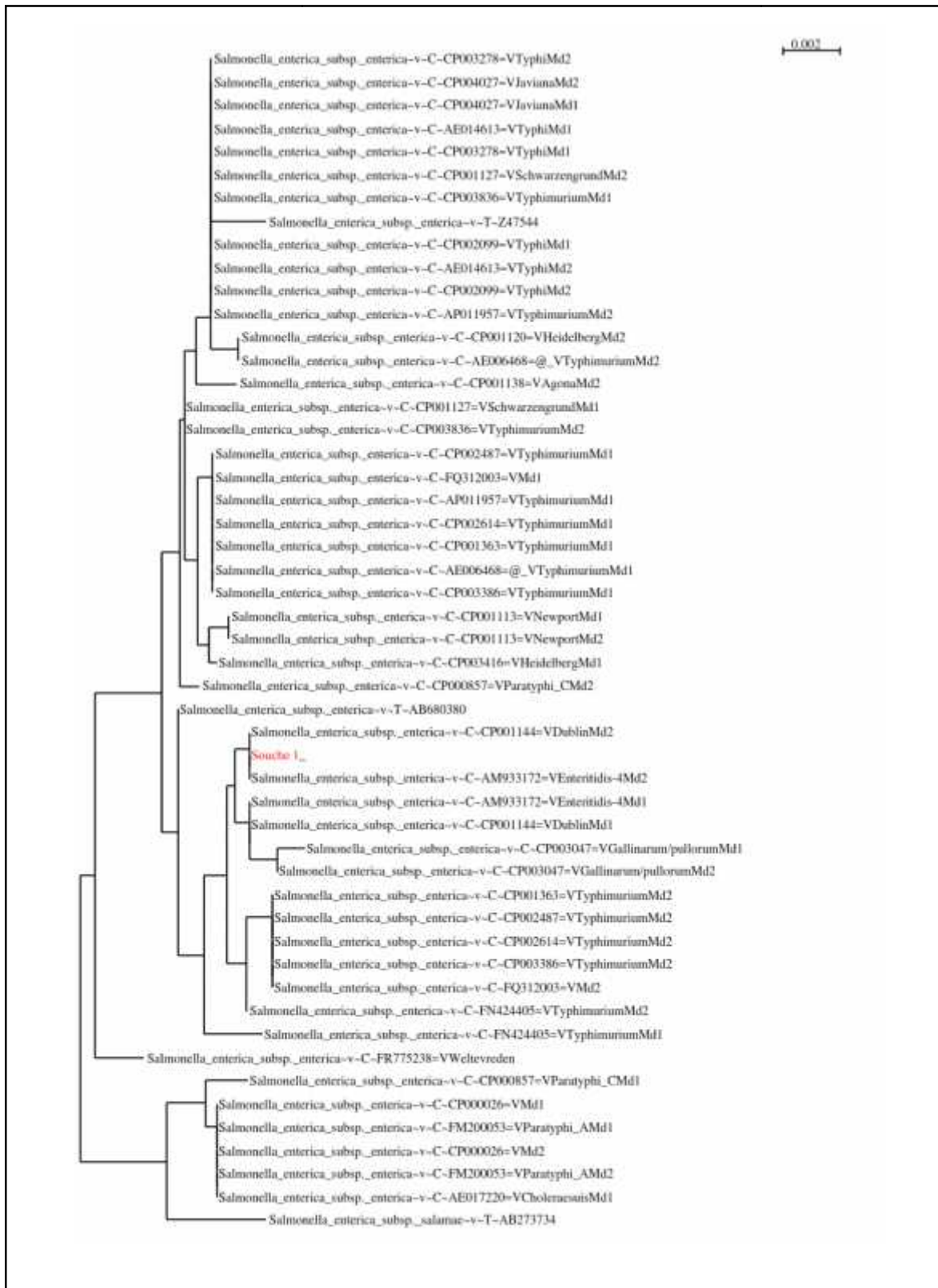
Nom	Espèce	Régions hypervariable		
		Sous-espèce	% de similitude	pb
<b>Souche1</b>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i>	100	1035/1035
<b>Souche2</b>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i>	99,00	1038/1039
<b>Souche3</b>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i>	99.00	1037/1038
<b>Souche4</b>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i>	100	1042/1042
<b>Souche5</b>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i>	99.00	1033/1034
<b>Souche6</b>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i>	99.00	535/537
<b>Souche7</b>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica/salamea</i>	99.00	978/980
<b>Souche8</b>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i>	99.00	994/995

La séquence d'ADNr 16S ribosomal de la souche 1 présente une excellente homologie de (100%) aux séquences des souches type de *Salmonella* Dublin CP001144-Md2 et la souche

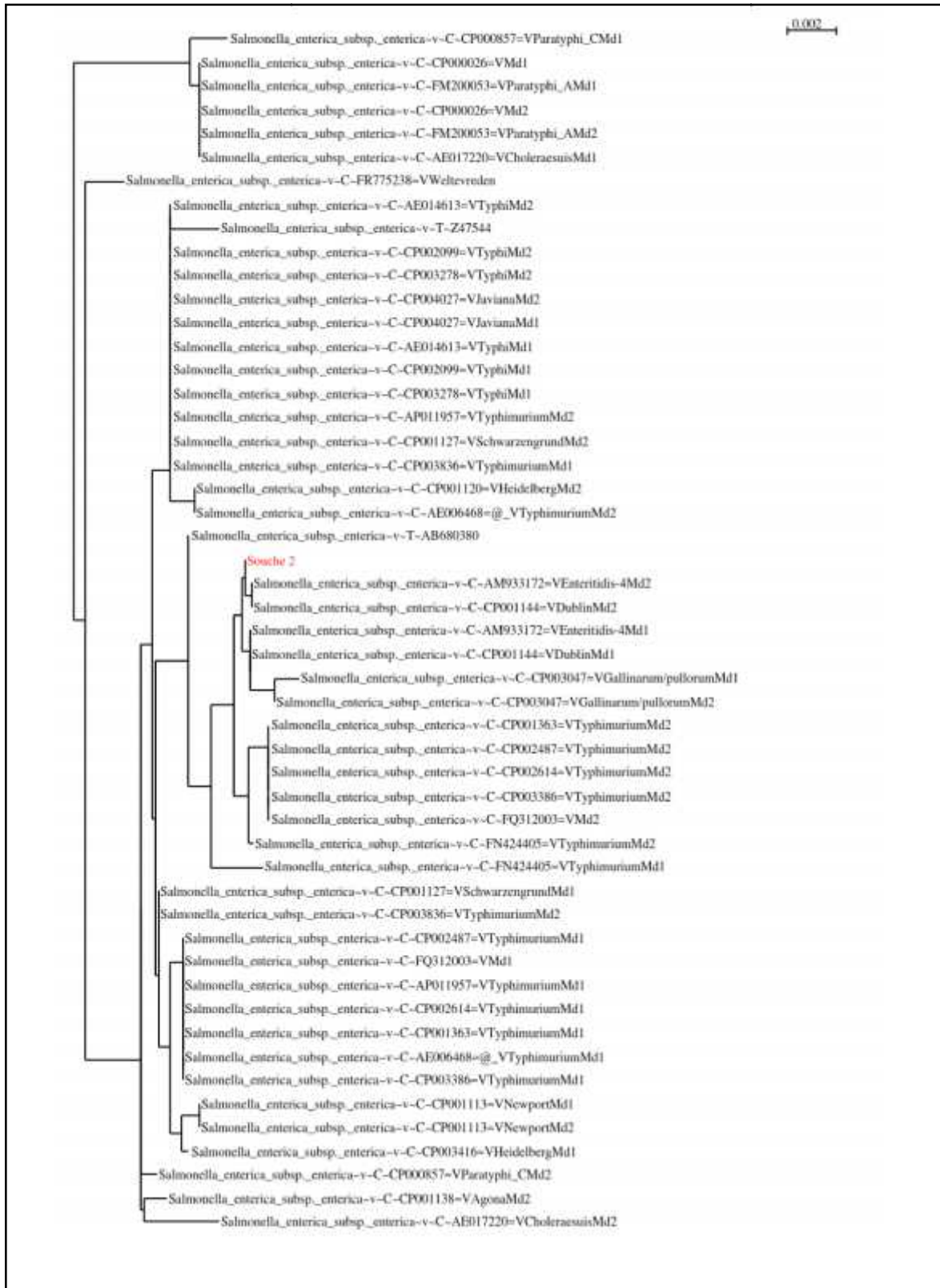


*Salmonella* Enteritidis AM933172-4Md2 (**Figure31**) respectivement. Alors que la séquence 16S d'ADN ribosomal de la souche 2 montre une homologie supérieure ou égale à 99% aux séquences de la souche type *Salmonella* Enteritidis AM933172-4Md2 (**Figure32**).

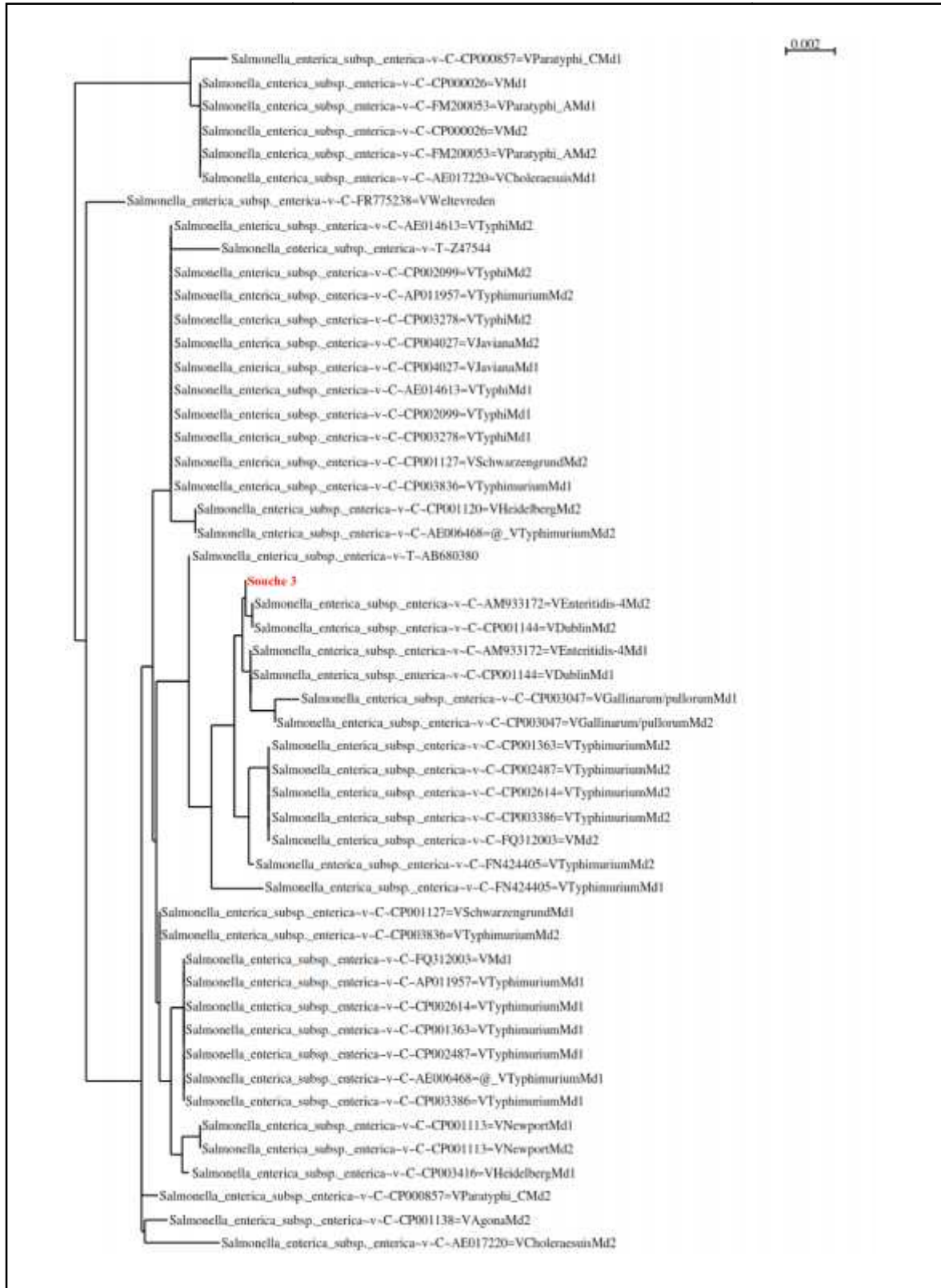
Les séquences des souches 3, 4, 5 et 8 sont affiliées aux membres du genre *Enterobacteriaceae* avec une homologie comprise entre 99% et 100% avec les souches types des espèces de *Salmonella* Dublin CP001144-Md2 et *Salmonella* Enteritidis AM933172-4Md2 (**Figure33, 34, 35, 38**). En effet la souche 6 d'origine humaine présente une homologie d'ADNr 16S d'ordre de 99% aux séquences de la souche type *Salmonella* Agona CP001138-Md2 (**Figure36**), de même pour la souche 7 qui a présenté une homologie de 99% avec les deux autres souches types *Salmonella* Paratyphi CP000857-CMd1 et *Salmonella salamae* AB273734 respectivement (**Figure37**). Cependant, ce degré élevé de similitude n'inclut pas nécessairement ces isolats dans les sérotypes déterminées antérieurement Galinarum et Enteritidis.



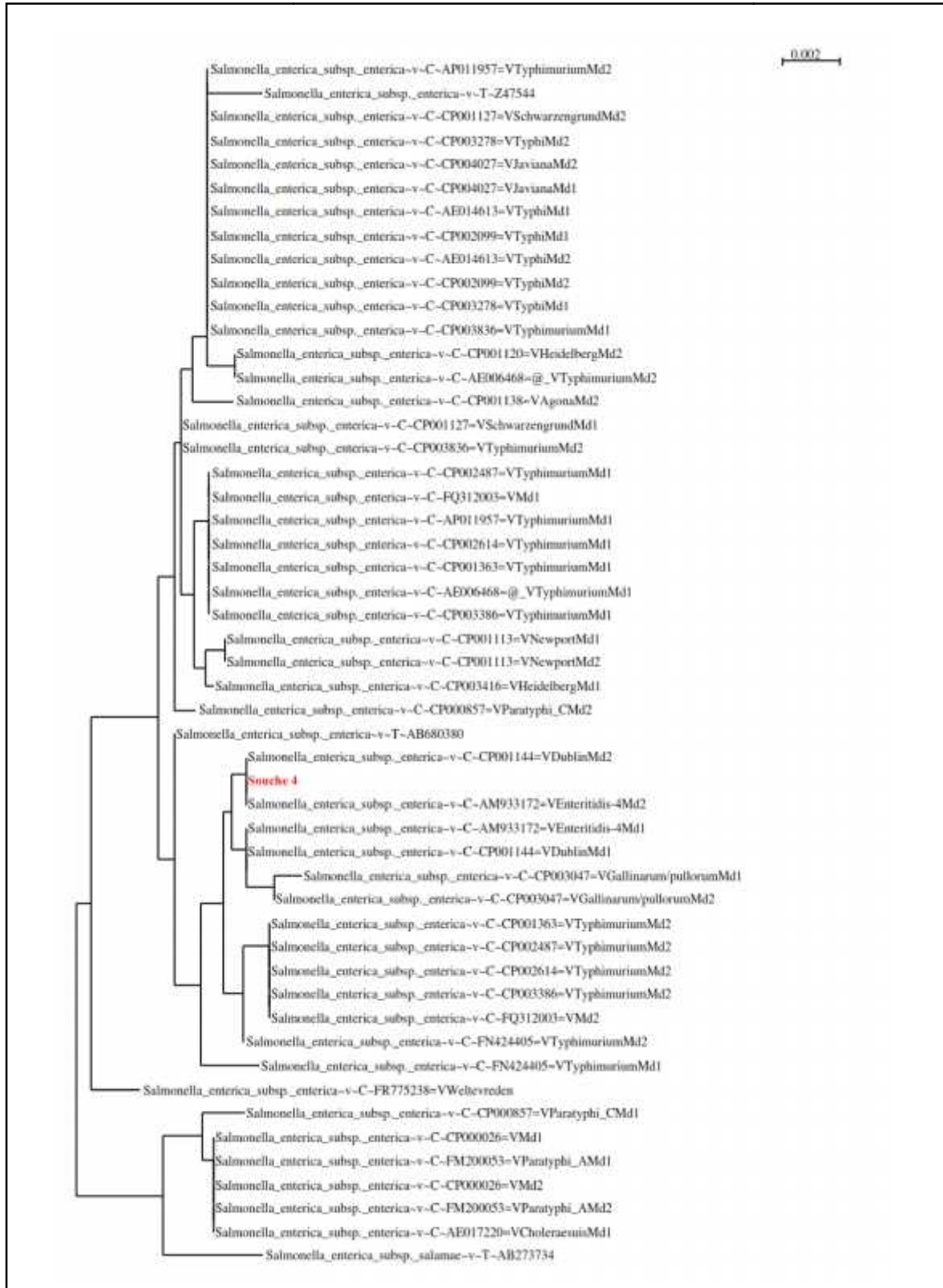
**Figure 31.** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 1 affiliée au genre *Salmonella*. La barre représente 2 substitutions par 1000 nucléotides.



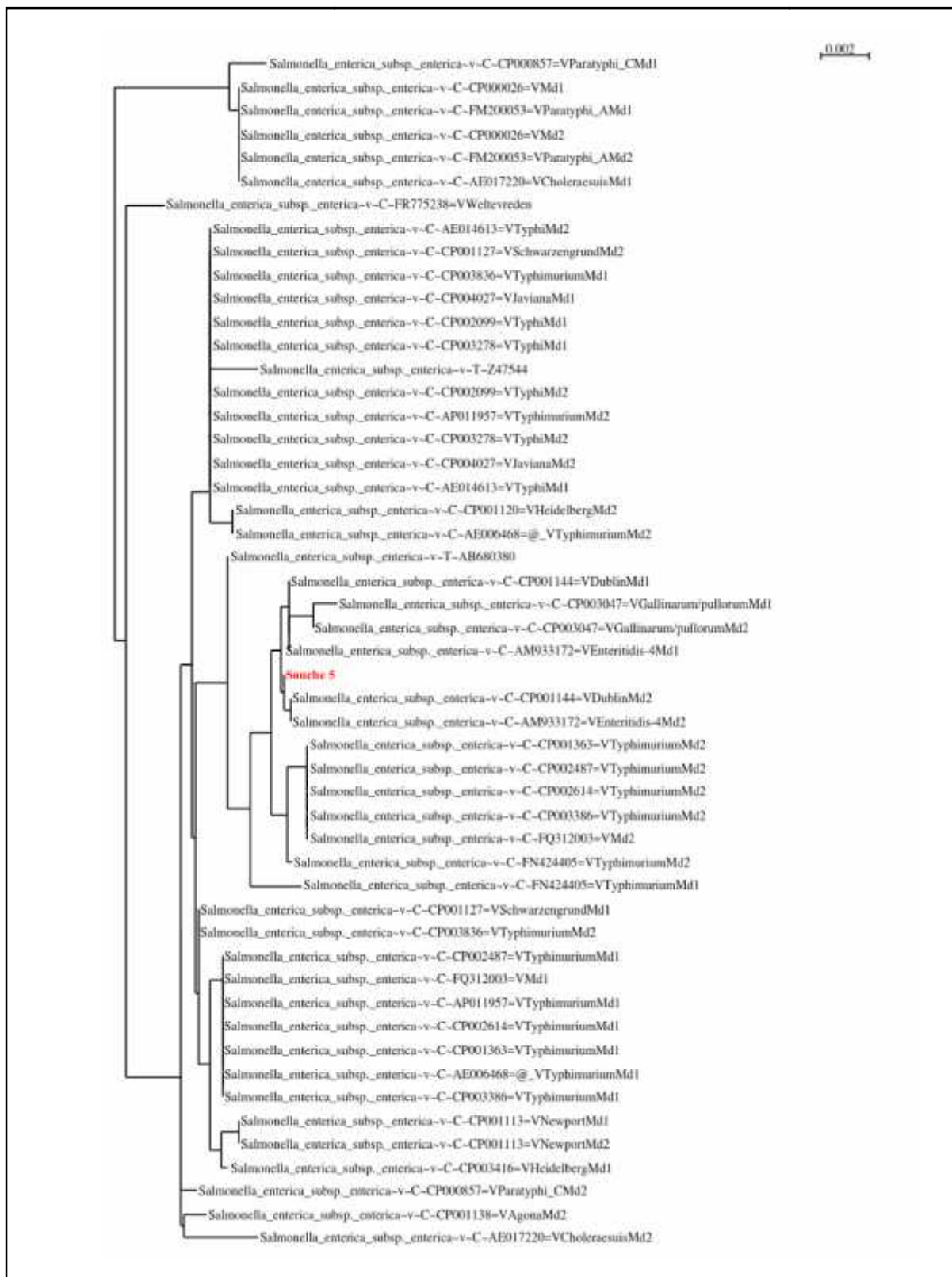
**Figure32.** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 2 affiliée au genre *Salmonella*. La barre représente 2 substitutions par 1000 nucléotides.



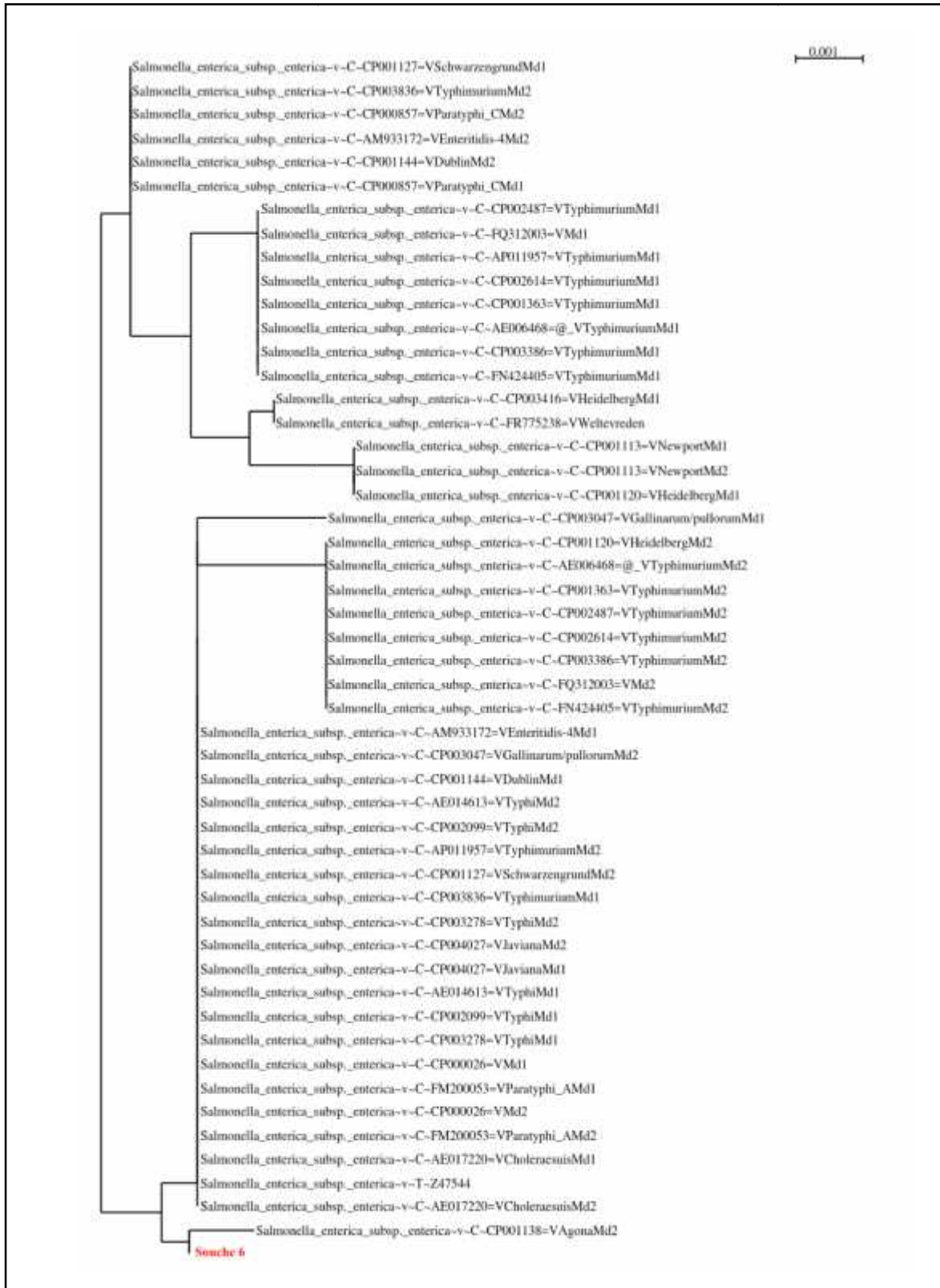
**Figure33.** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 3 affiliée au genre *Salmonella*. La barre représente 2 substitutions par 1000 nucléotides.



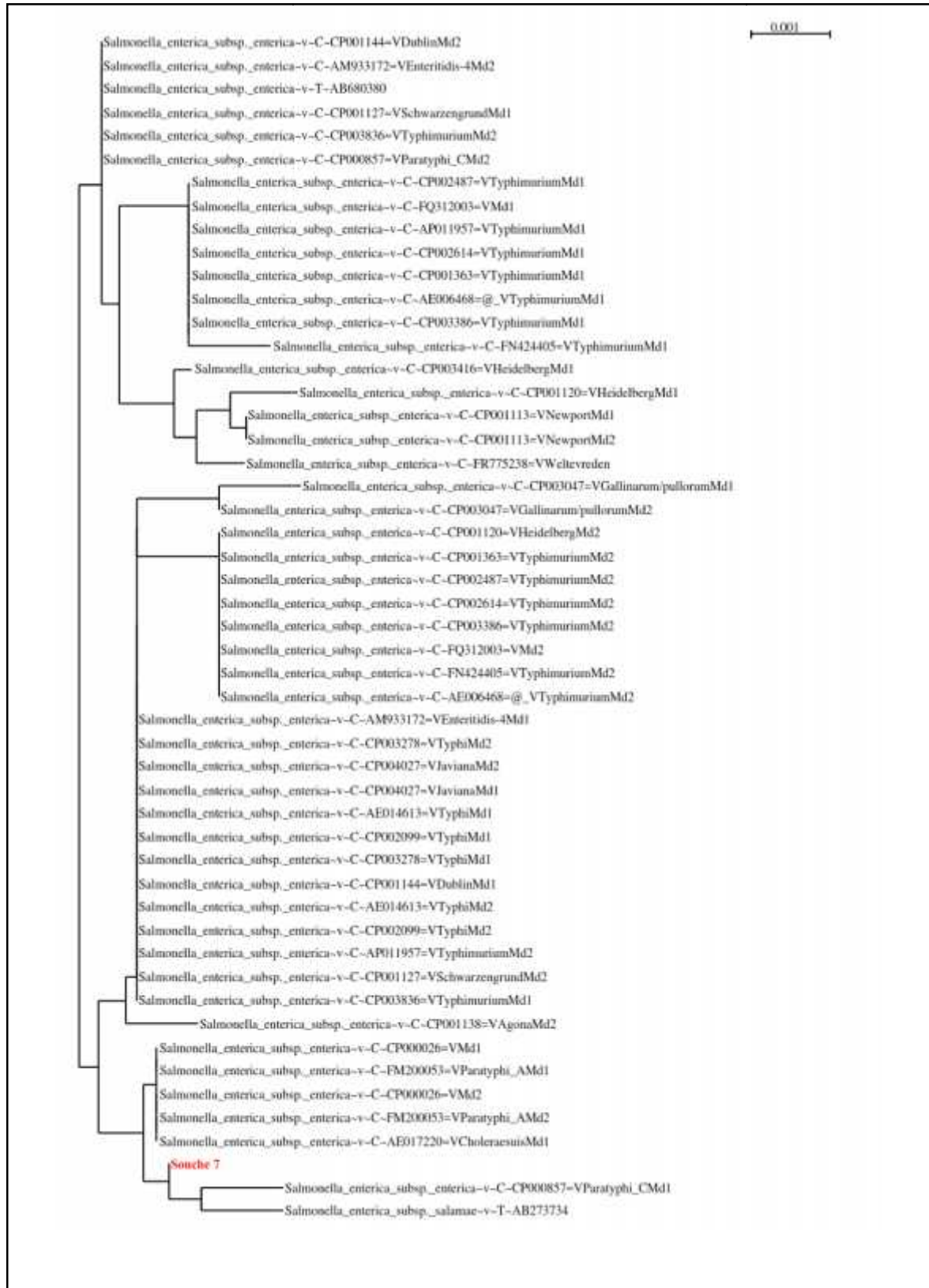
**Figure 34.** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 4 affiliée au genre *Salmonella*. La barre représente 2 substitutions par 1000 nucléotides.



**Figure35.** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 5 affiliée au genre *Salmonella*. La barre représente 2 substitutions par 1000 nucléotides.

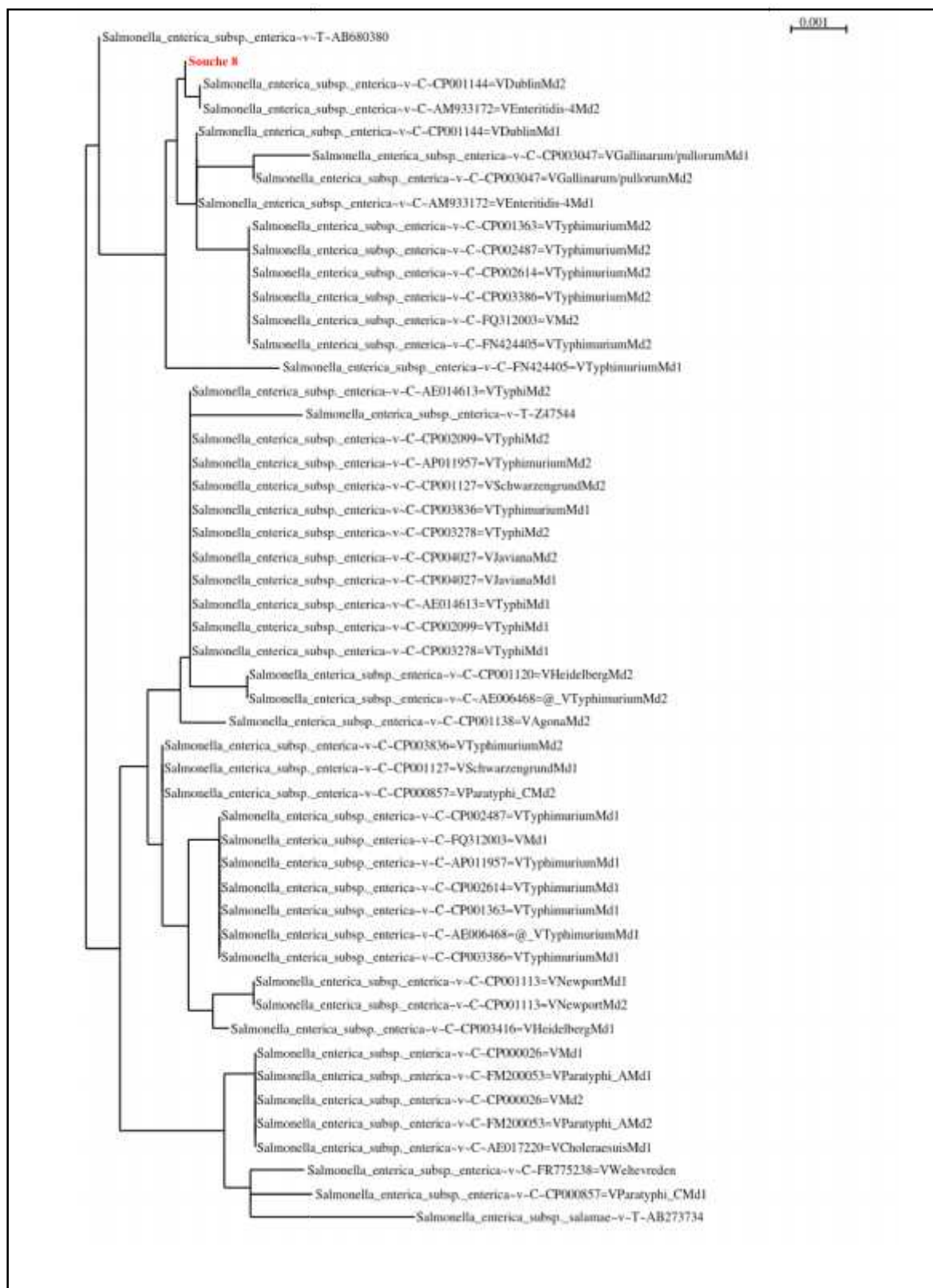


**Figure36.** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 6 affiliée au genre *Salmonella*. La barre représente 1 substitution par 1000 nucléotides.



**Figure37.** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 7 affiliée au genre *Salmonella*. La barre représente 1 substitution par 1000 nucléotides.





**Figure38.** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 8 affiliée au genre *Salmonella*. La barre représente 1 substitution par 1000 nucléotides.

### 2.3.2. Étude moléculaire par MLST

#### ➤ Profils alléliques, Séquences Types et complexes clonaux des différents isolats

Les séquences des sept loci MLST ont été identifiées pour les (08) souches de deux origines et les profils alléliques ont pu être assignés. Trois **STs** sont identifiés parmi les séquences répertoriées dans la base de données MLST (**ST-78**, **ST-11**, **ST-367**). La totalité des **STs** ont été décrites précédemment. Le profil allélique le plus représenté est le **ST-11** (4 souches soit 50 % du total), le **ST-78** (2 souches soit 25% du total) et le **ST-367** (une souche seulement soit 12.5 %) (**Tableau19**).

L'analyse des souches avec la même base des données a permis de regrouper les souches dans deux grands complexes clonaux, **CC-04**, et le **CC-37** (**Tableau19**). La majorité des souches analysées appartiennent aux complexe clonal **CC-04** (06 souches soit 75%), uniquement une souche appartient au complexe clonal **CC-37** ( 12.5 %).

Pour l'isolat **S7** et les marqueurs (**dnaN**, **thrA**), des produits de PCR ou des séquences de qualité suffisante n'ont pu être obtenues : L'échantillon ne donne que cinq séquences exploitables sur sept. L'analyse MLST ne permet pas de déterminer avec plus d'exactitude la séquencetype le complexe clonal et le sérotype de cette souche de *Salmonella*.

**Tableau19.** Profils allélique, séquence type et complexe clonal de six (06) souches de *Salmonella enterica* d'origine alimentaire et deux (02) d'origine humaine obtenue par la technique MLST utilisant sept (07) marqueurs.

Isolats	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA	ST	CC	Serotype
Souche1	5	2	42	7	31	6	11	78	4	<i>S. Gallinarum</i>
Souche2	5	2	42	7	31	6	11	78	4	<i>S. Gallinarum</i>
Souche3	5	2	3	7	6	6	11	11	4	<i>S. Enteritidis</i>
Souche4	5	2	3	7	6	6	11	11	4	<i>S. Enteritidis</i>
Souche5	5	2	3	7	6	6	11	11	4	<i>S. Enteritidis</i>
Souche6	14	112	43	123	118	115	120	367	37	<i>S. Cerro</i>
<b>Souche7</b>	2	<b>X</b>	9	9	5	9	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	Heidelberg, Typhimurium, Agona diphasic, Derby diphasic, Crossness
Souche8	5	2	3	7	6	6	11	11	4	<i>S. Enteritidis</i>

➤ **Corrélation Séquence Types, complexes clonaux et sérotype des souches**

Il existe une très grande corrélation entre les STs et les sérotypes. Ainsi, toutes les souches ST-11 et ST-78 sont respectivement composés de sérotype *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Gallinarum. D'un autre coté on a noté une absence de corrélation entre les sérotypes et les complexe clonaux. Ainsi, les souches de deux sérotypes Gallinarum et Enteritidis appartiennent au même complexe clonal CC -04 (**Tableau19**).

➤ **Corrélation entre Séquence Types, complexes clonaux et biotypes des souches**

Pour *Salmonella* Enteritidis, il n'existe pas une corrélation étroite entre le biotype et la séquence type, où les différents biotypes appartiennent à la même séquence type (ST-11). Par contre, les autres sérotypes analysés (Galinarum et Cerro), il semble hautement lié à une unique et différente séquence type (ST78, ST367) respectivement. D'un autre côté, l'absence de lien entre le biotype et le complexe clonal est clair où la majorité des souches ont été inclus dans le complexe clonal CC-04.

➤ **Corrélation entre Séquence Types, complexes clonaux et antibiotypes des souches**

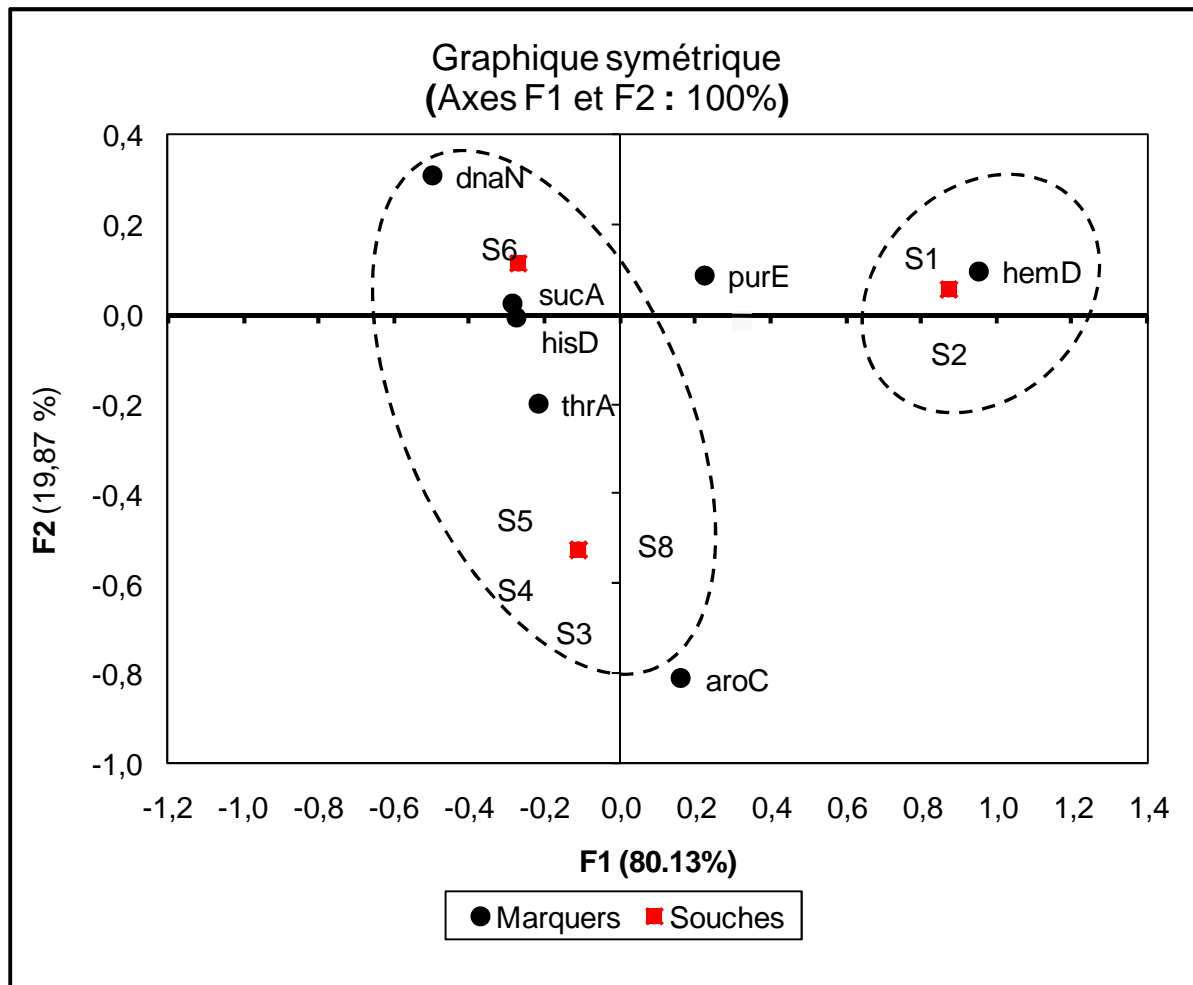
Il n'existe pas de corrélation vrai entre antibiotypes d'un côté, séquencetype et complexe clonal d'un autre coté où des profils similaires ont été réparties sur des séquencetypes différentes ST-11 et ST-78, inclus dans le même complexe clonal à la fois CC-04.

➤ **Analyse factorielle des correspondances (AFC)**

L'analyse factorielle des correspondances (AFC) (**Figure39**) appliquée pour la distribution des marqueurs spécifiques des souches est représentée sur le plan factoriel (F1xF2) avec le maximum d'inertie 94,18% (axe1= 80.13%, axe2=19,87%). Le plan (F1xF2) permet de mettre en évidence deux ensembles par rapport à l'axe des abscisses (100%) ; concernant la répartition des marqueurs signalées et les souches analysées.

**Groupe 1 :** composé essentiellement d'un groupe de valeurs positives par rapport à l'axe des abscisses. Il est formé par les deux souches (1, 2) analysée pour l'espèce *S. Gallinarum* caractérisé par le marqueur hemD et purE.

**Groupe 2 :** des valeurs négatives à l'axe des abscisses, composé essentiellement d'un groupe de souches (3, 4, 5, 6 et 8) caractérisées par un ensemble des marqueurs (dnaN, sucA, hisD, thrA).



**Figure39.** Analyse factorielle (AFC) de la distribution des marqueurs (MLST) suivant les différents isolats de *Salmonella*.

### 2.3.3 Étude moléculaire par MLVA

Neuf marqueurs de VNTRs sélectionnés et testés sur une collection de six souches (1,2, 3, 4, 5, 8) parmi les huit sélectionnées, pour déterminer la taille des fragments amplifiés obtenus par PCR et le nombre de répétition en tandem (TR) contenus dans les fragments. En outre, les deux souches (6 et 7) ont été exclues d'une part, vue l'absence d'un schéma MLVA de typage adapté pour le sérotype Cerro (souche 6) à nos jours, et la non caractérisation sérotypique par MLST de la souche 7.

- **Nombre de répétition en tandem (TR) (Tableau20)**

Les résultats obtenus pour chaque marqueur sont les suivants :

- Les marqueurs (**SENTR7** et **SE3**) : le nombre de répétition en tandem (**TR**) avec ces deux marqueurs est identique pour toutes les souches de *Salmonella* Enteritidis, trois (**TR**) par souche et une (**TR**) par souche respectivement.
- Le marqueur **SENTR5** : le nombre de répétition en tandem (**TR**) avec ce marqueur est peu variable d'une souche à l'autre, de neuf à onze (**TR**) par souche de *Salmonella* Enteritidis.
- Le marqueur **SENTR6** : le nombre de répétition en tandem (**TR**) avec ce marqueur est identique avec les trois souches de *Salmonella* Enteritidis (3, 4, 8), cinq (**TR**) par souche, par contre ce nombre est réduit en une (**TR**) avec la souche (5).
- Le marqueur **SENTR4** : le nombre de répétition en tandem (**TR**) avec ce marqueur est peu variable entre les quatre souches de *Salmonella* Enteritidis. Quatre (**TR**) pour les souches (3, 5, 8), et trois (**TR**) pour la souche (4).
- Les marqueurs (**SGTR1** et **SGTR4**) : Le nombre de répétition en tandem (**TR**) avec ces deux marqueurs est similaire pour toute les deux souches de *Salmonella* Gallinarum, neuf (**TR**) par souche et huit (**TR**) par souche respectivement.
- Le marqueur **SGTR2** : le nombre de répétition en tandem (**TR**) avec ce marqueur a été très différentes entre les deux souches de *Salmonella* Gallinarum, dix (**TR**) pour la souche 1 et absence de (**TR**) pour la souche 2.
- Le marqueur **SGTR3** : nombre de répétition en tandem (**TR**) avec ce marqueur est peu variable entre les deux souches, treize (**TR**) pour la souche1 et douze (**TR**) pour la souche 2.

**Tableau20.** Différents profils génétiques « MLVA » des souches de *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Gallinarum d'origine alimentaire.

<b>Marqueurs S. Enteritidis</b>					
<b>ISOLATS</b>	<b>SENTR7</b>	<b>SENTR5</b>	<b>SENTR6</b>	<b>SENTR4</b>	<b>SE3</b>
Souche3	3	10	5	4	1
Souche4	3	11	5	3	1
Souche5	3	11	1	4	1
Souche8	3	9	5	4	1
<b>Marqueurs S. Gallinarum</b>					
<b>ISOLATS</b>	<b>SGTR1</b>	<b>SGTR2</b>	<b>SGTR3</b>	<b>SGTR4</b>	
Souche1	9	10	13	8	
Souche 2	9	00	12	8	

## 2.4. DISCUSSION

Dans ce travail, trois techniques d'analyses moléculaires ont été utilisées (**séquençage de l'ADN16s, MLST, MLVA**), pour étudier les caractéristiques génétiques de la population de salmonelles sélectionnés sur la base de leur diversités phénotypique établie auparavant à partir de l'ensemble des souches de deux origines. Le présent document rapporte la diversité génétique des huit (08) isolats, représentés de manière graphique, et par des arbres phylogénétiques.

**Le séquençage de l'ADNr16S** a été utilisé dans notre étude pour visualiser la position taxonomique, confirmer l'identification biochimique et adapter les schémas de la caractérisation moléculaire de nos souches par les deux techniques (MLST) et (MLVA). Cette technique a permis d'éclaircir la phylogénie de ces dernières, l'alignement des séquences nucléotidiques avec celles de la base des données « LeBibi ». Le ribotypage a montré que sept de nos isolats appartiennent au genre *Salmonella*, espèce : *enterica* et la sous espèce *enterica* et une souche probablement caractérisée (subsp. *salamea* ou *enterica*). Chaque isolat présente une similitude avec plusieurs espèces de la banque de donnée «Genbank». Pour affilier chacun des isolats à l'une des espèces les plus proches, des arbres phylogénétiques représentant les relations phylogénétiques entre les séquences nouvellement obtenues et les séquences de référence dans la banque des données ont été construits par la méthode des distances «Neighbor- Joining», une méthode de distance basée sur le nombre moyen de substitutions nucléotidiques entre des séquences prises deux à deux. Elle permet de trouver les paires de séquences les plus voisines qui minimisent la somme des longueurs des branches de chaque étape de regroupement (Saitou & Nei, 1987).

Les différents types d'arbres qui ont été élaborés pour déterminer l'appartenance taxonomique aux espèces les plus similaires à nos isolats ont confirmé les résultats obtenus avec l'analyse biochimique qui avait comme limite l'identification du genre : *Salmonella*. Toute fois l'analyse moléculaire ADNr16S n'a pas pu déterminer le sérotype, ce qui renforce la place importante du sérotypage classique par agglutination sur lame ou en suspension en tube (Anne, 2001), sachant que la notion sérotype chez les salmonelles est équivalente à la notion espèce chez d'autre bactérie (Patrick *et al.*, 2007). Des résultats opposés ont été observés chez les bactéries lactiques ou l'analyse d'ARNr16S s'impose comme solution pour révéler le plus précisément possible l'identité de ces bactéries, c'est le cas d'étude mené par Moor *et al.*, (2006), qui a visualisé le niveau d'exactitude dans l'identification des entérocoques en utilisant des galeries biochimiques API 20 strep, qui est de l'ordre de 79%

pour le genre et 39% pour l'espèce, tandis qu'il est nettement supérieur en utilisant les séquences du groupes ARNr 16S de ces bactéries, qui est aux alentours de 100% pour révéler le genre et l'espèce de ce même groupe de bactérie (Moor *et al.*, 2006).

**L'étude moléculaire (MLST)** a permis d'individualiser sept sérotypes parmi les huit souches analysées, sans pouvoir déterminer avec exactitude le sérotype de la souche (7) d'origine humaine qui a montré surtout des caractéristiques biochimiques exceptionnelles (**Inositol+**), (**Saccharose+**), avec comme résultat probable un ensemble de sérotype (Heidelberg, Typhimurium, Agona diphasic, Derby diphasic, Crossness), ce qui montre les limites de typage de cette technique moléculaire de caractérisation. Par contre cette dernière a permis d'apprécier un sérotype rarement isolée chez l'humain et dans notre pays (*Salmonella* Cerro) (Hoelzer *et al.*, 2011), qui apparait dans notre étude non typable avec la méthode classique de sérotypage, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotype Cerro (formule antigénique 6,14, 18 :z4, z23 : [1, 5]), est un sérotype du séro groupe O : 18 (K). Cette bactérie rarement isolée en pathologie humaine et fréquemment isolée dans la filière bovine laitière dans certains pays. Dans une étude récente de *Salmonella* provenant de bovins laitiers à New York le sérotype Cerro était le sérotype le plus répandu et significativement associée à la maladie gastro-intestinale (Cummings *et al.*, 2010). L'isolement de ce sérotype a été décrite aussi à partir de l'œuf de poule, œufs de canard, (Saitanu *et al.*, 1994).

Des études moléculaires ont été menées sur ce dernier sérotype émergent en médecine vétérinaire, dont les résultats de la caractérisation par la technique MLST des souches de *Salmonella* Cerro au États-Unis ont montré la prédominance de la séquence type (ST367) à laquelle appartient notre isolat (Rodriguez *et al.*, 2014). Ce qui renforce l'hypothèse de l'émergence monoclonal mondial de ce sérotype méconnu dans notre pays et non identifié par les techniques phénotypique et spécifiquement par sérotypage, suite aux schémas d'agglutination mal conduit réduisant et éliminant l'utilisation des sérums polyvalent, qui renferme les anticorps dirigés contre la spécificité (O : 18) ainsi que les sérums monovalents correspondants.

L'homogénéité génétique intrasérotypique des isolats *Salmonella* Gallinarum ST-78, et *Salmonella* Enteritidis (ST-11), qui sont d'origines alimentaires différentes isolées de plusieurs types d'échantillons et à des intervalles de temps éloignés. Elle est expliquée probablement et dans un premier temps par l'origine géographique commune et très localisée de ces isolats (région de Tébéssa). Toute fois l'unique séquence type pour les deux sérotypes et surtout celle de *Salmonella* Enteritidis (ST11) renforce l'hypothèse de la dissémination mondiale de cette séquence type. Nos résultats sont comparables à ceux d'études

précédemment effectuées sur des souches de *Salmonella* Enteritidis isolées au Japon (Noda *et al.*, 2011), entre 1973 et 2004 les souches de *Salmonella* utilisées dans cette étude sont d'origine humaine provenant de différents foyers de toxi-infections alimentaires collectives (années 1973-1981), d'autres isolats humains (à partir de foyers individuels), une souche d'œuf liquide et l'autre isolé de la coquille. Toutes les souches ont été caractérisées (ST-11) suivant la base de données (<http://mlst.ucc.ie>), ce qui suggère que la lignée (ST-11) a survécu sans modifications génétiques importantes produites par les processus fondamentaux de la mutation et de recombinaison. Cette persistance de la clonalité de *Salmonella* Enteritidis au Japon soutient l'idée que la lignée ST-11 avait peut-être acquis une niche dans les organes reproducteurs de poulet. En plus selon la base des données MLST, la composition du ST-11, seul parmi tous les autres ST des souches d'origine humaine, renforce le lien entre aliments et humain (Noda *et al.*, 2011).

Parmi les sept marqueurs (**aroC**, **dnaN**, **hemD**, **hisD**, **purE**, **sucA**, **thrA**), le marqueur (**purE**) possédait un pouvoir discriminant élevé pour le sérotype *Salmonella* Gallinarum contrairement aux autres marqueurs qui sont avérés peu discriminants. De leur côté les deux marqueurs (**sucA** et **hisD**) caractérisent l'espèce *Salmonella* Cerro. Il est remarquable que les marqueurs les plus discriminants soient impliqués dans l'adaptation métabolique des salmonelles à spécificité d'hôte (Holt *et al.*, 2009; Thomson *et al.*, 2008). Toutefois on a noté l'absence de marqueur discriminant majeur pour le sérotype *Salmonella* Enteritidis.

Nos résultats montrent que les sérotypes identiques ont été regroupés dans une seule séquence type (100%) *Salmonella* Gallinarum ST-78 et (100%) *Salmonella* Enteritidis ST-11, ceci s'explique probablement par la spécificité des gènes de ménages explorés par la technique moléculaire MLST, qui sont le support génétique des spécificités métaboliques et non structurales (Maiden *et al.*, 1998).

Par contre, les mêmes biotypes et antibiotypes surtout de *Salmonella* Enteritidis ont été assemblés dans la même séquence type et un même complexe clonal. Ceci peut être expliqué par le nombre des tests biochimiques étudiés et de sensibilité aux antibiotiques qui sont nombreux (24 tests biochimiques et 18 tests de sensibilités aux antibiotiques), mais toute fois ils ne sont pas représentatifs de l'ensemble totale des caractéristiques métaboliques non exploré dans notre étude et qui peuvent être identiques dans l'ensemble et donc reflètent l'homogénéité allélique des différents marqueurs génétiques inclus dans notre analyse moléculaire (MLST).

L'étude moléculaire **MLVA**, avec l'ensemble de marqueurs utilisés (05) avec *Salmonella* Enteritidis SENTER7, SENTER5, SENTER6, SENTER4, SE3 et (04) avec *Salmonella* Gallinarum



SGTR1, SGTR2, SGTR3, SGTR4, a visualisé quatre (04) profils MLVA avec le premier sérotype : (3-10-5-4-1), (3-11-5-3-1), (3-11-1-4-1), (3-9-5-4-1) et deux (02) profils avec le deuxième serotype (9-10-13-8), (9-0-12-8). Les marqueurs utilisés dans cette étude ont permis d'obtenir (06) génotypes à partir de (06) isolats et de (02) sérotypes différents de *S. enterica*, ce qui témoigne un caractère très discriminant de cette technique moléculaire de caractérisation par rapport aux différentes techniques utilisées dans cette étude, que soit phénotypique ou moléculaire. Ce pouvoir discriminant a été prouvé et vérifié dans plusieurs études comparatives entre cette technique moléculaire (MLVA) et d'autres telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et la lysotypie (Boxrud *et al.*, 2007 ; Ross & Heuzenroeder, 2009).

Le sous-typage des souches par des méthodes moléculaires est un outil puissant pour la surveillance et l'investigation des flambées des épidémies d'origine alimentaire attribuables à *Salmonella* sérotype Enteritidis. Cependant, il a été entravé par le fait que *Salmonella* sérotype Enteritidis est l'un des sérotypes les plus génétiquement homogène de *Salmonella* est mal différencié par les méthodes couramment utilisées de sous-typage (Hilton *et al.*, 1996 ; Lin *et al.*, 1996 ; Lopes *et al.*, 2004 ; Ridley *et al.*, 1998 ; Rodrigue *et al.*, 1992 ; Wachsmuth *et al.*, 1991).

Le pouvoir discriminant apparaît remarquable avec les deux marqueurs (SENTR6) et (SGTR2). Ces deux derniers sont probablement impliqués dans l'interaction hôte-pathogène (antigène de virulence) ou dans l'interaction de l'agent pathogène avec l'environnement (division cellulaire) ce qui témoigne de l'ampleur des réarrangements génétiques en rapport avec la variabilité environnementale probable (Jordan *et al.*, 2003 ; Rocha *et al.*, 2002). Les autres marqueurs apparaissent peut ou faiblement discriminants.

L'impact de la qualité des marqueurs choisis et leurs nombre sur la reproductibilité des résultats a été toujours soulevés jusqu'à nos jours avec la technique MLVA. Une étude antérieure en Asie effectuée sur des salmonelles de différents sérotypes et de différentes origines (humaine, alimentaire et animale) a montré que le pouvoir discriminant des différents marqueurs choisis est variable, quatre marqueurs (STTR5, STTR3, STTR8 et Sal20) possédaient un pouvoir discriminant élevé pour l'ensemble des souches. Par contre le pouvoir discriminant des marqueurs (Sal06 et Sal10) était moins élevé que dans les études précédentes (vanCuyck *et al.*, 2011).

# Conclusion Générale

---

## Conclusion générale

Cette étude qui a été menée sur un ensemble de salmonelles non typhiques isolées à partir des aliments vecteurs principales des salmonelloses humaines et maillon central entre animal producteur et l'homme consommateur. Ce travail a été réalisé avec une approche comparative face à des souches d'origine humaine et qui a combiné différentes techniques de caractérisation phénotypiques et moléculaires (génétique) ancienne (Ribotypage) et modernes (MLST et MLVA), afin d'apprécier la diversité et l'évolution de cette bactérie dans notre pays et évaluer l'apport de différentes techniques pour la caractérisation.

La diversité des sérotypes ou la prédominance de *Salmonella* Enteritidis a été franche dans les deux origines alimentaire et humaine, ce qui renforce l'hypothèse du réservoir principalement animal et surtout aviaire (volaille), source de la contamination humaine via les denrées alimentaires qui en dérivent.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des salmonelles d'origine alimentaire a permis de supposer que l'acquisition de la résistance ne serait pas seulement liée à l'usage des antibiotiques en milieu vétérinaire mais aussi chez l'homme. Ceci a été justifié par des profils et des mécanismes de résistance aux antibiotiques touchant la majorité des classes d'antibiotiques testées au niveau des souches d'origine humaine. Contrairement à des profils de sensibilité observés avec les isolats alimentaires où la résistance a touché sélectivement l'acide nalidixique et l'ofloxacine, les souches d'origine humaine ont montré plus de résistance aux antibiotiques notamment la ciprofloxacine, les betalactamines et trimethoprime/sulfamethoxazole. Cette situation serait liée à l'introduction anarchique de ces molécules en médecine humaine avec une antibiothérapie inadaptée (posologie ou durée), qui a précédé le secteur agro-alimentaire et surtout la médecine vétérinaire dans notre pays. Face à ce problème, un système national de surveillance de cette bactérie et son évolution vis-à-vis des antibiotiques doivent être installés sur toute la chaîne de la production alimentaire surtout d'origine animale y compris l'homme consommateur et l'animal producteur.

Sur le plan biochimique les salmonelles d'origine alimentaire ont montré une diversité minime par rapport à celles isolées chez l'homme. Ces dernières ont montré une diversité biochimiques appréciable avec des caractères inhabituels (Inositol+), (Saccharose+), ceci laisse conclure l'impact de la pression (stress) environnemental et la diversité des niches écologiques sur l'évolution biochimique de cette bactérie pour pouvoir s'adapter.

Cette étude a permis d'évaluer l'apport de différentes techniques de caractérisation phénotypique des salmonelles. L'utilisation de la galerie biochimique seule permet d'identifier uniquement le genre *Salmonella*, et exceptionnellement, le sérotype Gallinarum qui possède des caractéristiques biochimiques spécifiques. Le sérotypage par agglutination sur lame a révélé les différents sérotypes, mise à part quelques souches qui ont échappé à ce moyen de caractérisation. Le sérotypage est un outil nécessaire pour surveiller les sérotypes rares ou nouveaux émergent, cas de *Salmonella Cerro* isolée dans cette étude.

En dernier lieu l'étude de la sensibilité aux antibiotiques avec les deux techniques (antibiogramme standard sur milieu solide et détermination de la CMI en milieu liquide), a visualisé les différents profils de sensibilité. Toute fois la corrélation des résultats entre les deux techniques n'a pas été totale avec la molécule (colistine). La détermination de la (CMI) est nécessaire pour les salmonelles vis-à-vis de cette molécule selon les recommandations des comités de standardisation de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

D'autre part sur le plan moléculaire (génétique), les différents outils moléculaires ont permis de montrer la diversité génétique à différents degrés. Le ribotypage a permis d'identifier et de classer nos souches au niveau de l'espèce *enterica* et la sous espèce *enterica* pour sept souches parmi les huit analysées. La sous espèce d'une seule souche n'a pas pu être déterminé. Le serotype pour l'ensemble des isolats, avec l'enrichissement exponentiel des bases de données en séquences ADN<sub>r</sub>16S, cette technique apparait non rentable sur le plan phylogénétique dans notre étude. Le sérotypage classique par agglutination, constitue un moyen de diagnostic et épidémiologique meilleur que le ribotypage concernant les salmonelles ou la notion de sérotype est équivalente à celle des espèces avec d'autres genres.

**Le typage (MLST)** a révélé une homogénéité (profil allélique) génétique au niveau des gènes de ménage responsable de métabolisme parmi les souches de même sérotype isolées de différents échantillons alimentaires et à des intervalles de temps éloignés (*Salmonella* Gallinarum) et (*Salmonella* Enteritidis). Cette technique a permis de caractériser un sérotype rare dans le monde chez l'humain à savoir *Salmonella Cerro* non typé par la technique de sérotypage classique. D'autre part cette technique n'a pas pu déterminer le profil allélique d'une seule souche, avec laquelle le ribotypage n'a pas révélé la sous-espèce contrairement aux autres salmonelles, il serait probable que cette souche appartienne à un nouveau sérotype. Le typage moléculaire par cette technique a déterminé les séquence-types et les complexes clonaux pour les isolats d'origine alimentaire (*Salmonella* Gallinarum) ST-78 et (*Salmonella*

Enteritidis) ST-11 *Salmonella* Cerro ST-376. Malgré le nombre limité des souches inclus dans cette étude, nous constatons que les sérotypes sont de même séquence-type et complexes clonaux que les souches isolées en Europe. Ces résultats témoignent de l'importance de cette technique dans l'investigation épidémiologique descriptive (biosurveillance).

Notre étude qui s'est ensuite développée autour des six souches, dont les sérotypes ont été déterminés et sélectionnés pour la caractérisation par la technique MLVA.

Cette technique a permis de déterminer six génotypes pour les six isolats au sein de deux sérotypes, distincts l'un de l'autre par les profils de répétition en tandem (TR) correspondant aux différents marqueurs choisis. Cette méthode moléculaire était plus discriminante que l'ensemble de techniques phénotypiques et moléculaires utilisées dans cette étude et par conséquent elle renforce sa place dans les études épidémiologiques d'intervention (MLVA) afin d'établir le lien entre isolats suspectés de faire partie de la même chaîne de transmission, la confirmation de l'état épidémique ou la validation des hypothèses sur les réservoirs, sources et modes de transmission.

Enfin, au vue des résultats de ce travail il apparait que l'apport des différentes techniques est complémentaire. Le sérotypage par agglutination garde sa place comme un maillon central pour la caractérisation des salmonelles à condition de disposer des sérums d'agglutination. Le ribotypage s'est révélé faiblement discriminant avec le genre *Salmonella*.

Le sérotypage avec l'antibiotypie peut constituer un moyen d'investigation épidémiologique préliminaire pour les salmonelles et les salmonelloses dans les pays dépourvus des techniques moléculaires.

Deux techniques moléculaires (MLST et MLVA) ont prouvé leur pouvoir discriminant et leur utilité dans les deux aspects de l'épidémiologie qu'elle soit descriptive ou d'intervention. Ils permettent d'établir une épidémiologie moléculaire plus précise.

A l'avenir, il serait intéressant de développer et d'introduire les deux techniques moléculaires (MLST) et (MLVA) pour suivre l'évolution épidémiologique des salmonelles dans notre pays sur un échantillon représentatif des différentes régions. Des mesures préventives sont nécessaires afin d'éviter la dissémination des Salmonelles aussi bien chez l'animal que chez l'homme. Le contrôle rigoureux de l'hygiène lors de l'élevage des animaux, la réduction de l'utilisation des antibiotiques aussi bien chez l'animal que chez l'homme ainsi que le respect des règles de préparation des aliments sont nécessaires pour éviter la dissémination des Salmonelles.

# Références bibliographiques

---

## Références bibliographiques

- Ahmed AM, Nakano H & Shimamoto T (2005). Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55, 371–374.
- Amabile-Cuevas CF & Chicurel ME (1992). Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* 70: 189-199.
- Ambler R (1980). The Structure of  $\beta$ -Lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 289: 321-31.
- Anderson ES (1968). Drug resistance in *Salmonella* Typhimurium and its implications. *Br Med J.* 3 : 333 – 339.
- Anderson ES, Ward LR, De, Saxe M.J. & DeSa JDH (1977). Bacteriophage typing designations of *Salmonella* Typhimurium. *J. Hyg.*, 78: 297-300.
- Anne Brisabois (2001). Intérêt et limites des techniques de caractérisation des *Salmonella* *Epidémiol. et santé anim*, 39, 31-42.
- Anonyme (2010). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the european union in 2008. *The efsa journal* 1496.
- Arcangioli MA, Leroy-Setrin S, Martel JL & Chaslus-Dancla E (1999). A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiology Letters* 174: 327-332.
- Arlet G, Barrett TJ, Butaye P, Cloeckaert A, Mulvey MR, White DG (2006). *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes Infect* 8: 1945 – 1954.
- Asna SM, Haq JA & Rahman M (2003). Nalidixic acid-resistant *Salmonella enterica* serovar typhi with decreased susceptibility to ciprofloxacin caused treatment failure: a report from Bangladesh. *Jpn J Infect Dis* 56, 32–33.
- Barrow PA, Lovell MA (1991). Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. *Avian Pathol.* 20, 335-348.
- Bauernfeind A, Schweighart S & Grimm H (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, 18, 294-98.
- Bäumlér A, Tsolis R, Ficht T & Adams L (1998). Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.*, 66, 4579-4587.
- Bean N, Goulding J, Daniels M, Angulo F (1997). Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 1988- 1992. *J. Food Prot*, 60, 1265-1286.
- Begum F, Adachi Y & Khan MSR (2008). Characterization of *Salmonella* serovars in comparison with some Enterobacteria by sds-page analysis., *Bangl. J. Vet. Med.* 6 (2) : 169–174.

- Bennett PM (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology* 153, S347- 357.
- Berends B, Urlings H, Snijders J, Van Knapen F (1996). Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. In pigs. *Int. J. Food Microbiol.*, **30**, 37-53.
- Berger CN, Brown DJ, Shaw RK, Minuzzi F, Feys B, Frankel G (2011). *Salmonella enterica* strains belonging to O serogroup 1,3,19 induce chlorosis and wilting of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Environ Microbiol* 13, 1299-1308.
- Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P, Frankel G (2010). Vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol* 12, 2385-2397.
- Betancor L, Schelotto F, Martinez A, Pereira M, Algorta G, Rodriguez MA, Vignoli F & Chabalgoity A (2004). Random Amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995-2002. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 1155-1162.
- Blanc-Potard AB, Groisman EA (1997). The *Salmonella* selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *Embo J* 16, 5376-5385.
- Bonnet R (2004). Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 48, 1-14.
- Borrego JJ, Castro D, Jimenez-Notario M, Luque A, Martinez-Manzanares E, Rodriguez-Avil C, Picazo (1992). Comparison of epidemiological markers of *Salmonella* strains isolated from different sources in Spain, *J. Clin. Microbiol.* 30, 3058-3064.
- Bouvet P (2002). *Salmonella* : Biochimie, Cours International de Microbiologie et Maîtrise de la Sécurité des Aliments, Institut Pasteur de Lille.
- Boxrud D, Pederson-Gulrud K, Wotton J, Medus C, Lyszkowicz E, Besser J (2007). Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *J Clin Microbiol* 45, 536-43.
- Boxrud D, Pederson-Gulrud K, Wotton J, Medus C, Lyszkowicz E, Besser J (2007). Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *J Clin Microbiol* 45, 536-43.
- Boyd D, Peters GA, Cloeckert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imberechts H, Mulvey, MR (2001). Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J Bacteriol.* 183, 5725 – 5732.
- Bradford PA (2001). Extended-spectrum betalactamases in the 21 century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 14 : 933 – 951.



- Breuil JIC, Hanau- Bercot B, Dublanchet A, Collatz E (2001). Troisième enquête nationale sur la sensibilité aux antibiotiques des Salmonelles et Shigelles : Résultats de l'étude 2000 du collège de bactériologie, virologie et hygiène des hôpitaux. N°43.
- Briggs CE & Fratamico PM (1999). Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella*. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 846-849.
- Brun-Buisson C (2005). The risk for and approaches to control of nosocomial infections in ICUs: guideline from the SRLF/SFAR task force on nosocomial infections in ICUs. *Réanimation.*, 14, 463-471.
- Burrus V, Pavlovic G, Decaris B & Guedon G (2002). Conjugative transposons: The tip of the iceberg. *Mol Microbiol.*, 46, 601-610.
- Bush K, Jacoby GA & Medeiros AA (1995). A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.*, 39, 1211-1233.
- Busse M (1995). Media for *salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 117-131.
- Callow BR (1959). A new phage-typing scheme for *Salmonella* Typhimurium. *J. Hyg., Cambridge* 57, 346-559.
- Carattoli A, Tosini F, Giles WP, Rupp ME, Hinrichis SH, Angulo FJ, Barrett TJ, Fey PD (2002). Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded spectrum cephalosporin resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 1269-1272.
- CERVACH (Centre D'étude et de Recherches Vétérinaires et Agro-Chimiques) (2006). *Salmonella* Serotypes analysed at the CODA-CERVA in 2005 evolution among poultry, cattle and pig isolates from 1992 to 2005 with results of antimicrobial resistance testing. Centre d'Etude et de Recherches vétérinaires et agro-chimiques : Bruxelles, 40 p.
- Chilcott GS, & Hughes KT (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 694-708.
- Chiu CH, Su LH, Chu C, Chia JH, Wu TL, Lin TY, Lee YS & Ou JT (2004). Isolation of *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis resistant to ceftriaxone and ciprofloxacin. *Lancet* 363: 1285-1286.
- CLSI (2008). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth informational supplement. M100-S18, vol 28, 1.
- CNR-Salm (Centre National de Référence des *Salmonella*) (2008). Rapport d'activité 2008.
- Cohen ML & Tauxe RV (1986). Drug-resistant *Salmonella* in the United States: an epidemiologic perspective. *Science*. 234, 964 – 969.

- Corinne D, Sophie G, Marylène B, Christine P, Françoise L, Sylvine F, Chemaly M, Julien S, Laurence G, Alexandre BG, Pascal S, Anne B (2011). Surveillance active de la résistance aux antibiotiques des *Salmonella* isolées de la filière « poulet de chair » à différentes étapes de la chaîne alimentaire (données 2008-2009). *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* no 44, 13-17.
- Cossart P, & Sansonetti PJ (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304, 242-248.
- Cowden JM, Chisholm D, O'mahony M, Lynch D, Mawer SL, Spain GE, Ward L, Rowe B (1989). Two outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infections associated with the consumption of fresh shell-egg products. *Epidemiol. Infect.*, 103, 47-52.
- Crump, J.A., Luby, S.P. and Mintz, E.D (2004). The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ* 82, 346-353.
- CSAFSCA (Comité Scientifique de l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire) (2005). Terminologie en matière d'analyse des dangers et des risques selon le codex alimentarius. Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire : *Bruxelles*, 46 p.
- Cummings KJ, Warnick LD, Elton LD, Rodriguez-Rivera M, Siler LD, Wright JD, Grohn E.M, Wiedmann YT (2010). *Salmonella enterica* serotype Cerro among dairy cattle in New York: an emerging pathogen? *Foodborne Pathog. Dis* 7, 659–665.
- Darwin KH, & Miller VL (1999). Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* 12, 405-428.
- Dauga C, Zabrovskaja A & Grimont PAD (1998). Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. *J. Clin. Microbiol.*, 36 : 2835-2843.
- Davis MA, Hancock DD & Besser TE (2002). Multiresistant clones of *Salmonella enterica*: The importance of dissemination. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 140: 135-141.
- De Buck J, van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R (2004). Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 233-245.
- De Louvois J (1993). *Salmonella* of eggs. *Lancet*, 342, 366-7.
- Delarocque-Astagneau E, Desenclos JC, Bouvet P, Grimont PA (1998). Risk factors for the occurrence of sporadic *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in children in France: a national casecontrol study. *Epidemiol. Infect.*, 121, 561-567.
- Delmas, G., A. Gallay, et al. (2007). "Food borne infection and intoxication occurrence in France between 1996 and 2005." *Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005* 48(278): 74-78.

- Denoeud, F & Vergnaud, G (2004). Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains : à Web-based ressource. *BMC Bioinformatics* 5: 4.
- Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U & Hacker J (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2, 414-424.
- Desenclos JC, Vaillant V, Delarocque Astagneau E, Campese C, Che D (2007). Principales of an outbreak investigation in public health practice. *Med Mal Infect*, 37: 77-94.
- Dodd CER. (1994). The Application of Molecular Typing Techniques to Haccp. *Trends in Food Science & Technology* 5: 160-164.
- Doublet B, Carattoli A, Whichard JM, White DG, Baucheron S, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A (2004). Plasmid-mediated florfenicol and ceftriaxone resistance encode by the floR and bla genes in *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Newport isolated in the United States. *FEMS Microbiol Lett.* 233, 301 – 305.
- Eblen DR, Levine P, Rose BE, Saini P, Mageau R, Hill WE (2005). Nationwide microbiological baseline data collected by sponge sampling during 1997 and 1998 for cattle, swine, turkeys, and geese. *J. Food Prot.*, 68, 1848-1852.
- EFSA (European Food Safety Agency) (2010). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. EFSA Journal <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1496.pdf7>
- EFSA, ECDC (2011). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal* <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs>
- EFSA (EUROPEAN FOOD SECURITY AUTHORITY) (2007). The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006.
- Eckmann L, Rudolf MT, Ptasznik A, Shultz C, Jiang T, Wolfson H, Tsien R, Fierer J, Shears SB, Kagnoff MF & Traynor-Kaplan AE (1997). D-myo- inositol 1,4,5,6-tetra bisphosphate produced in human intestinal epithelial cells in response to *Salmonella* invasion inhibits phosphoinositide 3-Kinase signalling pathways *Proc. Natl.Acad. Sci.USA* 94 (26): 14 450- 60.
- EUCAST (2008). Expert rules in antimicrobial susceptibility testing –European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
- Fedorka-Crayp, Grayj, Wrayc (2000). *Salmonella* infection in pigs. In: Wray C., Wray A. (Eds.), *Salmonella* in domestic animals. *CABI Publishing* : Oxon, 191- 207.
- Figueroa-Bossi N, Coissac E, Netter P & Bossi L (1997). Un suspected prophage-like elements in *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology* 25, 161-173.

- Figueroa-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D & Bossi L (2001). Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol* 39, 260-271.
- Finlay BB & Falkow S (1990). *Salmonella* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *J Infect Dis* 162, 1096-1106.
- Fofana Aissatou (2004). Etude de la résistance aux antibiotiques des souches de *Salmonella* spp et *Escherichia coli* isolées de la viande de poulet de chair au Sénégal, N° 06, 1-43.
- Galan JE (1996). Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol* 20, 263-271
- Galan JE (2001). *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 53-86.
- Galyov EE, Wood MW, Rosqvist R, Mullan PB, Watson PR, Hedges S & Wallis TS (1997). A secreted effector protein of *Salmonella* Dublin is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol Microbiol* 25, 903-912.
- Gast RK, & Beard CW (1990b). Production of *Salmonella* Enteritidis-contaminated eggs by experimentally infected hens. *Avian Dis* 34, 438-446
- Gerlach RG, Jackel D, Stecher B, Wagner C, Lupas A, Hardt WD & Hensel M (2007). *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* 9, 1834-1850.
- Giles WP, Benson AK, Olson ME, Hutkins RW, Whichard JM, Winokur PL, Fey PD (2004). DNA sequence analysis of regions surrounding bla<sub>CMY-2</sub> from multiple *Salmonella* plasmid backbones. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 2845-2852.
- Glynn MK, Bopp C, Dewitt W, Dabney P, Mokhta R M, Angulo FJ (1998). Emergence of multi-drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *N. Engl. J. Med.*, 338, 1333-1338.
- Golberg D, Kroupitski Y, Belausov E, Pinto R, Sela S (2011). *Salmonella* Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *Int J Food Microbiol* 145, 250-257.
- Griffith RW, Schwartz KJ & Meyerholz DK (2006). *Salmonella*, p.739-754. In B.E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, D. J. Taylor (ed.), Diseases of swine, 9th Edition. Blackwell Publishing, Ames.
- Grimont PAD (1992). Les marqueurs Épidémiologiques des *Salmonella*. *Med. Mal. Infect.*, 22, spécial, 249-257.
- Grimont P, Grimont F & Bouvet P (2000). Taxonomy of the genus *Salmonella*. In: Wray C., Wray A. (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. *CABI Publishing* : Oxon, 1-17.

- Grimont P & Weill FX (2007). Unité Biodiversité des bactéries pathogènes émergentes. Institut Pasteur, Paris. Centre national de référence des *Salmonella*. Rapport d'activité annuel.
- Grimont PAD, Grimont F, & Bouvet P (2000). Taxonomy of the genus *Salmonella*, p. 1-17. In A. Wray, C. Wray (ed.), *Salmonella* in domestic animals. *CABI Publishing*, New York.
- Guerra B, Soto SM, Arguelles JM, Mendoza MC (2001). Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4, 5, 12: i:-]. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1305–1308.
- Guilloteau LA, Wallis TS, Gautier, AV, MacIntyre S, Platt DJ & Lax AJ (1996). The *Salmonella* virulence plasmid enhances *Salmonella*-induced lysis of macrophages and influences inflammatory responses. *Infect Immun* 64, 3385-3393.
- Hakanen A, Kotilainen P, Jalava J, Siitonen A & Huovinen P (1999). Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in salmonellas and validation of nalidixic acid screening test. *J Clin Microbiol* 37, 3572–3577.
- Hacker J & Kaper JB (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54, 641-679.
- Hanes D (2003). Nontyphoid *Salmonella*. In: Miliotis N., Bier J. (Eds.) International Handbook of Foodborne Pathogens, *Marcel Dekker*: New York, 137-149.
- Hansen-Wester I & Hensel M (2001). *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* 3, 549-559.
- Harold Noel, Nathalie Pihier, François-Xavier Weill, Corinne Danan, Angie Bone, Marie-Eve Raguenaud, Siham Salah, Hedia Bellali, Véronique Vaillant, Nathalie Jourdan-DaSilva, Simon Le Hello (2010). Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation n° 41 Épidémie nationale d'infections à *Salmonella enterica* subspecies *enterica* sérotype 4,12:i:liée à la consommation de saucisson sec.
- Hayes S, Nylén G, Smith R, Salmon RL, Palmer SR (1999). Undercooked hens eggs remain a risk factor for sporadic *Salmonella* Enteritidis infection. *Commun. Dis. Public. Health.* 2, 66-67.
- Helms M, Ethelberg S. & Molbak K (2005). International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerging Infectious Diseases* 11, 859-867.
- Henry DP, Frost AJ, Samuel JL, O'Boyle DA, Thomson RH (1983). Factors affecting the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* in anaerobically fermented pig waste. *J Appl Bacteriol* 55, 89-95.
- Hensel M (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 294, 95-102.
- Herikstad H, Hayes P, Mokhtar M, Fracaro ML, Threlfall EJ, Angulo FJ (1997). Emerging quinolone-resistant *Salmonella* in the United States. *Emerg Infect Dis.* 3, 371 – 372.

- Hilton AC, Banks JG & Penn CW (1996). Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella*: strain differentiation and characterization of amplified sequences. *J. Applied Bacteriol.*, 81, 575-584.
- Hilton AC, Banks JG, Penn CW (1996). Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella*: strain differentiation and characterization of amplified sequences. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 575-584.
- Hohmann EL (2001). "Nontyphoidal salmonellosis." *Clinical Infectious Diseases* 32(2): 263-269.
- Hood DW, Deadman ME, Jennings MP, Bisercic M, Fleischmann RD, Venter JC & Moxon ER (1996). DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11121-5.
- Holt KE, Thomson NR, Wain J, Langridge GC, Hasan R & Bhutta ZA (2009). Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics* 10: 36.
- Holt KE, Thomson NR, Wain J, Langridge GC, Hasan R & Bhutta ZA (2009). Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics* 10: 36.
- Hopkins KL, Peters TM, E de Pinna, Wain J (2011). Standardisation of multilocus variable number tandem-repeat analysis (MLVA) for subtyping of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *Euro Surveill.* Aug 11;16 (32).
- Hu L, Kopecko D (2003). Typhoid *Salmonella*. In: Miliotis N., Bier J. (Eds.), *International Handbook of Foodborne Pathogens.* Marcel Dekker: New York, 151-165.
- Hughes L, Wigley P, Bennett M, Chantrey J, & Williams N (2010). Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from wild birds in northern England suggests host-adapted strain. *Lett Appl Microbiol.* 51, 477-479.
- Hulton CS, Higgins CF & Sharp PM (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and other enterobacteria. *Mol Microbiol.* 5, 825-834.
- Humbert F. (1995). Salmonelloses et filières avicole : aspects épidémiologiques et incidences sur la santé publique Maghreb Vétérinaire, Vol .7 N°30.
- Humphrey TJ (1994). Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* Enteritidis : a review. *Int. J. Food Microbiol* 21, 31-40.
- Humphrey TJ, Chart H, Baskerville A, Rowe B (1991). The influence of age on the response of SPF hens to infection with *Salmonella* Enteritidis PT4. *Epidemiol. Infect.* 106, 33-43.
- Humphrey TJ, Mead GC, Rowe B (1988). Poultry meat as a source of human salmonellosis in England and Wales. Epidemiological overview. *Epidemiol. Infect.*, 100, 175-184.

- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1996). *Salmonellae*. In: ICMSF (Ed.), *Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens*. Blackie Academic & Professional: London, 217-264.
- INVS (Institut Nationale de Veille Sanitaire) (2004). Salmonelloses non typhiques. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France. *Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice*, 92–105.
- Iveson JB, Shellam GR, Bradshaw SD, Smith DW, Mackenzie JS, Mofflin RG (2009). *Salmonella* infections in Antarctic fauna and island populations of wildlife exposed to human activities in coastal areas of Australia *Epidemiology and Infection* vol. 137, n°6, 858- 870.
- Jean Guard-Petter (2001). The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis* *Environmental Microbiology*, 3(7), 421-430.
- Jordan P, Snyder LA, & Saunders NJ (2003). Diversity in coding tandem repeats in related *Neisseria* spp. *BMC Microbiol* 3, 23.
- Kang MS, KwonYK, Oh JY, Call DR, Byung K. An1, Song EA, Kim JY, Shin EG, Kim MJ, Kwon JH, Chung GS (2011). Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for (tableau Gallinarum) subtyping *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. *Avian Pathology* 40(6), 559\_564.
- Kapil AR & Das B (2002). Nalidixic acid susceptibility test to screen ciprofloxacin resistance in *Salmonella* Typhi. *Ind J Med Res* 115, 49–54.
- Kihlstrom E & Edeb L (1976). Association of viable and inactivated *Salmonella* Typhimurium 395 MS and MR 10 with HeLa cells. *Infect Immun* 14, 851-857.
- Kim S, Kim SH, Park JH, Lee KS, Park MS, Lee BK (2009). Clustering analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates in Korea by PFGE, ribotyping, and phage typing. *Foodborne Pathog Dis.* 6, 733-738.
- Kimuraa C, Reddy V, Marcus R, Cieslak PR, Mohle-Boetani JC, Kassenborg HD, Segler SD, Hardnett FP, Barrett T, Swerdlow DL (2004). Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in the United States: a case-control study in FoodNet sites. *Clin. Infect. Dis.*, 38, 244-252.
- Kingsley RA, Humphries AD, Weening EH, de Zoete MR, Winter S, Papaconstantinopoulou A, Dougan G & Baumler AJ (2003). Molecular and Phenotypic Analysis of the CS54 Island of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium: Identification of Intestinal Colonization and Persistence Determinants. *Infect Immun* 71, 629-640.
- Kingsley RA, Santos RL, Keestra AM, Adams LG, Baumler AJ (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Mol Microbiol* 43, 895-905.
- Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M & Mitsuhashi S (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 11,315-317.

- Koh-Luar SI, Chew ST, Lau E, & Chua SB (1996). Short Communication: Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of *Salmonella* organisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 12, 405-407.
- Korsak N, Clinquart A, Daube G (2004). *Salmonella* spp. dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique. *Ann. Méd. Vét.*, 148, 174-193.
- Kroupitski Y, Golberg D, Belausov E, Pinto R, Swartzberg D, Granot D, Sela S (2009). Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Appl Environ Microbiol* 75, 6076-6086.
- Kurita A, Gotoh H, Eguchi M, Okada N, Matsuura S, Matsui H, Danbara H & Kikuchi Y (2003). Intracellular expression of the *Salmonella* plasmid virulence protein, SpvB, causes apoptotic cell death in eukaryotic cells. *Microb Pathog* 35, 43-48.
- Lan R, Davison AM, Reeves PR, & Ward LR (2003). AFLP analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates of phage types DT 9 and DT 135: diversity within phage types and its epidemiological significance. *Microbes and Infection*. 5, 841-850.
- Lawley TD, Chan K, Thompson LJ, Kim CC, Govoni GR & Monack DM (2006). Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* 2, e11.
- Le Lostec Z, Fegueux S, Jouve P, Cheron M, Mornet P & Boisivon A (1997). Reduced susceptibility to quinolones in *Salmonella* Typhi acquired in Europe: a clinical failure of treatment. *Clin Microbiol Infect*. 3 : 576-577.
- Le Minor L & Véron M (1989). *Salmonella*. In *Bactériologie Médicale* 2e édition, pp. 259-274: Flammarion Médecine-Sciences.
- Le Minor L, Popoff MY, Laurent B, Hermant D (1986). *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, 137, 211-217.
- Le Minor L, Véron M, Popoff M (1982). *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 133, 223-243
- Le Minor L, & Genus III (1984). *Salmonella*, In: Krieg N., Holt, J. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (volume 1), Williams and Wilkins: Baltimore 427-458.
- Legendre L & Legendre P (1998). Numerical ecology. *Ed. Elsevier*, Netherlands, 853.
- Libby SJ, Lesnick M, Hasegawa P, Weidenhammer E & Guiney DG (2000). The *Salmonella* virulence plasmid spv genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Cellular Microbiology* 2, 49-58.
- Liebana EC, Clouting L, Garcia-Migura FA, Clifton-Hadley E, Lindsay EJ, Threlfall & Davies RH (2004). Multiple genetic typing of *Salmonella* Enteritidis phage-types 4, 6, 7, 8 and 13a isolates from animals and humans in the UK. *Vet. Microbiol* 100, 189-195.



- Lin AW, Usera MA, Barrett TJ, & Goldsby RA (1996). Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 870–876.
- Lindstedt BA, Heir H, Gjernes E (2003). DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem loci. *J Clin Microbiol.* 4, 1469-1479.
- Liu Y, Lee MA, Ooi EE, Mavis Y, Tan AL & Quek HH (2003). Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar typhi isolates from various countries in Asia by a multiplex PCR assay on variable-number tandem repeats. *J Clin Microbiol* 41: 4388-94.
- Livermore DM (1995). Beta-lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.*, 8; 557-584.
- Llanes C, Kirchgessner V, Plesiat P (1999). Propagation of TEM and PSE-type beta lactamases among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2430–2436.
- Lopes VC, Velayudhan BT, Halvorson DA, Lauer DC, Gast RK, Nagaraja KV (2004). Comparison of methods for differentiation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type isolates. *Am. J. Vet. Res.* 65, 538–543.
- Lundberg U, Vinatzer U, Berdnik D, von, Gabain A & Baccarini M (1999). Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol.*, 181, 3433-3437.
- Lynch JA & Kierstead ME (1985). Antibiotic Resistance Associated with Inositol Metabolism in *Salmonella*., 26, 251–253.
- Macnab (2004). Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Volume 1694, Issues 1–3, Pages 207–217.
- Maddocks S, Olma T & Chen S (2002). Comparison of CHROM-Agar *Salmonella* medium and Xylose-Lysine-Desoxycholate and *Salmonella*-Shigella Agars for isolation of *Salmonella* strains from stool samples. *Journal Of Clinical Microbiology*, p. 2999R3003 Vol. 40, No. 8.
- Madoff LC, Michel JL, Gong EW, Kling DE & Kasper DL (1996). Group B streptococci escape host immunity by deletion of tandem repeat elements of the alpha C protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4131-6.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, & Spratt BG (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 3140-3145.
- Majowicz SE, Musto JE, Scallan FJ, Angulo M, Kirk, SJ, O'Brien TF, Jones A, Fazil & Hoekstra R M, (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 50, 882-889.

- Malorny B, Junker E, Helmuth R (2008). Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *BMC Microbiol*; 8:84.
- Malorny B, Junker E, Helmuth R (2008). Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *BMC Microbiol* 8, 84.
- Martel JL & Savey M (1992). Salmonellose des ruminants et santé humaine, *Point Vét*, 145, 13-18.
- Martinetti G, & Altwegg M (1990). rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as tool for typing *Salmonella* Enteritidis, *Res. Microbiol*, 141, 1151-1162.
- Mastroeni P, Sheppard M (2004). *Salmonella* infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. *Microbes Infect* 6, 398-405.
- Mawer SL, Spain GE, Rowe B (1989). *Salmonella* Enteritidis phage type 4 and hens' eggs. *Lancet*, 1, 280-281.
- McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du M, Hou S, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R & Wilson RK (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica*. *Nature*., 413, 852-856.
- McCormick BA, Parkos CA, Colgan SP, Carnes DK, Madara JL (1998). Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella* Typhimurium. *J Immunol* 160, 455-466.
- McWhorter AC, Murrell MC, Edwards PR (1963). Resistance of *Salmonella* isolated in 1962 to chlorotetracycline. *Appl Microbiol*. 11, 368 – 370.
- Mermin J, Villar R, Carpenter J, Roberts L, Samariddin A, Gasanova L, Lomakina S, Bopp C, Hutwagner L, Mead P, Ross B, Mintz E (1999). A massive epidemic of multidrug-resistant typhoid fever in Tajikistan associated with consumption of municipal water. *J. Infect. Dis.*, 179, 1416-1422.
- Miriagou V, Carattoli A, Tzelepi E, Villa L, Tzouvelekis LS (2005). IS26-associated In4-type integrons forming multiresistance loci in enterobacterial plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 3541- 3543.
- Miriagou V, Tassios PT, Legakis NJ, Tzouvelekis LS (2004). Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *Int J Antimicrob Agents*. 23, 547 - 555.
- Morales AS, Fragoso de Araújo J, Túlio de Moura Gomes V, Trindade Reis Costa A, dos Prazeres Rodrigues D, Ferreira TSP (2012). Antibiotic Resistance Associated with Inositol Metabolism in *Salmonella* from Ontario Cattle. *ScientificWorldJournal*: 109795.

- Morgan, E, Bowen, AJ, Carnell, SC, Wallis TS, Stevens, MP (2007). SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infect Immun* 75, 1524- 1533.
- Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloeckert A (2006). The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect* 8, 1915-1922.
- Murase T & Okitsu T (1995). Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for *Salmonella* infections. *Microbio. Immunol.*, 39, 673-676.
- Nath G, Maurya P & Gulati AK (2010). Eric-PCR and RAPD based fingerprinting of *Salmonella* Typhi strains isolated over a period of two decades. *Infect Genet Evol.* 10, 530-536.
- Neutra MR (1998). Current concepts in mucosal immunity. V Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. *Am J Physiol* 274,785-791.
- Nevola JJ, Laux DC & Cohen PS (1987). In vivo colonization of the mouse large intestine and in vitro penetration of intestinal mucus by an avirulent smooth strain of *Salmonella* Typhimurium and its lipopolysaccharide-deficient mutant. *Infect Immun* 55, 2884-2890.
- Noda T, Murakami K, Asai T, Etoy Y, Ishihara T, Kuroki T, Horikawa K, Fujimoto S (2004). Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis strains in Japan between 1973 and 2004. *Acta Veterinaria Scandinavica*.
- Nogrady N, Gado I, Zsolt Fekete P, Paszti J (2005). Chloramphenicol resistance genes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from human and animal sources in Hungary, *Vet. Med. – Czech*, 50, (4) : 164–170.
- Novick RP (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiological Reviews* 51: 381-395.
- Oboegbulem S (1993). Comparison of two enrichment media and three selective media for isolation of *salmonella* from fresh chicken carcass rinse fluids and sewer swabs. *Int. J. Food Microbiol* 18, 167-170.
- Parry CM & Threlfall EJ (2008). Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal *salmonella*. *Current Opinion in Infectious Diseases* 21, 531-538.
- Paterson DL & Bonomo RA (2005). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18, 657-86.
- Patrick AD, Grimont & Weil FX (2007). Formules antigeniques des serovars de *Salmonella*. 9ème édition 1-166
- Poisson DM, Bertin ND, Pariente EA, Calamy G (1988). *Salmonella* Agona saccharose-positive : etude bacteriologique succincte et epidemiologique retrospective à propos de 10 souches isolees au chr d'orleans. *Médecine et Maladies Infectieuses* 18, 433–439.
- Popoff MY (2007). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 9th edition WHO collaborating centre for collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris-France.

- Popoff MY, Bockemuhl J & Gheesling LL (2004). Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* 155, 568-570.
- Poppe C, McFadde KA, Brouwer AM, & Demczuk W (1993). Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains, *Can. J. Zool.* 71, 176-184.
- Prouty AM, Gunn JS (2000). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infect Immun* 68, 6763-6769.
- Ramisse V, Houssou P, Hernandez E (2004). Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp *enterica* for typing purpose. *J Clin Microbiol* 42, 5722-5730.
- Ramsey CH & Edwards PR (1961). Resistance of *Salmonellae* isolated in 1959 and 1960 to tetracyclines and chloramphenicol. *Appl Microbiol* 9, 389 – 391.
- RASRBA (Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques) (2011). Surveillance de la résistance des bactéries à l'antibiotique 12<sup>ème</sup> rapport d'évaluation p : 66.
- RASRBA (Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques) (2011). Standardisation de l'antibiogramme a l'échelle nationale 6ème Edition.
- Refsum T, Heir E, Kapperud G, Vardund T, & Holstad G (2002). Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates determined by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of isolates from avian wildlife, domestic animals, and the environment in Norway. *Applied Env Microbiol* 68, 5600-5606.
- Rho MJ, Chung MS, Lee JH, Park J (2001). Monitoring of microbial hazards at farms, slaughterhouses, and processing lines of swine in Korea. *J. Food Prot.*, **64**, 1388-1391.
- Richter-Dahlfors A, Buchan AM, Finlay BB (1997). Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella* Typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med* 186, 569-58.
- Ridley AM, Threlfall EJ, Rowe B (1998). Genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2314–2321.
- RNSRSA (Réseau national de la surveillance de la résistance des salmonelles aux antibiotiques) (2012). 13<sup>ème</sup> Rapport d'Évaluation (p71, p133) [www.sante.dz/aarn](http://www.sante.dz/aarn).
- Rodrigue DC, Cameron DN, Puhf ND, Brenner FW, Louis ME St., Wachsmuth IK, Tauxe RV (1992). Comparison of plasmid profiles, phage types, and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* Enteritidis isolates in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 30, 854–857.
- Rodriguez-Rivera LD, Switt AIM, Degoricija L, Fang R, Cummings CA, Furtado MR, Wiedmann M, den Bakker HC (2014). Genomic characterization of *Salmonella* Cerro ST367, an emerging *Salmonella* subtype in cattle in the United States *BMC Genomics*.

- Rohwer JM, Bader R, Westerhoff HV & Postma PW (1998). Limits to inducer exclusion : inhibition of the bacterial phosphotransferase system by glycerol kinase. *Mol. Microbiol.* 29(2) : 641-52.
- Ross IL, Heuzenroeder M. (2009). A comparison of two PCR-based typing methods with pulsed-field gel electrophoresis in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int J Med Microbiol*; 299, 410- 20.
- Ruiz J, Castro D, Goni P, Santamari JA, Borrego JJ & Vila J (1997). Analysis of the mechanism of quinolone resistance in nalidixic acid-resistant clinical isolates of *Salmonella*. *J Med Microbiol* 46, 623-628.
- Ruiz M, Rodriguez JC, et al. (2004). "Available options in the management of non-typhi *Salmonella*." *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 5(8): 1737-1743.
- Saitanu K, Jerngklinchan J, Koowatananukul C (1994). Incidence of *salmonellae* in duck eggs in Thailand. *South east Asian J Trop Med Public Health*; 25, 328-31.
- Saitanu K, Koowatananukul C, Jerngklinchan J, Sasipreeyajan J (1994). Detection of *salmonella* in hen eggs in Thailand. *South east Asian J Trop Med Public Health* 25, 324-7.
- Saitou N, Masatoshi Nei (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees' Center for Demographic and Population Genetics, *The University of Texa Health Science Center at Houston Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Salyers AA, Shoemaker NB, Stevens AM & Li L. Y (1995). Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiological Reviews* 59, 579- 590.
- Santos RL, Baumler AJ (2004). Cell tropism of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol*, 294, 225-233.
- Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Baumler AJ, Adams LG (2002). Morphologic and molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium infection in neonatal calves. *Vet Pathol* 39, 200-210.
- Schikora A, Carreri A, Charpentier E, Hirt H (2008). The dark side of the salad: *Salmonella* Typhimurium overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows an endopathogenic lifestyle. *PLoS ONE* 3, e2279.
- Schmid H, Burnens AP, Baumgartner A, Oberreich J (1996). Risk factors sporadic salmonellosis in Switzerland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 15, 725-732.
- Schroder G, Krause ES, Zechner L, Traxler B, Yeo HJ, Lurz R, Waksman G & Lanka E, (2002). TraG-like proteins of DNA transfer systems and of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system: inner membrane gate for exported substrates. *Journal of Bacteriology* 184, 2767-2779.
- Schutze G.E., Fawcett H.A., lewno m.J., Flice E.L., KIrby R.S. (1996). Prevalence of *Salmonella* Enteritidis in poultry shell eggs in Arkansas. *South Med. J.* 89, 889-891.

- Schwartz S, Cloeckert A & Roberts MC (2006). Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. In F. M. Aarestrup (ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. ASM Press, Washington, D. C. 73-98 p
- SCVMPH (Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health) (2003). Opinion of the SCVMPH on *Salmonella* in Foodstuffs.
- Selander RK, Beltran P, Smith NH, Backer RM, Crichton PB, Old D, Musser JM & Whittam TS (1990). Genetic population structure, clonal phylogeny, and pathogenicity of *Salmonella* paratyphi B. *Infect. Immun* 58, 1891-1901.
- Sharma A & Qadri A (2004). Vi polysaccharide of *Salmonella* typhi targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 17492-17497.
- Sheppard M, Webb C, Heath F, Mallows V, Emilianus R, Maskell D, Mastroeni P (2003). Dynamics of bacterial growth and distribution within the liver during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol* 5, 593-600.
- Shivaprasad H.L., Timoney J.F., Morales S., Lucio, B., 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 HL, (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Revue Scientifique et Technique*, 19, 405\_424.
- Simon M, Zieg J, Silverman M, Mandel G, Doolittle R (1980). Phase variation: evolution of a controlling element. *Science* 209, 1370-1374.
- Smith JT, Lewin CS (1988). Chemistry and mechanism of action of the quinolons antibacterial. In: *Andriole Ved the quinolons Academic. Press*. New York. 23-82 p.
- Struelens MJ, De Gheldre Y, Deplano A (1998). Comparative and library epidemiological typing systems: outbreak investigations versus surveillance systems. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 19: 565-569.
- Tindall BJ, Grimont PA, Garrity GM, & Euzeby JP (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 521-524.
- Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C (2008). Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res* 18, 1624-1637.
- Threlfall E (2000). Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104-a truly international multiresistant clone. *J. Antimicrob. Chemother* 46, 7-10.
- Threlfall EJ, Hampton MD, Chart H & Rowe B (1994). Use of plasmid profile typing for surveillance of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 from humans. Poultry and eggs. *Epidemiology Infection*.112, 25-31.

- Threlfall EJ & Frost JA (1990). The identification typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. *J Appl Bacteriol* 68: 5-16.
- Threlfall EJ & Ward LR (2001). Decreased susceptibility to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serotype Typhi in the United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 7, 448–450.
- Threlfall EJ, Rowe B & Ward LR (1989). Subdivision of *Salmonella* Enteritidis phage types by plasmid profile typing. *Epidemiol. Infect* 102, 459-465.
- Threlfall EJ, Ward LR, Rowe B (1978). Spread of multiresistant strains of *Salmonella* Typhimurium phage types 204 and 193 in Britain. *Br Med J* 2, 997.
- Van Asten AJ & Van Dijk JE (2005). Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44, 251-259.
- Van Cuyck H, Farbos-Granger A, Leroy P, Yith V, Guillard B, Sarthou JL, JL Koeck, Van Cuyck SLK (2011). *BMC Research*, 4:306 <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/306>
- Van Immerseel f, De Buck J, Boyen F, Pasmans F, Bertrand S, Collard JM, Saegerman C, Hooyberghs J, Haesbrouck F, Ducatelle R (2005). *Salmonella* dans la viande de volaille et dans les oeufs : un danger pour le consommateur qui demande la mise en place d'un programme de lutte efficace. *Ann. Med. Vet.* 149, 34-48.
- Varnam A, Evans M (1996). Chapter4–*Salmonella*. In: Varnam A., Evans, M. (Eds.) Foodborne pathogens – an illustrated text 2nd ed. *Manson Publishing* : London, 51-86.
- Vergnaud G & Pourcel C (2009). Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. *Methods Mol Biol.* 551, 141 158.
- Virlogeux-Payant & Popoff MY (1996). The Vi antigen of *Salmonella* Typhi. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, Volume 94, Issue 3, Pages 237–250.
- Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R, Cieslak PR, Deneen VC, Tauxe RV (2004). Emerging Infections Program FoodNet Working. FoodNet estimate of the burden of illness caused by non-typhoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin Infect Dis* 38, S127 – S134.
- Wachsmuth IK, Kiehlbauch JA, Bopp CA, Cameron DN, Strockbine NA, Wells JG, Blake PA (1991). The use of plasmid profiles and nucleic acid probes in epidemiologic investigations of foodborne, diar- rheal diseases. *Int. J. Food Microbiol* 12, 77–89.
- Walsh TR (2006). Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Current Opinion in Microbiology* 9: 476-482.
- 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.
- Weill FX (2008). *Bull. Acad. Vét. France* — 2008 - Tome 161 - N°3

- Weill FX, Le Hello S (2011). Centre national de référence des *Salmonella*, Rapport d'activités annuel. Unité Biodiversité des bactéries pathogènes émergentes. *Institut Pasteur*, Paris.
- Welch TJ, Fricke WF, McDermot PF, White DG, Rosso ML, Rasko D.A., Mammel, M.K., Eppinger M, Rosovitz MJ, Wagner, D (2007). Multiple antimicrobial resistances in plague: an emerging public health risk. *PLoS ONE*. 2 : e309.
- Wegener HC, Hald T, Lo Fo Wong D, Madsen M, Korsgaard H, Bager F, Gerner-Smidt P, and Molbak K (2003). *Salmonella* control programs in Denmark. *Emerg Infect Dis* 9:774-780.
- Westrell T, Ciampa N, Boelaert F, Helwigh B, Korsgaard H, Chriel M, Ammon A, & Makela P (2009). Zoonotic infections in Europe in 2007: a summary of the EFSA-ECDC annual report. *Euro Surveill* 14.
- Who (World Health Organization) (1997). Antibiotic use in food-producing animals must be curtailed to prevent increased resistance in humans. Geneva : The Organization ; WHO Press Release WHO/73, 1997 Oct 20.
- WHO (World Health Organization) (1998). Use of Quinolones in Food Animals and Potential Impact on Human Health [pdf 292kb]. Report of a WHO Meeting Geneva, Switzerland, 2 – 5 June 1998 WHO/EMC/ZDI/98.12.
- Woese CR. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev*; 51: 221-71.
- Wolfon JS, Hooper DC (1985). The fluoroquinolones Structure, mechanism of action and resistance spectra of activity in vitro. *Antimicrob Agent chemother*. 28 : 581-586.
- Wozniak RA & Waldor MK (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews Microbiology* 8, 552- 563.
- Yves Millemann (1998). Les marqueurs épidémiologiques des salmonelles. *Elsevier Inra, Vet Res* 29, 3-19.
- Zhang S, Adams LG, Nunes J, Khare S, Tsolis RM, Baumler AJ (2003). Secreted effector proteins of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium elicit host-specific chemokine profiles in animal models of typhoid fever and enterocolitis. *Infect Immun* 71, 4795-4803.
- Zhou D, & Galán J (2001). *Salmonella* entry into host cells : the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect.*, 3, 1293-1298.



# **Annexes**

# Annexe 1 : Publication

Advances in Environmental Biology, 7(13) November 2013, Pages: 3899-3907

AENSI Journals  
**Advances in Environmental Biology**  
Journal home page: <http://www.aensiweb.com/aenb.html>

**A**  
**E**  
**B**  
Advances in Environmental Biology  
Volume 7(13) November 2013  
ISSN 1821-2038  
AENSI Publisher

---

## Assessment of the diversity and antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp. isolated from food and human patients with gastroenteritis

<sup>1,2</sup>Mourad Boukoucha, <sup>2</sup>Nadjia Ramdani-Bouguessa, <sup>3</sup>Taha Menasria, <sup>3</sup>Nadia Bouguerra

<sup>1</sup>Department of Natural and Life Sciences, Faculty of Exact Sciences and Natural and Life Sciences, University of Tébessa, Tébessa 12002, Algeria.  
<sup>2</sup>Department of Microbiology, University Hospital Mustapha Bacha, Algiers 16000, Algeria.  
<sup>3</sup>Institute of Nutrition, Food and Agri-Food Technologies (I.N.A.T.A.), University of Constantine (1), Constantine 25000, Algeria.

---

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Article history:</b> Received 15 September 2013 Received in revised form 26 November 2013 Accepted 29 November 2013 Available online 4 January 2014</p> <p><b>Keywords:</b> non-typhoid <i>Salmonella</i>, poultry product, humans, gastroenteritis, antibiotic susceptibility.</p>	<p>The study was carried out in Tébessa (Northeast Algeria) to investigate antimicrobial susceptibility of <i>Salmonella</i> isolated from poultry product and human patients. Antibiotic resistance profiles were detected against 25 selected antimicrobial agents using micro dilution method (MICs). Seventy-six <i>Salmonella</i> strains were selected and serotyped which <i>Salmonella</i> Enteritidis serovar was the most prevalent serotype. Over all, High level of resistance were noted with quinolones (nalidixic acid), non-wild types with fluoroquinolones (moxifloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin) and variable scaling values with colistin. Foodborne strains showed some trends to shift toward non-wild types with some beta-lactams and sulfamethoxazole/trimethoprim. Moreover, human serovars showed heterogeneity in susceptibility patterns indicating wide spread multi-drug resistance with quinolones, beta-lactams (aminopenicillins, cefalosporins), aminoglycosides, tetracycline, and chloramphenicol. As a result, the relatively high resistance among the <i>Salmonella</i> lying in both human and poultry products could pose therapeutic and public health problems as potential vehicles of resistant <i>Salmonella</i>.</p>

---

© 2013 AENSI Publisher All rights reserved.

**To Cite This Article:** Mourad Boukoucha, Nadjia Ramdani-Bouguessa, Taha Menasria, Nadia Bouguerra., Assessment of the diversity and antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp. isolated from food and human patients with gastroenteritis. *Adv. Environ. Biol.*, 7(13), 3899-3907, 2013.

---

### INTRODUCTION

Non-typhoid *Salmonella* is one of major bacterial pathogen of food contamination, being an important health problem in industrialized and developing countries [4,10]. Human infections with *Salmonella* are most commonly caused by the ingestion of contaminated food, water or milk, which are the principal sources of non-typhoidal salmonellosis in humans [37]. According to the World Health Organization, annually there are about 17 million cases of acute gastroenteritis due to non-typhoidal salmonellosis with over 3 million deaths [32].

Indeed, *Salmonella* food contamination presents a significant impact as result of the lost productivity and costs for public health [21,23]. Furthermore, one of the most sources of human gastroenteritis is the consumption of *Salmonella*-contaminated poultry products, especially eggs and meat [4,21,29,34,37]. However, the presence of pathogenic and spoilage microorganisms in poultry products remains a significant concern for suppliers, consumers and public health officials worldwide. The persistence of *Salmonella* throughout the chain food production (slaughtering, meat handling phases, evisceration, failure detection of contamination, cross-contamination...), contributes in increasing human non-typhoid salmonellosis cases [14].

A variety of *Salmonella* serovars were isolated and identified in several outbreaks of foodborne infections either collective or sporadic throughout the world. *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium and Enteritidis are the two most frequent etiological agents associated with food-borne non-typhoidal salmonellosis [3,13].

In recent years, the widespread use of antimicrobial agents in human medicine and food animal production has contributed to the occurrence of antibiotic-resistant bacteria including zoonotic pathogens [3,31]. An increase in antibiotic resistance has been observed in *Salmonella* isolated from foods of animal origin. In addition, several authors have reported an increase in the incidence of salmonellosis in humans due to multi-drug-resistant strains such as *S.* Typhimurium DT104, which is currently the most geographically widespread strain [6,35].

In Algeria, laboratory members involved in bacterial resistance surveillance network reported a total of 197 non-typhoid *Salmonella* with a predominance of *Salmonella* Enteritidis (45 isolates) and 28 typhoid *Salmonella*

---

**Corresponding Author:** Taha MENASRIA, Department of Natural and Life Sciences, Faculty of Exact Sciences and Natural and Life Sciences, University of Tébessa, Tébessa 12002, Algeria.  
E-mail: [tahamenasria@hotmail.com](mailto:tahamenasria@hotmail.com).

were isolated in human medicine [1]. The study of the antibiotic susceptibility of different non-typhoid *Salmonella* isolates has shown multidrug resistance with 31.7% to ampicillin, 14.3% to amoxicillin and only 3.5% resistance to third generation cephalosporin, 45.8% for nalidixic acid and 9% resistance to ciprofloxacin [1].

However, sporadic studies and limited information on *Salmonella* food contamination and microbiological investigation in foodborne infections have not cleared the incertities in regard of the salmonellosis epidemiology in Algeria. Therefore, the current study evaluate the prevalence of *Salmonella* spp. isolated from food and human in Tebessa (Eastern Algeria) from 2007 to 2012. A combination of serotyping and analyses of antimicrobial resistance patterns was used (i) to appreciate and to characterize the diversity of non-typhoid isolated *Salmonella* serovars (ii) to identify the possible emergence of resistance and (iii) ultimately help to understand the actual contamination sources.

## MATERIALS AND METHODS

### *Sampling and bacterial isolation:*

The study was conducted over a period of five years (2007-2012), in collaboration with several health sector laboratories in Tebessa (Northeast Algeria) and the laboratory of microbiology of University Hospital Center, University of Algiers.

In aseptic conditions, samples of poultry products (eggs, poultry related samples) were collected from markets (wholesale and retail sales), transported to the laboratory and investigated immediately for bacterial contamination. For the isolation of *Salmonella*, sterile swabs from the outer surface of chicken carcass were performed during all wholesale phases, and a homogenous enrichment suspension of it was prepared in nutrient broth. Whereas for retail sale phase, eggs and chicken samples (carcass, wings, necks and breast) were placed in sterile sampling bags with nutrient broth for an enrichment suspension preparation.

Clinical specimens for human samples were collected from patients suspected of having gastrointestinal tract infection in Tebessa region and coprocultures were carried out to identify bacterial causes.

### *Salmonella identification and serotyping:*

All food and human origin *Salmonella* were isolated on Hecktoen solid media after a double selective enrichment in Selenite F broth (SFB). Suspicious strains were subjected to biochemical key tests: oxidase, sugars fermentation in TSI (Triple sugar iron), ONPG (*O*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside test) as well as urease and tryptophan decarboxylase (TDA). Presumptive positive *Salmonella* species were confirmed using miniature standard method API 20E (bioMérieux, France) and serotyped using the Kauffmann-whyte le Minor typing scheme by slide agglutination with polyvalent and type specific antisera (Bio-Rad).

### *Antimicrobial susceptibility:*

The MICs of *Salmonella* isolates were determined according to EUCAST guidelines for the micro dilution method (EUCAST, 2013). The strain *Escherichia coli* ATCC 25922 was used for quality control of the study. The micro-dilution procedure for *Salmonella* isolates was performed with an automated micro scan system (Walk-Away® plus) using the following antimicrobials: Ampicillin, Amoxicillin/clavulanic acid, Piperacillin, Cefazolin, Cefuroxime, Cefoxitin, Cefotaxime, Cefazidime, Cefepime, Imipenem, Ertapenem, Aztreonam, Nalidixic acid, Norfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin, Tetracycline, Tigecycline, Nitrofurantoin, Trimethoprim/sulfamethoxazole, Chloramphenicol, Colistin, Amikacin, Gentamicin, and Tobramycin.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest antibiotic concentration to completely inhibit bacterial growth, and the strains were considered susceptible, intermediate, or resistant according to the recommendations of the EUCAST and CA-CFM (EUCAST, 2013; CA-SFM, 2010) (Table 1). Epidemiological cut-off defined by EUCAST was focused on distinguishing susceptible isolates (wild-type) from those with reduced susceptibility (non-wild type) without taking into consideration pharmacological targets or clinical efficacy data (Table 2). Concentration ranges of tested antibiotics considered the critical concentrations corresponding to the sensitivity and resistance of limited intervals of bacterial strains.

### *Data analysis:*

An Agglomerative Hierarchical Clustering (AHC) was applied for determining relationships between isolated *Salmonella* strains according to their behavior towards the different antimicrobial tested drugs (MIC profile), which were grouped according to Pearson correlation coefficient similarities based on Ward's aggregation method.

### *Results:*

#### *Antimicrobial patterns susceptibility:*

*Salmonella* are naturally sensitive to antibiotics tested for *Enterobacteriaceae*, the distribution of strains of food and human origin according to MICs recorded with the range of selected antibiotics were presented in the context of sampling (Table 2 and 3).

**Table 1:** Minimum inhibitory concentrations interpretative standards and epidemiological cut-offs for *Salmonella* (EUCAST, 2013) [ND: Not determined, \*: MICs according to (CA-SFM, 2010)]

Antibiotics	Epidemiological cut-off (mg/L)	Minimum inhibitory concentrations (MICs) (mg/L)	
		Sensitive $\leq$	Resistant $>$
Ampicillin	8.0	8	8
Amoxicillin/Clavulanic acid	ND	8/2	8/2
Piperacillin	ND	8	16
Cefazolin*	ND	8	32
Cefoxitin*	8.0	8	32
Cefuroxime	16	8	8
Cefotaxime	0.5	1	2
Ceftazidime	2.0	1	4
Cefepime	ND	1	4
Imipenem	1.0	2	8
Ertapenem	0.064	0.5	1
Aztreonam	ND	1	4
Nalidixic acid*	16	8	16
Norofloxacin	ND	0.5	1
Ofloxacin	0.25	0.5	1
Ciprofloxacin	0.064	0.5	1
Amikacin	ND	8	16
Tobramycin	ND	2	4
Gentamycin	2.0	2	4
Tetracyclin*	8.0	4	8
Tigecyclin	1.0	1	2
Nitrofurantoin	ND	64	64
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	1.0	2/38	4/76
Chloramphenicol	16	8	8
Colistin	2.0	2	2

**Table 2:** Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates recovered from human and poultry products (ND: Not determined, Res: Resistance, Sen: Sensitive)

Antibiotic	Human origin (N = 39 strains)			Poultry product (N = 37 strains)		
	Non Wild (%)	Res (%)	Sen (%)	Non Wild (%)	Res (%)	Sen (%)
Ampicillin	38.46	38.46	61.54	0	0	100
Amoxicillin/clavulanic Acid	ND	20.51	79.49	ND	0	100
Piperacillin	ND	2.56	97.44	ND	0	100
Cefazolin	ND	15.39	84.62	ND	0	100
Cefoxitin	0	0	100	0	0	100
Cefuroxime	7.69	7.69	92.31	0	0	100
Cefotaxime	100	7.69	92.31	0	0	100
Ceftazidime	7.69	7.69	92.31	0	0	100
Cefepime	ND	7.69	92.31	ND	0	100
Imipenem	0	0	100	100	0	100
Ertapenem	100	0	100	100	0	100
Aztreonam	ND	12.82	87.18	ND	0	100
Nalidixique Acid	46.15	46.15	53.85	45.94	45.94	54.06
Norofloxacin	ND	25.64	74.36	ND	ND	ND
Ofloxacin	100	0	100	100	32.43	67.57
Ciprofloxacin	100	0	100	100	0	100
Amikacine	ND	0	100	ND	0	100
Gentamicin	7.69	7.69	92.31	0	0	100
Tobramycin	ND	20.51	79.49	ND	0	100
Tetracycline	25.64	25.64	74.36	0	0	100
Tigecycline	2.56	2.56	97.44	ND	ND	ND
Nitrofurantoin	ND	10.26	89.74	ND	ND	ND
Trimethprim/Sulfamethoxazole	10.25	15.38	84.62	100	0	100
Chloramphenicol	0	20.51	84.62	0	0	100
Colistin	0	0	100	0	0	100

**Table 3:** Resistance patterns of *Salmonella* isolates recovered from humans (AMP: Ampicillin, ATM: Aztreonam, CHL: Chloramphenicol, CPM: Cefepime, CTX: Cefotaxime, CXM: Cefuroxime, CZO: Cefazolin, GEN: Gentamicin, NAL: Nalidixic acid, NOF: Norfloxacin, OFX: Ofloxacin, PIP: piperacillin, SXT: Sulfamethoxazole/Trimethoprim, TCY: Tetracycline, TOB: Tobramycin)

Code	Serotype	Sampling date	Resistance patterns
H19	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	Sensitive
H20	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	Sensitive
H21	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	Sensitive
H27	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	NAL, NOF
H29	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	NAL, NOF, AMP, CHL
H39	<i>Salmonella</i> Hadar	2007	NAL, NOF, AMP, CZO, TCY
H28	<i>Salmonella</i> Hadar	2007	TCY
H7	<i>Salmonella</i> Heidelberg	2007	NAL, NOF
H22	<i>Salmonella</i> Heidelberg	2007	NAL, NOF
H16	<i>Salmonella</i> Typhimurium	2007	AMP, AMC, CHL
H5	<i>Salmonella</i> Typhimurium	2007	AMP, CZO, CTX, CAZ, CXM, CPM, ATM, GEN, TOB, SXT
H30	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2008	NAL, NOF
H23	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2008	NAL, NOF, AMP, CZO, AMC
H2	<i>Salmonella</i> Heidelberg	2008	NAL, NOF
H4	<i>Salmonella</i> spp.	2008	NAL, NOF, AMP, CZO, AMC, PIP, OFX, TCY
H14	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	Sensitive
H1	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	Sensitive
H18	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	NAL, NOF
H26	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	NAL, NOF
H25	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	NAL, NOF
H11	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	NAL, NOF
H6	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	NAL, NOF, TCY
H24	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	NAL, NOF, AMP
H15	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	AMP, AMC, CHL
H8	<i>Salmonella</i> Heidelberg	2009	NAL, NOF, AMP
H17	<i>Salmonella</i> Mordifii	2009	Sensitive
H9	<i>Salmonella</i> spp.	2009	AMP, AMC, CHL
H13	<i>Salmonella</i> spp.	2009	AMP, AMC, CZO, CPM, CTX, CAZ, CXM, ATM, SXT, GEN
H10	<i>Salmonella</i> Typhimurium	2009	AMP, SXT
H3	<i>Salmonella</i> Typhimurium	2009	AMP, SXT
H12	<i>Salmonella</i> Typhimurium	2009	AMP, AMC, CHL
H32	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Sensitive
H33	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Sensitive
H34	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Sensitive
H31	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Sensitive
H37	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	NAL, NOF
H35	<i>Salmonella</i> spp.	2011	NAL, NOF, SXT, TCY
H38	<i>Salmonella</i> spp.	2011	AMP, CZO, ATM, CAZ, CXM, CPM, CTX, GEN, TOB, TCY
H36	<i>Salmonella</i> Typhimurium	2011	AMP, AMC, CHL

#### Strains from poultry product:

Of the 37 *Salmonella* isolates, serotyping was allowed to characterize nine serovars. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis predominated other serovars with 62.16% (23/37), while 37.83% (14/37) of isolated strains were represented by a variety of serovars: *S. Heidelberg*, *S. New Port*, *S. Infantis*, *S. Agona*, *S. Virchow*, *S. Livingstone*, *S. Hadar* and *S. Gallinarum* (Table 4).

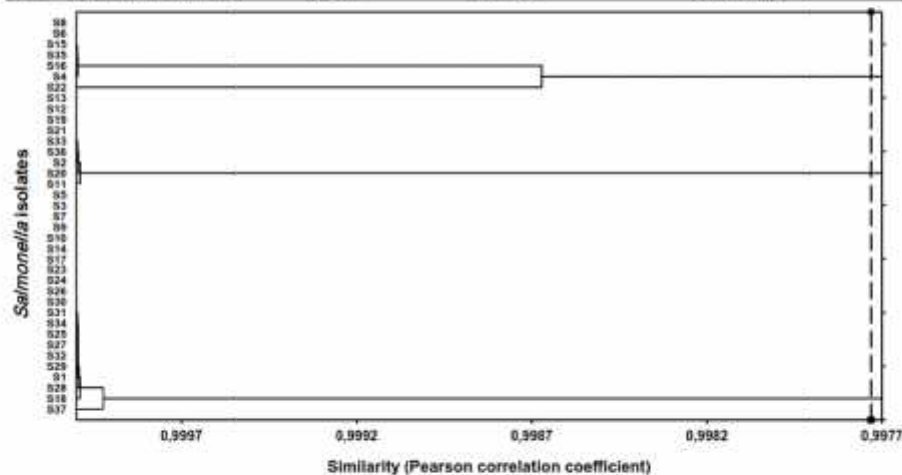
The set of non-typhoid *Salmonella* serovars showed susceptibility to all beta-lactams, aminoglycosides, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracycline and chloramphenicol. Indeed, all strains showed non-wild-type against imipenem, ertapenem, ofloxacin, ciprofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole (Table 2) and limited MICs with colistin among epidemiological thresholds values defined by EUCAST [17].

Moreover, 45.94% of *Salmonella* isolates had showed a high-level of resistance against nalidixic acid (MIC > 16 mg/L), whereas 32.43% of strains exhibited resistance to ofloxacin (MIC = 4mg). However, all tested strains were susceptible to ciprofloxacin (MIC ≤ 0.5) (Table 2).

Variations in MICs profiles were represented in a dendrogram (Figure 1). The 37 *Salmonella* strains were differentiated into three major clusters. Cluster 1 was made up of 95% of susceptible strains. This group was composed of 21 strains including 11 from carcass, eight from meat (cut) and only three strains from egg shell. A second group was made up of nine strains presenting high level of resistance to Nalidixic acid. A third group was composed of seven strains with 100% resistance to Nalidixic acid and 71.43% to Ofloxacin.

**Table 4:** Resistance patterns of *Salmonella* isolated from poultry products in the region of Tebessa (NAL: Nalidixic acid, OFX: Ofloxacin)

Code	Serotype	Sampling date	Isolate source	Resistance patterns
S1	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	Carcass	Sensitive
S3	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	Carcass	Sensitive
S2	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	Meat (Cut)	OFX, NAL
S4	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2007	Carcass	OFX, NAL
S5	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2008	Eggshell	Sensitive
S7	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2008	Meat (Cut)	Sensitive
S9	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2008	Carcass	Sensitive
S10	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2008	Carcass	Sensitive
S14	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2008	Carcass	Sensitive
S8	<i>Salmonella</i> Gallinarum	2008	Carcass	OFX, NAL
S30	<i>Salmonella</i> Agona	2009	Meat (Cut)	Sensitive
S17	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	Eggshell	Sensitive
S16	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	Carcass	OFX, NAL
S21	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2009	Meat (Cut)	OFX, NAL
S23	<i>Salmonella</i> Heidelberg	2009	Carcass	Sensitive
S13	<i>Salmonella</i> Gallinarum	2009	Carcass	OFX, NAL
S29	<i>Salmonella</i> Livingstone	2009	Carcass	Sensitive
S25	<i>Salmonella</i> New pon	2009	Meat (Cut)	Sensitive
S24	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2010	Meat (Cut)	Sensitive
S32	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2010	Minced meat	Sensitive
S28	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2010	Meat (Cut)	Sensitive
S15	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2010	Eggshell	OFX, NAL
S33	<i>Salmonella</i> Gallinarum	2010	Carcass	NAL
S26	<i>Salmonella</i> Infantis	2010	Carcass	Sensitive
S31	<i>Salmonella</i> Virchow	2010	Carcass	Sensitive
S18	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Eggshell	Sensitive
S36	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Meat (Cut)	NAL
S6	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Carcass	OFX, NAL
S11	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Meat (Cut)	OFX, NAL
S20	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2011	Eggshell	OFX, NAL
S22	<i>Salmonella</i> Gallinarum	2011	Carcass	NAL
S34	<i>Salmonella</i> Gallinarum	2011	Meat (Cut)	NAL
S27	<i>Salmonella</i> Hadar	2011	Carcass	Sensitive
S35	<i>Salmonella</i> Heidelberg	2011	Meat (Cut)	NAL
S37	<i>Salmonella</i> Heidelberg	2011	Carcass	Sensitive
S12	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2012	Carcass	OFX, NAL
S19	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2012	Carcass	OFX, NAL

**Fig. 1:** Clustering dendrogram showing relationships between *Salmonella* strains isolated from poultry products based on MICs similarity profiles.

**Cluster 1:** S1, S3, S5, S7, S9, S10, S14, S17, S18, S23, S24, S25, S26, S27, S28, S29, S30, S31, S32, S34, S37/  
**Cluster 2:** S2, S11, S12, S13, S19, S20, S21, S33, S36/ **Cluster 3:** S4, S6, S8, S15, S16, S22, S35.

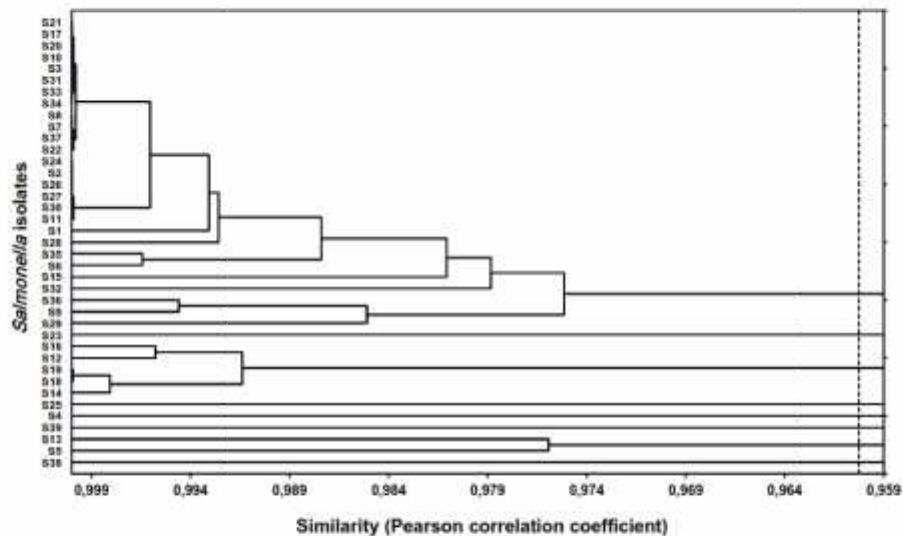
*Clinical isolated strains:*

A total of 39 *Salmonella* strains were isolated, six different serovars were identified of which *Salmonella* Enteritidis presented the predominant isolated serovar with 53.84% (21/39) followed by *S. Typhimurium* serovar with 15.38% (6/39), *Salmonella* spp. 12.82% (5/39) and 10.25% (4/39) of *Salmonella* Heidelberg. Whereas 5.13% (3/39) shared by other serovars *S. Morbifi* and *S. Hadar*, respectively (Table 3).

Among all the *Salmonella* isolates from human source, 18 antibiotic resistance patterns were observed indicating wide spread multi-drug resistance (Table 2). Twenty nine of strains (74.36%) showed a resistance to at least one antibiotic and 28 of isolated *Salmonella* (71.79%) were found to be multi-resistant. While 10 strains (25.64%) were susceptible to all tested antibiotics. Low resistance rates were seen for quinolones and fluoroquinolones (25.64%) with different levels against nalidixic acid (>16mg/L and norfloxacin > 4mg/L. All *Salmonella* strains were found susceptible to amikacine, colistin, ertapenem, ceftoxitin, ciprofloxacin, imipenem and ofloxacin

Regarding the antimicrobial susceptibility, non-wild type (100% of strains) was observed with ofloxacin (MIC = 1 mg/mL and  $\leq$  0.5 mg/L), ciprofloxacin (MIC  $\leq$  0.5 mg/L) and ertapenem (MIC = 1 mg/mL and  $\leq$  0.5 mg/L) (Table 3), while 41.02% of isolated strains were resisted to beta-lactam (aminopenicillinase, cephalosporinase) justified by different resistance profiles with three strains exhibited an extended spectrum beta-lactamase (ESBL) responsible for resistance to third-generation cephalosporins (C3G) confirmed by a synergy between the antibiotics discs amoxicillin-clavulanic acid and cefotaxim/ceftazidime. This resistance to beta-lactam was related with at least one other antibiotic; tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole, gentamicin, tobramycin, nitrofurantoin and chloramphenicol (Table 3).

Such diversity of expressing susceptibility towards different antibiotics was revealed by AHC based on Pearson's coefficient, which clustered clinical *Salmonella* into eight classes. These clusters are distinguished from each other by the number of tested antibiotics affected by an increase in the MICs belonging to a given class or a set of antibiotics classes at once. Cluster 1 was composed of 27 strains (62.23% of clinical isolates); Clusters 2, 5, 6, 7 and 8 were represented by strain each; Cluster 3 compiled two strains and cluster 4 classified five strains (Figure 2).



**Fig. 2:** Dendrogram showing relationships between *Salmonella* strains isolated from humans based on MICs similarity profiles.

**Cluster 1:** H1, H2, H3, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H15, H17, H20, H21, H22, H24, H26, H27, H28, H29, H30, H31, H32, H33, H34, H35, H36, H37; **Cluster 2:** H4; **Cluster 3:** H5, H13; **Cluster 4:** H12, H14, H16, H18, H19; **Cluster 5:** H23; **Cluster 6:** H25; **Cluster 7:** H38; **Cluster 8:** H39.

*Discussion and conclusion:*

In the present study, *Salmonella* was recovered from food (Poultry related products) and humans in eastern Algeria. Among the 11 detected serotypes, *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* are the most frequent serotypes associated with human salmonellosis in Algeria as reported the Algerian Antimicrobial Resistance Network [1].

Besides, the European Centre for Disease Prevention and Control in Europe and the Centers for Disease Control and Prevention of the US have reported that *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* are the most prevalent serotypes reported by public health laboratories in the last years [9,15]. The National Centre of Reference for *Salmonella* recorded in 2009 almost 10,000 cases of *Salmonella* spp. isolated from humans [18].

Serotypes of the foodborne *Salmonella* strains revealed the predominance of *Salmonella* Enteritidis, which was mainly recovered from carcass and meat cut chicken. In which poultry meats and eggs have been identified as the major reservoir of *S. Enteritidis*. The high prevalence of *S. Enteritidis* in poultry related products suggest that the contamination can be induced through feces due to the intestinal flora of broilers and laying hen [30]. Indeed, this fact reflects poor hygiene practices especially during slaughter with inappropriate evisceration processes for broiler, in absence of mean technologies for hygienic rules in breeding environment for laying hens.

The isolation of invasive *Salmonella* serotypes such as *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* with other pathogenic *Salmonella* indicates the public health significance as contaminated chicken meat and meat product. Our results are similar to other studies in the world, where two serovars have been implicated in human salmonellosis. In 2002 throughout the European Commission, 70% of human salmonellosis cases were caused by Enteritidis serovar and 17% of Typhimurium [13], while in the United States, *Salmonella* Enteritidis was the most frequently gastroenteritis incriminated (24.7%) followed by Typhimurium serovar (23.5%) [20]. Indeed, several studies have reported the presence of *S. Gallinarum*, *S. Newport*, *S. Infantis*, *S. Agona*, *S. Virchow*, *S. Livingstone*, *S. Hadar* and *S. Heidelberg* in poultry products, but with varying rates depending on locations, sampling protocol and the enrichment or identification methods [2,6,12,25,33].

Almost half of foodborne strains are resistance to quinolones and fluoroquinolones (nalidixic acid and ofloxacin) with varying levels, accompanied by an expression of non-wild type with ciprofloxacin, which reflects the licensing of fluoroquinolones as a growth promoter in poultry sector and for veterinary use [25]. This prevalence of resistance to nalidixic acid is in agreement with the findings of studies conducted in Spain, Turkey and China [2,38].

Serovars *S. Enteritidis* isolated from the sample sets displayed resistance to the two common antibiotics (nalidixic acid and ofloxacin). *Salmonella* resistances to quinolones or fluoroquinolones are frequently observed with nalidixic acid-resistant strains accomplished by interference with bacterial DNA metabolism mediated by mutations in bacterial DNA gyrase, and ciprofloxacin attributed to active efflux mechanisms [22]. The set of non-typhoid *Salmonella* showed susceptibility to all beta-lactams, aminoglycosides, tetracycline and chloramphenicol with expression of non-wild-type for imipenem, ertapenem, ofloxacin, ciprofloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole suggesting carriage of antibiotic resistance silent genes i.e. unexpressed genes [16,28].

In contrast, the antimicrobial susceptibility patterns of the clinical *Salmonella* strains indicated that over 84.62% of the isolates were resistant to a variety of the antibiotics tested particularly ofloxacin, nalidixic acid, ampicillin, chloramphenicol, norfloxacin, cefotaxime, cefuroxime, tobramycin and tetracycline, as reported by Zhou et al. [38] and Cardinale et al. [7].

For clinical *Salmonella* strains, several profiles marked this study compared to foodborne strains, where, eight strain classes were distinguished with the AHC in contrast to three classes observed with foodborne strains, reflecting variability of resistance mechanisms and genetic serving materials. The high rates of resistance can be explained by the overuse of antibiotic agents in human therapy practices as prophylaxis or treatment in Algeria. Indeed, clinical strains that showed susceptibility pattern to quinolones and fluoroquinolones such as foodborne strains, expressed different behavior to other antibiotic classes mainly with beta-lactams where findings of different profiles suggested the establishment of various resistance mechanisms at several spectra of inhibitory activity. However, resistance to quinolones and cephalosporins has emerged among *Salmonellae* worldwide. While *Salmonella* strains of decreased susceptibility to quinolones are now considered as widely spread [27]. Arlet et al. [5] and Miriagou et al. [24] reported an increase in the number of human infections caused by *Salmonella* resistant strains, which are originally of animal origin or food. The intense use and misuse of antibiotics play a major role in the emergence of resistant strains. Unfortunately, this is the case for Algeria where the use of antibiotics is anarchistic due to self-medication and/or medicine prescription without prior bacteriological explorations.

Non-typhoid *Salmonella* strains are a real issue for public health. They are among the main causes of collective and sporadic foodborne infections in gastrointestinal main symptoms. Usually poultry industries have complained: firstly, as a reservoir of *Salmonella* spp. and a major source of contamination of all derived food products all along the food chain, secondly, as a level of acquisition of an arsenal of resistance mechanisms often associated with the same strain due to the use of antibiotics such as growth promoter.

In order to implement strategies for prevention and infection control in developing countries, the installation of *Salmonella* monitoring program generally organized as national networks is crucial and critical for assessing serovars diversity, monitor the evolution of antibiotic susceptibility at all levels "from animal



production to human consumption", detect emerging resistant clones and finally determine the contamination sources.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the staff of Laboratory of Microbiology at the Department of Natural and Life Sciences (University of Tebessa) and Microbiology laboratory, Hospital University Center (Algiers University), for all facilities provided during carrying out this study.

#### REFERENCES

- [1] AARN (Algerian Antimicrobial Resistance Network), 2010. Antibiotic resistance monitoring. 12th evaluation report. Available on : <http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/rapport12.pdf>
- [2] Álvarez-Fernández, E., C. Alonso-Calleja, C. García-Fernández and R. Capita, 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain : Comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology*, 153: 281-287.
- [3] Amorim, L.R.P., J.A.C. Tamames, J.G.L. Silva, P.A. Gibbs and P.C. Teixeira, 2010. Numeric taxonomy approaches for lytic evaluation of *Salmonella* specific bacteriophages. *Food Control*, 21: 754-759.
- [4] Antunes, P., C. Reub, J.C. Sousa, L. Peixe and N. Pestana, 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 97-103.
- [5] Arlet, G., T.J. Barrett, P. Butaye, A. Cloeckaert, M.R. Mulvey and D.G. White, 2006. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes and Infection*, 8: 1945-1954.
- [6] Bacci, C., E. Boni, I. Alpigiani, E. Lanzoni, S. Bonardi and F. Brindani, 2012. Phenotypic and genotypic features of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolated from chicken meat and chicken and quail carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, 160: 16-23.
- [7] Cardinale, E., J.D.P. Gros-Claude, K. Rivoal, V. Rose, F. Tall, G.C. Mead and G. Salvat, 2005. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *Enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 968-977.
- [8] CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie), 2010. Recommandations 2010. [http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/sfm/2010\\_antibiotiques\\_casfm.pdf](http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/sfm/2010_antibiotiques_casfm.pdf)
- [9] CDC (Centers for Disease Control), 2011. Preliminary FoodNet Data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states, 2008. Available on: [http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5813a2.htm?s\\_cid=mm5813a2\\_e](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5813a2.htm?s_cid=mm5813a2_e)
- [10] Chu, C., D-W. Wong, M-H. Wang, H-H. Lin, Y-S. Chen, N. Tien, M-C. Shih, T-H. Chen and C-H. Chiu, 2009. Genotyping, plasmid analysis and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis isolates from humans and chickens in central Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association*, 108: 765-771.
- [11] CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth informational supplement, 28: 1. CLSI, Wayne, PA.
- [12] Diez-García, M., R. Capita and C. Alonso-Calleja, 2012. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology*, 31: 173-180.
- [13] EC (European Commission), 2003. Opinion of the Scientific Committee for Veterinary Measures Relating to Public Health on *Salmonellae* in Foodstuffs, Adopted 14-15 April 2003. Available at: [http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out66\\_en.pdf](http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out66_en.pdf)
- [14] EFSA (European Food Safety Authority), 2008. Opinion of the scientific panel on Biological Hazards (BIOHAZ). A quantitative microbiological risk assessment on *Salmonella* in meat [1]: Source attribution for human salmonellosis from meat [2]. *EFSA Journal*, 8: 625-657. Available at: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/625.htm>
- [15] EFSA (European Food Safety Authority), 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2009. *EFSA Journal*, 9: 2090-2477. Available at: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/209.pdf>
- [16] Enne, V.I., A.A. Delsol, J.M. Roe and P.M. Bennett, 2006. Evidence of Antibiotic Resistance Gene Silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 3003-3010.
- [17] EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), 2013. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 3.0. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/EUCAST\\_Breakpoint\\_table\\_v\\_3.0.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_Breakpoint_table_v_3.0.pdf).
- [18] Francois-Xavier, W and L.H. Simon, 2009. Rapport d'activité annuel, 2009. Institut Pasteur, Paris, France.

- [19] Geornaras, I. and A. von Holy, 2001. Antimicrobial susceptibilities of isolates of *Staphylococcus aureus*, *Listeria* species and *Salmonella* serotypes associated with poultry processing. *International Journal of Food Microbiology*, 70: 29-35.
- [20] Glynn, M.K., C. Bopp, W. Dewitt, P. Dabney, R.M. Mokhta and F.J. Angulo, 1998. Emergence of multi-drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *The New England Journal of Medicine*, 338: 1333-1338.
- [21] Gorman R. and C. Adley, 2004. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from human, food and animal sources in the Republic of Ireland. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 2314-2316.
- [22] Hur, J., C. Jawale and J.H. Lee, 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International*, 45: 819-830.
- [23] Mała, L., E. Maćkiw, H. Ścieżyńska, K. Pawłowska and M. Popowska, 2013. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated from retail meat products in Poland between 2008 and 2012. *Food Control*, 36: 199-204.
- [24] Miriagou, V., P.T. Tassios, N.J. Legakis and L.S. Tzouvelekis, 2004. Expanded spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23: 547-555.
- [25] Oliveira, S.D., F.S. Flores, L.R. Santose and A. Brandelli, 2005. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 297-305.
- [26] Oliveira, S.D., L.R. Santos, D.M.T. Schuch, A.B. Silvae, C.T.P. Salle and C.W. Canal, 2002. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Veterinary Microbiology*, 87: 25-35.
- [27] Piddock, L.J.V., 2002. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiology Letters*, 26: 3-16.
- [28] Randall, L.P., S.W. Coole, M.K. Osborn, L.J.V. Piddock and M.J. Woodward, 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53: 208-216.
- [29] Rotimi, V.O., W. Jamal, T. Pal, A. Sovenned and M. John Albert, 2008. Emergence of CTX-M-15 type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella* spp. in Kuwait and the United Arab Emirates. *Journal of Medical Microbiology*, 57: 881-886.
- [30] Singh, S., A.S. Yadav, S. M. Singh and P. Bharti, 2010. Prevalence of *Salmonella* in chicken eggs collected from poultry farms and marketing channels and their antimicrobial resistance. *Food Research International*, 43: 2027-2030.
- [31] Threlfall, E.J., C.J. Teale, R.H. Davies, L.R. Ward, J.A. Skinner, A. Graham, C. Cassar and K. Speed, 2003. A comparison of antimicrobial susceptibilities in nontyphoidal *Salmonellas* from humans and food animals in England and Wales in 2000. *Microbial Drug Resistance*, 9: 183-189.
- [32] Turki, Y., I. Mehri, H. Cherif, A. Najjari, R. Ben Aissa, A. Hassen, H. Ouzari, 2012. Epidemiology and antibiotic resistance of *Salmonella enterica* Serovar Kentuck isolates from Tunisia: The new emergent multi-drug resistant serotype. *Food Research International*, 45: 925-930.
- [33] Uyttendaele, M.R., J.M. Debevere, R.M. Lips and K.D. Neyts, 1998. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 40: 1-8.
- [34] Williams, M.S., E.D. Ebel, N. J. Golden and W.D. Schlosser, 2014. Temporal patterns in the occurrence of *Salmonella* in raw meat and poultry products and their relationship to human illnesses in the United States. *Food Control*, 35: 267-273.
- [35] World Health Organization, 1997. *The Medical Impact of the Use of Antimicrobials in Food Animals*. Geneva, Switzerland: World Health Organization WHO/EMC/ZOO.
- [36] Van Diest, J and A. de Jong, 1999. Overview of quinolone usage for food-producing animals. In: *Use of quinolones in food animals and potential impact on human health*. Report and proceedings of a WHO meeting. Geneva: World Health Organization, p: 97.
- [37] Vijaya, D., K. Janakiram, J.V Sathish, D.R Mohan and A. Sharma. 2012. *Salmonella Enteritidis* Causing Gastroenteritis: A Case Report. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 6: 727-728.
- [38] Zhou, Y., Z. Pan, Y. Li, X. Kang, X. Wang, S. Geng, Z. Liu, X. Jiao and X. Liu, 2013. Epidemiological analysis of *Salmonella* isolates recovered from food animals and humans in eastern China. *Food Research International*, 54: 223-229.

## Annexes 2

### Milieu Hektoen (HK)

- Peptone pepsique de viande.....	12,0 g
- Extrait autolytique de levure .....	3,0 g
- Lactose.....	12,0 g
- Saccharose .....	12,0 g
- Salicine.....	2,0 g
- Sels biliaires .....	9,0 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g
- Thiosulfate de sodium .....	5,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal .....	1,5 g
- Bleu de bromothymol .....	65 mg
- Fuchsine acide .....	40 mg
- Agar agar bactériologique .....	13,5 g
- Eau distillée .....	qsp 1000ml
-pH final .....	7,2-7,4

### Milieu (SFB)

-Enzymatic Digest of Casein .....	2.5 g
-Enzymatic Digest of Animal Tissue.....	2.5g
-Lactose .....	4 g
-Sodium Phosphate .....	10 g
-Sodium Selenite .....	4 g
-pH final .....	7.0 ± 0.2

### Milieu Mueller-Hinton (MH)

-Infusion de viande de boeuf déshydratée .....	300g
-Hydrolysate de caséine .....	17,5g
-Amidon de maïs .....	1,5g
-Agar agar .....	13g
-Eau distillée .....	qsp 1000ml
-pH final .....	7,2-7,4

**SCHEMA DE WHITE-KAUFFMANN-LE MINOR**  
**Formules antigéniques des sérotypes de *salmonella* les plus fréquents**

Mélange O polyvalent	Groupe	Nom usuel	Antigènes O	Antigènes H			
				Phase1	Phase2		
OMA	<b>Groupe O : 4 (B)</b>	Paratyphi B	<u>1</u> , 4, [5], 12	b	1, 2		
		Wien	<u>1</u> ,4, 12, <u>27</u>	b	1, w		
		Stanley	<u>1</u> ,4, [5], 12, <u>27</u>	d	1, 2		
		Duisburg	<u>1</u> ,4, 12, <u>27</u>	d	e, n, z15		
		Saintpaul	<u>1</u> ,4, [5], 12, <u>27</u>	e, h	1, 2		
		Reading	<u>1</u> ,4, [5], 12	e, h	1, 5		
		Chester	<u>1</u> ,4, [5], 12	e, h	e, n, x		
			<u>1</u> ,4, [5], 12	f, g	[1, 2]		
		<b>Derby</b>	<u>1</u> ,4, 12	f, g, s	-		
		Agona	<u>1</u> ,4, [5], 12	i	1, 2		
		Typhimurium	<u>1</u> ,4, [5], 12	i, v	e, n, z15		
		Brandenburg	1,4, 12	r	1, 2		
		Heidelberg	4, [5], 12	y	1, 2		
		Coeln	4, 12	g, m	-		
		Essen		c	1, 6		
		Abortusovis					
		OMB	<b>Groupe O : 7 (C1)</b>	Paratyphi C	6, 7 [Vi]	c	1, 5
				Choleraesuis	6, 7	c	1, 5
				Isangi	6, 7	d	1, 5
Livingstone	6, 7			d	1, w		
Eimsbuttel	6, 7, <u>14</u>			d	1, w		
Montevideo	6, 7			g, m, s	-		
Oranienburg	6, 7			m, t	-		
Thompson	6, 7			k	1, 5		
Infantis	6, 7			r	1, 5		
<b>Groupe O : 8 (C2-C3)</b>	Muenchen			6, 8	d	1, 2	
	Manhattan			6, 8	d	1, 5	
	Newport		6, 8	e, h	1, 2		
Blockley	6, 8		k	1, 5			
Lichtfeld	6, 8		l, v	1, 2			
Bovismorbificans	6, 8	r	1, 5				
OMA	<b>Groupe O : 9 (D1)</b>	Typhi	9, 12 [Vi]	d	-		
		Enteritidis	1, 9, 12	g, m	-		
		Dublin	1, 9, 12	g, p	-		
		Gallinarum	<u>1</u> , 9, 12	-	-		
		(volailles)	1, 9, 12	l, v	1, 5		
		Panama	[9], 46	d	1, 7		
		Strasbourg					
OMA	<b>Groupe O:3,10 (E1)</b>	Muenster	3, 10	e, h	1, 5		
		Anatum	3, 10	e, h	1, 6		
		Meleagridis	3, 10	e, h	1, w		
		London	3, 10	l, v	1, 6		
		Give	3, 10, [15]	l, v	1, 7		
	<b>Groupe O:1,3,19 (E4)</b>	Senftenberg	1, 3, 19	g, [s], t	-		
	OMB	<b>Groupe O : 13 (G)</b>	Kedougou	<u>1</u> , 13, 23	i	1, w	
Worthington			1, 13, 23	z	1, 5		
OMA	<b>Groupe O : 2 (A)</b>	Paratyphi A (Afrique, Asie)	<u>1</u> , 2, 12	a	-		
OMC	<b>Groupe O : 18 (K)</b>	Cerro	<u>6</u> , <u>14</u> ,18	Z 4, Z23	[1,5]		

- **Sérums d'agglutination des salmonelles et conduite de serotypage selon le fabricant (BIO-RAD)**
- **Sérums O pour la détermination de la formule antigénique**

Ces sérums sont destinés à l'identification du groupe O. Ils doivent être utilisés successivement dans un ordre logique (polyvalents puis monovalents spécifiques du groupe...). Les facteurs O secondaires ne seront recherchés que dans un deuxième temps. Par exemple, on ne recherchera

- les facteurs O : 7 et O : 8 que si l'on observe une agglutination dans le sérum O : 6, 7,8.
- le facteur O : 15 que si l'on observe une agglutination dans le sérum O : 3, 10, 15

### SÉRUMS MELANGES (POLYVALENTS) O (BIO-RAD)

Polyvalent sera	Contains agglutinins for groups	Corresponding O somatic antigen	Code
Antiserum Salmon	A, B, D, E, L	1, 2,12 + 4, 5,12 + 9,12 + 9,46 + 3,10 + 3,15 + 1,3,19 +21	60801
Antiserum <i>Salmonella</i> polyvalent OMB	C, F, G, H	6, 7 + 6, 8 + 11 + 13, 22 + 13, 23 + 6, 14, 24 + 8, 20	60811
Antiserum <i>Salmonella</i> polyvalent OMC	I, J, K, M, N, O, P	16 + 17 + 18 + 28 + 30 + 35 + 38	60821
Antiserum <i>Salmonella</i> polyvalent OMD	Q, R, S, T, U, V, W	39 + 40 + 41 + 42 + 43 + 44 + 45	60831
Antiserum <i>Salmonella</i> polyvalent OME	X, Y, Z, 51 à 53	47 + 48 + 50 + 51 + 52 + 53 + 61	60841
Antiserum <i>Salmonella</i> polyvalent OMF	54 + 55 + 56 + 57 + 58 + 59		60851
Antiserum <i>Salmonella</i> polyvalent OMG	60 + 62 + 63 + 65 + 66 + 67		60861

### SÉRUMS MONOVALENTS O (BIO-RAD)

Monovalent sera	Group	Code	Monovalent sera	Group	Code
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent O:1, 2	A	59031	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent O:3, 10, 15	E1, E2	59112
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent O:4,5	B	59021	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent O:15		59127
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent O:6,7,8	C	59062	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent O:1, 3, 19	E4	59131
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent O:7		59081	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent O:11	F	59141
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent O:8		59091	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent O:13, 22, 23	G	59162
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent O:9	D	59101	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent O:6, 14, 24		59171

- **Sérums H pour la détermination de la formule antigénique**

On suivra dans l'utilisation de ces sérums la même logique que pour les sérums O. Par exemple, on utilisera :

- les sérums monovalents H:2, H:5, H:6, H:7 si l'on observe une agglutination dans le sérum polyvalent H1
- les sérums monovalents z10 et z15 si l'on observe une agglutination dans le sérum polyvalent HE, etc...

## SERUMS MELANGES (POLYVALENTS) H (BIO-RAD)

Polyvalent sera	Corresponding flagellar antigen	Code
Antiserum <i>Salmonella</i> polyvalent HMA	a + b + c + d + i + z10 + z29	60451
Antiserum <i>Salmonella</i> polyvalent HMB	e, h + e, n, x + e, n, z15 + G	60461
Antiserum <i>Salmonella</i> polyvalent HMC	k + y + z + L + Z4 + r	60471
Antiserum <i>Salmonella</i> polyvalent HMD	z35 + z36 + z38 + z39 + z41 + z42 + z44 + z60	60481
Antiserum <i>Salmonella</i> polyvalent HMIII facteurs H des sous-espèces III (Arizona)	z52 + z53 + z54 + z55 + z57 + z61	60493

## SERUMS MONOVALENTS H (BIO-RAD)

Monovalent sera	Code	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:r	60201
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:a	60111	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:v	61115
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:b	60121	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:w	61116
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:c	60131	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:x	61123
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:d	60141	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:y	60211
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:g, m	61121	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:z	60221
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:g, p	61122	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H: z10	60241
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:h	61119	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H: z15	61120
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:i	60161	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:2	61111
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:k	60171	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:5	61112
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:m	61117	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:6	61113
Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:p	61118	Antiserum <i>Salmonella</i> monovalent H:7	61114

- **Sérum Anti Vi**

L'antigène Vi est un antigène de surface thermolabile qui peut masquer l'activité antigénique somatique. Il est principalement exprimé par les souches *S. Typhi*, plus rarement par les souches *S. paratyphi C*. Les *Salmonella* possédant cet antigène ne sont pas agglutinées par les antisérums O.

Lorsqu'une bactérie n'agglutine ni le "mélange" OMA ni le "mélange" OMB, il est recommandé de tester cette bactérie avec le sérum Vi. Si la réaction est positive, il faut alors chauffer la suspension bactérienne à 100°C pendant 30 minutes, puis tester à nouveau les polyvalents OMA et OMB puis les monovalents correspondants.

- **Sérums pour inversion de phases (méthode de sven gard) :**

Si la population bactérienne est équilibrée entre phases 1 et 2 de l'antigène H, il est alors possible de les détecter et donc de faire l'identification du sérovar. Si, au contraire, on ne peut identifier qu'une des 2 phases de l'antigène H, il faut alors déterminer la spécificité de la seconde phase en utilisant la gélose Sven Gard pour inversion de phase additionnée d'une goutte d'antisérum SG contenant l'agglutinine de la phase déjà déterminée.

Le milieu Sven-Gard (code 53431) est une gélose suffisamment molle pour qu'une *Salmonella* mobile, ensemencée au centre d'une boîte de petri, envahisse la surface du milieu après une nuit d'étuve.

### SÉRUMS ANTI-H POUR INVERSION DE PHASE (METHODE DE SVEN GARD)

Sérums polyvalents	Agglutinines	Codes
Antiserum <i>Salmonella</i> SG1	a + b+ c+ z10	61011
Antiserum <i>Salmonella</i> SG2	d + i + e, h	61021
Antiserum <i>Salmonella</i> SG3	k + y + l, v + l, w + l, z13 + l, z28	61031
Antiserum <i>Salmonella</i> SG4	r + z	61041
Antiserum <i>Salmonella</i> SG5	e, n, x + e, n, z15	61051
Antiserum <i>Salmonella</i> SG6	1, 2 + 1, 5 + 1, 6 + 1, 7 + z6	61061

#### • MODE OPÉRATOIRE (AGGLUTINATION SUR LAME)

Le serotypage est effectué, après identification de l'espèce, à partir d'une culture pure et fraîche de *Salmonella* isolée sur milieu gélosé non sélectif.

Réaliser un contrôle de la souche à tester en eau physiologique :

- Prélever 1 öse de la culture de *Salmonella*.
- Mettre ces bactéries en suspension dans une goutte d'eau physiologique en prenant soin de faire une suspension homogène.

Il ne doit pas y avoir d'agglutination avec l'eau physiologique. S'il y a agglutination, il s'agit d'une souche auto-agglutinable et le test avec les antisérums n'est pas réalisable.

- Rechercher d'abord l'agglutination avec les sérums polyvalents puis avec les sérums spécifiques correspondant au mélange donnant une agglutination nette (polyvalents O et monovalents O puis polyvalents H et monovalents H).
- Déposer sur une lame 1 goutte d'antisérum.
- Prélever 1 öse de la culture de *Salmonella* (dans la partie la plus humide pour la recherche des antigènes H).
- Mettre ces bactéries en suspension dans la goutte d'antisérum en prenant soin de faire une suspension homogène par adjonction progressive des bactéries dans le sérum.
- Agiter la lame par un léger mouvement rotatif.
- Observer le mélange à l'oeil nu au-dessus d'une surface sombre ou au-dessus d'un miroir concave.

- **INVERSION DE PHASES**

- Ajouter à la gélose liquéfiée de Sven Gard, et ramenée à 45°C environ, une goutte de sérum SG contenant l'agglutinine de la phase déjà déterminée.
- Agiter le milieu par un mouvement tournant tel que le sérum y soit mélangé de manière homogène, puis couler en boîte de Petri.
- Après solidification, s'il reste des gouttes d'eau de condensation en surface, sécher la gélose couvercle entrouvert.
- Ensemencer abondamment au centre 3 à 4 colonies de culture pure et fraîche de salmonelles prélevées sur milieu gélosé.
- Mettre à l'étuve à 37°C pendant 18 heures (couvercle de la boîte vers le haut).
- Rechercher l'agglutination avec les sérums anti-H à la périphérie de la zone d'envahissement de la gélose (suivant le mode opératoire ci-dessus).

- **INTERPRETATION DES RÉSULTATS**

Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une agglutination en **1 minute maximum**. L'agglutination O est fine et régulière et se distingue très facilement de fragments de colonie bactérienne mal émulsionnés éventuellement présents.

**Remarques :**

- Toute culture de *Salmonella* O agglutinable sera immédiatement agglutinée dans l'un des sérums polyvalents. Une co-agglutination plus tardive et d'intensité moindre pourra se produire dans un ou plusieurs des autres sérums.
- Lorsqu'une bactérie n'agglutine ni le "mélange" OMA ni le "mélange" OMB, il est recommandé de tester cette bactérie avec le sérum Vi.
- *S. Typhi* en forme Vi est O inagglutinables vivante. Elle ne devient O agglutinables qu'après chauffage de la suspension.
- Les sérums HMA, HMB, HMC, et HMD ne contiennent pas d'agglutinines O. Au contraire, il reste des agglutinines O dans le sérum HM III. Si une culture est agglutinée par ce sérum, on pourra confirmer qu'il s'agit d'une agglutination H en rajoutant à 1ml de suspension bactérienne 1 goutte de sérum HM III. Après 2 heures au bain-marie à 37°C, une agglutination floconneuse apparaît si la souche possède un antigène correspondant aux anticorps de ce sérum.
- Une souche qui possède le facteur H: g est agglutinée par les deux sérums H:g, m et H:g, p.
- Le sérum H1 permet de détecter une souche dont l'antigène H serait en phase 2 "non spécifique" (1, 2 ou 1, 5 ou 1, 7).



- **La galerie API 20 E : mode opératoire et règles de lecture selon le fabricant (Bio-Mérieux)**

#### **. Préparation de la galerie :**

- ✓ mettre de l'eau distillée sur le fond de la boîte (partie alvéolée), toutes les alvéoles doivent être remplies, éliminer l'excès d'eau en renversant la boîte au dessus de l'évier.
- ✓ Placer la galerie sur le fond de la boîte, elle doit être manipulée avec la pince.
- ✓ Recouvrir la boîte avec son couvercle.

#### **. Inoculation de la galerie**

- ✓ A partir d'une culture pure de 18 à 24 heures, faire une suspension bactérienne ayant une concentration de  $10^8$  bactéries/ml (standard McFarland No 5) dans 5 ml d'eau physiologique.
- ✓ Bien mélanger la suspension bactérienne au vortex 5-10 secondes.
- ✓ Déposer soigneusement 150  $\mu$ l de la suspension bactérienne dans chaque cupule de la galerie en utilisant un embout stérile.
- ✓ Ajouter de nouveau 150  $\mu$ l de la suspension bactérienne aux cupules CIT, VP et GEL (total = 300  $\mu$ l) par puits.
- ✓ Après l'inoculation, remplir les cupules ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S et URE d'huile minérale.
- ✓ Placer les galeries dans une chambre humide (boîte de plastique avec couvercle contenant un papier humide) et incuber à 30°C pendant 18 à 24 heures.

#### **. Lecture de la galerie**

- ✓ Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- ✓ Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs

- Lecture de la galerie miniaturisée Api 20 E

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
<b>ONPG</b>	Ortho-nitro-phenyl-galactoside	Beta-galactosidase	incolore	Jaune
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
<b>LDC</b>	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
<b>ODC</b>	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
<b>CIT</b>	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleau-vert/vert
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
<b>TDA</b>	Tryptophane	Tryptophane désaminase	<b>TDA/ Immédiat</b>	
			Jaune	Marron foncé
<b>IND</b>	Tryptophane	Production d'indole	<b>IND /2 mn, max</b>	
			Jaune	Anneau rouge
<b>VP</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	<b>VP1 + VP2 / 10 mn</b>	
			Incolore	Rosé-rouge
<b>GEL</b>	Gélatinbe de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
<b>GLU</b>	Glucose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>MAN</b>	Mannitol	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>INO</b>	Inositol	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>SOR</b>	Sorbitol	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>RHA</b>	Rhamnose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>SAC</b>	Saccharose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>MEL</b>	Melibiose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>AMY</b>	Amygdaline	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>ARA</b>	Arabinose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>OX</b>	Sur papier filtre	Cytochrome-oxydase	<b>OX / 5- 10 mn</b>	
			Incolore	Anneau violet
<b>NO<sub>3</sub>-NO<sub>2</sub></b>	Tube GLU	Production de NO <sub>2</sub>	<b>NIT 1 + NIT 2 /2-3 mn</b>	
			Jaune	Rouge
		Réduction au stade N <sub>2</sub>	<b>ZN</b>	
			Rouge	Jaune
<b>MOB</b>	Microscope	Mobilité	Immobile	Mobile
<b>MAC</b>	Milieu de MacConKey	Culture	Absence	Présence
<b>OF</b>	Glucose	Fermentation : sous huile	Vert	Jaune
		Oxydation : à l'air	Vert	Jaune
<b>CAT</b>		Possession d'une catalase	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 1-2 mn</b>	
			Pas de bulles	Bulles

**Récapitulatif des caracteristiques biochimiques des salmonelles d'origine alimentaire sur galerie API 20E.**

nd	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	CODE
1	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
3	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
4	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
5	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	6604102
6	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	6604102
7	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	6604102
8	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	6604102
9	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
10	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
11	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
12	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
13	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
14	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
15	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
16	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	6704512
17	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	6604102
18	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
19	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
20	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
21	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
22	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
23	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
24	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
25	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
26	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
27	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
28	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
29	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
30	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
31	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
32	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552

md	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
2	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
3	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
4	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
5	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
6	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
7	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
8	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
9	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
10	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
11	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
12	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
13	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
14	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
15	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
16	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1
17	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1
18	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
19	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
20	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
21	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
22	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
23	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
24	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
25	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
26	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
27	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
28	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
29	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
30	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
31	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
32	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1

**Récapitulatif des caractéristiques biochimiques des salmonelles d'origine humaine sur galerie API 20E.**

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	CODE
1	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	6704752
2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	6704752
3	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
4	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	6704762
5	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	6704752
6	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	6704752
7	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
8	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	6704752
9	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	6704752
10	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
11	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
12	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
13	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
14	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	6704752
15	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
16	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
17	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	6704752
18	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
19	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	6704752
20	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	6704752
21	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
22	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
23	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	6704712
24	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
25	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	6704752
26	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	6704552
27	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	6704712

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
2	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
3	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
4	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
5	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
6	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
7	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
8	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
9	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
10	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
11	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
12	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
13	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
14	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
15	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
16	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
17	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
18	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
19	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
20	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
21	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
22	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
23	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
24	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
25	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
26	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
27	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1

**Annexe 3 :**

**Consensus ARN 16S**

**>souche5**

CAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCGCCAAGGCACAAATCCATCTCT  
GGATTCTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCG  
AATTAACCCACATGCTCCACCCTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTG  
AGTTTTAACCTTGCAGGCTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAG  
CTCCGGAAGCCACGCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTAC  
GGCGTGGACTACCAGGATCTAATCCTGTTTGTCCACGCTTTTCGCA  
CCTGAGCGTCACTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCCGCCACCGGATTCTCT  
CCAGATCTTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTTACCCCCCTCA  
CAAGACTCAAGCCTGCCAGTTTCAATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGG  
GATTTACATCCGACTTGACAGACCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTA  
ATTCCGATTAAACGCTTGACCCCTCGTATTACCGCGCTGCTGGCAGGA  
GTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACTGCAATGCTGCGGTTATTAAC  
CACAAACCTTCTCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGCCCTTCT  
TCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTCATTAATTC  
CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGACCGGTGCTCAGTTCAGTGTG  
GCTGGTCACTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTGCCTTGGTGGAGCCGTT  
ACCTCACCAACAAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCAAGAGGCC  
CGAAGGTCCCCTCTTGGTCTTGCAGCTTATGCGGTATTAGCCACCGT  
TTCAGTAGTATCCCTCCATCAGGCAGTTTCCAGACATTAATCACCC  
CGTCCGCACTCGTACGCAAGCAGCAAGCTGCTTCTGTTACCGTTTCA  
CTTGATGTGTTAGGCTGCCGCCAGGCTTCAATCTGA

**>Souche7**

GGCTCAGATTGAACGCTGGCGGACAGGCTAACACATGCAAGTGAACCGT  
AACAGGAAGCAGCTTGTCTTGTGCTGACGAGTGGCGGACGGTGAGTAA  
TGTCTGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACCGTGGCT  
AATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTTG  
CCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTWGTGGTGGTAAACGGCTCA  
CCAAGGGCAGCATCCCTAGCTGCTGAGAGGATGACCCAGCCACTGGA  
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC  
ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCTGCGCGTGTATGAAGAAGGCC  
TCGGGTTGTAAGTACTTTACGCGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAAC  
CRCAGCAATTGACGTTACCCGCAAGAAAGCACCAGGCTAATCCGTTGCA  
GCAGCCGCGTAATACGAGGGTGAAGCGTTAATCG

**>souche3**

CATGCAGCACTGTCTCACAGTTCGCCAAGGCACAAATCCATCTCTGGAT  
TCTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATT  
AAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTT  
TTAACCCTTGCAGGCTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAGCTCC  
GGAAAGCCACGCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCG  
TGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCACGCTTTTCGCACTG  
AGCGTCACTTGTCCAGGGGGCCGCTTCCGCCACCGGATTCTCCAG  
ATCTCTACGCAATTCACCGCTACACCTGGAATTTACCCCCCTCAAG  
ACTCAAGCCTGCCAGTTTCAATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGGATT  
TCACATCCGACTTGACAGACCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATTC  
CGATTAACGCTTGACCCCTCGTATTACCGCGCTGCTGGCACGGAGTTA  
GCCGGTCTTCTTCTGCGGTAACGTTCAATGCTGCGGTTAATAACCACA  
ACACCTTCTCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCCTTCTCAT  
ACAGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTTCCCA  
CTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTG  
GTCATCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTGCCTTGGTGGAGCCGTTACCT  
CACCACAAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCAAGAGGCCGAA  
GGTCCCCTCTTGGTCTTGCAGCTTATGCGGTATTAGCCACCGTTTCC  
AGTAGTATTTCCCTCCATCAGGCAGTTTCCAGACATTAATCAACCGTC  
CGCACTCGTACGCAAGCAGCAAGCTGCTTCTGTTACCGTTTCGACTTG  
CATGTGTTAGGCTGCCGCCAGGCTTCAATCTGA

**>Souche6**

GATTGAACGCTGGCGGACAGGCTAACACATGCAAGTGAACGGTAAACAGG  
AAGCAGCTTGTCTTGTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTG  
GGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACCGTGGCTAATACC  
GCATAACCTCGCAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTTGGCATCA  
GATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGTGGTGGTAAACGGCTCACCAGG  
CGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGG  
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG  
GGCGCAAGCTGATGCAGCCTGCCGCTGATGAAGAAGGCCCTTCGGGT  
TGTAAAGTACTTTACGCGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGC  
AATTGACGTTACCCGCAAGAAAGCACCAGGCTAATCCGTTGCCAGCAGCC  
GCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAATGGCGTAAAGC  
GCACGAGCGGTCTGCAAGTCCGATGTGAAATCCCCGGCTCAACCTG  
GGAAGTGCATTGAAACTGGCAGGCTTGGTCTGTAGAGGGGKGTAGAA  
TTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC  
GAAGGCGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG  
AGCAAACAGGATTAGATACCTGGTGTCCACGCCGTAACAGATGTCTAC  
TTGGAGGTTGTCCCTTGGCGGTGGCTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTA  
GACCCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAATGAATTGACGG  
GGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAG  
AACCTTACCTGGTCTGACATCCACGGAAG

**>souche8**

GCTCAGATTGAACGCTGGCGGACAGGCTAACACATGCAAGTGAACGGTA  
ACAGGAAGCAGCTTGTCTTGTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAT  
GTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACCGTGGCTA  
ATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTTGC  
CATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGTGGTGGTAAACCGCTCAC  
CAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAA  
CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA  
CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCTGCCGCTGTATGAAGAAGGCCCT  
CGGGTTGTAAGTACTTTACGCGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACC  
GCAGCAATTGACGTTACCCGCAAGAAAGCACCAGGCTAATCCGTTGCCAG  
CAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAATGGCGCT  
AAAGCGCAGCAGCGGCTGTCAAGTCCGATGTGAAATCCCCGGCTCA  
ACCTGGGAACTGCATTGCAAACTGGCAGGCTTGAAGTCTGTAGAGGGGG  
TAGAATCCAGGTTGAGCGTGAATGCTGAGATCTGGAGGAATACCG  
GTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCG  
TGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTGTCCACGCCGTTAAACGATG  
TCTACTGGAGGTTGTGCCCTTGGGCGTGGCTTCGGAGCTAACCGGTT  
AAGTAGACCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAATGAAT  
GACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACG  
CGAAGAACCTTACCTGCTTGCATCCACAGAAGATCCAGAGA

**>souche1**

CAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCGCCAAGGCACAAATCCATCTCT  
GGATTCTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCG  
AATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTG  
AGTTTTAACCTTGCAGGCTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAG  
CTCCGGAAGCCACGCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTAC  
GGCGTGGACTACCAGGATCTAATCCTGTTTGTCCACGCTTTTCGCA  
CCTGAGCGTCACTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCCGCCACCGGATTCTCT  
CCAGATCTTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTTACCCCCCTCA  
CAAGACTCAAGCCTGCCAGTTTCAATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGG  
GATTTACATCCGACTTGACAGACCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTA  
ATTCCGATTAAACGCTTGACCCCTCGTATTACCGCGCTGCTGGCAGGA  
GTTAGCCGGTCTTCTTCTGCGGGTAACTGCAATGCTGCGGTTATTAAC  
CACAAACCTTCTCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCCTTCT  
TCATACACGCGCATGGCTGCATCAGGCTTCCGCCCCATTGTCATTAATTC  
CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTG  
GCTGGTCACTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTGCCTTGGTGGAGCCGTT  
ACCTCACCAACAAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCAAGAGGCC  
CGAAGGTCCCCTCTTGGTCTTGCAGCTTATGCGGTATTAGCCACCGT  
TTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCAGACATTAATCAC  
CGTCCGCACTCGTACGCAAGCAGCAAGCTGCTTCTGTTACCGTTTCA  
CTTGATGTGTTAGGCTGCCGCCAGGCTTCAATCTGA

**>souche4**

AGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTCCCGAAGGCACAAATCCATCTCTG  
GATTCTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGA  
ATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGA  
GTTTTAACCTTGC GGCCGTA CCCCAGGCGGTACTTAAACGCGTTAGC  
TCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACTCCAAGTAGACATCGTTTACG  
GCGTGGA CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCAC  
CTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCTC  
CAGATCTACGCATTTACCCTGCTACACCTGGAATTCTACCCCTCTAC  
AAGACTCAAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGGG  
ATTTACATCCGACTTGACAGACCGCTGCGTGCGCTTACGCCAGTAA  
TTCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAG  
TTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATTGCTGCGGTTATTAACC  
ACAACACCTTCTCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTT  
CATACACGCGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCC  
CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGG  
CTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTA  
CCTCACCAACAAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCAAGAGGCC  
GAAGGTCCCCCTTTGGTCTTGCACGTTATGCGGTATTAGCCACCGTT  
TCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCAGACATTACTACCC  
GTCCGCCACTCGTCAGCRAAGCAGCAAGCTGCTTCTGTTACCGTTTCGAC  
TTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGC

**>souche2**

CAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTCCCGAAGGCACAAATCCATCTCT  
GGATTCTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCG  
AATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTG  
AGTTTTAACCTTGC GGCCGTA CCCCAGGCGGTACTTAAACGCGTTAG  
CTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACTCCAAGTAGACATCGTTTAC  
GGCGTGGA CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCA  
CCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCTC  
CCAGATCTACGCATTTACCCTGCTACACCTGGAATTCTACCCCTCTA  
CAAGACTCAAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGG  
GATTTACATCCGACTTGACAGACCGCTGCGTGCGCTTACGCCAGTA  
ATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGA  
GTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATTGCTGCGGTTATTAAC  
CACAAACCTTCTCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCT  
TCATACACGCGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATT  
CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTG  
GCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTT  
ACCTCACCAACAAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCAAGAGGCC  
CGAAGGTCCCCCTTTGGTCTTGCACGTTATGCGGTATTAGCCACCGT  
TTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCAGACATTACTACCC  
CGTCCGCCACTCGTCAGCGAAGCAGCAAGCTGCTTCTGTTACCGTTTCGA  
CTTGATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCA



## Consensus MLST

### >Souche1\_aroC

AGCGCCGCGAACCGACCAGGTA AAAAATCTCTCCGGCGTGTGGATGGC  
GTGACGACCGGCACCAGCATTGGCTGCTGATTGAAAACACCGATCAGCG  
CTCGCAGGACTACAGCGGATTAAGATGTTTTCTCCGGGACACGCGG  
ATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGGATTACCGTGCGGTGGA  
CGTTCTCCGCGCTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGCGATCGC  
CAAGAAATACCTGGCGGAAAAGTTCCGGCATCGAAATCCGGGCTGCCTGA  
CCCAGATGGGCGATATTCCGCTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAG  
CTTAATCCGTTCTTTGTCCTGATGCGGACAACTTGACGCGCTGGACGA  
ACTGATGCGCGCTGAAAAAGAGGGGACTCCATCGCGCGAAAAGTGA  
CGGTGATGGCGAGCGCGCTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCGGTTTTGAC  
CGACTGGATGCGGACATCGCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAA  
AGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTAACGTGGTGGCGCTGCGCGGACAGC  
AGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGTTTTAGAGCAACCACGCTGGC  
GGCATCTCGGTGGTATCAGTAGCGGGCAACACATTGGGCGCATATGGC  
GCTGAAACCTACCTCCAGCATTACCGTGCCGGGACGTACGATCAACCGGA  
TGGGTGAAGAAGTCGAAATGATCAC

### > Souche1-DNAN

GTGAACATTTATTA AAAACCGCTTCAGCAGGTCAGCGGCCCGCTGGGCGGT  
CGTCTACGCTGCCGATTCTCGGTAACCTGCTCCTCAAGTAGCGGACGG  
TACGCTTTCTGACCGGCACCGATCTTGAAATGGAGATGGTCCGCGCGG  
TTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGCGCCACTACCGTCCCGCGCGG  
AAATTTGATATCTGCCGCGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGT  
TCAGTTGGAAGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGTTCT  
CGTGTCTACGCTGCCTGCCGCGATTCCCGAATCTTGACGACTGGCAA  
AGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGAGGCCACGATGAAGCGCCTGATTGA  
AGCGACCCAGTTTTCGATGGCTCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACG  
GTATGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGAC  
GGCCACCGCTGGCGGTGTGCTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTACCAG  
CCACTCGGTGATTGTGCCGCTAAAGGCGTATTGAACTGATGCGTATGC  
TCGACGCGGTGAAAACCGCTGCGCGTGCAGATCGGCAAGTAATAATATC  
CGCGCGCACGTTGGCGACTTTATCTTACCTCGAAGCTGGTGGATGGTCCG  
CTTCCCGGATTACCGTCCGCTTCTGCCAAGAATCCGGATAAACATCTGG  
AAGCGGGCTGCGATATCTCAAGCAGGCGTTTGCCC

### > Souche1\_HEMD

CTTGCCAGCCAGCTCCCGGGCGAGGTGCGCCAGACGTTCACTGACGACC  
AATAGCCGACAGCGTAGTAACCAGTGCTCACGATACCACCTCGGGAGTCAG  
CGACCAGAGCCGTTGCAACATCTCGCCGCTGGTAACAACAAGCGTTGTTA  
CGCCGCGAGTATGCCAGCGCATCGCTTCTCCGCGCCATCGTAATGTTTC  
GCACATCGTTGATAACATTCACAAAACTGACTTCGGCTCCGCGAGCTGT  
CAGGGTTTCGCCCAGCAGTTCCGGGCGCCATTGCCACGCAAAATCAGCG  
CGCGTTTGCCCGCAATATTTGTAATTCAGGTAATTGTAGCAAGGCTTCG  
CTGATTTCCCGATCCAATGGATAACGAATATCGAACCCGCTAACGGTATG  
AAGGGCGAGCGCCGTGGTCCGGCAATCGTGAATAGCGCGGCGACGCGAG  
GCCAGTTTCGGCCATCCCGCTGGAGCTGGGCGTGAGCAAGGCGACGGCG  
TGCTGTGAAAGGCAAAAACAGATCGTTTTCCGTCAGTGTCCGACGGCG  
GTCGGCCAGGGTGGGTAGCTCCCGGCGGCGACAAATCAATCAGTGGAA  
AACTCCAGGCCACCTGCCCCAGTGCGCGCAGAC

### > Souche16-HISD

GCAGACGCTACCGCCTGTAGATGTGAAAACCCAGCCAGGCGTGCCTGGC  
AGCAGGTTACGCGTCCCGTCCGCTGTGTGCTCGGCTGTATATCCCGCGCGC  
TCGGCTCCGCTCTTCTCAACGGTGTGATGCTGGCGACGCCGCGCGTAT  
TGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCCCATCGCTGATG  
AAATCCTCTATGCGGCGCAACTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTC  
GGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTTGGCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACC  
GAAAGTGGATAAAAATTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAACCGAAGCCA  
AACGTGAGGTGAGCAACGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCC  
GGGCGTCTGAAAGTACTGGTATCGCCGACAGCGCGCAACACCGGATTT  
CGTGCCTTCTGACCTGCTCTCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTTCGAGG  
TGATTCTGCTGACGCTGATGCTGACATTGCCTGCAAGGTGGCGGAGGCG  
GTAGAACGTCAACTGGCAGAACTGCCGCGCGGGACACCGCCAGGCGAGG  
CCTGAGCGCCAGTCTGCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCCTCG  
CCATCTAATCAGTATGGGCCGGAACACTTAATTATCCAGACGCGCAAT  
GCGCGCATTTGGTGGATGCGATTACCAGCGCAGGCTCGGTATTTCTCGG

> **Souche8--SUCA**

CCTACTGCGGCCGATTGGCGCTGAGTATATGCACATCACCAGCACCGAA  
GAGAAACGCTGGATCAAACAGCGCATCGAATCCGGTCGTGCGGCCTTAG  
CGCTGACGAGAAAAACGCTTCTGAACGAACGACCGCCGCTGAAGGGC  
TGAAACGTTATCTGGGTGCCAAATCCCGGGTGCAGAAACGTTTCTGCTC  
GAGGGGGGAGATGCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGTTCGCCATGC  
GGGTAACAGCGGCACCTCGCAAGTGGTGTGGGGATGGCGCACCGCGGT  
GCCTGAACGTGCTGATCAACGACTGGGTAAAAAACCGCAGGATCTGTTC  
GACGAATTTGCCGTAAGCATAAAGAACATCTGGGTACCGCGCAGCTGAA  
GTATCACATGGGCTTCTGTCAGATATCGAAACCGAAGGCGGTCTGGTTC  
ACCTGGCGCTGGCGTTAAACCCATCGCATCTGAAATTTGAGCCCGGTG  
GTGATGGGCTCCGTGCGCGCCGCTGGACAGACTGGACGAACCGAGCAG  
CAACAAAGTGTGCCGATCACTATTACGCGCAGCGCGGTGACCGGCC  
AGGGCGTGGTTCAGGAAACCTGAACATGTGAAAGCGCGCGGTACGAA  
GTGGCGGTACGGTACGTATCGTTATCAACAACAGGTGGGCTTACCAC  
CTTAACCCACTGGATGCGCGTTCAACGCCTTACTGCACCGATATCGGTA  
AAATGGTCCAGGCG

> **Souche8-THRA**

CTACCGTCGATATCGCGGAATCGACTCGCGGTATCGCCGACCCAGATC  
CCGGCCGATCACATGATCCTGATGCGGGCTTACCGCCGTAATGAAAA  
GGGTGAACGTTGGTGTGCTGGGCCGTAATGGTCCGACTATCCGCCGCC  
TGCTGGCCGCTGTTACGCGCTGACTGCTGTGAAATCTGGACTGACGTC  
GATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCGGACGCCAGGCTGCT  
GAAATCGATGCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCCGGCGCA  
AAGTTCTTACCCTCGACCATACGCCATCGCCAGTTCCAGATCCCC  
TGCTGATTAATAAATACCGGTAATCCGAGGCGCCAGGAACGCTGATCGG  
CGGTCACGCGACGATGATAACCTGCCGTTAAAGGGATCTTAACCTTA  
ACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGAATGAAAGGGATGATT  
GGGATGGCGCGCGTGTTCGCGCCATGTCTCGCGCCGGATCTCGGT  
GGTGCTCATTACCCAGTCTCCTCTGAGTACAGCATCAGCTTCTGTGTGC  
CGCAGAGTACTGCGCGCTGCCCGCGTGCATGCAGGATGAGTTCTAT  
CTGGAGCTGAAAGAGGGGCTGCTGGAGCCGCTGGCGTTACGGAGCGGT  
GGCGATTATCTGTTGTCGGCGACGGTATGCGCACGCTACGCGCATTT  
CAGCGAAATTCT

> **Souche1-THRA**

GGCGGTGGGCCATTACCTTGAATCTACCGTCGATATCGCGGAATCGACTC  
GCCGTATCGCCGACAGCCAGATCCCGCCGATCACATGATCCTGATGGCG  
GGTTTACCGCCGTAATGAAAAGGGTGAACGTTGGTGTGGGCCGTAA  
TGTTCCGACTATCCGCCGCGTGTGGCCGCTGTTACGCGCTGACT  
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGC  
CAGGTGCCGACGCCAGGCTGCTGAAATCGATGCTTACCAGGAAGCGAT  
GGAACCTCTTACTTCCGGCCAAAGTTCTTACCCTCGCACCATACGC  
CCATCGCCAGTTCAGATCCCTGTCTGATTAATAAATACCGTAATCCG  
CAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCTCCAGCGACGATGATAACCTGCC  
GGTTAAAGGGATCTTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCG  
GCCCGGGAATGAAAGGGATGATTGGGATGGCGGCGGTGTTTCGCGGCC  
ATGCTCGCGCCGGATCTCGGTGGTGTCTATTACCCAGTCTCCTCTGA  
GTACAGCATCAGCTTCTGTGTGCCGAGAGTACTGCGCGCTGCCGCC  
GTGCGATGCAGGATGAGTTCTATCTGGAGCTGAAAGAAGGGCTGCTGGAG  
CCGCTGGCGGTTACGGAGCGGTTGGCGATTATCTGTTGTCGGCGACGG  
TATGCGCACGCTACGCGCATTTACGCGAAATTTCCGCCGCTGGCGC  
GGCT

> **Souche1-PURE**

GCGGTTGCGCCGCTGGCGCAGCATTGCGCCAGTTGTCGGTTGCCGAGA  
ACGCAAACCTTGCTTCATAGCGTCCCCCGCGGATCGGGATTTCCAGTACT  
TCATCGGTTTTCGCTTTGCGCCAGTCGGCAATGCGCTGATGCAATCCGC  
GTCGTGTTGCGCCAGAATCTGCGCGGCGAGCAGGGCGCGGTAGCGGCAC  
CGGCTTACCAGTCCGACGCTACCCACCGAATGCCGCGCGCATCTGC  
ACAATGGAGTAGAGGCTGTCCACGCGCTTAGCGCAGCGCTTTGTACCGG  
CACGCCAGTACCGGACCGAGCTTTTTCGCCAATCATTCCCGCGCAGGT  
GCGCCGCGCCCGCGCGCAATAATCACTTGATATCCGTTCTCTTCC  
GCCGTTTCGCGGAAGCTGAACAGTTTATCGGGGTGCGATGGGCGGAAAC  
CACTTCTACATGGTGGGGACATCCAGAATTTCAAAAATTTCCGGCGGCGA  
ATTGCATGGTAGCCAGTCGCTTTTGGACCCATCACGATGGCGACACGC  
GCCGGATTATTGCGGAAGACATGCGCTTAAACCTCTGTGGTGGCGGA  
CACGCTG

>> **Souche1-SUCA**

CCCATTGGCGCTGAGTATATGCACATCACCAGCACCGAAGAGAAACGCT  
GGATCCAAACAGCGCATCGAATCCGGTCGTGCGGCCTTTAGCGCTGACGAG  
AAAAACGCTTCTGAACGAACGACCGCCGCTGAAGGGCTGGAACGTTA  
TCTGGGTGCCAAATCCCGGGTGCAGAACGTTTCTGCTCGAGGGGGGAG  
ATGCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGTTCGCCATGCGGGTAACAGC  
GGCACTCGCAAGTGGTGTGGGGATGGCGACCGCGGTGCGCTGAACGT  
GCTGATCAACGACTGGGTAAAAAACCGCAGGATCTGTTTCGACGAATTTG  
CCGGTAAGCATAAAGAACATCTGGGTACCGCGCAGCTGAAGTATCACATG  
GGCTTCTGTCAGATATCGAAACCGAAGGCGGTCTGGTTACCTGGCGCT  
GGCGTTAAACCCATCGCATCTGAAATTTGAGCCCGGTGGTATGGGCT  
CCGTGCGCGCCGCTGGACAGACTGGACGAACCGAGCAGCAACAAAGT  
TTGCCGATCACTATTACGCGCAGCGCGGTGACCGGCCAGGGCGTGGT  
TCAGGAAACCTGAACATGTGAAAGCGCGCGTTACGAAGTGGGCGGTA  
CGGTACGTATCGTTATCAACAACAGGTGGGCTTACCACCTTAACCCA  
CTGGATGCGCGTTCAACGCCTTACTGCACCGATATCGGTAAAAATGGTCCA  
GGC

> **Souche8-AROC**

AGCGCCGCAACCGGACCAGGTAAAAATTCTCTCCGGCGTGTGTTGAAGGC  
GTGACGACCGGCACAGCATTGGCCTGCTGATTGAAAACACCGATTACGCG  
CTCGCAGGACTACAGCGGATTAAGATGTTTTTCGTCGGGACACGCGG  
ATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGGCGGTGGA  
CGTTCTCCGCGCGTAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATCGC  
CAAGAAATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGA  
CCCAGATGGGCGATATCCGCTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAG  
CTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCGGACAACTTGACGCGCTGGACGA  
ACTGATGCGCGCTGAAAAAGAGGGCGACTCCATCGGCGGAAAAGTGA  
CGGTGATGCGGAGCGCGTCCCGGAGGGCTTGGCGAACCGTTTTTGAC  
CGACTGGATGCGGACATCGCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAA  
AGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTAACGTGGTGGCGCTGCGCGGACGCC  
AGAATCGCGATGAAATCAGCGCGCAGGGTTTTAGAGCAACACGCTGGC  
GGCATCCTCGGTGATCAGTAGCGGGCAACACATTGTGGCGCATATGGC  
GCTGAAACCTACCTCCAGCATTACCGTCCCGGGACGTACGATCAACCGGA  
TGGGTGAAGAAGTCGAAATGATCA

> **Souche8--DNAN**

TCGAGAGGATTGCTGCGCGGGCAAACGCTGCTTGAGGATATCGACGCC  
GCTTCCAGATGTTTATCCGATTCTTCGGCAGAACGCGACGGAATCCGG  
GAAGCGACCATCCACAGCTTCGAGGTGAAGATAAAGTCGCCAACGTGGC  
CGCGATATTACTGCCGATCTGCAGCGCAGCGGGTTTTACCGCGCG  
TCGAGCATACGATCAGTTCAATCACGCTTTACGCGGCACAATCACCGA  
GTGGCTGGGTAAAGACGCTTCCAGCGGCATTGAGCACACCGCCAGGCGGT  
GGCGTCCGTCGCGACAGTGGCAGTTGCTACCTTCCGTTTTAAACAGC  
ATACCGTTAAGTAGTAGCGCACATCTGATGAGCCATCGAAAACCTGGGT  
CGCTTCAATCAGGCGCTTATCGTGGCTGCGGCAGCGTAAATCAACT  
CGCTTTCAGTCGTCAAGATTGCGGAAATCGGCGGAGGCAGCGTAGAC  
AGCGAGAAGCGGCTACGGCCAGAACGCACAGCATCCGATCGCCTTCCAA  
CTGAACGGCAATCTCCGCGCCTCCGGCAGGCCGCGGAGATATCAAGA  
ATTTCCGCGCCGGCACGGTAGTGGCGCCCGCTCATGCGGCTGAGAAAAG  
GTAACGCGCGGACCATCTCCATTTCAAGATCGGTGCCGTCAGAGAAAAG  
CGTACCGTCCGCTACCTGGAGGAGCAGGTTACCGAGAATCGGCGCGTAG  
GACGACCGCCAGCGGGCGCTGACCTGCTGAAGCGGTTTTAATAATGT  
TCACGTTCAA

> **Souche8--HEMD**

CGTCTGCGGCGACTGGGGCAGGTGGCCTGGAGTTTTCCACTGATTGAATT  
TGTCGCGCGCCGGGAGCTACCCACCCTGGCCGACCGCTGGCGACTGA  
CGGAAAACGATCTGGTTTTGCCCTTTCACAGCACGCCGTCGCTTTGCT  
CACGCCAGCTCCAGCGGGATGGCCGAAACTGGCCTGCGTCGCCGCGTA  
TTTTCGGATTGGCCGACACGGCGCTCGCCCTTCATACCGTTAGCGGGT  
TCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAGCGAAGCCTTGCTACAA  
TTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGCGCGCTGATTTTGGTGG  
CAATGGCGGCGGCGAACTGCTGGGGCAAACCTGACAGCTCGCGGAGCCG  
AAGTCAGTTTTTGTGAATGTTATCAACGATGTGCGAAAACATTACGATGGC  
GCGGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTCGCGCGTAACAACGCTTGTGT  
TACCAGCGGCGAGATGTTGCAACGCTCTGGTCGCTGACTCCCAGTGGT  
ATCGTAGACTGGTTACTACGCTGTCGGCTATTGGTGTGCTGAGTAACT  
CTGGCGCACCTCGCCGGGAGCTGGGCTGGCAAG

> **Souche8--HISD**

CGCAGACGCTACCGCTGTAGATGGAACCCAGCCAGGCGTGCCTTGC  
CAGCAGGTTACGCTCCCGTCGCTGTGCTGGTCTGTATATCCCGCGCG  
CTCGGCTCCGCTCTTCTCAACGGTGTGATGCTGGCGACGCCGCGCGTA  
TTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCCGCCCATCGCTGAT  
GAAATCCTCTATGCGGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTAACT  
CGGCGGCGCGCAGCGGATTGCCGCTCTGGCTTCGGCAGCGAGTCCGTAC  
CGAAAGTGATAAAAATTTTGGCCCCGCAACGCTTTGTAACCGAAGCC  
AAACGTGAGGTGAGCAACGCTCGACGCGCGGCTATCGATATGCCAGC  
CGGGCCGTCTGAAGTACTGGTGTGCTCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATT  
TCGTGCTTCTGACCTGCTCTCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTGCGAG  
GTGATTCTGCTGACGCTGATGCTGACATTGCCTGCAAGGTGGCGGAGGC  
GGTAGAACGTCAACTGGCAGAACTGCCGCGCGGACACCGCCAGGCGAG  
CCCTGAGCGCCAGTCTGATTGTGACCAAGATTTAGCGCAGTGGCTC  
GCCATCTAATCAGTATGGGCGGAAACACTTAATTATCCAGACGCGCAA  
TGCGCGGATTTGGTGGATGCGATTACCAAGCGCAGGTTGTTATTTCTCG  
GCGAC

> **Souche8--PURE**

CAGCGTGTCCCGCACACAGGAGTTTTAAGCGCATGCTTCCCGCAATA  
ATCCGGCGCGTGTGCCATCGTATGGGGTCCAAAAGCGACTGGGCTACC  
ATGCAATTCGCGCGGAAATTTTTGAAATCTGGATGTCGCCACCATGT  
AGAAGTGGTTTTCCGCCATCGCACCCCGATAAACTGTTAGCTTCGCCG  
AAACGCGGGAAGAGAACGATATCAAGTATTGTCGGCGCGGGCGGG  
GCGGCGCACCTGCCGGGAATGATTGCGGCAAAAACGCTGGTCCCGTACT  
CGGCGTCCGGTACAAAGCGCTGCGCTAAGCGCGTGGATAGCTTACT  
CCATTGTGAGATGCCGCGCGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGT  
AAAGCCGGTGGCGTAACGCCGCTGCTCGCCGCGCAGATTCTGGCGCA  
ACACGACGCGGAACTGCATCAGCGCATTGCCACTGGCGCAAAGCGCAA  
CCGATGAAGTACTGGAAAATCCCGATCCGCGGGGACGCTATGAAGCAAG  
TTTTGCTTCTCGGCAACGGAACCTGGGCCAATGCTGCGCCAGCGGGG  
GAACCG

## Consensus MLVA

### **Souche3\_se3**

AGCAGCATACCAGCCGGGATAAGTGCCACATAACACAGTCGCTAAGCAACCTGTGCAAAC  
GTGAACCCACGCTGGCTCTCTTTGAAACAGAACGGGCATTTGATGGTATTGTTTTCCAT  
ATTGGTTTCCTTAATTGGCTTTCCAGCCATTGCTGGTCTTAAAGAGATTATTGCACCAT  
CAGCAGGTTCAATTCCTTTAACTGGCGAATGCCTTTTTGTCAATCCAGTTCGGAA  
CGTCAACCAGCTTCCACGTATAAGACACACGAACTACTTTCTG

### **>souche4\_se3**

AGCAGCATACCAGCCGGGATAAGTGCCACATAACACAGTCGCTAAGCAACCTGTGCAAAC  
GTGAACCCACGCTGGCTCTCTTTGAAACAGAACGGGCATTTGATGGTATTGTTTTCCAT  
ATTGGTTTCCTTAATTGGCTTTCCAGCCATTGCTGGTCTTAAAGAGATTATTGCACCAT  
CAGCAGGTTCAATTCCTTTAACTGGCGAATGCCTTTTTGTCAATCCAGTTCGGAA  
CGTCAACCAGCTTCCACGTATAAGACACACGAACTACTTTCTG

### **>souche5\_se3**

AGCAGCATACCAGCCGGGATAAGTGCCACATAACACAGTCGCTAAGCAACCTGTGCAAAC  
GTGAACCCACGCTGGCTCTCTTTGAAACAGAACGGGCATTTGATGGTATTGTTTTCCAT  
ATTGGTTTCCTTAATTGGCTTTCCAGCCATTGCTGGTCTTAAAGAGATTATTGCACCAT  
CAGCAGGTTCAATTCCTTTAACTGGCGAATGCCTTTTTGTCAATCCAGTTCGGAA  
CGTCAACCAGCTTCCACGTATAAGACACACGAACTACTTTCTG

### **>souche8\_Se3**

AGCAGCATACCAGCCGGGATAAGTGCCACATAACACAGTCGCTAAGCAACCTGTGCAAAC  
GTGAACCCACGCTGGCTCTCTTTGAAACAGAACGGGCATTTGATGGTATTGTTTTCCAT  
ATTGGTTTCCTTAATTGGCTTTCCAGCCATTGCTGGTCTTAAAGAGATTATTGCACCAT  
CAGCAGGTTCAATTCCTTTAACTGGCGAATGCCTTTTTGTCAATCCAGTTCGGAA  
CGTCAACCAGCTTCCACGTATAAGACACACGAACTACTTTCTG

### **>souche3\_SENTR4**

ACCAACTCTATGAACCAATGGCAACGAGACCATCGACTAAATGMTTGTGGTAGTTG  
GTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTGTACCGGATATTCTGATAGCGAATAGTTGCCTGGTA  
>1508AL\_SENTR4F

-----TGATTGTTGGTA----

---GTTGGTAGTTGGTAGTTGGTGTACCGGATATTCTGATAGCGAATAGTTGCCTGGTA

### **>souche5\_SENTR4**

ACCAACTCTATGAACCAATGGCAACGAGACCATCGACTAAATGATTGTTGGTAGTTG  
GTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTGTACCGGATATTCTGATAGCGAATAGTTGCCTGGTA  
>VH\_SENTR4

ACCAACTCTATGAACCAATGGCAACGAGACCATCGACTAAATGATTGTTGGTAGTTG  
GTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTGTACCGGATATTCTGATAGCGAATAGTTGCCTGGTA



**> souche1\_sgtr2**

CTGAAGAAGCGGCAAAACTGGCGCAACAGCAGCWACAGGTCTGAAGAAGCGGCGAAAAGCGG  
CGGCGGACGCGAAGAAAANAGCGGAGGCCGAAGCGGCGAAAAGCGGCGGCGGACGCGAAGA  
AGAAAGCGGAGGCCGAGGCGGCGAAAAGCGGCGGCGGACGCGAAGAAGAAAAGCGGAAAGCCG  
AGGCGGTAAAAGCGGACGCGGACGCGAAGAAGAAAAGCGGAAAGCCGAAGCGGCGAAAAGCGG  
CGGCGGAGGCGAAGAAGAAAAGCGGAAAGCCGAAGCGGCGAAAAGCGGCGGCGGAGGCGAAGA  
AGAAAAGCGGATGCCGAGGCGGCGAAAAGCGGCGGCGGAGGCGAAGAAGAAAAGCGGATGCCG  
CGGCGGCGAAAAGCAGCGGCGGAGGCGAAGAAGAAAAGCGGATGCCGAGGCGGCGAAAAGCGG  
CGGCGGAGGCGAAGAAGAAAAGCGGATGCCGCGGCGGCGAAAAGCAGCGGCGGACGCTAAGA  
AGAAAAGCGGCTGCCGAAAAGCGGCGCCCGCAGAAGGCGTCGACGA

**> souche1\_sgtr3**

TCAGCCATCCATACCAAGACCAACACTCTATGAACCAATGGCAACGAGACCATCGACTAA  
ATGATTTGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTG  
GTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGT  
TAGCGAATAGTTGCCTGGTCTATCTTTTTCATTTCCGATATCTGCCAA

**> souche2\_sgtr3**

TCAGCCATCCATACCAAGACCAACACTCTATGAACCAATGGCAACGAGACCATCGACTAA  
ATGATTTGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGT-----TG  
GTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGTAGTTGGT  
TAGCGAATAGTTGCCTGGTCTATCTTTTTCATTTCCGATATCTGCCAA

**> souche1\_sgtr4**

TGTCATGCCCGAGTCAACGCCTGTTAGCAACCTGTAGCGCCGAGCCGAGTATCAGCA  
GCCGAGCAACCGGTAGCGCCGAGCCTCAGCCACAGTACCAGCAGCCGCAACAGCCGGT  
AGCGCCGCAACCGCAGTATCAGCAGCCGAGCAGCCGGTAGCGCCTCAGCCGAGTATCA  
GCAGCCGCAACAGCCGGTAGCGCCGAGCCGAGTATCAGCAGCCGAGCAGCCGGTAGC  
GCCGAGCCGAGTATCAACAGCCGCAACAGCCGGTAGCACCAGCCGAGTATCAGCA  
GCCGAGCAGCCGGTAGCGCCGAGCCACAGTATCAGCAGCCGCAACAGCCGACAGCGCC  
GCAAGACAGCTTGATCCACCCGCTGTTGATGCGTAACGGCGACAGTCGTCCA

**> souche2\_sgtr4**

TGTCATGCCCGAGTCAACGCCTGTTAGCAACCTGTAGCGCCGAGCCGAGTATCAGCA  
GCCGAGCAACCGGTAGCGCCGAGCCTCAGCCACAGTACCAGCAGCCGCAACAGCCGGT  
AGCGCCGCAACCGCAGTATCAGCAGCCGAGCAGCCGGTAGCGCCTCAGCCGAGTATCA  
GCAGCCGCAACAGCCGGTAGCGCCGAGCCGAGTATCAGCAGCCGAGCAGCCGGTAGC  
GCCGAGCCGAGTATCAACAGCCGCAACAGCCGGTAGCACCAGCCGAGTATCAGCA  
GCCGAGCAGCCGGTAGCGCCGAGCCACAGTATCAGCAGCCGCAACAGCCGACAGCGCC  
GCAAGACAGCTTGATCCACCCGCTGTTGATGCGTAACGGCGACAGTCGTCCA

## RÉSUMÉ

Les salmonelles sont l'une des premières causes de la contamination des aliments et par conséquent une étiologie majeure de gastro-entérites humaines. L'évolution phénotypique, moléculaire de cette bactérie n'a pas cessé, permettant à cette dernière de s'adapter aux conditions de l'environnement, à la réponse de l'hôte et aux moyens de lutte. Afin de mieux adapter les moyens de prévention, de lutte et dans le but de surveiller ce pathogène, les travaux entrepris dans le cadre de la thèse ont eu, en premier lieu, l'objectif d'apprécier la variabilité et la diversité phénotypique de (37) salmonelles isolées à partir des aliments (diversité antigénique, biochimique et sensibilité aux antibiotiques) et visualiser la variabilité moléculaire, en utilisant des techniques diverses : Ribotypage, MLST (Multi-Locus Sequence Typing) et MLVA (Multiple-Locus VNTR Analysis). Une seconde approche a été également menée et consiste en une étude comparative avec (39) salmonelles d'origine humaine responsables de gastroentérites isolées dans la même période. Les résultats obtenus avec les isolats d'origine alimentaire ont montré une diversité serotypique avec une prédominance de *Salmonella* Enteritidis et biochimique minime accompagné d'une variabilité dans la sensibilité aux antibiotiques (résistance à l'acide nalidixique et l'ofloxacine et des phénotypes non sauvages vis-à-vis de la ciprofloxacine, triméthoprime /sulfaméthoxazole, et bêta-lactamines observées avec certains serovars. Comparativement avec les serovars d'origine humaine, une variété serotypique et une prédominance de la même espèce a été observée. Une complexité et une hétérogénéité des caractéristiques biochimiques et des profils de sensibilités aux antibiotiques plus avancés que celles des isolats alimentaires. Parmi les huit souches analysées, le ribotypage a permis d'identifier et de classer nos souches au niveau de l'espèce *enterica* et la sous espèce *enterica* pour sept souches sans pouvoir déterminer la sous espèce d'une seule souche et le serotype pour l'ensemble des isolats. La technique (MLST) apparaît discriminante avec les sept marqueurs choisis entre les souches d'un même serotype. Elle a permis tout de même de déterminer les séquence types et les complexes clonaux correspondants à nos isolats, le (ST-78,CC-4) pour *Salmonella* Gallinarum, (ST-11,CC-4) pour *Salmonella* Enteritidis et le (S-367,CC-37) pour *Salmonella* Cerro. Différents génotypes ont été visualisés (six génotypes) par la technique (MLVA) confirmant son pouvoir discriminant plus élevé que les autres techniques jusqu'au niveau intra-serotype. La variabilité génétique intra-serotype reflète l'impact des facteurs environnementaux et la diversité probable des réservoirs (animal et humain) et des sources de contamination.

**Mots clés :** Salmonelles, aliments, caractérisation phénotypique, CMI, caractérisation moléculaire, Ribotypage, MLST, MLVA.

## Abstract

*Salmonella* bacteria are of the main causes of food contamination and therefore a major etiology of human gastroenteritis. The phenotypic and molecular evolution of these bacteria has not stopped, allowing to the latter to adapt to each step of pathogenesis, including: environmental conditions, host response and control methods. Emergence of antibiotic-multi resistant *salmonella* strains, which is often the cause of treatment failure that significantly exacerbated the situation. With regard to this development, an arsenal of biological techniques have been developed to study the phenotypic and molecular diversity of this bacterium in order of support and monitor to better adapt the means of prevention and control.

The undertaken work as part, first the objective of assessing the phenotypic variability of 37 *Salmonella* isolated from food (serotype diversity, biochemical characterization and sensitivity to antibiotics) and visualize the molecular (genetic) variability using various techniques: ADN16S sequencing, MLST (Multi-Locus Sequence Typing), MLVA (Multiple-Locus VNTR Analysis) by identifying and exploring the genetic materials whose expression is essential for metabolism and necessary for the adaptation of *Salmonella* to their environment.

A second approach was also conducted. It consisted of a comparative study of 39 human-origin *Salmonella* responsible for gastroenteritis during the same period. Results obtained with food borne isolates revealed a serotype diversity with predominance of *Salmonella* Enteritidis accompanied by biochemical variability in antibiotic susceptibility resistance to nalidixic acid, ofloxacin and non-wild phenotypes to the ciprofloxacin, trimethoprim/sulfamithoxazol and betalactamines observed with some serovars that reflect the development of resistance mechanisms poorly expressed or silent. Compared with serovars of human origin, a variety of serotype and predominance of the same species was observed.

A complexity and heterogeneity of the biochemical characteristics and profiles of antibiotic sensitivities more advanced than those of food-isolates. MLST technic seem to be little discriminating between the seven selected markers between strains of the same serotype. For its part, MLVA technique has confirmed high discriminating power between the *Salmonella* until intra-serotype level. Different clones were visualized (06) genotypes were obtained from (06) serotypes. The intra-serotype variability reflects the impact of environmental factors and the diversity of reservoirs (animal or human) and sources of contamination.

**Keywords:** *Salmonella*, food, phenotypic characterization, CMI, molecular characterization, Ribotyping, MLST, MLVA.



السالمونيلا هي واحدة من أهم مسببات التلوث الغذائي و بالنتيجة فهي من الأسباب الرئيسية لالتهاب المعدة و الأمعاء عند

إن التطور المظهري و الجزيئي لهاته البكتريا لم يتوقف مما سمح لها الظروف البيئية مع ردود فعل الحاضن و طرق مكافحة.

إن ظهور سلالات مقاومة للمضادات الحيوية و المسببة لفشل العلاجات فاقم الوضع مقابل هذا مجموعة من التقنيات البيولوجية طورت لدراسة التنوع المظهري و الجزيئي لهاته البكتريا من أجل مراقبة ضبط و تكييف طرق مكافحة و الوقاية. هاته الدراسة كانت أول أهدافها تقييم التنوع و الاختلاف المظهري لـ (37) من السالمونيلا المعزولة من الأغذية ( تنوع بيوكميائي و الحساسية للمضادات الحيوية). و تبين التنوع الجزيئي ( ) المرافق لها و هذا باستخدام تقنيات مختلفة. ADNr16S، التعيين عن طريق التسلسل الجيني متعدد الأمكنة (MLST)

المتعدد و المتغير الجيني في عدة مواضع (MLVA) هذه تمثل طرق جديدة و حديثة تسمح بدراسة التعدد المظهري و التنوع الوراثي و هذا بالكشف و التعريف عن القاعدة الوراثية التي تعبر على التمثيل الغذائي و التكيف البيئي للسلمونيد جهة (39) سالمونيلا معزولة من الإنسان مسؤولة عن الإلتهاب

النتائج المتحصل عليها من العينات المعزولة من الأغذية وضحت تنوع النمط المصلي مع غالبية *Salmonella Enteritidis*، تنوع أيضا في النمط الغذائي مصحوب بتنوع الحساسية للمضادات الحيوية المقاومة (l'acide nalidixique)، مع أنماط ظاهرية غير فطرية مقابل (ofloxacin,ciprofloxacin)، trimethoprim /sulfamithoxazol, betalactamines مع بعض الأنماط المصلية. مما يعكس آليات مطورة للمقاومة غير معبر عنها بطريقة جيدة أو سامطة، مقارنة مع الأنماط المصلية المعزولة من الإنسان لاحظنا تنوع مع غالبية للنمط *Salmonella Enteritidis*. تعقيد و تنوع في الأنماط الغذائية ووضعية مقاومة للمضادات الحيوية أكثر تقدما على غيرها ذات المنشأ الغذائي.

بين ثمانية عينات المعزولة	ADNr16S سمحت بتحديد	تيب	<i>enterica</i>	تيب
<i>enterica</i>	إمكانية تحديد هذا الأخير	جميع		

إن تقنية (MLST) قليلة التميز مع 7 علامات مختارة من بين السلالات التابعة لنفس النمط المصلي هذا بتحديد (ST-78,CC-4), *Salmonella Gallinarum* (ST-11,CC-4)

*Salmonella Enteritidis* (S-367,CC-37), *Salmonella Cerro*، من جانبها تقنية (MLVA) أثبتت قدرتها على التمييز بين السلالات المنتمة لنفس النمط المصلي أين تم تحديد ستة سلالات تحصلنا عليها من ستة أنماط مصلية ، إن نمط المصلي يعكس مدى العوامل البيئية و تنوع الخزانات (حيوان و إنسان)

الكلمات المفتاحية: السالمونيلا ، الأغذية ، توصيف مظهري ، توصيف جزيئي .