

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Hassiba BEN BOUALI -Chlef-**

**Faculté Des Sciences**

**Département de Biologie**



**Mémoire de fin d'étude**

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

**Option: Microbiologie**

**Thème**

**Isolement et identification des salmonelles à partir de poulets  
de chair et des eaux usées**

**Présentée par :**

**M<sup>elle</sup> Atba Hadjer**

**Devant le jury :**

Présidente : M<sup>me</sup> **Allem R.**

Professeur

Promoteur : Mr **Sebahia M.**

Maître de conférences A

Examineur: Mme **Souna D.**

Maître de conférences B

**Année universitaire :**

**2015/2016**

# Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu « **Allah** » le tout puissant miséricordieux de m'avoir donné le courage et la confiance ainsi que la volonté pour préparer ce travail.

Mes remerciements s'adressent d'abord, à mon promoteur, **Mr M. Sebaihia** Maître de conférences A à l'Université Hassiba ben bouali Chlef.

Je le remercie pour son encadrement, ses encouragements, sa disponibilité et pour sa rigueur scientifique.

Qu'il trouve le témoignage de ma haute considération et de mon profond respect.

**Mme R. Allem** professeur à l'Université Hassiba ben bouali Chlef.

Vous me faites le grand honneur de présider ce jury. Je vous prie de bien vouloir recevoir le témoignage de mon profond respect.

**Mme D. Souna** Maître de conférences B à l'Université Hassiba ben bouali Chlef.

Je vous remercie de m'honorer par votre présence en tant qu'examinatrice et pour avoir acceptée d'évaluer ce mémoire.

Je tiens à remercier également **Melle R. Naamoune** et **Melle A. Djabar** pour leurs aides continues et leurs encouragements durant ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les Médecins vétérinaires pour leurs efforts et leurs soutiens, plus particulièrement **Mr M. Foudad** et **Mr. salhi**

Je remercie également les éleveurs et le personnel des abattoirs pour leurs collaborations et sympathie.

Je remercie l'ensemble du personnel de la Direction d'office national d'assainissement pour leurs accueils et leurs soutiens.

Merci également à Tout le personnel du laboratoire à l'UHBC.

**Hadjer**



## *Dédicaces*

*Je commence par rendre grâce à dieu et à sa bonté, pour la patience, la compétence et le courage qu'il m'a donné pour arriver à ce stade.*

*Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions.*

*Je dédie ce modeste travail à*

*Mon cher père, ma chère maman qui ont veillé à ce que je suis arrivé maintenant.*

*Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.*

*Mes frères Aboubaker et Alaadine.*

*Ma sœur Madjeda.*

*Que dieu vous protège et vous offre une vie pleine de joie, bonheur et de réussite.*

*Mes grands-parents ainsi qu'aux défunts*

*Toute ma famille, oncles et tantes.*

*Mes cousins et cousines.*

*Mes chers amis.*

*Une dédicace particulière pour mes enseignants et mes collègues de la faculté des Sciences Biologiques*

*Enfin, à tous ceux qui m'aiment.*

*Hadjer*



## Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction générale

### Chapitre I: Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les salmonelles .....	03
2. Taxonomie et nomenclature .....	03
3. Caractères bactériologiques .....	04
3.1. Caractères morphologiques .....	04
3.2. Caractère culturaux .....	05
3.3. Caractères biochimiques .....	05
3.4. Caractères antigéniques .....	06
4. Epidémiologie .....	07
4.1. Réservoir- .....	07
4.2. <i>Salmonella</i> dans les élevages de volailles .....	08
5. Pathogénie et symptômes associés aux salmonelles.....	10
6. Le processus infectieux de <i>Salmonella</i> .....	10
7. Facteurs de virulence .....	11
8. Détection et identification des salmonelles.....	13
8.1. Les méthodes phénotypiques .....	13
8.2. Les méthodes microbiologiques .....	13
8.3. Les méthodes biochimiques .....	13
8.4. Les méthodes moléculaires .....	13
➤ Technique d'amplification par PCR .....	13
9. Typage des souches de <i>Salmonella</i> .....	14
9.1. Typages phénotypiques.....	14
9.1.1. Serotypie .....	14
9.1.2. Lysotypie .....	14
9.2. Typages moléculaires .....	14
9.2.1. Multilocus sequence typing (MLST).....	15

9.2.2. Analyse de multiple locus de séquences localisées répétées en tandem (MLVA).....	15
9.2.3. Electrophorèse en champs pulsé (PFGE) .....	15
9.2.4. Restriction fragment length polymorphism (RFLP).....	15
9.2.5. Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD).....	15
9.2.6. La ribotypie.....	16
9.2.7. Profils plasmidiques .....	16
10. Antibiorésistance des salmonelles .....	16

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

1. Echantillonnage .....	18
2. Solutions et milieux de culture.....	18
3. Recherche des salmonelles .....	18
3.1. Pré-enrichissement .....	18
3.2. Enrichissement sélectif .....	19
3.3. Isolement .....	19
3.4. Identification .....	19
3.4.1. Coloration de Gram .....	19
3.4.2. Identification biochimique .....	19
a. Test oxydase.....	19
b. Test catalase.....	20
c. Test urease.....	20
d. Utilisation de Citrate.....	20
e. Fermentation des sucres.....	20
f. Test de mobilité .....	21
3.4.2.1. Identification par la galerie API20E .....	21
3.4.3. Identification moléculaire par PCR .....	21
4. Extraction de l'ADN plasmidique .....	22
5. Test d'antibiorésistance .....	23

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

### **Conclusion et perspectives**

### **Références bibliographiques**

### **Annexe**

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide DesoxyriboNucléique.

**ARN** : Acide RiboNucléique

**CDC**: The Center for Disease Control and prevention.

**COT** :Co-trimoxazole

**CTX**: Céfotaxime

**EPT** : Eau Peptonée Tamponné

**GR** : Grossissement.

**H** : heure.

**H<sub>2</sub>S** : Hydrate de soufre.

**LPS** : lipopolysaccharides

**M** : Molaire.

**mg /l** : Milligramme par litre.

**min** : Minute.

**ml** : Millilitre.

**mM** : Millimolaire.

**OMS** : Organisation mondiale de la santé.

**Pb** : paire de base.

**PCR** : Polymérase Chain Reaction

**pH** : potentiel d'Hydrogène.

**RV** : Rappaport Vassiliadis

**SSTT** : système de sécrétion de type trois

**SDS** : Sodium dodécyl sulfate

**TAE** : Tris Acétate EDTA

**TE** : Tris EDTA.

**TIAC** : Toxi-infection Alimentaire Collective.

**tr/min** : Tours par minute.

**TE** : Tétracycline

**OF**: Ofloxacine

**UV** : ultra-violet

**V** : volt

**µl** : Microlitre.

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Nombre de sérovars identifiés dans chaque espèce et sous-espèce de <i>Salmonella</i> .	04
<b>Figure 2:</b> Cycle récapitulatif de la transmission des salmonelles dans la filière avicole.....	09
<b>Figure 3:</b> Représentation schématique des différentes étapes durant l'infection orale par <i>Salmonella</i> .	11
<b>Figure 4:</b> Facteur de virulence de <i>Salmonella</i> .....	11
<b>Figure 5:</b> Représentation schématique de T3SS1 et T3SS2 de <i>Salmonella</i> .....	12
<b>Figure 6:</b> protocole pour la recherche des salmonelles.....	24
<b>Figure 7 :</b> Aspect des colonies présumées <i>Salmonella</i> sur milieu XLD.....	25
<b>Figure 8:</b> Aspect des colonies suspectes <i>Salmonella</i> sur milieu SS.....	26
<b>Figure 9:</b> Aspect de colonies suspectes <i>Salmonella</i> sur milieu Héктоen. ....	26
<b>Figure 10:</b> Aspect des colonies suspectes <i>Salmonella</i> sur milieu MacConkey. ....	27
<b>Figure 11:</b> A : Bacille à Gram négatif des isolats suspects de <i>Salmonella</i> (GR×100) ; B. Catalase positive ; C : Oxydase négative.....	27
<b>Figure 12:</b> Résultat de l'identification par la galerie classique de l'isolat A5 .....	28
<b>Figure 13:</b> Résultat de l'identification de l'isolat A6 par la galerie API 20 E.....	29
<b>Figure 14:</b> Electrophorèse su gel d'agarose des résultats de l'amplification par PCR .....	32
<b>Figure 15:</b> Analyse des résultats d'extraction plasmidique sur gel d'agarose .....	33
<b>Figure 16:</b> Sensibilités de la souche A5 aux antibiotiques.....	34

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Caractères biochimiques de <i>Salmonella</i> .....	06
<b>Tableau 2:</b> Exemples de <i>Salmonella</i> adaptées à des hôtes.....	08
<b>Tableau 3:</b> Séquences d’amorces utilisées.....	21
<b>Tableau 4:</b> Liste des antibiotiques utilisés pour les antibiogrammes .....	23
<b>Tableau 5:</b> Résultats des caractères biochimiques des isolats identifiés par la galerie classique. .....	28
<b>Tableau 6:</b> Résultat de lecture des codes sur API web.....	30
<b>Tableau 7:</b> Répartition des isolats de salmonelles dans les prélèvements.....	30
<b>Tableau 8:</b> Résultat de l’antibiogramme des isolats de <i>Salmonella</i> .....	34



# **Introduction**

---

## **générale**

## *Introduction générale*

Les infections dues aux salmonelles constituent un problème majeur de santé publique.

Les gastroentérites à *Salmonella* représentent une des causes principales des toxi-infections alimentaires dans les pays développés, et de mortalité infantile dans les pays en voie de développement. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS,2013), les *Salmonelles* (non typhiques) sont responsables de plusieurs dizaines de millions de cas de maladies d'origine hydrique et alimentaire chez les humains chaque année dans le monde.

La contamination de l'homme se fait principalement par voie orale suite à l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. Les volailles et leurs produits dérivés, dont la viande et les œufs, sont connus depuis longtemps comme source majeure d'infections alimentaires dues aux espèces de *Salmonella* (Zoubar, 2011).

Le poulet de chair est le principal type de volaille consommé dans de nombreux pays du monde, y inclut l'Algérie. Malgré les efforts des éleveurs de volailles à travers le monde, le taux de contamination de la volaille vivante par *Salmonella* reste toujours très élevé. A l'échelle globale, il a été estimé que la majorité des épidémies de salmonelloses implique le poulet comme moyen de transmission (Greig et Ravel 2009). Ceci constitue une préoccupation majeure dans la filière avicole (Corrégé, 2001).

L'existence de souches multi-résistantes aux antibiotiques responsables de gastroentérites aggrave le problème de santé publique que constituent les salmonelloses.

En Algérie, la production annuelle de poulet de chair est de 253.000 tonnes selon l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. La valeur des économiques de filière avicole s'élèverait à plus de deux cent millions d'euros par année (Djerou, 2006).

Malgré l'importance de la filière avicole en Algérie, les données sur la prévalence de *Salmonella* dans les élevages de poulets de chair sont très limitées.

C'est dans ce contexte que cette étude a été effectuée, et dont l'objectif principal est d'améliorer les connaissances sur l'épidémiologie de *Salmonella* dans la région de Chlef ; et compte tenu du rôle prépondérant des volailles et les eaux usées en tant que vecteur de transmission, les objectifs spécifiques de cette étude sont:

- ✓ L'isolement et l'identification des espèces de *Salmonella* à partir de quelques locaux d'élevage de poulet de chair et de la station d'épuration des eaux usées à Chlef.
- ✓ Evaluation de la sensibilité et spécificité de la méthode de PCR pour la détection des salmonelles.
- ✓ Analyse du profil d'antibiorésistance des souches de *Salmonella*.

# Chapitre I

---

## *Synthèse bibliographique*

## 1. Généralité sur les salmonelles

Les salmonelles sont des entérobactéries, nommées ainsi en l'honneur du médecin vétérinaire américain Daniel Elmer Salmon (Bergeron, 2009).

En 1880, Eberth observe le bacille de la typhoïde dans des coupes de rate et de ganglion dont la culture de la bactérie a été possible en 1884 par Gaffky. Puis, en 1889 KLEIN isola l'agent de la typhose aviaire *Salmonella* Gallinarum. Ensuite le bacille de LOEFFLER, *Salmonella* Typhimurium a été isolé à partir de sang des souris atteintes de salmonellose en 1890. En 1894, SMITH a décrit *Bacillus cholerae* maintenant connu comme *Salmonella* Choleroesuis, l'agent responsable de choléra du porc (la fièvre porcine). Enfin, en 1896 Widal a mis en évidence la diversité antigénique des souches de salmonelles à l'aide d'un nouveau test qu'il a appelé le sérodiagnostique. Depuis, de nombreux sérovars sont identifiés (Grimont *et al.*, 2000; Camart-perie, 2006).

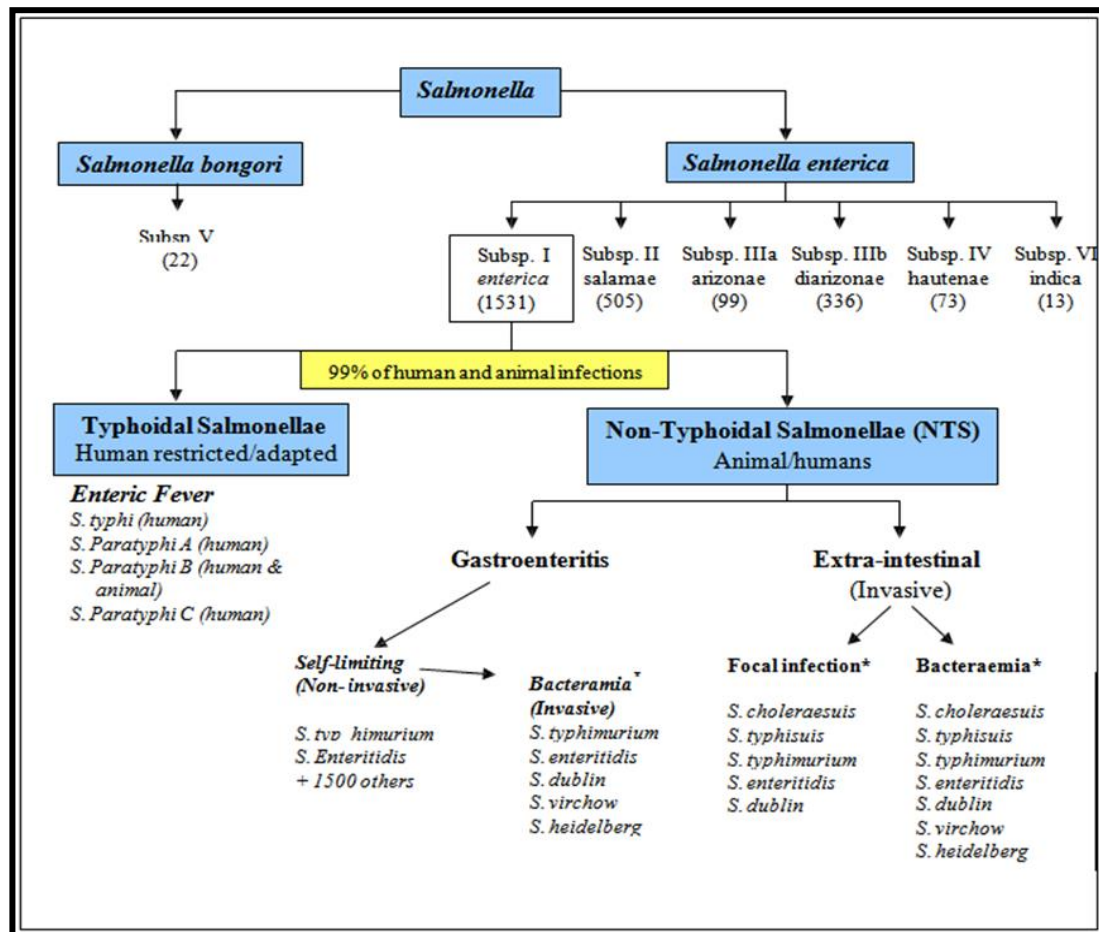
## 2. Taxonomie et nomenclature

*Salmonella* représente certainement le genre le plus complexe et le plus vaste de la famille des *Enterobacteriaceae*, sa classification a fait l'objet de beaucoup de modifications et de controverses ces dernières années. Elle repose notamment sur le schéma de Kauffmann-White qui tient compte des caractères antigéniques, auxquels les données biochimiques et moléculaires (hybridations ADN-ADN) ont été ajoutées (Le Minoret Veron, 1989; Grimont, Weill, 2007).

Selon le Bergey's Manuel (2001), le Genre *salmonella* fait partie de la Famille des *Enterobacteriaceae*, de l'ordre des *Enterobacteriales*, Classe des *Gamma-proteobacteria* et du Phylum des *Proteobacteria* (Scaria *et al.*, 2008).

Le genre *Salmonella* se divise en deux espèces bien distinctes (Agasan *et al.*, 2002): la première est *Salmonella enterica*, espèce majoritaire, qui se divise en six sous-espèces: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* (Popoff *et al.*, 2004; Tindall *et al.*, 2005). La sous-espèce *S. enterica subsp enterica* est-elle même divisée en plusieurs sérovars: Dublin, Enteritidis, Infantis, Paratyphi, Typhi, Typhimurium, Virchow, etc...(Aubry, 2013) (**Figure 1**).

Les sérovars s'écrivent avec une majuscule et en caractère romain (non italique) pour indiquer qu'il s'agit bien d'un sérovars et non pas d'espèce (Brenner *et al.*, 2000; CDC, 2010). Ainsi, le sérotype Typhimurium par exemple, s'écrit: *Salmonella enterica subsp. enterica* sérovar Typhimurium ou de façon plus concise *Salmonella* Typhimurium ou *S.* Typhimurium (Korsak *et al.*, 2004). La deuxième espèce est *Salmonella bongori* qui correspond à l'ancienne sous-espèce V de *S. enterica* et ne représente qu' 1% du genre, rarement isolée (Barrow et Methner, 2013).



**Figure 1:** Nombre de sérovars identifiés dans chaque espèce et sous-espèce de *Salmonella* (Langridge *et al.*, 2005)

### 3. Caractères bactériologiques

#### 3.1. Caractères morphologiques

Les salmonelles sont des bacilles Gram-négatif, non sporulants (Jawetz *et al.*, 1973), la plupart du temps doués d'une mobilité propre grâce à des flagelles péritriches à l'exception de sérovars aviaires: *S. Gallinarum* et *S. Pullorum* (Andino and Hanning, 2015). La taille des

bâtonnets varie entre 2.0 et 5.0µm de longueur sur 0,7 à 1,5 µm de largeur (Korsak *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2009).

### **3.2. Caractères cultureux**

Les salmonelles sont aéro-anaérobies facultatives. Après 24 heures d'incubation à 37°C sur un milieu ordinaire de pH compris entre 6.5 à 7.5, les colonies obtenues ont un diamètre de 2 à 4 mm à l'exception de certains sérovars donnant toujours des colonies naines tel que: *S. Abortusovis* et *S. Abortusequi*. A l'isolement, les colonies sont blanchâtres, circulaires, limitées par un bord régulier, légèrement bombées, translucides, généralement lisses, rarement rugueuses (Legiot *et al.*, 1993; Bourgeois *et al.*, 1996).

### **3.3. Caractères biochimiques**

Les caractères permettant l'identification biochimique des salmonelles sont l'absence d'uréase, de tryptophane désaminase, mais également l'absence de production d'indole et d'acétoïne. Les salmonelles réduisent les nitrates en nitrites, peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone, et fermentent le glucose avec ou sans production du gaz. Cependant elles ne fermentent ni le lactose ni le saccharose. Elles produisent aussi H<sub>2</sub>S à partir du thiosulfate et la réaction au test à l'oxydase est toujours négative (Korsak *et al.*, 2004).

En résumé, le profil biochimique de la majorité des souches de *Salmonella* isolées chez l'homme et les animaux à sang chaud, appartenant à la sous-espèce I est présentées dans le tableau 1.

**Tableau 1:** Caractères biochimiques de *Salmonella* (Gledel, 1996).

Tests	Réaction	Tests	Réaction
Motilité (1)	+	Fermentation de	
Réduction des nitrates	+	Glucose avec gaz (2)	+
Oxydase	-	Mannitol	+
Catalase	+	Maltose	+
Uréase	-	Lactose (3)	-
Indole	-	Saccharose (3)	-
Production d'H <sub>2</sub> S	+	Salicine	-
Utilisation du citrate	+	Adonitol	-
Rouge de méthyle	+	Dulcitol	+
Vogue – Proskauer	-	Lysine décarboxylase (3)	+
Gélatinase	- /+	Arginine dihydrolase	+
ONPG (4)	-/+	Ornithine décarboxylase	+
Tétrathionate réductase	+	Désaminase de la phénylalanine	-

(1) Sauf *S. Gallinarum* ; (2) Sauf les sérovars Typhiet Gallinarum ; (3) Certaines souches atypiques peuvent fermenter le lactose (exemple: *S. Seftenberg*) ou le saccharose ou ne pas décarboxyler la lysine. Les *S. arizonae* peuvent fermenter le lactose ; (4) ONPG : Orthonitrophenyl-β-D-galactopyranoside.

### 3.4. Caractères antigéniques

Les salmonelles peuvent posséder trois types d'antigènes d'intérêt diagnostique (LE Minor, Veron, 1989). Des antigènes de paroi (somatiques) ou antigènes O qui correspondent aux polysides fixés sur les lipopolysaccharides (LPS) et qui constituent les endotoxines des bactéries à Gram négatif, cet antigène résiste au phénol et à l'alcool, il est thermostable même à une température de 100°C (Wray et Wray, 2003).



En plus, les espèces mobiles possèdent des antigènes de flagelles ou antigènes H de nature protéique, constitués de flagellines, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool. Ils sont présents sous deux phases différentes, Soit sous les deux phases simultanément "diphase" soit "monophasique", ce cas le moins fréquent chez *Salmonella*, est retrouvé chez *S. Typhi* ou encore chez *S. Enteritidis* (Grimont *et al.*, 2000).

Certaines souches possèdent en plus un antigène capsulaire (Vi) qui masque l'antigène O et le rendre inagglutinable, cet antigène correspond à une enveloppe polyosidique constituant une véritable capsule et donnant un aspect muqueux (Thiaw, 1998). L'enveloppe peut être détruite par chauffage à 100°C pendant 10 minutes. L'antigène de virulence (Vi) n'a été identifié que chez 3 sérovars : *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* et *S. Dublin* (Carip *et al.*, 2008).

C'est sur la base des multiples combinaisons des antigènes somatiques O, des antigènes flagellaires H et, enfin, capsulaires (Vi) que découlent les sérovars des salmonelles. Ce type de classification porte le nom de schéma de KAUFFMAN et WHITE (LE Minore et Veron, 1989 ; Guillot and Loret, 2010).

## **4. Epidémiologie**

### **4.1. Réservoir**

Le réservoir naturel des salmonelles est très large et s'étend à tout le monde animal, elles sont essentiellement parasites du tube digestif des vertébrés. Elles peuvent être disséminées dans l'environnement par les excréta où leur survie est possible pendant plusieurs semaines à plusieurs mois si les conditions sont favorables (Grosjean *et al.*, 2009; Korsak, 2004).

Elles peuvent aussi survivre dans les aliments d'origine animale (Oliver *et al.*, 2005) ou végétale, fruits et légumes (Kirk *et al.*, 2008). Leur capacité de survie leur permet également de persister dans les boues d'épurations, et les eaux usées (Sahlstrom *et al.*, 2006). Ces bactéries peuvent se fixer également sur de nombreux supports, comme les bottes, les brosses, les pelles, les roues et les vêtements ... (Korsak *et al.*, 2004).

La sous-espèce I (*Salmonella enterica subsp. enterica*) regroupe la majorité des sérovars identifiés chez les animaux à sang chaud, dont l'homme, les autres sous-espèces se retrouvent chez des animaux à sang froid comme les reptiles, les batraciens ou les tortues

(Grimont *et al.*, 1994 ). Sur la base de leur spécificité d'hôtes, les salmonelles sont distinguées en trois groupes (**Tableau 2**).

**Tableau 2:** Exemples de *Salmonella* adaptées à des hôtes (Foley *et al.*, 2013)

Groupe	Sérotype
Sérovars étroitement adaptés à l'homme	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>S. Typhi</i>,</li> <li>• <i>S. Paratyphi A</i>,</li> <li>• <i>S. Paratyphi C</i></li> <li>• <i>S. Sendai</i>.</li> </ul>
Sérovars étroitement adaptés à certains animaux	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>S. Dublin</i> (Bovins)</li> <li>• <i>S. Abortusovis</i> (ovins)</li> <li>• <i>S. Abortusequi</i> (chevaux)</li> <li>• <i>S. Gallinarum-Pullorum</i> (volailles)</li> <li>• <i>S. Cholerasuis</i> et <i>S. Typhisuis</i> (porcs)</li> </ul>
Sérovars ubiquistes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>S. Enteritidis</i></li> <li>• <i>S. Typhimurium</i></li> <li>• <i>S. Montevideo</i></li> <li>• <i>S. Panama</i></li> <li>• <i>S. Saintpaul</i></li> </ul>

#### 4.2. *Salmonella* dans les élevages de volailles

Il est connu depuis de nombreuses années qu'un grand nombre de cas de salmonellose chez les humains sont attribués à la consommation de la viande de poulets et les œufs contaminés. La majorité de ces cas sont due à *S. enterica* sérotype Enteritidis ou le sérotype Typhimurium (Poppe, 2000).

Le secteur avicole comprend toutes les étapes dans la chaîne de conversion du poulet vivant en produits alimentaires pour la consommation humaine.

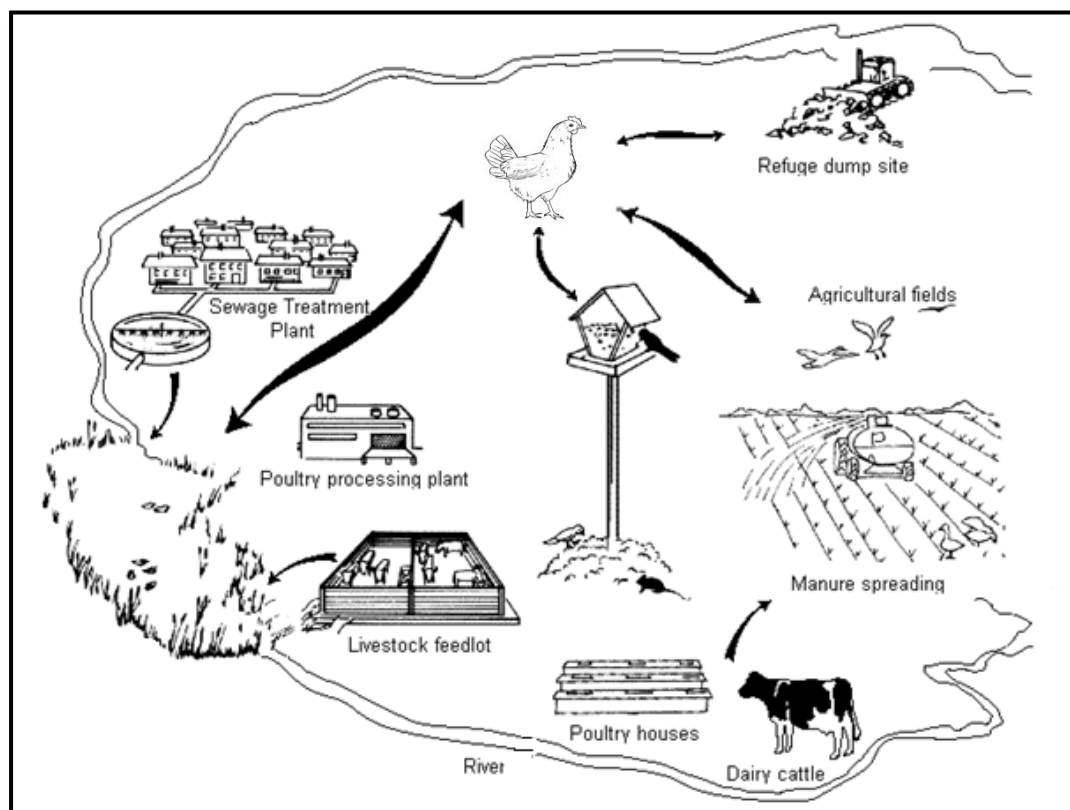
L'élevage de poulets est une des formes les plus intensives d'élevage animal. Les conditions dans lesquelles les poulets sont cultivés sont facilement conductrices à des infections par les pathogènes opportunistes. Le risque de contamination par des pathogènes

potentiels est omniprésent au niveau de toutes les étapes de la chaîne de production avicole (Ayachi *et al.*, 2009).

Il y a deux voies de transmission de *Salmonella* dans l'élevage avicole: transmission verticale à partir des ovaires, qui conduit à la production d'œufs contaminés, qui peuvent ainsi propager l'infection à l'ensemble du troupeau de volailles; ou par transmission horizontale par des vecteurs inanimés (tout objet en contact avec les volailles) ou par des vecteurs animés comme les insectes et les rongeurs (Van immerseel *et al.*, 2005) (**Figure 2**).

Les signes cliniques ne sont pas généralement observés chez les volailles, alors qu'elles peuvent être apparentes chez les poulets jeunes et les poussins. Les signes sont non spécifiques et peuvent se manifester sous plusieurs formes, dépression, croissance ralentit, faiblesse et diarrhée. La mortalité se produit généralement durant les premières semaines de la vie, une septicémie rapide peut aussi se développer, causant un taux élevé de mortalité (Ait abdelouhab, 2001).

Les normes de sécurité et de qualité sont donc des préoccupations majeures pour les éleveurs de volailles.



**Figure 2:** Cycle récapitulatif de la transmission des salmonelles dans la filière avicole. (Ciganovich *et al.*, 1999).

## 5. Pathogénie et symptômes associés aux salmonelles

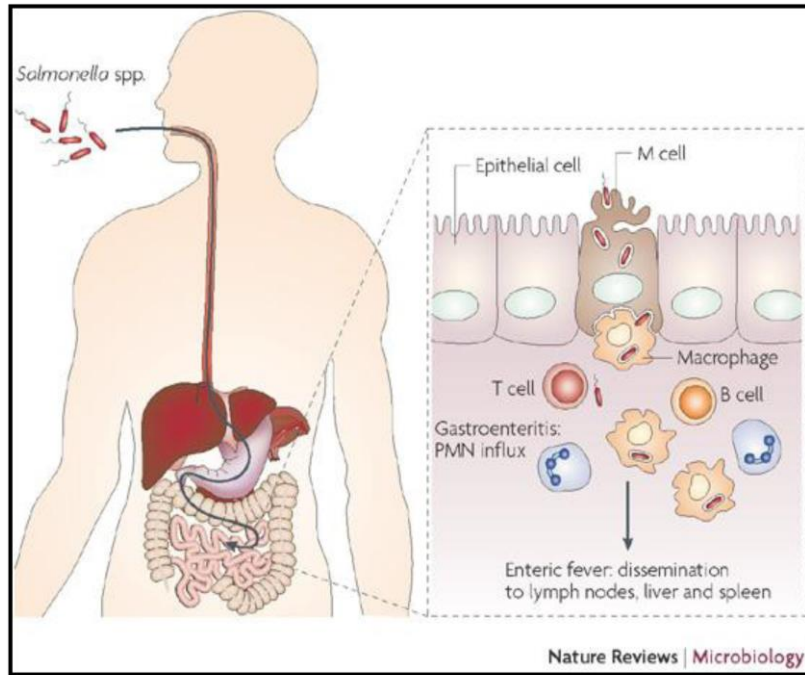
Les infections causées par les sérotypes de *Salmonella* peuvent produire la fièvre entérique, la gastroentérite, ou des conditions de bactériémie ou septicémie. La fièvre entérique est causée par *Salmonella* Typhi et Paratyphi. La période d'incubation de cette infection peut s'étaler de 8 à 28 jours et les symptômes les plus communs sont la fièvre, la diarrhée, douleurs abdominales et maux de tête. Quand les infections sont dues à la consommation d'aliments contaminés avec des salmonelles non-typhique, la maladie est autolimitée chez les individus sains. Les symptômes apparaissent à partir de 8 à 72 h après l'ingestion, et ils sont moins sévères que la fièvre entérique, la diarrhée et les douleurs abdominales disparaissent au bout de 5 jours (Weill, 2008; Rabie *et al.*, 2012).

*Salmonella* peut aussi persister d'une manière asymptomatique chez les humains, ceux-ci deviennent des porteurs sains, qui peuvent excréter les salmonelles pendant des années (Bäumler *et al.*, 1998).

## 6. Le processus infectieux de *Salmonella*

Suite à l'ingestion des salmonelles par voie orale, elles survivent à l'acidité de l'estomac, et parviennent au niveau de l'intestin grêle où elles s'adhèrent aux cellules de l'épithélium intestinal, préférentiellement aux cellules M des plaques de Peyer.

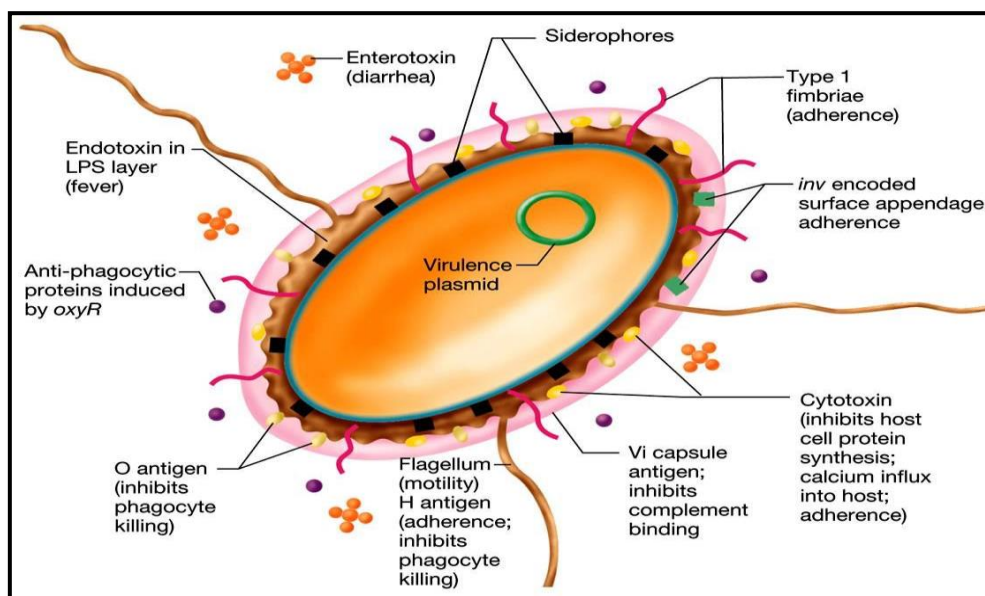
Les bactéries sont ensuite internalisées dans les cellules épithéliales ou elles résident et se multiplient à l'intérieur des vacuoles. Une fois l'épithélium est franchis, Il y'a deux possibilités: **(1)** les sérotypes de *Salmonella* responsables de maladies systémiques (comme *S. Typhi*) pénètrent dans les macrophages intestinales et se disséminent vers d'autres organes du corps. **(2)** Par contre, les sérotypes de *Salmonella* non-typhique, responsables de gastroentérites (comme *S. Typhimurium*), induisent une inflammation locale précoce, qui conduit à l'afflux massif de neutrophiles au niveau de la muqueuse intestinale, causant la destruction de l'épithélium intestinal et de la diarrhée (Haraga *et al.*, 2008) (**Figure 3**).



**Figure 3:** Représentation schématique des différentes étapes durant l'infection orale par *Salmonella* (Haraga *et al.*, 2008).

## 7. Facteur de virulence

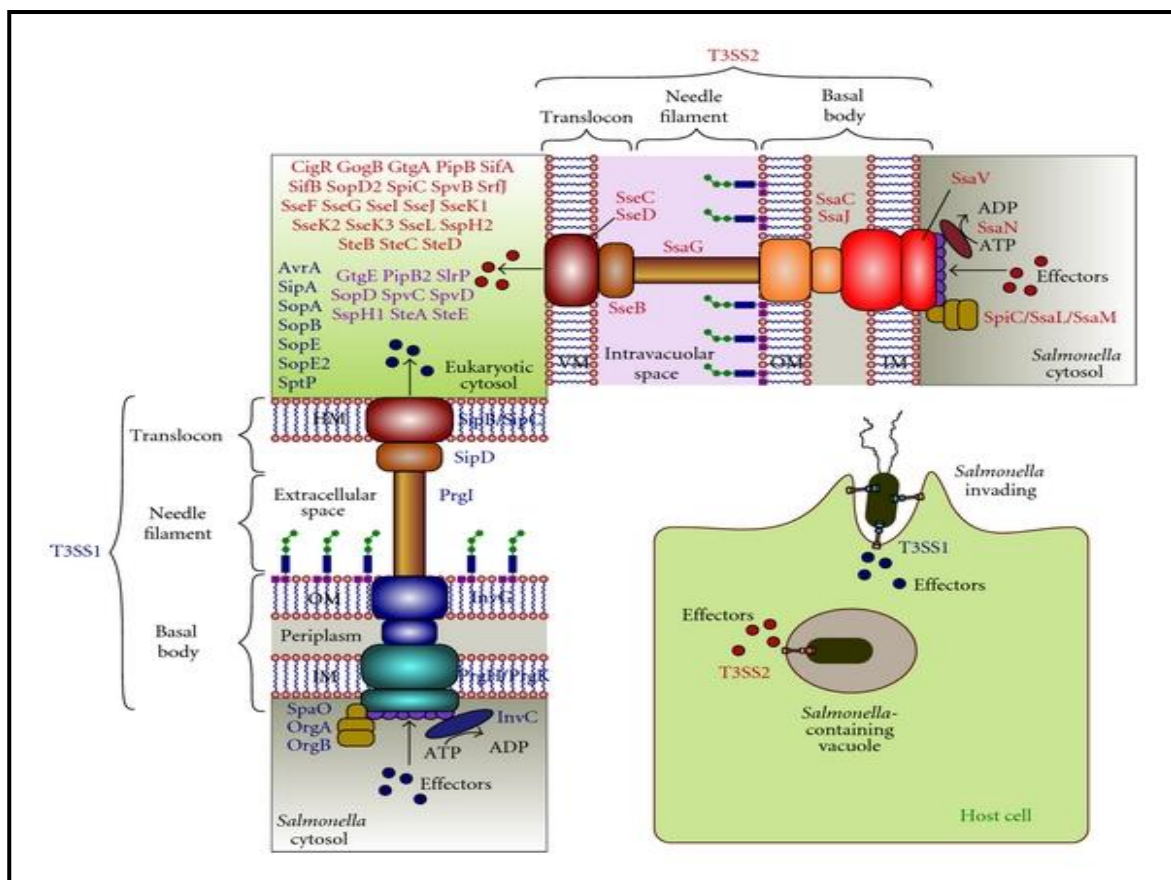
Les facteurs de virulence chez les salmonelles sont impliqués dans les diverses étapes de l'infection, soit: la production de toxines (endotoxine, entérotoxine, cytotoxine), la colonisation, l'adhésion et l'invasion, ainsi que dans la survie à l'intérieur des cellules de l'hôte (Finlay et Brumell, 2000; Millemann, 1998) (**Figure 4**).



**Figure 4:** Les facteurs de virulence de *Salmonella* (Madigan et Martinko, 2007)

Chez *Salmonella*, 200 à 400 gènes interviennent directement ou indirectement dans le processus infectieux. Ces gènes sont fréquemment regroupés dans des régions du chromosome bactérien appelées îlots de pathogénicité SPI (*Salmonella* pathogenicity islands). Au total cinq SPI ont été identifiés : SPI1 et SPI2 encodent des systèmes de sécrétion de type III (Winnen *et al.*, 2008). Les salmonelles disposent de deux TTSS, impliqués historiquement dans deux étapes distinctes du processus infectieux (Velge *et al.*, 2012).

Le TTSS-1 codé sur l'îlot de pathogénicité SPI-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 (Winnen *et al.*, 2008). Le TTSS-2 codé par des gènes regroupés au niveau de l'îlot SPI-2, permet à la bactérie 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 (Stevens *et al.*, 2009) (Figure 5).



**Figure 5:** Représentation schématique de T3SS1 et T3SS2 de *Salmonella* (Ramos-Morales, 2012)

Alors que le SPI-3 contribue à la survie intracellulaire, SPI-4 participe à l'adhésion des salmonelles aux cellules épithéliales et le SPI-5 requis pour plusieurs procédés pathogéniques chez l'hôte, cette région renferme plusieurs effecteurs associés au SST3-1 et au SST3-2. Ces protéines effectrices contribuent à l'invasion de l'épithélium, à la survie intracellulaire et au maintien de l'infection systémique (Sabbagh *et al.*, 2010).

*Salmonella* dispose d'autres facteurs qui eux aussi contribuent à la virulence comme les LPS durant l'activation des processus inflammatoires, et les sidérophores pour le transport du fer (Madigan et Martinko, 2007).

## **8. Détection et identification des salmonelles**

### **8.1. Les méthodes phénotypiques**

Les techniques phénotypiques étudient les propriétés exprimées par les bactéries et permettent la caractérisation des isolats. Ces dernières sont couramment utilisées dans le cadre de la surveillance épidémiologique des salmonelloses (Brisabois, 2001; Foley *et al.*, 2009).

### **8.2. Les méthodes microbiologiques**

La recherche des salmonelles dans un échantillon humain, animal ou alimentaire a pour but de mettre en évidence un petit nombre de ces bactéries au sein d'une flore abondante (associée ou de contamination). C'est pour cette raison que les méthodes mises en œuvre classiquement, visent à favoriser la multiplication des salmonelles et à inhiber les flores adventices par l'utilisation des milieux sélectifs. Ces milieux permettent une différenciation préliminaire, macroscopique, sur la base de la morphologie des colonies.

### **8.3. Les méthodes biochimiques**

Les méthodes biochimiques reposent sur la mise en évidence des caractères biochimiques différentiels qui permettront de classer les souches selon leur activité métabolique par l'utilisation de sucre et/ou leur activité enzymatique (Millemann, 1997).

### **8.4. Les méthodes moléculaires**

#### **➤ Technique d'amplification par PCR**

La technique PCR à l'avantage d'être simple à mettre en œuvre et permettent d'avoir des résultats rapidement. En fait, c'est une méthode qui permet d'amplifier une région spécifique

de l'ADN bactérien *in vitro*. Elle se base sur l'utilisation d'une paire d'amorces spécifiques en présence d'une enzyme résistante à la chaleur *Taq* polymérase (Hudson *et al.*, 2000).

## **9. Typage des souches de *Salmonella***

### **9.1. Typages phénotypiques**

#### **9.1.1. Serotypie**

Selon le schéma de Kauffmann et White, la classification des salmonelles en sérotypes repose sur la diversité des antigènes somatiques O et flagellaires H, exposés sur la surface bactérienne (Brisabois, 2001; **Abatcha**, 2014). Le sérotypage est basé sur l'agglutination des bactéries avec des sérums spécifiques pour identifier les variants antigéniques. Ces antigènes sont très variables avec 64 O et 114 H variants identifiés (Wattiau *et al.*, 2011).

#### **9.1.2. Lysotypie**

La lysotypie consiste à étudier la sensibilité ou la résistance d'une souche à une série de bactériophages (Brisabois, 2001). Les protéines de surface du phage se lient aux récepteurs spécifiques à la surface de la bactérie, il s'en suit une lyse cellulaire bactérienne qui traduit une sensibilité au phage spécifique. Pour le sérotype Typhimurium, un ensemble de 37 phages est utilisé, ce qui permet de classer les souches parmi 210 lysotypes (Anderson *et al.*, 1977).

La lysotypie est une méthode plus discriminante que la sérotypie car elle permet de distinguer des types à l'intérieur de sérotypes donnés. Elle est aussi reproductible et rapide mais sa capacité de typage est parfois limitée car le lysotype peut être modifié après acquisition d'un plasmide ou d'un bactériophage ou modification du LPS (Gormanet Adley, 2004).

### **9.2. Typages moléculaires**

Les méthodes moléculaires sont basées sur l'analyse de l'ADN total, chromosomique ou plasmidique (Brisabois, 2001). L'utilisation d'outils moléculaires pour le sous typage de *Salmonella* est très répandue. On peut citer:

#### **9.2.1. Multilocus sequence typing (MLST)**

Analyse de plusieurs loci de gènes de ménage, cette méthode est basée sur l'analyse de la séquence de 7 gènes conservés, indispensables et dont l'expression est constitutive (Ben-darifet *al.*, 2010; CNRESS, 2014).



### **9.2.2. Analyse de multiple locus de séquences localisées répétées en tandem (MLVA)**

MLVA détecte des polymorphismes dans des locus génomiques qui sont composées de séquences d'ADN répétées en tandem. La méthode consiste à amplifier par PCR ces régions répétées et à analyser la taille des fragments avec un système haute résolution. Il s'agit d'une méthode reproductible et de plus, particulièrement discriminante pour le sérotype Typhimurium (Davis *et al.*, 2009).

### **9.2.3. Electrophorèse en champs pulsé (PFGE).**

L'électrophorèse en champ pulsé, actuellement considérée comme la méthode de sous-typage moléculaire de référence pour *Salmonella* (Mezal *et al.*, 2014). L'ADN bactérien est soumis à l'action d'une enzyme (endonucléase de restriction) reconnaissant des sites de coupure "rares", générant un nombre restreint de fragments d'ADN de très grande taille. Pour le genre *Salmonella spp.*, les enzymes de restriction les plus souvent utilisées sont *XbaI*, *SpeI* et *BlnI* (Sahlstrom *et al.*, 2006). Les fragments sont séparés par une technique d'électrophorèse utilisant un champ électrique pulsé.

### **9.2.4. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)**

Les méthodes de restriction RFLP reposent sur l'utilisation d'enzymes de restriction, avec une révélation des fragments d'ADN migrés à l'aide d'une sonde spécifique, sonde ciblant ici les gènes codant pour les ARN ribosomiaux. Le pouvoir discriminant de cette méthode est très variable selon les sérotypes (David, 2009).

### **9.2.5. Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)**

Le principe consiste à mettre en œuvre un oligonucléotide d'une dizaine de bases comme amorce. Celui-ci va s'apparier au génome bactérien à différents endroits non spécifiques, en créant ainsi un polymorphisme important en taille et en nombre de fragments générés après. Cette méthode de typage est très utilisée. Les profils des produits amplifiés ainsi obtenus peuvent être caractéristiques de la souche permettant une bonne discrimination au sein d'un sérotype donné (Hilton *et al.*, 1996).

### **9.2.6. La ribotypie**

Le ribotypage consiste à amplifier des régions intergéniques entre les gènes qui codent pour les ARN ribosomiaux 16S et 23S suivie par digestion par enzymes de restriction. Cette

technique permet de déterminer les relations phylogénétiques entre les souches d'une même espèce (Millemann, 1998; Grimont *et al.*, 2001).

### **9.2.7. Profils plasmidiques**

La caractérisation du profil plasmidique d'une souche comprend la détermination du nombre de plasmides et leur taille. La comparaison des profils de restriction des plasmides accroît la discrimination entre les souches et permet de mesurer le degré de parenté de plasmides de tailles similaires. Ces profils ont été employés dans de nombreuses enquêtes afin d'aider à caractériser des souches de *Salmonella* de divers sérotypes (Martinetti et Altwegg, 1990).

## **10. Antibiorésistance des salmonelles**

La résistance antimicrobienne est l'un des problèmes majeurs de santé en médecine humaine et animale (Guillot, 1989). Elle est aussi reconnue par l'O.M.S., comme un problème émergent de santé publique, depuis, le phénomène est d'autant plus important qu'il concerne des germes pathogènes pouvant être transmis à l'homme (Duffy *et al.*, 1999; **Madec, 2012**).

Aujourd'hui, l'utilisation des antimicrobiens est incontournable en production animale. Ils sont utilisés dans un double objectif: en thérapeutique mais aussi comme additifs alimentaires ou promoteurs de croissance (Bergeron, 2009; Threlfall, 2002).

Depuis quelques années, les souches de *Salmonella* Typhimurium DT 104, isolées dans différents environnements humains et animaux, présentent très souvent un phénotype de multirésistance vis à vis les antibiotiques suivants: l'ampicilline, le chloramphénicol, la streptomycine, les sulfamides et les tétracyclines (Van *et al.*, 2005; Levings *et al.*, 2005).

La résistance aux antimicrobiens peut être le résultat d'une résistance intrinsèque ou acquise. La résistance intrinsèque est une résistance naturellement présente chez tous les isolats et est habituellement chromosomique, alors que la résistance acquise est généralement obtenue par une mutation au niveau des gènes du chromosome ou par acquisition d'éléments génétiques mobiles comme les plasmides, transposons et intégrons (Moreno *et al.*, 2009).

# Chapitre II

---

## *Matériel et méthodes*

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biologie Moléculaire de la faculté des Sciences de la vie et de la nature, Université de Hassiba Ben Bouali Chlef.

Notre étude a été menée, de Décembre 2015 jusqu'à Mai 2016 afin d'évaluer la prévalence de *Salmonella* dans la Wilaya de Chlef, dans 15 poulaillers (Ardbaida, Medjadja, Sidi el aroussi, Oued sly et Massina), 02 abattoirs et la station d'épuration de Chlef.

### **1. Echantillonnage**

En total 104 échantillons ont été collectés, dont 32 des eaux usées, 33 des fientes et 39 des intestins. Les prélèvements ont été recueillis dans des pots de crachats stériles pour les fientes et les eaux usées, et des sachets stomachers pour les intestins.

Les échantillons de fiente portent une fiche de renseignement distinguant les coordonnées suivants : la date et l'heure de prélèvement, le lieu, l'âge des animaux, la température du jour, les signes de pathologies et le nombre de morts. Tous les échantillons ont été traités au laboratoire le jour du prélèvement.

### **2. Solutions et milieux de culture**

La composition des milieux de culture et solutions utilisés dans cette étude est citée dans l'annexe.

### **3. Recherche des salmonelles**

L'analyse microbiologique pour la recherche de *Salmonella* a été faite selon la méthode AFNOR (Agence Française de Normalisation) NF U 47- 100 de février 2005, en 04 étapes: pré-enrichissement permettant de récupérer les bactéries ayant subi un stress; puis un enrichissement sélectif, favorisant la multiplication des salmonelles par rapport à la flore compétitrice; suivies d'un isolement sur des milieux sélectifs spécifiques et d'une identification biochimique et moléculaire (Colin, 2002; Bonny *et al.*, 2011) (**Figure 6**).

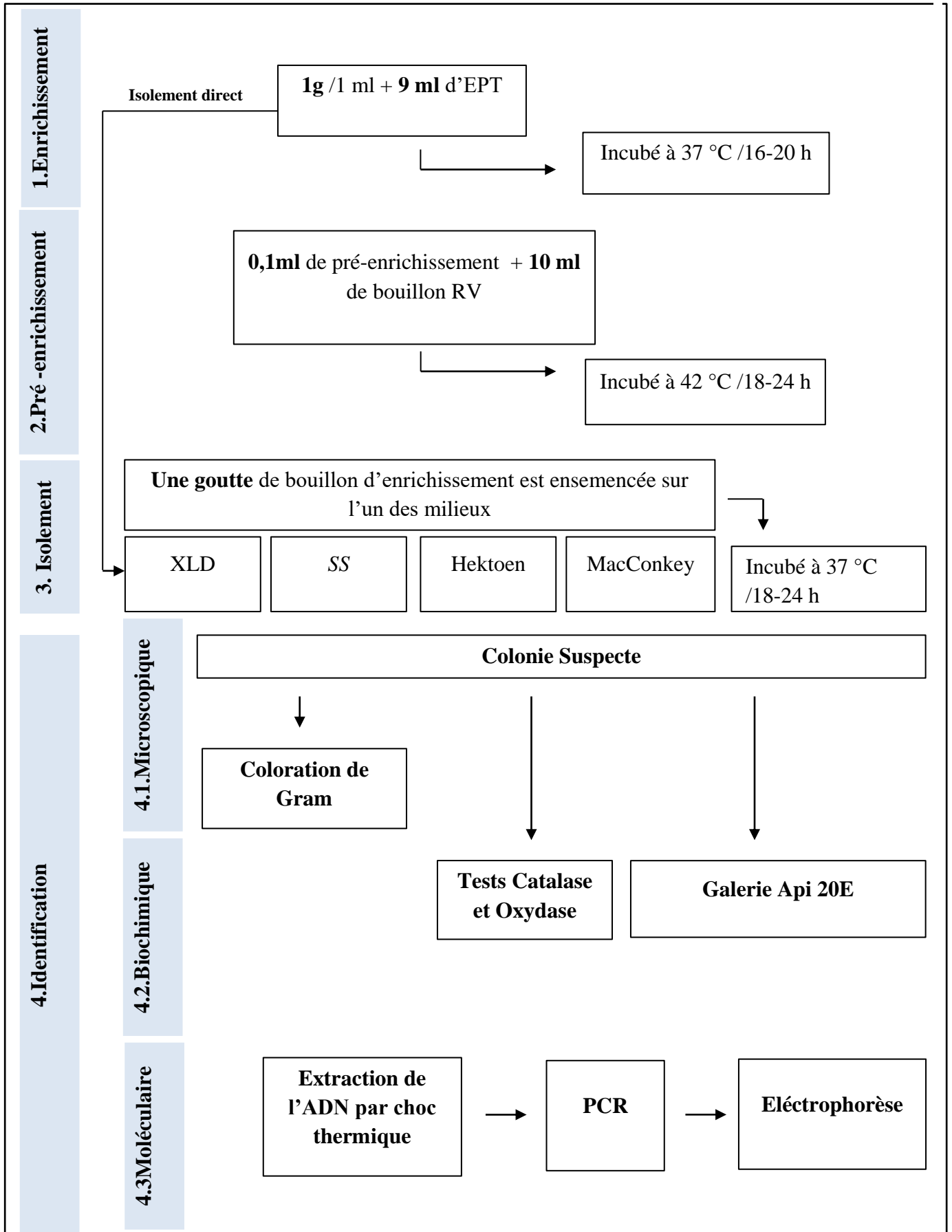


Figure 6: protocole pour la recherche des salmonelles

### **3.1. Pré-enrichissement**

Chaque prise d'essai (1g) a été mise dans 9 ml d'eau peptonée tamponnée, incubée à 37°C pendant 16 à 20 h (Elgroud *et al.*, 2008).

### **3.2. Enrichissement sélectif**

Transférer 0.1ml du pré-enrichissement dans un tube contenant 10 ml de bouillon Rappaport Vassiliadis, incubé à 42°C pendant 18 à 24 h (Nair *et al.*, 2015).

### **3.3. Isolement**

Par la technique des stries d'épuisement, une goutte de culture d'enrichissement est ensemencée sur l'un des milieux suivants : *Salmonella-Shigella*, Hektoen, XLD ou MacConkey. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 20 à 24 h. Après incubation, on examine les boîtes afin de rechercher la présence de colonies caractéristiques des salmonelles pour le milieu d'isolement utilisé (Delarras, 2014).

En parallèle, nous avons effectué un isolement direct sur l'un des milieux cité précédemment à partir d'eau peptonée tamponnée pour tous les prélèvements.

### **3.4. Identification**

Les colonies suspectes de *Salmonella spp.* sont purifiées sur gélose Hektoen ou gélose SS, suivi par la coloration de Gram et une galerie classique constituée de trois milieux est ensemencée: TSI, Citrate de Simmons et urée-tryptophane (Akhtar *et al.*, 2009). Enfin l'étude des autres caractères biochimiques: test oxydase, test catalase et la galerie API 20E (Boko *et al.*, 2013).

#### **3.4.1. Coloration de Gram**

C'est un test qui permet la distinction entre deux groupes bactériens, Gram positives et Gram négatives. Les bactéries Gram positif retiennent la coloration violette du violet de gentiane. Par contre les bactéries Gram négatif peuvent être décolorées par l'alcool et sont ensuite colorées en rose avec la safranine (Berraho, 2009).

### 3.4.2. Identification biochimique

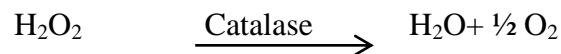
#### a. Test oxydase

La recherche de l'oxydase est un **test fondamental pour l'identification des bacilles à Gram négatif**. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée, à oxyder la forme réduite incolore de dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine, en leurs formes oxydées semi-quinone rose-violacées (Tankeshwar, 2012).

Sur un disque d'oxydase imprégné d'une goutte d'eau distillée stérile, on dépose une colonie pure; la présence de l'oxydase se manifeste par une coloration violette au bout de 30 secondes (Karraouan *et al.*, 2010).

#### b. Test catalase

La catalase est une enzyme respiratoire qui catalyse la libération de molécules d'eau et d'oxygène à partir de peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Pour mettre en évidence cette enzyme, une partie de la colonie suspecte est diluée dans une goutte d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sur une lame de verre. On remarque une effervescence lorsque la réaction est positive (**Tankeshwar, 2013**).

#### c. Test d'uréase

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée en ions d'ammonium et carbonate. La technique consiste à ensemencer un milieu urée-Tryptophane par une colonie bactérienne, incubé à 37°C pendant 24h. En cas de réaction positive, la décomposition de l'urée produit un dégagement d'ammoniac, faisant virer le rouge de phénol présent dans le milieu au rose puis au rouge foncé (Guillaume, 2004).

#### d. Utilisation de Citrate

Ce test est effectué sur le milieu citrate de Simmons qui contient le bleu de bromothymol comme indicateur de pH. La pente du milieu est ensemencée avec des stries puis l'incuber à 37°C pendant 18 h. Seules les bactéries capables d'utiliser le citrate peuvent se cultiver sur ce milieu en l'alcalinisant. Cette alcalinisation se traduit par un virage du milieu vers le bleu (**Tankeshwar, 2013**).

#### **e. Fermentation des sucres (milieu triple sucres)**

Ce milieu permet d'étudier la fermentation de trois sucres (glucose, lactose, saccharose), d'apprécier la production ou non d'H<sub>2</sub>S et de noter la production ou non de gaz à partir du glucose (Dellarras, 2007). La technique consiste à ensemencer le culot par piqûre puis la pente de la gélose par stries serrées, la lecture se fait après 18h d'incubation à 37°C.

#### **f. Le test de mobilité**

Le milieu Mannitol Mobilité a été ensemencé par piqûre centrale. Les germes immobiles ne poussent qu'au niveau de la piqûre central alors que les germes mobiles diffusent dans le milieu (Madigan et Martinko, 2007).

#### **3.4.2.1. Identification par la galerie API20E**

La galerie API 20E est un système pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatifs non fastidieux. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Ces substrats sont inoculés avec des suspensions bactériennes des salmonelles présumées obtenues à partir de la mini-galerie. Après incubation, les réactions sont traduites par des changements spontanés de coloration révélés par l'addition ou non des réactifs. La lecture s'est faite à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification ApiWeb.

#### **3.4.3. Identification moléculaire par PCR**

- **Extraction de l'ADN chromosomique par choc thermique**

Une colonie est suspendue dans 500 µl d'eau distillée stérile. Ensuite, cette suspension est placée dans un bain marie à 95 °C pendant 10 min, puis placée immédiatement sur glace pendant 10 min, l'opération a été répétée 2 à 3 fois afin de lyser les bactéries. Après une centrifugation de 10 min à 13000 tr/min, le surnageant est utilisé pour l'amplification par PCR ou conservé à -20°C (Roberta *et al.*, 2005).

- **Amplification par PCR**

La technique PCR permet d'amplifier une région spécifique de l'ADN bactérien «ARNr 16S de *Salmonella spp*» par l'utilisation des amorces spécifiques ITS1 –ITS2 (Gomez-duarte *et al.*, 2009). Les séquences d'amorces utilisées se trouvent sur le tableau (**Tableau 3**)



**Tableau 3:** Séquences d'amorces utilisées

Amorces	Séquence 5'- 3'	Taille	Localisation
ITS1	TATGCCCCATCGTGTAGTCAGAAC	312 pb	Chromosome
ITS 2	TGCGGCTGGATCACCTCCTT		

- **Préparation du mélange réactionnel**

Les amplifications ont été réalisées dans 25µL de mélange contenant : 3µL d'ADN, 0.25µL de Taq polymérase, 1.25µL d'amorces sens et 1.25µL d'amorce antisens, 0.05µl désoxynucléosides triphosphates (dNTPs), 2.5µl de tampon et 16.7 µl d'eau distillée stérile.

Le programme utilisé consiste en une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivie par 35 cycles de trois étapes : la dénaturation : 95°C pendant 1 min, l'hybridation : 59°C pendant 30 s et l'élongation : 72 °C pendant 1 minet une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 7 min (Gomez-duarte *et al.*, 2009).

- **Migration sur gel d'agarose et révélation**

Les produits de l'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %. La migration était faite sous une tension de 90V pendant une durée de 2 heures. La détermination des poids des fragments d'ADN obtenus était réalisée en utilisant un marqueur de taille (50 pb). Ensuite, les bandes sont visualisées sous la lumière UV (krzyzanowskif *et al.* 2014).

#### **4. Extraction de l'ADN plasmidique**

L'extraction de l'ADN plasmidique a été effectuée par la méthode de la lyse alcaline pour toutes les salmonelles isolées dans cette étude (Birnboim, 1983)

- Solution 1 : TE (Tris –HCl 50 mM pH 8 EDTA 10Mm)
- Solution 2 : NaOH 0.2 M SDS 1%
- Solution 3 : Acétate de potassium 3M pH 5.5

Brièvement, Une colonie bactérienne a été prélevée et mise en culture, une nuit à 37°C, dans 5 ml de bouillon LB. Le culot obtenu après centrifugation de 10 min à 13000 tr/min a été mis en suspension dans 300µl de la solution I, puis 300µl de la solution II ont été ajoutés au mélange qui a été mis à incuber 5 min à température ambiante, ensuite 300µl de la solution III fraîche a été ajouté. A partir du surnageant récupéré après une centrifugation de 10 min à 13000 tr/min, 650µl d'isopropanol ont été ajouté, suivie d'une centrifugation de 15 min à

13000 tr/min. Le surnageant a été éliminé et 700µl d'éthanol 70% ont été ajoutés au culot puis centrifugés 5 min à 13000tr/min. Le culot a été mis en suspension dans 50µl de TE.

5µl d'ADN ont été utilisés pour l'électrophorèse en gel d'agarose à 2 % contenant le bromure d'éthidium (BET). La migration s'est effectuée dans un tampon Tris Acétate EDTA 1X (TAE) pendant 2 heures à 70V. La révélation a été faite par illumination du gel sur une plaque UV.

## 5. Test d'antibiorésistance

La sensibilité des souches aux différents agents antibactériens a été déterminée par la technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton. Les disques d'antibiotique ont été déposés dans les boîtes inoculées par une suspension bactérienne à l'échelle de 0.5MacFarland (**Tableau 4**). Après 24 h d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition ont été mesurées et interprétées en sensible (S), résistant (R), ou intermédiaire (I), selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2013)

**Tableau 4:** liste des antibiotiques utilisés pour les antibiogrammes (Elgroud *et al.*, 2008 ).

<b>Famille</b>	<b>Antibiotiques</b>	<b>Concentration du disque</b>
Bêta-lactamines	Céfotaxime (CTX)	30 µg
Tétracyclines	Tétracycline (TE)	30 µg
Sulfamides	Co-trimoxazole (COT)	25 µg
<u>Fluoroquinolones</u>	Ofloxacin (OF)	05 µg

# Chapitre III

---

## *Résultats et discussion*

## 1. Echantillonnage

Au total 104 échantillons ont été collectés dont 33 des fientes, 39 des intestins de poulets et 32 des eaux usées.

Après pré-enrichissement et enrichissement, les échantillons ont été isolés sur des milieux sélectifs. L'identification des souches commence par l'observation des aspects morphologiques des colonies.

### 1.1. Isolement

#### ➤ Milieu XLD

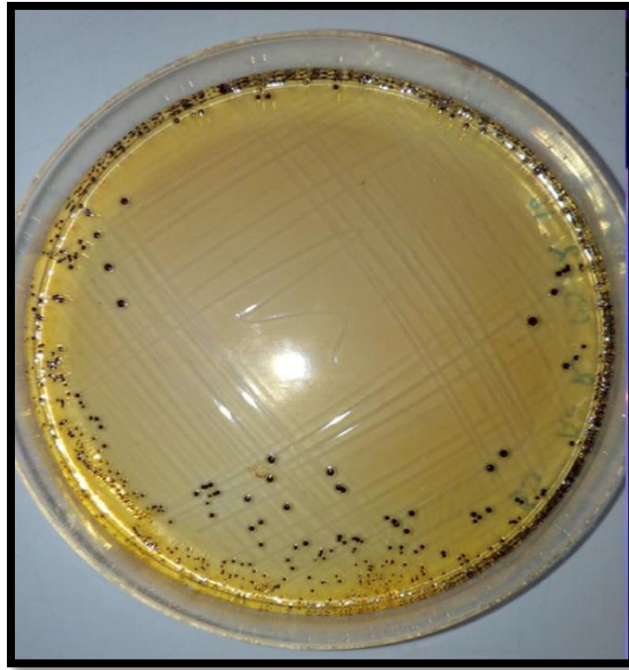
Sur ce milieu, les colonies de *Salmonella* apparaissent rouge due à la fermentation de xylose, à centre noire grâce à la production de sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ) par la réduction du citrate ferrique ammoniacal (**Figure 7**).



**Figure 7:** Aspect des colonies de *Salmonella* sur milieu XLD.

#### ➤ Milieu *Salmonella-Shigella* (SS)

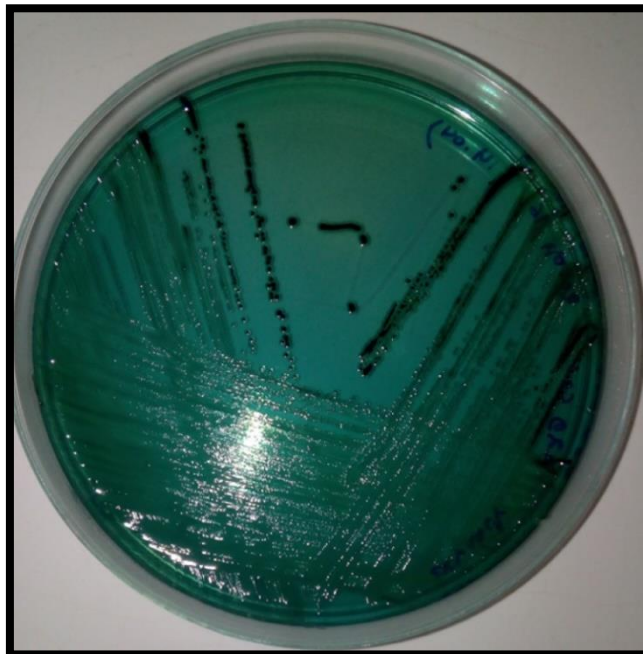
Sur le milieu SS, on observe des colonies incolores ce qui indique qu'elles ne fermentent pas le lactose, avec ou sans centre noire, le centre noir est dû à la production de sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ) en présence de thiosulfate et du citrate ferrique (**Figure 8**).



**Figure 8:** Aspect des colonies de *Salmonella* sur milieu SS.

➤ **Milieu Hektoen :**

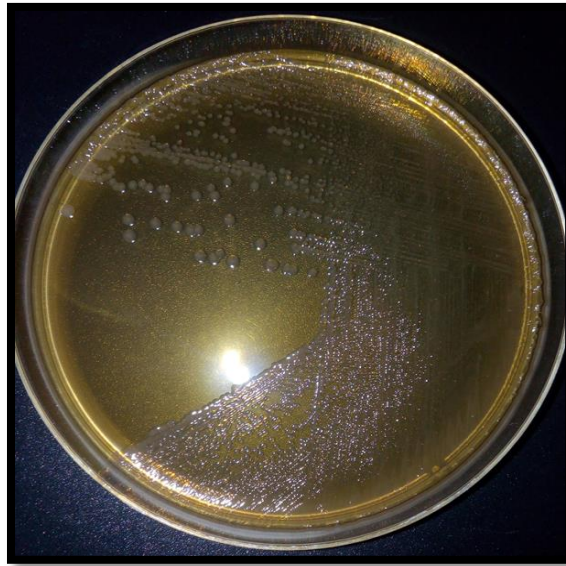
Les colonies sur le milieu Hektoen apparaissent vertes à centre noire, indiquant qu'elles ne fermentent pas les sucres inclus dans ce milieu et produisent l' $H_2S$  (**Figure 9**).



**Figure 9:** Aspect de colonies suspectes *Salmonella* sur milieu Hektoen.

➤ **Milieu MacConkey:**

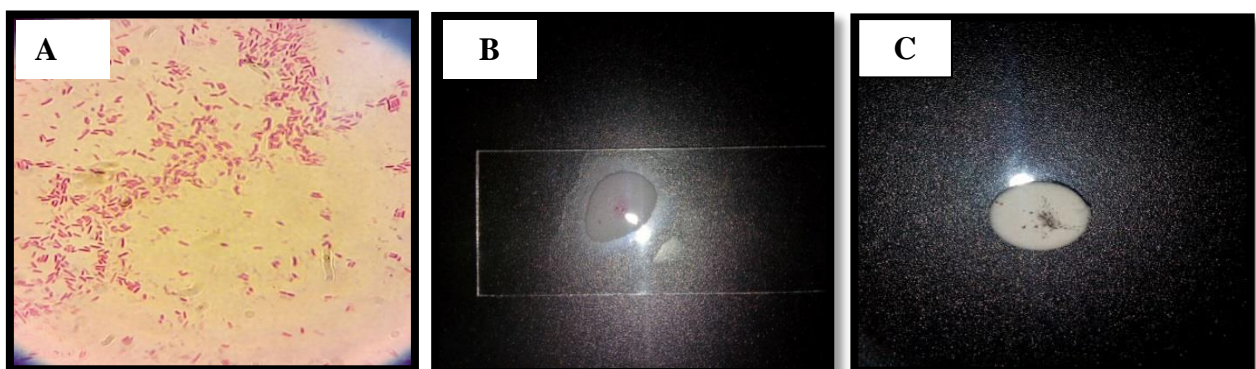
Sur milieu MacConkey, les colonies sont incolores due à l'absence de la fermentation du lactose (**Figure 10**).



**Figure 10:** Aspect des colonies suspectes *Salmonella* sur milieu MacConkey.

**1.2 Identification des salmonelles:**

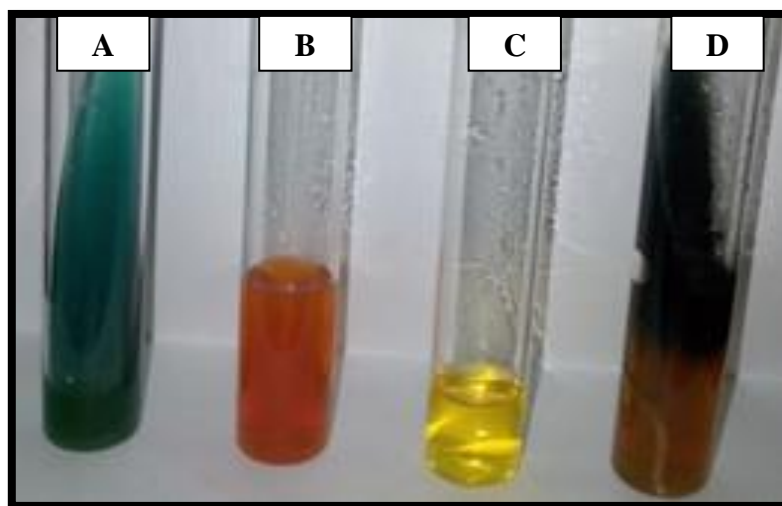
Les colonies suspectes sur les milieux selectifs ont ete observé au microscopique après coloration de Gram, puis sont subit a une série de des tests biochimiques : test catalase, test oxydase et d'autre tests discriminatifs pour le genre *Salmonella* tel que: test uréase, utilisation de Citrate, la fermentation des sucres (glucose, lactose pet saccharose), la production d'H<sub>2</sub>S et le test de mobilité. Les résultats de ces tests sont présentés dans la **figure 11** et le **tableau 5**.



**Figure 11 :** **A :** Bacille à Gram négatif sous microscope (GR×100) ; **B.** Catalase positive ; **C :** Oxydase négative.

**Tableau 5:** Résultats des caractères biochimiques des isolats identifiés par la galerie classique.

Tests	Résultats	
<b>TSI</b>	Glucose +	La culture de <i>Salmonella</i> correspond à une pente alcaline (rouge), avec formation de gaz, et un culot acide (jaune) et noircissement de la gélose par H <sub>2</sub> S
	Lactose -	
	Saccharose -	
	H <sub>2</sub> S +	
<b>Urée</b>	-	Milieu clair (jaune)
<b>Citrate de Simmons</b>	+	Virage de l'indicateur de pH au bleu : il y a eu alcalinisation du milieu
<b>Mobilité</b>	+	Les bacilles mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble du milieu.



**Figure 12:** Résultat de l'identification par la galerie classique de l'isolat A5

**A:** Utilisation de citrate positif; **B:** Test de Mannitol mobilité positif, **C:** Test d'uréase négatif;  
**D:** Fermentation des sucres et production H<sub>2</sub>S sur milieu TSI

Les tests microbiologiques et biochimiques cités ci-dessus nous ont permis de retenir 34 isolats suspects de *Salmonella*.



➤ **Galerie API20E :**

Pour confirmer l'appartenance des 34 isolats au genre *Salmonella* on a donc effectué une identification par la galerie API20E, qui est plus discriminant que les tests biochimiques classiques. Les résultats de l'API20 E, sont présentés sur **figure 13** et le **tableau 6**.



CE 0723 B		REF. : <b>A6</b>	<b>2.0.1.6 / 0.3 / 0.9</b>																																																																																					
<b>api® 20E</b>		Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie : <b>Intestin</b>																																																																																						
		<b>BIOMÉRIEUX</b>																																																																																						
<table border="1"> <tr> <td>(-)</td><td>(+)</td><td>(+)</td><td>(+)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(-)</td> </tr> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td> </tr> <tr> <td>ONPG</td><td>ADH</td><td>LDC</td><td>ODC</td><td>LDCI</td><td>H<sub>2</sub>S</td><td>URE</td><td>TDA</td><td>IND</td><td>URE</td><td>GEL</td><td>GLU</td><td>MAN</td><td>IND</td><td>SOR</td><td>RHA</td><td>SAC</td><td>MEL</td><td>AMY</td><td>ARA</td><td>CK</td> </tr> <tr> <td colspan="2">6</td><td colspan="3">7</td><td colspan="3">0</td><td colspan="3">4</td><td colspan="3">5</td><td colspan="3">5</td><td colspan="3">2</td><td colspan="3">7</td> </tr> </table>		(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	ONPG	ADH	LDC	ODC	LDCI	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	URE	GEL	GLU	MAN	IND	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	CK	6		7			0			4			5			5			2			7			Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλα τεστ / Andra tester / Andro tests / Inne testy : <b>670455277</b>	
(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)																																																																					
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4																																																																				
ONPG	ADH	LDC	ODC	LDCI	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	URE	GEL	GLU	MAN	IND	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	CK																																																																				
6		7			0			4			5			5			2			7																																																																				
		Ident. / Ταυτοποίηση : <b>Salmonella spp.</b>																																																																																						

**Figure13:** Résultat de l'identification de l'isolat A6 par la galerie API 20 E.



**Tableau 6:** Résultat de lecture des codes sur API web

N° de souche	Code	Espèce	N° de souche	Code	Espèce
<b>A5</b>	2704752	<i>Salmonella spp</i>	<b>A33</b>	1736551	<i>Citrobacter brakii</i>
<b>A6</b>	6704552	<i>Salmonella spp</i>	<b>A36V</b>	0756000	<i>Proteus mirabilis</i>
<b>A14</b>	5604512	<i>Citrobacter youngae</i>	<b>A44</b>	0756000	<i>Proteus mirabilis</i>
<b>A16T</b>	0354000	<i>Morganella morganii</i>	<b>A57E</b>	0636000	<i>Proteus mirabilis</i>
<b>A15H</b>	037000	<i>Morganella morganii</i>	<b>A59B</b>	0174000	<i>Morganella morganii</i>
<b>A15T</b>	0737000	<i>Proteus mirabilis</i>	<b>A61CN</b>	4736000	<i>Proteus mirabilis</i>
<b>A18CN</b>	1404513	<i>Citrobacter youngae</i>	<b>A62T</b>	0536000	<i>Proteus mirabilis</i>
<b>A15CN</b>	0733000	<i>Proteus mirabilis</i>	<b>A63CN</b>	0732000	<i>Proteus mirabilis</i>
<b>A23CN</b>	0736000	<i>Proteus mirabilis</i>	<b>A65T</b>	0732000	<i>Proteus mirabilis</i>
<b>A26CN</b>	6704752	<i>Salmonella spp</i>	<b>A65CN</b>	0732000	<i>Proteus mirabilis</i>
<b>A26T</b>	6704752	<i>Salmonella spp</i>	<b>A66T</b>	0736000	<i>Proteus mirabilis</i>
<b>A28CN</b>	6704752	<i>Salmonella spp</i>	<b>A66CN</b>	6704712	<i>Salmonella spp</i>
<b>A29CN</b>	6704752	<i>Salmonella spp</i>	<b>A68CN</b>	0732000	<i>Proteus mirabilis</i>
<b>A30CN</b>	2744752	<i>Salmonella spp</i>	<b>A73CN</b>	0732000	<i>Proteus mirabilis</i>
<b>A32</b>	1736551	<i>Citrobacer brakii</i>	<b>A74CN</b>	0736000	<i>Proteus mirabilis</i>

Les tests de la galerie API20E ont révélés que 10 souches, appartiennent au genre *Salmonella spp*. Le taux d'isolement est donc 9.61% (10/104), avec 3. % des fientes, 7.69 % des intestins de poulets et 18.75 % des eaux usées (**Tableau 7**).

**Tableau 7:** Fréquence des isolats de salmonelles dans les prélèvements

<b>Echantillons</b>	<b>Nombre de prélèvements</b>	<b>Nombre d'isolats</b>	<b>Fréquence d'isolat</b>
<b>Fientes</b>	33	01	3.03%
<b>Intestins de poulets</b>	39	03	7.69%
<b>Eaux usées</b>	32	06	18.75%

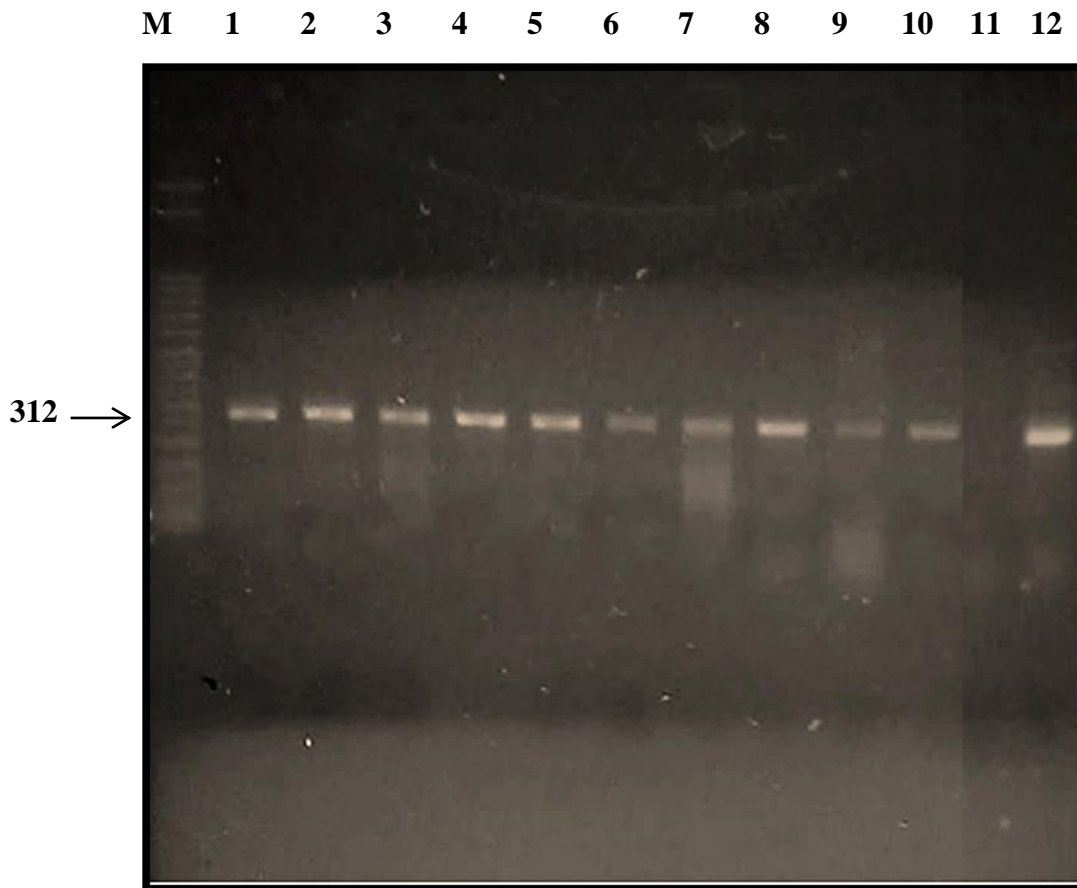
Notre taux global d'isolement à partir des fientes est proche de celui trouvé en Iraq (4%) (Nader *et al* 2015) et inférieur à celui d'Egypte (14%) (Rabie *et al* 2012).

Au niveau des abattoirs, on a trouvé des proportions plus élevées sur les intestins, ces résultats sont similaire à ceux reportés en Algérie par El groud *et al.*, 2008.

La prévalence des salmonelles dans les eaux usées est supérieure à celle reportée par Nair *et al* 2015 en Inde (10%).

#### ➤ **Identification moléculaire par PCR**

Nous avons ensuite évalué l'efficacité de la technique de PCR pour l'identification rapide et spécifique des salmonelles, en utilisant les amorces de Gómez-duarte *et al.* (2009), spécifiques à une région d'ADN unique au genre *Salmonella* (**Tableau 3**). Comme prévu, la PCR a produit un amplifiât avec une taille de 312 pb pour nos 10 isolats de *Salmonella* (**Figure 14**).



**Figure 14:** Electrophorèse sur gel d'agarose des résultats de l'amplification par PCR

5µl de mélange réactionnel du PCR sont migré sur un gel d'agarose (2%) avec un marqueur de taille de 50 pb.

**M :** Marqueur de taille (50 pb).

**Puits 1 :** isolat de fiente A5

**Puits 2 - 4 :** isolats des intestins de poulet (A6 - A26CN - A26T).

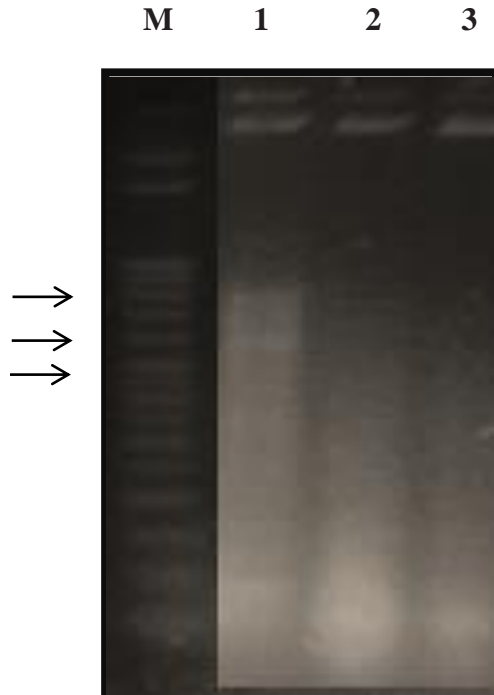
**Puits 5 - 10 :** isolats des eaux usées (A14T - A28T - A28CN - A29 - A30 - A66CN).

**Puits 11 :** Témoin négatif (eau distillée).

**Puits 12 :** Témoin positif (souche de référence de *Salmonella*).

## 2. Extraction de l'ADN plasmidique

Toutes les *Salmonella* isolées au cours de cette étude (n=10) ont fait l'objet d'une analyse du contenu plasmidique en utilisant la technique de lyse alcaline (voire matériels et méthodes). Les résultats montrent qu'un seul isolat provenant de fiente (A5) contient un plasmide (**Figure 15**).



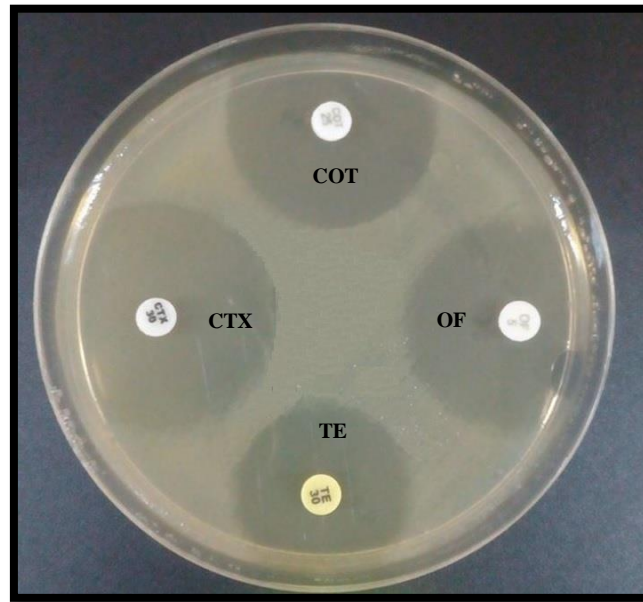
**Figure 15:** Analyse des résultats d'extraction plasmidique sur gel d'agarose

**M:** marqueur de taille (50pb).

**Puits 1 - 2 - 3:** Produits d'extraction A5- A26T- A28.

### 3. Test d'antibiorésistance

Les souches isolées de *Salmonella* ont été soumises à un test d'antibiogramme par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur gélose Mueller Hinton. Les résultats sont montrés dans la **figure 16** et le **tableau 8**.



**Figure 16:** Sensibilités de la souche A5 aux antibiotiques  
(CTX: Céfotaxime , OF: Ofloxacin, COT: Co-trimoxazole, TE: Tétracycline)

L'interprétation des résultats a été faite en comparant les diamètres obtenus aux diamètres critiques proposés par **CA-SFM, 2013** pour déterminer si les isolats sont résistants (R), sensibles (S) ou intermédiaires (I) (**Tableau 8**).

**Tableau 8:** Résultat du test d'antibiogramme sur les isolats de *Salmonella*

Dénomination commune	Diamètre critique (mm)		Résultat d'interprétation									
	S ≥	R <	A5	A6	A26T	A26C	A14	A28C	A28T	A29	A30	A66
Céfotaxime	26	23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tétracycline	19	17	I	R	S	S	R	R	R	R	R	R
Co-trimoxazole	16	13	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
Ofloxacine	25	22	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R

80% des souches sont résistantes à la tétracycline et à l'ofloxacine. Par contre elles sont toutes sensibles à la céfotaxime et la co-trimoxazole.

50 % des salmonelles isolées à partir des volailles (A5 - A6 - A26T - A26CN) sont résistantes à l'ofloxacine et à la tétracycline, cette fréquence de résistance est similaire à celle trouvée dans une étude menée sur les salmonelles de volaille en Algérie par Ayachi, 2008. On a aussi noté que 90% des souches provenant des eaux usées (A14 - A28CN - A28T - A29CN -

A30CN - A66CN) sont résistantes à l'ofloxacine, et 100% à la tétracycline, et sont toutes sensibles aux Co-trimoxazole et céfotaxime.

**Conclusion**

---

**générale**

## ***Conclusion générale***

L'objectif de cette étude était d'isoler et caractériser des souches de *Salmonella* dans les élevages de poulets de chair et les eaux usées. Au cours de cette étude, nous avons identifié 10 souches de *Salmonella* à partir de 104 échantillons (fientes et intestins de poulets et eaux usées). La caractérisation des isolats a été réalisée par des méthodes bactériologiques et biochimiques, et ensuite confirmés par une méthode moléculaire basée sur l'amplification d'une séquence d'ADN spécifique au genre *Salmonella* par la technique de PCR.

D'autre part, le test d'antibiorésistance a révélé la présence de 8 souches (80%) qui résistantes à l'ofloxacine et la tetracycline.

Vu le taux relativement élevé (10%) des salmonelles isolées dans cette étude et de la résistance aux tétracyclines et ofloxacine (80%), il semble donc indispensable d'implémenter des mesures de surveillance régulières et de revoir les pratiques d'hygiène, d'élevages de poulet et l'utilisation des antibiotiques. Il faut aussi signaler que les bactéries multirésistantes peuvent être facilement transmises aux humains, et leurs traitements par antibiotiques seraient inefficaces.

En perspectives, les salmonelles isolées dans cette étude devraient faire l'objet d'autres études sérologiques et génétiques afin de les mieux caractériser en vue de les comparer avec les souches circulantes au niveau régional et/ou mondial, et de déterminer les facteurs génétiques responsables de leurs pathogénicité et résistance aux antibiotiques.



*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

1. **A**batcha M.G., Zakaria, Z., Goni D.M. and Kaur, D. G.(2014). **Typing of Salmonella Species: A Mini-Review** .Vol.4, No.5. 2224-3186 .
2. Agasan A., Kornblum J., Williams G., Pratt C., Fleckenstein Ph., Wong M., and Ramon A.(2002) . **Profile of Salmonella enterica subsp. enterica (Subspecies I) Serotype 4,5,12:i:Strains Causing Food-Borne Infections in New York City**. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 40 : ( 6) .1924–1929.
3. Ait abdelouahab N. (2008). **Microbiologie alimentaire**, office de publications universitaires. P : 452 .
4. Akhtar F., Hussain I., Khan A., and Rahman U. (2009) . **Prevalence and antibiogram studies of Salmonella Enteritidis Isolated from Human and Poultry Sources**. Pakistan Veterinary Journal . 2074-7764 . 30 (1): 25-28.
5. Anderson E., Ward L., DE Saxe M., DE SA J. (1977). **Bacteriophage-typing designations of Salmonella Typhimurium**. 78, 297-300.
6. Andino A. and Hanning I.(2015). **Salmonella enterica: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars**. *Review Article*. The ScientificWorld Journal.p : 16 .
7. Aubry P. (2013) .**Les salmonelloses**. *Medecine tropicale des pays de l’Océan Indien* . <http://www.sup-numerique.gouv.fr>
8. Ayachi A., Alloui N., Kassah-laouar A., Bennoune.O. (2009). **Detection de Salmonelles mineurs au niveau des couvoirs du secteur étatique et privé de la Wilaya de Batna**. JRA :413-417.
9. **B**arrow A. P. and Methner U. (2013). **Salmonella in Domestic Animals**.2 nd edition CABI .P:8.
10. Bäumlér A., Tsohis R., Ficht T., Adams L. (1998).**Evolution of host adaptation in Salmonella enterica**. Infect.Immun., 66, 4579-4587
11. Ben-Darif E., JuryF., De Pinna E., Threlfall E. J., Bolton F.J., Fox, A. J. and Upton1 M. (2010) . **Development of a Multiplex Primer Extension Assay for Rapid Detection of Salmonella Isolates of Diverse Serotypes**. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY., Vol. 48, No. 4 : 1055–1060 .
12. Bergeron N. (2009) .**Caractérisation phénotypique et génotypique d’isolats de Salmonella Typhimurium provenant de porcs sains ou septicémiques**.Thèse de doctorat d’université de Montréal. p :8.
13. Berraho E. (2009).**Cours de Microbiologie Générale**. Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire, B.P. 1014, Rabat.

14. Birnboim, H. C. (1983). **A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA.** *Methods Enzymol.* 100: 243 – 255.
15. Boko C .K., Marc Kpodekon T., Duprez J-N., Imberechts H., Taminiou B., Bertrand S. & Jacques Mainil G.(2013). **Identification and typing of *Salmonella enterica* serotypes isolated from guinea fowl (*Numida meleagris*) farms in Benin during four laying seasons (2007 to 2010).** *Avian Pathology.* Vol. 42, No. 1, 1-8.
16. Bonny A.C., Karou T.G., Atobla.K., Bohoua L.G., Niamkey.L.S.(2011).**Portage de *Salmonella* au niveau du gésier cru de poulets exposes a la vente à Abidjan, Côte d’Ivoire.** *Appl. Biosci.* 47: 3230– 3234.
17. Bourgeois CM., J.F.Mescle ,J .Zucca. (1996). **Microbiologie alimentaire Tome1** .Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité de aliments. ISS N :0243-5624
18. Brisabois A. (2001). **Intérêt et limites des techniques de caractérisation des *Salmonella*.** *Epidémiol. et santé anim.*, 39, pp : 31-42.
19. Brenner F.W., Villar R.G., Angulo F.J., Tauxe R., Swaminathan B. (2000). ***Salmonella* nomenclature.** *Journal of Clinical . Microbiology .* 38 (7) : 2465 – 2467.
20. **C**amart-Périé A. (2006). ***Salmonella*, salmonelloses bovines : état des lieux, épidémiologie en France,** Ecole nationale vétérinaire d’Alfort. Thèse de doctorat vétérinaire. P : 122.
21. Carip C.,JackyB., Dorsainvil E, Salvert M-H., Tandreau A. (2008) **Microbiologie Hygiène : Base microbiologique de la diététique.** LONDRES-PARIS-NEW YORK.
22. Comité de l’antibiogramme de la société française de Microbiologie (CA-SFM )  
Recommandations 2013.Web site : <http://www.sfm.asso.fr>.
23. Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2010) **.Emerging infectious diseases.**1080 -6059.
24. Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* (CNRSS). (2014) . **Unité de Recherche et d’Expertise des Bactéries Pathogènes Entériques.**
25. Ciganovich E.A., Editor Phillip J. Redman, Design and layout Rosemary S. Stenback, Illustrator.(1999). **Field Manual of Wildlife Diseases.** Congress.
26. Colin M . ( 2002 ) . ***Salmonella spp*** . afssa . 1-6 .
27. Corrége I., Proux K., Fravallo P., Cornou C., Flého J. Y.(2002). **Les salmonelles en élevage porcin : caractérisation et rôle épidémiologique du statut des cochettes.** *Journées de la Recherche Porcine*, 34, 309-315.
28. Coulibaly e.K., Bakayoko S., Karou T.G., Coulibaly K. J., Goualie G.B., Dosso M. et Diopoh K.J.(2010). **Sérotypage et antibiorésistance des souches de *Salmonella* isolées**

**dans les foies de poulets vendus sur les marchés de Yopougon (Abidjan Côte d'Ivoire) en 2005.** RASPA Vol.8 N0S, 2010.

29. **D**avid J. (2009). **Attribution des cas de salmonelloses humaines aux différentes filières de production animale en France. Adaptabilité et robustesse du modèle bayésien d'attribution par typage microbiologique.** Cellular Biology. Agrocampus - Ecole nationale supérieure d'agronomie de rennes, 2009. French.
30. Davis M. A., Baker K. N. K., Call D. R., Warnick L.D., Soyer Y., Wiedmann M., Groh Y., McDonough P. L., Hancock D.D., and Besser T. E.( 2009). **Multilocus variable-number tandem-repeat method for typing *Salmonella enterica* serovar Newport.** J. Clin. Microbiol. 47:1934–1938.
31. Dellarras C. (2007). **Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire.** Technique et documentation. France. Lavoisier.
32. Dellarras C.(2014).**Pratique en microbiologie de laboratoire. Recherche de bactéries et de levures-moisissures.** Lavoisier .Paris .P.340
33. Djerou Z. (2006). **Influence des conditions d'élevage sur les performances chez le poulet de chair.** Thèse de Magister de UNIVERSITÉ MENTOURI DE CONSTANTINE p :46.
34. Duffy G., Cloak O. M. , O'Sullivan M. G., Guillet A., Sheridan J. J., Blair I. S., McDowell D. A.(1999) . **The incidence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella spp.* on Irish retail meat products.** FoodMicrobiology, 16, 623-631.
35. **E**lgroud R., Zerdoumi F., Benazzouz M., Bouzitouna C., Granier S., Brisabois A., Dufour B., Millemann Y. (2009) **Contaminations du poulet de chair par les salmonelles non typhiques dans les élevages et abattoirs de la wilaya de Constantine.** Sciences & Technologie C – N°27 : 37-48.
36. **F**inlay B. B., Brumell, J. H. 2000. ***Salmonella* interactions with host cells: in vitro to in vivo.** Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 355: 623-631.
37. Foley S. L., Johnson T.J., Ricke S. C., Nayak R., Danzeisen J. (2013). ***Salmonella* Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars.**77: (4). Microbiology and Molecular Biology Reviews p. 582-607.
38. Foley S. L., White D. G. , McDermott P. F. , Walker R. D. , Rhodes B. , Fedorka-Cray P. J., Simjee S. and Zhao S. (2006). **Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources.**Journal of Clinical Microbiology 44(10): 3569-3577.
39. **G**ómez-Duarte O.G., Bai J., and Newel E.(2009). **Detection of *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter spp.***

- enteropathogens by Three-reaction Multiplex PCR.** *Diagn Microbiol Infect Dis*63(1): 1–9.
40. Gorman R. et Adley,C.C.(2004). **Characterization of *S. enterica* sérotype Typhimurium isolates from human, food and animal sources in the republic Ireland.** *Journal of clinical microbiology*, vol. 42, n° 5, 2314-2316.
  41. Grimont P. A. D., Weill F. X. (2007). **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars.** Institut Pasteur & WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 9th edition, Paris, France.
  42. Grimont P.A.D., Grimont F. et Bouvet P.J.M. (1994). ***Salmonella* In: J. Freney et al.: Manuel de bactériologie clinique** Vol. 2. coll. Option Bio, Paris, 1017-1037.
  43. Grimont P.A.D., Grimont F. et Bouvet P.J.M.(2000). ***Salmonella* .In : Freney J., Renaud F., Hansen W. et Bollet C. Précis de Bactériologie clinique.** Paris : Editions ESKA: 1137-1156.
  44. Grimont, P.A.D., Grimont, F. et Bouvet, P. (2001).**Molecular basis of the diversity in the genus *Salmonella*.In: *Salmonella* in domestic animals.** Wray et col.CABI Publishing,British Library, London,U.K.:1-17.
  45. Grosjean J., Clavé D., Archambaud M., Pasquier C.(2009 ). **Bactériologie et virologie pratique .** de boeck université . 1 er édition . p. 125- 130.
  46. Guillaume P T. **La microbiologie.** In 2004.
  47. Guillot E., and Loret J., F. (2010) .**Watherborne pathogens : Review for the Drinking Water industry** .London- new york . p:20 -23.
  48. Guillot J.F.( 1989). **Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques.** HAL. ARTICLE DE SYNTHESE .(20) : 3-16 .
  49. Gledel J. (1996). Le genre *Salmonella* In: Bourgeois. *Microbiologie alimentaire*. Tome 1. Tec & Doc. Paris. p : 61-77.
  50. **H**ilton 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 (6):575-84.
  51. Hudson, C.R., Quist, C., Lee, M.D., Keyes, K., Dodson, S.V., Morales, C., White, D.G., Maurer, J.J., 2000. **Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in Southeastern United States.** *J. Clin. Microbiol.* 38, 1860–1865.
  52. Haraga A, Maikke B. Ohlson & Samuel I. (2008) **Miller Nature Reviews Microbiology** 6, 53-66

53. **J**awetz E., Melnick J. L., Adelberg E.,A., (1973) .**Microbiologie médicale** .Paris .p : 254.
54. **K**arraouan B., Fassouane A., EL ossmani H., Cohen N., Charafeddine O., BOUHRIF B.(2010).**Prévalence et gènes de virulence des *Salmonella* isolées des viandes hachées crues de dinde à Casablanca (Maroc)**. Revue Méd. Vét., 161, 3, 127-132.
55. Kirk, M. D., McKay, I. et al. 2008. "**Food safety: foodborne disease in Australia: the OzFood Net experience.**" Clin Infect Dis, 47(3): 392-400.
56. 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., 2004, 148, 174-193.
57. Krzyzanowski F.Jr., Zappellini L., Martone-Rocha S. , Dropa M., Helena Matté M., Nacache F. and Tereza Pepe Razzolini M.(2014). **Quantification and characterization of *Salmonella spp.* isolates in sewage sludge with potential usage in agriculture** .BMC Microbiology.
58. **L**angridge G. C., Wain J., and Nair S.(2005). **Invasive Salmonellosis in Humans**. *EcoSalPlus* .Cambrige CB 10.
59. Le Minor L., Veron M.(1989). **Bactériologie médicale. Les entérobactéries : *Salmonella***. Flammarion. Médecine. Sciences Edition, Paris, 2ème Edition. p : 411-427.
60. Legiot A.D., LE mao P., Convenant A. et Penot.(1993). **Recherche des salmonelles dans les mollusques bivalves marins par conductance-metrie**. direction de l'environnement et de l'aménagement journal :6.
61. Levings R. S., Lightfoot D., Partridge S.R., Hall R.M., and Djordjevic S.P.(2005 ).**The Genomic Island SGI1, Containing the Multiple Antibiotic Resistance Region of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 or Variants of It, Is Widely Distributed in Other *S. enterica* Serovars**. journal of bacteriology, vol. 187, no. 13, p. 4401–4409.
62. **M**adec J.-Y.(2012). **Antibiorésistance : le passage animal - Homme, mythe ou réalité ?**.Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation no 53/Sécial Antibiotiques et Antibiorésistances.50-53.
63. Madigan M., Martinko J. (2007). **Biologie des micro-organismes**. 11 ème édition. Pearson, Paris. p : 731-735, 790-792, 943, 947-948.
64. Martinetti G., Altwegg M.(1990). **rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as tool for typing *Salmonella* Enteritidis**. Res. Microbiol.141, 1151-1162.

65. Mezal H E., Sabol A., Khan M. A., Nawab A., Stefanova R., and Khan A.A. (2014). **Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010.** Food Microbiology. 38 : 67-74.
66. Millemann Y., (1997). **Les marqueurs epidemiologiques des salmonelles.** Veterinary Research, BioMed Central, , 29 : 3-19.
67. Millemann Y., (1998). **Le pouvoir pathogène des salmonelles : facteurs de virulence et modèles d'étude.** Veterinary Research, BioMed Central, 29: 385-407.
68. Moreno S. ,Andrea I., Yesim Soyer, Lorin D. Warnick, and Wiedmann M. ,( 2009). **Review : Foodborne Pathogens and Disease.Emergence, Distribution, and Molecular and Phenotypic Characteristics of *Salmonella enterica* Serotype 4,5,12:i:- .** V:6. P : 407-408 .
69. **N**ader M.I., Rasheed M.N., Hammed H. H.(2015).**Molecular Identification of *Salmonella typhimurium* from Chicken, meat, and Human by PCR.** Cellular & Molecular Biology, Pharmaceutical & Food Sciences .5-6.
70. Nair A., Balasaravanan T., Malik S. V. S, Mohan V., Kumar M., Vergis J. and Rawool D.B.(2015). **Isolation and identification of *Salmonella* from diarrheagenic infants and young animals, sewage waste and fresh vegetables.**vol.8. 2231-0916.
71. **O**liver, S. P., Jayarao,B.M. et al. 2005. "**Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications.**" *Foodborne Pathog Dis*, 2(2): 115-29.
72. Organisation Mondiale de la Santé (OMS), (2013) .**Infections à *Salmonella* (non typhiques).**
73. **P**opoff M. Y., Bockemuhl, J., and Gheesling,L.L.,( 2004). **Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme.** Rev Microbiol, 155: 568-570.
74. Poppe, C., 2000. ***Salmonella* infections in the domestic fowl.** In: Wray C. and Wray A. ***Salmonella* in domestic animals.** CAB International, New York, US. 107-132.
75. **R**abie N.S., Khalifa N.O., M.E.I. Radwan and Afify J. S.A (2012) .**Epidemiological and Molecular Studies of *Salmonella* Isolates from Chicken, Chicken Meat and Human in Toukh, Egypt.** Global Veterinaria 8 (2): 128-132.
76. Ramos-Morales F.(2012). **Impact of *Salmonella enterica* Type III Secretion System Effectors on the Eukaryotic Host Cell.** ISRN Cell Biology. 787934, p.36.
77. Roberta FreschiI C., Luiz Fernando de Oliveira e Silva CarvalhoI, Celso José Bruno de Oliveira.(2005). **Comparison of DNA-extraction methods and Selective Enrichment broths on the detection of *Salmonella* Typhimurium in swine feces by polymerase**



**chain reaction (PCR).** VETERINARY MICROBIOLOGY .Braz. J. Microbiol. vol.36 no.4. 1678-4405.

78. **S**abbagh S.C., Forest C.G., Lepage C., Leclerc J.-M.& Daigle F.(2010) .**So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi.** FEMS Microbiol Lett 305. 1–13.
79. Sahlstrom, L., De Jong, B.et Aspan A.(2006). "***Salmonella* isolated in sewage sludge traced back to human cases of salmonellosis.**" Lett Appl Microbiol, 43(1): 46-52.
80. Scaria J, Palaniappan R, Chiu D, Ann Phan J, Ponnala L, McDonough P, Grohon Y, Porwollik S, McClelland M, Chiou C, Chu C, Chang Y-F.,(2008). **Microarray for 43 molecular typing of *Salmonella enterica* serovars, Molecular and Cellular Probes,** 22p, 238-243.
81. Stevens M. P., Humphrey T. J. and Maskell D. J. (2009) . **Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections.** Review. Animal and zoonotic salmonellosis. 364, 2709–2723.
82. **T**ankeshwar A.(2012). **Oxidase test: Principle Procedure and oxidase positive organisms.** Biochemical tests in Microbiology, laboratory diagnosis of Bacterial Disease. <http://www.microbeonline.com>.
83. Tankeshwar A.(2013). **Catalase test: principle, uses, procedure and results.** Biochemical Tests for Gram Negative Bacteria. <http://www.microbeonline.com>.
84. Tankeshwar A.(2013). **Citrate utilization test: Principle, Procedure, expected results and positive organisms.** <http://www.microbeonline.com>.
85. Thiaw A., (1998). **Les salmonelloses au C.H.U. de fann : aspects bacteriologiques.** Thèse de doctorat. P : 8-9.
86. Threlfall E. J.,(2002). **Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections** .FEMS Microbiology Reviews 26 141-148. [www.fems-microbiology.org](http://www.fems-microbiology.org)
87. Tindall B. J., Grimont P. A. D., Garrity G. M. and . Euze´ by J. P.(2005) . **Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55, 521–524 .
88. **V**an H. H.T., Moutafis G., Istivan T., Thuoc Tran L., and Coloe P. J.(2005). **Detection of *Salmonella spp.* in Retail Raw Food Samples from Vietnam and Characterization of Their Antibiotic Resistance.** APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Nov. 2007, p. 6885–6890 Vol. 73, No. 21
89. Van immerseel F., De buck J., Boyen F., Pasmans F., Bertrand S., Collard J.M., Saegerman C., Hooyberghs J., Haesebrouck F., Ducatelle R.,(2005) . ***Salmonella* dans**



**la viande de volaille et dans les oeufs : un danger pour le consommateur qui demande la mise en place d'un programme de lutte efficace.** 149, 34-48.

90. Velge P., Wiedemann A., Rosselin M., Abed N., Boumart Z., Chaussé AM., Grépinet O., Namdari F., Roche SM, Rossignol A., Virlogeux-Payant I.(2012).**Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis.** Microbiologyopen.1(3):243-58.
91. **W**attiau P., Boland C., and Bertrand S., (2011) . **Methodologies for *Salmonella enterica subsp. enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives.** APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 77, No. 22. p. 7877–7885.
92. Weill X. F., (2008) .**Zoonotic non-typhi *Salmonella* and antibiotic resistance.** Bull. Acad. Vét. France - Tome 161 - N°3. P : 222 .
93. Winnen B., Schlumberger M. C., Sturm A., Schupbach K., Siebenmann S., Jenny P., Hardt W.D. (2008). **Hierarchical Effector Protein Transport by the *Salmonella* Typhimurium SPI-1 Type III Secretion System.** PLoS ONE | www.plosone.org. Vol. 3 , 5 , e 2178.
94. Wray C ., Wray A. ,(2003). ***Salmonella* in Domestic Animals** . CABI . PP: 5 - 9.

# *Annexe*

## Annexe

**Tableau 1:** Composition des milieux de culture

Milieux	Composition (par litre)	
<b>Bouillon Eau Peptonée Tamponnée</b>	Peptone Chlorure de sodium Hydrogéoorthophosphatedisodique Dihydrogéo-orthophosphate de potassium pH= 7,0 ± 0,1	10,0 g 5,0 g 9,0 g 1,5 g
<b>Bouillon Rappaport Vassiliadis</b>	Peptone papainique de soja Chlorure de sodium Phosphate monopotassique Phosphate dipotassique Chlorure de magnésium anhydre Vert malachite (oxalate) pH = 5,2 ± 0,2.	4,50 g 7,20 g 1,26 g 8 g 13,40 g 36,0 mg
<b>Gélose Hektoen</b>	Peptone pepsique de viande Extrait autolytique de levure Lactose Saccharose Salicine Sels biliaires Chlorure de sodium Thiosulfate de sodium Citrate ferrique ammoniacal Bleu de bromothymol Fuchsine acide Agar agar bactériologique pH = 7,6 ± 0,2.	12,0 g 3,0 g 12,0 g 12,0 g 2,0 g 9,0 g 5,0 g 5,0 g 1,5 g 65 mg 40 mg 13,5 g
<b>Gélose <i>Salmonella-Shigella</i></b>	Peptone pancréatique de viande Extrait de viande Lactose Sels biliaires Citrate de sodium Thiosulfate de sodium Citrate ferrique Rouge neutre Vert brillant Agar agar bactériologique pH = 7,0 ± 0,2.	5,0 g 5,0 g 10,0 g 8,5 g 10,0 g 8,5 g 1,0 g 25,0 mg 0,33 mg 15,0 g

<b>Gélose MacConkey</b>	Peptone pancréatique de gélatine Tryptone Peptone pepsique de viande Lactose Sels biliaires Chlorure de sodium Rouge neutre Cristal violet Agar agar bactériologique pH = 7,1 ± 0,2.	17,0 g 1,5 g 1,5 g 10,0 g 1,5 g 5,0 g 30,0 mg 1,0 mg 13,5 g
<b>Gélose XLD</b>	Extrait autolytique de levure L-Lysine. Lactose Saccharose Xylose . Désoxycholate de sodium Chlorure de sodium Thiosulfate de sodium Citrate ferrique ammoniacal Rouge de phénol Agar agar bactériologique pH = 7,4 ± 0,2.	3,0 g 5,0 g 7,5 g 7,5 g 3,5 g 2,5 g 5,0 g 6,8 g 0,8 g 80,0 mg 13,5 g

**Tableau 2:** Composition des solutions

<b>Solutions</b>	<b>Composition</b>	
0.5M EDTA	EDTA pH =8	294.29 g
SDS 10%	SDS Eau distillée	10 g 100 ml
TAE 50X	Tris base Acide acétique glacial EDTA 0,5M pH=8	242 g 57,1 ml 100 ml
1M NaOH	NaOH Eau distillée	3.99 g 100 ml
1M Tris-HCl	Tris base HCl pH = 8	121,1g 40 ml

## Résumé

*Salmonella*, constitue une des causes majeures des infections du tractus digestif humain liées à la consommation d'aliments d'origine animales, la viande de volaille et les œufs sont fortement impliqués. L'objectif de cette étude est d'analyser le phénotype et le génotype d'isolats de *Salmonella* provenant d'installations de production de poulets de chairs et de station d'épuration.

A partir de 104 échantillons collectés, dont 32 des eaux usées, 33 des fientes et 39 des intestins de poulet, on a isolé dix souches de *Salmonella spp.* : (A5-A6-A26T-A26C-A14-A28T-A28C-A29-A30-A66). La confirmation moléculaire est réalisée par la technique d'amplification génique (PCR).

Le test d'antibiogramme a révélé que l'ensemble des salmonelles sont sensibles aux bêta-lactamine et les sulfamides alors qu'elles sont résistantes aux tétracyclines et aux fluoroquinolones. L'analyse du contenu plasmidique a montré qu'un seul isolat provenant de volaille héberge un ou plusieurs plasmides.

**Mots clés : *Salmonella*, Poulets de chairs, Station d'épuration, antibiogramme, PCR.**

## Abstract

*Salmonella*, represents one of the major causes of infections such as foodborne infections where the consumption of animal foods, poultry meat and eggs are heavily involved. The objective of this study is to analyze the phenotype and genotype of *Salmonella* isolates from broiler farms and sewage treatment.

From 104 samples collected, including 32 of wastewater, 32 samples of droppings and 39 samples of broiler intestines, ten strain of *Salmonella* was isolated: (A5-A6-A26T-A26C-A14-A28T-A28C-A29-A30-A66). The molecular confirmation was carried out by the PCR.

The antibiogram test revealed that all sensitive to beta-lactam antibiotics and sulfonamides as they are resistant to tetracyclines and fluoroquinolones. The analysis of the plasmid content showed that a single isolate from poultry hosts one or more plasmid.

**Key words: *Salmonella*, broiler, sewage treatment, antibiogram test, PCR**

## ملخص

السالمونيلا هي سبب رئيسي لالتهابات الجهاز الهضمي للإنسان بسبب استهلاك الأطعمة ذات الأصل الحيواني، لحوم الدواجن والبيض هي متورطة بشدة.

الهدف من هذه الدراسة هو تحليل النمط الظاهري والتركيب الوراثي لسالمونيلا المعزولة من مرافق إنتاج لحوم الدجاج ومحطة معالجة مياه الصرف الصحي.

السالمونيلا المعزولة من خلال 104 عينة، (32 من مياه الصرف الصحي، 33 من فضلات الدجاج 39 من امعاءه). تم عزل عشرة ذراري (A5-A6-A26T-A26C-A14-A28T-A28C-A29-A30-A66). تم التأكيد الجزيئي بواسطة تقنية PCR.

كشف اختبار الحساسية للمضادات الحيوية أن كل السالمونيلا حساسة للمضادات الحيوية بيتا لاكتام والسلفوناميدات مقاومة للنتراسلين والفلوري

كلمات البحث: السالمونيلا، الدواجن، مياه الصرف الصحي، المضادات الحيوية ، PCR