

# Généralités sur les salmonelles

## 2.1. Les salmonelles

### 2.1.1. Historique

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

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

### 2.1.2. Taxonomie et nomenclature

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

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

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

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

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

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

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

### 2.1.3. Schéma de Kauffmann-White-Le Minor

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

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

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

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

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

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

#### 2.1.4. Caractères morphologiques

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

- **Le glycocalyx:** Il est constitué de polysaccharides et recouvre la membrane externe. Il n'a pas de rôle vital pour la bactérie mais lui confère certaines propriétés. Il intervient lorsque les bactéries se développent dans le sol ou dans l'eau. Il participe aussi à l'adhérence de la bactérie sur la cellule hôte.
- **Les flagelles:** Constitués principalement d'une protéine -la flagelline- ils permettent à la bactérie de se déplacer par chimiotactisme. Celui-ci s'effectue par l'intermédiaire de récepteurs protéiques membranaires. Les flagelles sont également porteurs des antigènes H.
- **Les fimbriae (ou pili):** Constitués essentiellement d'une protéine (la piline), ils sont observables au microscope électronique sous forme d'appendices raides. Ils sont de deux types: les pili communs et les pili sexuels. Les pili communs sont très nombreux (cent à deux cents par cellule). Ils confèrent notamment des propriétés hémagglutinantes aux bactéries qui les portent. Les pili sexuels sont l'expression de certains plasmides. Toutes les salmonelles n'en possèdent pas et lorsqu'ils sont présents, ils sont peu nombreux (un à quatre par bactérie). Ces pili sont impliqués dans les phénomènes de fixation de bactériophages et de transfert de matériel génétique entre bactéries au cours de la conjugaison (Desperes, 1992).
- **Le lipopolysaccharide (LPS):** il est composé de trois parties, le lipide A fixé à la membrane externe (c'est l'endotoxine des entérobactéries), le core (oligosaccharide constant dans une même espèce bactérienne) et les chaînes polysaccharidiques latérales appelées antigènes O et possédant un fort pouvoir immunogène. Les mutants R ont perdu ces chaînes latérales et sont moins pathogènes. Du fait de sa forte charge électro-négative, le LPS confère à la bactérie les propriétés suivantes : résistance aux sels biliaires, aux détergents, aux protéases, aux lipases, au lysozyme, à de nombreux antibiotiques. Il est thermostable et sa structure est représentée sur la figure 5. Au moins trente gènes, situés aux loci *rfa*, *rfb* et *rfc*, sont requis pour la synthèse du LPS. Leur position sur le chromosome de *S. Typhimurium* est connue avec précision (Popoff et Norel, 1992).

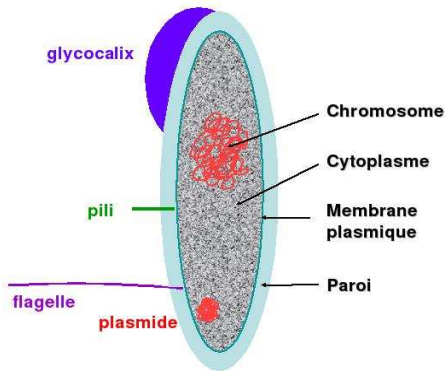


Figure 3: Structure d'une *Salmonella*

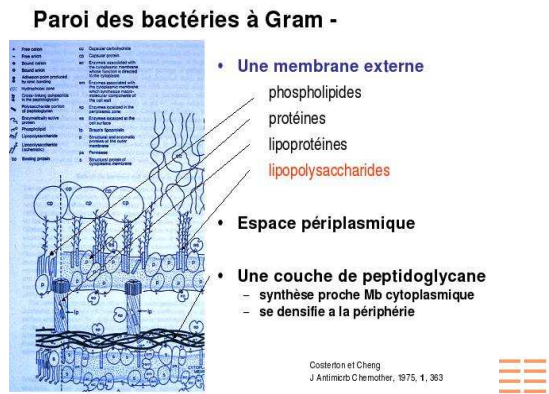


Figure 4: Paroi d'une bactérie Gram-

**Le peptidoglycane**

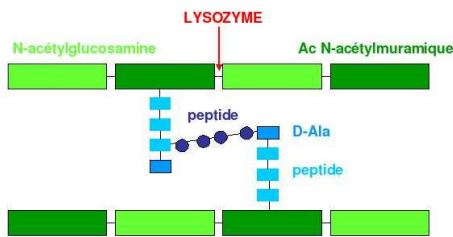


Figure 5: Structure du peptidoglycane

**Le LPS  
Lipopolysaccharide**

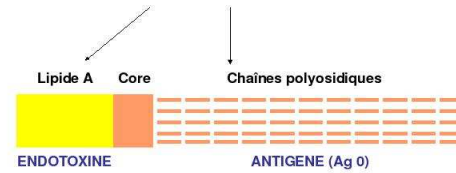


Figure 6: Structure du LPS

**2.1.5. Caractères cultureux**

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

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

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

### 2.1.6. Caractères biochimiques

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

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

- **la fermentation du sucre ou d'alcools** en présence d'un indicateur de pH (rouge phénol ou bleu de bromothymol). On peut ainsi mettre en évidence la présence d'acides produits par fermentation d'un substrat fermentescible. Lorsqu'ils sont en quantité suffisante, l'indicateur de pH vire à une autre coloration.
- **la production de métabolites** : recherche de nitrites produits à partir de nitrates, d'indole à partir du tryptophane, recherche des gaz produits au cours de la fermentation du glucose...
- **les enzymes bactériennes** : la décarboxylase de la lysine (LDC) et de l'ornithine (ODC), la tétrathionate réductase (TTR), la désaminase du tryptophane (TDA), l'uréase, la bétagalactosidase, la production d'H<sub>2</sub>S à partir du thiosulfate (présence d'une thiosulfate réductase)...
- **l'aptitude à cultiver en milieu minimal** en utilisant une source de carbone définie (par exemple le citrate de sodium en milieu de Simmons) (Caron et Menard, 1997 ; Desperéz, 1992).

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

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

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

### 2.1.7. Caractères antigéniques

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

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

#### **2.1.7.1. Les antigènes somatiques (paroi ou AgO)**

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

- ✓ Des facteurs O majeurs: les souches qui les possèdent en commun, font partie d'un même groupe. Par exemple dans le groupe B, toutes les souches possèdent l'antigène O4 dont *S. Typhimurium*.
- ✓ Des facteurs O accessoires : leur intérêt est mineur, étant donné qu'ils sont souvent communs à de nombreux groupes (O12 est commun aux groupes A, B et D). Leur présence est liée à la modification de la structure du LPS par une enzyme, par un bactériophage ou par un plasmide. Ces antigènes fournissent une agglutination fine et granuleuse (Le Minor et Popoff, 1987).

#### **2.1.7.2. Les antigènes flagellaires (AgH)**

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

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

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

#### **2.1.7.4. Les antigènes M et R**

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

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

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

## **2.1.8. L'habitat et la pathogénicité**

### **2.1.8.1. L'habitat**

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

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

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

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

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

### **2.1.8.2. Spécificité d'hôte**

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

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



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

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

### 2.1.8.3. La pathogénicité

#### 2.1.8.3.1. Le pouvoir pathogène

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

Les salmonelles peuvent en général, entraîner:

- ✓ soit un portage sain, limité strictement au niveau du tractus digestif. L'excrétion fécale de salmonelles peut être intermittente, allant de moins de  $10^4$  à  $10^7$  germes par gramme de fèces. On parle dans ce cas de porteur inapparent ;
- ✓ soit un portage sain avec passage de quelques bactéries dans l'organisme mais sans symptômes apparents, les salmonelles sont hébergées dans les monocytes et les macrophages où elles sont capables de survivre sans se multiplier ;
- ✓ soit un portage latent, lorsque le portage ne peut être détecté en l'absence d'excrétion de germes ;
- ✓ soit une maladie avec symptômes diarrhéiques et hyperthermie, lorsque le système immunitaire de l'hôte est déficient ou dépassé par le nombre de salmonelles envahissant l'organisme. Elle survient à la faveur d'ingestion d'une dose de l'ordre de  $10^5$  à  $10^8$  germes.

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

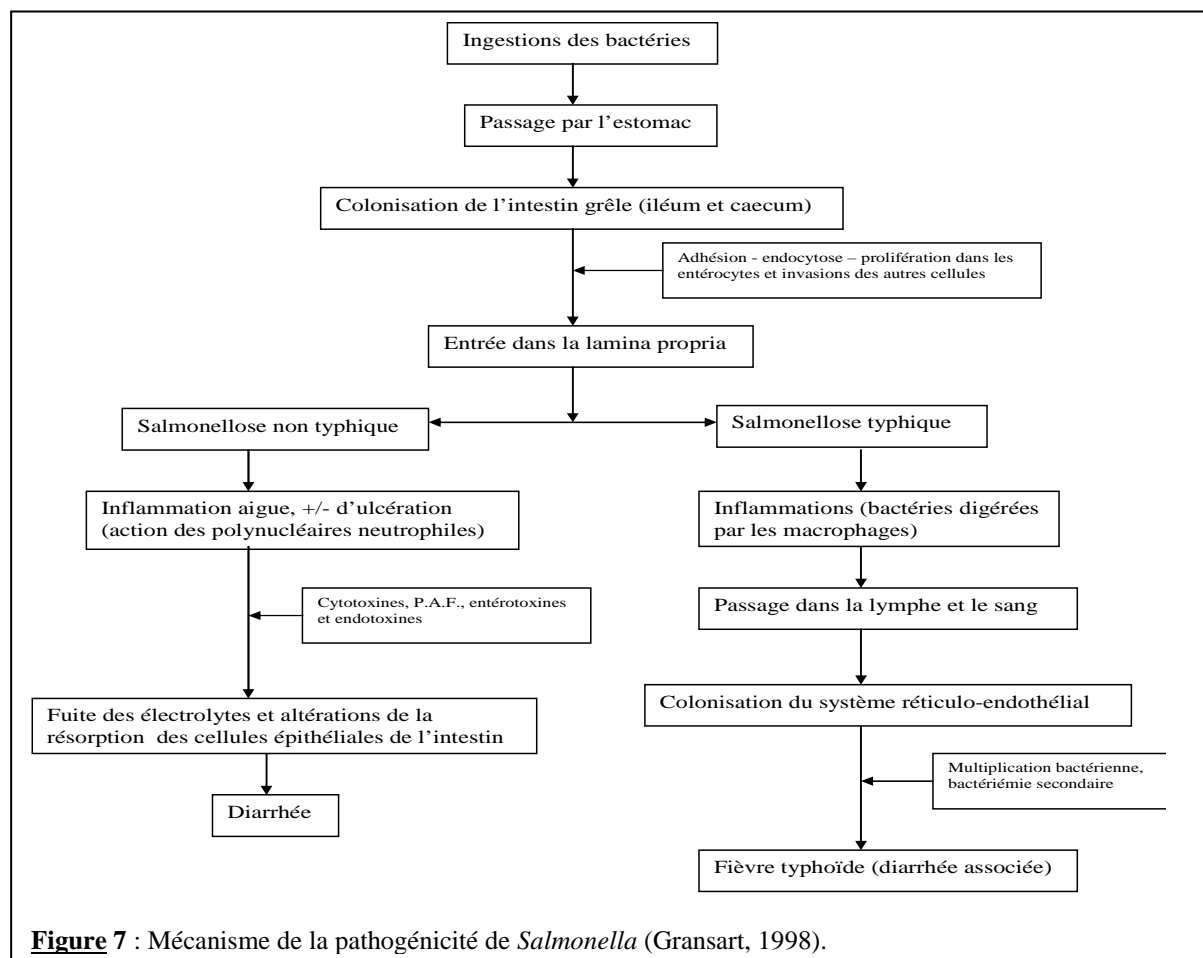
### 2.1.8.3.2. Le pouvoir invasif

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

### 2.1.8.3.3. Le pouvoir toxique

Trois types de toxines sont associés aux infections à salmonelles:

- ✓ L'endotoxine ou toxine glucidolipidoprotéique est certainement responsable des symptômes toxiques dans une salmonellose invasive. L'action de cette toxine sur les paramètres biologiques aboutit à une hypotension artérielle, à l'installation d'un collapsus cardio-vasculaire et dans certains cas à la survenue d'un état de choc pouvant aboutir à la mort. Cette action toxique a pour support le lipide A.
- ✓ Les deux autres toxines sont la cytotoxine, élaborée par la membrane externe, qui inhibe la synthèse des protéines dans les cellules épithéliales et l'entérotoxine, ressemblant à la toxine du choléra, qui serait responsable de l'augmentation du taux intracellulaire d'A.M.P. (Adénosine Mono-Phosphate) cyclique avec, comme effet, l'accumulation des fluides dans les interstices cellulaires (Rhen et Dorman, 2005).



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

#### 2.1.8.3.4. Les facteurs de virulence

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

##### a. Les pili ou fimbriae

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

##### b. Invasion et colonisation de l'organisme

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

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

##### c. Survie dans les phagocytes

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

##### d. Le complexe lipopolysaccharidique

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

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

### e. Synthèse de toxines et systèmes de captation du fer

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

#### 2.1.9. Le diagnostic

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

##### 2.1.9.1. Les milieux

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

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

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

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

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

## 2.1.9.2. Méthodes bactériologiques

### 2.1.9.2.1. Dans les élevages et environnements

La méthode bactériologique classique consiste en un isolement et une identification de la sous-espèce de salmonelle puis d'une identification intra-spécifique. Les techniques de recherche varient en fonction de l'origine du prélèvement. Lorsque l'échantillon provient de chiffonnettes, de fonds de boîtes, de poussières d'éclosoirs, de plumes, de l'eau, de prélèvements intestinaux, d'œufs incubés, d'organes prélevés sur des animaux morts, la recherche s'effectue en trois étapes : pré-enrichissement dans un milieu liquide non sélectif, destiné à revivifier les bactéries, enrichissement dans un ou plusieurs milieux sélectifs afin d'obtenir une multiplication sélective des salmonelles, et isolement sur un milieu solide pour obtenir des colonies isolées. Le milieu d'isolement sélectif permet d'orienter le diagnostic. L'adjonction de certains substrats non acidifiés par la majorité des salmonelles (lactose, glycérol, cellobiose, salicine, saccharose) permet de différencier les colonies de salmonelles des colonies formées par d'autres entérobactéries. La détection d'une C8-estérase propre aux salmonelles s'effectue en versant sur une gélose d'isolement un substrat chromogène (le 4-méthylumbelliféryl-caprylate=MUCAP) qui libère de la 4-méthylumbelliférone fortement fluorescente à 365 nm. D'autres milieux utilisent une propriété commune à la majorité des salmonelles comme l'acidification du propylène-glycol, l'acidification du glucuronate, la fermentation du xylose, l'absence de bêta-galactosidase, la décarboxylation de la lysine, la production d'H<sub>2</sub>S. Dans un échantillon comme des organes prélevés après sacrifice, les salmonelles sont dans un état physiologique satisfaisant et constituent la flore dominante ou exclusive de l'échantillon. L'isolement se réalise alors directement sur un milieu gélosé nutritif non sélectif. La détermination du sérovar et la lysotypie sont les dernières étapes de l'identification. L'identification du sérovar s'effectue par des réactions d'agglutination sur lame avec une culture humide et des sérums commercialisés (Humbert et Salvat, 1997)

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

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

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

### **2.1.9.2.3. Dans les denrées alimentaires**

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

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

### **2.1.9.2.4. Méthode utilisée en santé animale**

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

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

## **2.1.9.3. Les méthodes immunologiques**

### **2.1.9.3.1. Les techniques d'immunofluorescence**

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

### **2.1.9.3.2. Les techniques immunoenzymatiques**

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

#### 2.1.9.4. Les méthodes sérologiques

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

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

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

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

Les différentes méthodes analytiques sont :

- ✓ Agglutination rapide par plaque (RPA) : basée sur un antigène pullorique. Avec l'agglutination rapide sur lame, il existe une réaction croisée entre les Ac-anti Enteritidis et l'Ag pullorique (spécifiques chez les volailles);
- ✓ Agglutination lente en tube ;
- ✓ ELISA indirecte basée sur l'antigène LPS (antigène de paroi) des deux sérotypes Enteritidis et Typhimurium (sérotype B et D) ;
- ✓ DAS-blocking ELISA basée sur les Ac monoclonaux d'un Ag spécifique d'épitope flagellaire (antigène gm du sérotype Enteritidis ou antigène i de Typhimurium)

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

#### 2.1.10. Les marqueurs épidémiologiques

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



### **2.1.10.1. Les marqueurs phénotypiques**

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

#### **2.1.10.1.1. La sérotypie**

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

#### **2.1.10.1.2. La biotypie**

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

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

#### **2.1.10.1.3. La lysotypie**

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

#### **2.1.10.1.4. La bactériocinotypie**

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

#### **2.1.10.1.5. L'antibiotypie**

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

### **2.1.10.2. Les marqueurs génotypiques**

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

#### **2.1.10.2.1. Marqueurs liés à l'ADN plasmidique**

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

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

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

### **2.1.10.2.2. Marqueurs liés à l'ADN chromosomique**

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

#### **2.1.10.2.2.1. La RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism.)**

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

#### **2.1.10.2.2.2. Electrophorèse en champ pulsé (Pulsotypage)**

C'est la méthode de choix pour l'étude d'épidémiologie moléculaire des bactéries pathogènes. La technique consiste à diriger des enzymes sur des sites de digestion rares (macrorestriction), dans le but précis de diminuer le nombre de fragments de restriction (fragments de 20 à 30 kb). Les fragments restant sont de grandes tailles et mieux exploitables (de 50 à 1000 kb), (Dijkshoorn *et al.*, 2001). Les enzymes les plus couramment utilisées sont *XbaI*, *SpeI* et *NotI* (Millemann, 1998a ; Struelens *et al.*, 2001).

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

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

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

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

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

L'IS200 a été identifiée à l'origine sur des mutants de *Salmonella*, à savoir *Salmonella* Typhimurium LT2. C'est une séquence d'environ 700 pb, retrouvée sur le chromosome de la plupart des salmonelles mais aussi sur l'ADN plasmidique de quelques sérotypes (Lam et Roth, 1983). En 1997, Olsen *et al.*, rapportaient que *Salmonella* Typhimurium pouvait posséder entre 5 et 20 copies de la séquence IS200 sur son génome, alors que *Salmonella* Enteritidis ou *Salmonella* Dublin n'en comportaient que 2 ou 3 copies, et *Salmonella* Agona n'en possédait pas du tout.

L'IS200 est considérée comme un marqueur possédant un très bon pouvoir discriminant, car les profils sont obtenus grâce au polymorphisme de fragments de restriction des sites d'insertion, mais aussi des réarrangements de l'ADN suite aux transpositions. Cette méthode est généralement utilisée dans les investigations épidémiologiques, en association avec d'autres techniques telles que la PFGE et la ribotypie (Chadfield *et al.*, 2001, Millemann *et al.*, 2000).

#### **2.1.10.2.2.4. La ribotypie**

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

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

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

#### **2.1.10.2.2.5. RAPD (Random Amplified polymorphic DNA)**

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

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

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

#### **2.1.10.2.2.6. ERIC-PCR et REP-PCR**

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

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

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