
Du portage sain à la fièvre typhoïde : *Salmonella*, une entérobactérie ubiquitaire

1.1 Description et nomenclature de *Salmonella*

1.1.1 Historique de la découverte des salmonelles

Le bacille connu sous le nom de *Salmonella* a été décrit pour la première fois en 1879 par l'allemand Karl Joseph Eberth dans la rate et les ganglions lymphatiques de patients atteints de la fièvre typhoïde (Marineli et al., 2013). En 1884 le bacille responsable du choléra porcin est isolé, depuis l'intestin d'un cochon mort, par Théobald Smith, assistant de recherche sous la supervision de Daniel E Salmon, vétérinaire responsable des recherches de l'USDA aux Etats Unis. Le bactériologiste français Liengières donne le nom au genre « *Salmonella* » en hommage à Daniel E. Salmon en 1900 (Evangelopoulou et al., 2018). En 1934, a lieu le premier comité de nomenclature de *Salmonella* dirigé par le danois F. Kauffman qui fixe les premières tentatives de nomenclature pour ce pathogène (Evangelopoulou et al., 2018). A l'origine les salmonelles sont différenciées par la pathologie dont elles sont la cause, expliquant la distinction entre les salmonelles typhoïdiques et les salmonelles non-typhoïdiques, distinction encore utilisée de nos jours (Kirk et al., 2015; Evangelopoulou et al., 2018).

1.1.2 Nomenclature

Le genre *Salmonella* peut être divisé en deux espèces : *Salmonella bongori*, associé essentiellement au système digestif des animaux à sang froid (Fookes et al., 2011), et *Salmonella enterica*. *Salmonella enterica* peut être divisée en 6 sous-espèces : *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *Indica* (**figure 1**). Parmi les sous-espèces de *Salmonella enterica* ; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* regroupe 60 % des sérovars de *Salmonella* et représente 95 % des isolats issus de l'humain et des animaux domestiques au niveau mondial. (MacKenzie et al., 2017).

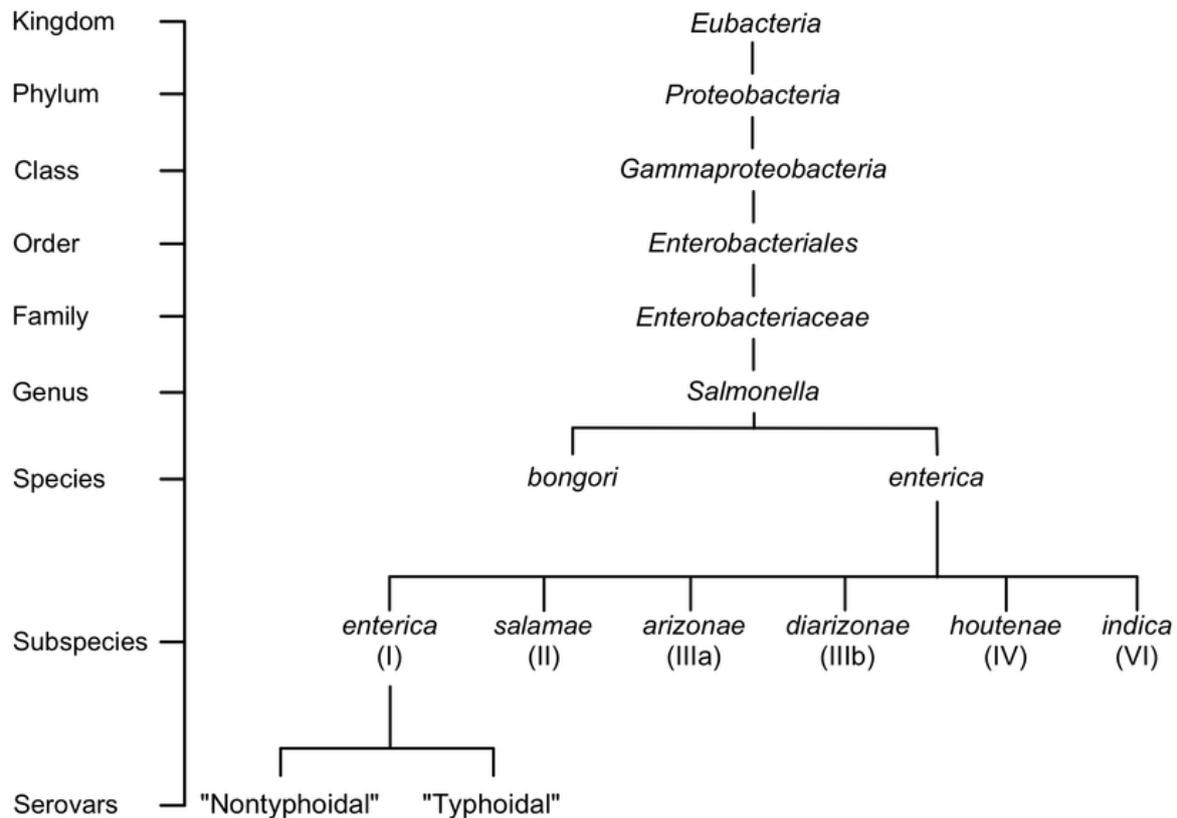


Figure 1 Taxonomie des espèces et sous espèces de *Salmonella*. (MacKenzie et al., 2017).

Selon le schéma de Kaufmann White le Minor qui décrit la méthode de typage antigénique de *Salmonella* (voir chap. 1,3), plus de 2 600 sérovars ayant une formule antigénique de surface différentes ont été décrites (Tindall et al., 2005; Grimont and Weill, 2007). Dans ce schéma sont pris en considération les antigènes somatiques (O), les antigènes flagellaires (H) et les antigènes de virulence (Vi), plus rares, qui n'ont été détectés que pour les sérovars Typhi, Paratyphi C et Dublin.

Les noms des différents sérovars de *Salmonella* reflètent leur caractère pathogène (*Salmonella* Typhi, Typhisuis, Abortusovis, Typhimurium), leur spécificité à un hôte donné (*S. Gallinarum*) ou encore leur lieu d'isolement (*S. Panama*, *Orianenburg*, *Derby* etc.). Les sérovars les plus récents sont systématiquement nommés d'après leur lieu d'isolement (Brenner et al., 2000).

1.1.3 Caractéristiques biochimiques

Les Salmonelles sont des bacilles à coloration de Gram négative appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Ce germe ubiquitaire est un hôte habituel du système digestif des vertébrés mais les salmonelles sont également capables de survivre dans de nombreux environnements tel que les sols, l'eau, les végétaux ou les aliments pour animaux (Andino and Hanning, 2015). Les salmonelles sont aéro-anaérobies facultatives. Elles présentent une

gamme de température allant de 2 à 57 °C avec un optimum de croissance à 37 °C. Elles sont généralement détruites par toute température dépassant les 70 °C. Elles se multiplient à un pH compris entre 3.8 et 9.5 avec un optimum de croissance à pH=7. Enfin, une activité de l'eau (aw) de 0.94 (équivalent à une concentration en NaCl de 10.34 g/100 mL) est suffisante pour permettre leur croissance (Korsak et al., 2004). Les salmonelles sont capables de réduire les nitrates, de fermenter le glucose mais ne possèdent pas d'oxydase. Elles peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone. On peut distinguer les salmonelles des autres entérobactéries par leur incapacité à fermenter le lactose, le saccharose, le 2-cétogluconate, l'inositol, l'adonitol et l'amygdaline. *Salmonella* se distingue également par l'absence d'uréase et de tryptophane désaminase, par la présence d'une tétrathionate réductase, d'une thiosulfate réductase et, pour la plupart des souches, par la décarboxylation de la lysine et de l'ornithine (voir **tableau 1**). Il faut noter que certains sérovars peuvent présenter des divergences importantes à ces caractères métaboliques mais qu'ils constituent des exceptions.

Tableau 1. Caractéristiques métaboliques de *Salmonella*.

(d : variable en fonction des souches). * plus de 75% des souches, sauf *diarizonae*

	Arabinose	Esculine	Inositol	Lactose	Sorbitol	Sucrose	Citrate	Arginine decarboxylase	Gélatinase	H ₂ S	Indole	Lysine decarboxylase	Ornithine Decarboxylase	Uréase	Glucose
<i>Salmonella</i>	+	d	-	-*	+	-	+	+	d	+	-	+	+	-	+

Les espèces et sous-espèces de *Salmonella* se distinguent par 11 caractéristiques biochimiques détaillées dans le **tableau 2** (Grimont and Weill, 2007). Les différentes sous – espèces de *Salmonella* présentent des différences importantes dans la métabolisation des dérivés du carbone et dans leur activité enzymatique. Ainsi, *Salmonella diarizonae* est capable de fermenter le lactose contrairement aux autres salmonelles.

Tableau 2 : caractéristiques biochimiques des différentes espèces et sous-espèces du genre *Salmonella* (Grimont and Weill, 2007).

(ONPG : orthonitrophényl- β -D-galactopyranoside)

Species	<i>S. enterica</i>					<i>S. bongori</i>	
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Characters							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Growth with KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-tartrate ^(a)	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
γ -glutamyltransferase	+ ^(*)	+	-	+	+	+	+
β -glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucate	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	-(75%)	+(75%)	-	d	-
Lysed by phage O1	+	+	-	+	-	+	d
Usual habitat	Warm-blooded animals		Cold-blooded animals and environment				
<p>(a) = <i>d</i>-tartrate. (*) = Typhimurium d, Dublin -. + = 90 % or more positive reactions. - = 90 % or more negative reactions. d = different reactions given by different serovars.</p>							

1.2 Epidémiologie de *Salmonella* – problématique de sécurité des aliments

Salmonella enterica est un agent pathogène entérique invasif capable de coloniser l'intestin grêle de son hôte et de s'y multiplier. La bactérie est capable de pénétrer dans les cellules intestinales en provoquant une invagination de la membrane cellulaire (**figure 2**). Les cellules épithéliales infectées vont être tuées par apoptose entraînant une inflammation et une gastro-entérite aiguë. L'évolution de la maladie varie ensuite en fonction du sérovar. Les sérovares Typhi et Paratyphi sont ainsi responsables de la fièvre typhoïde (voir paragraphe 1.1.2). D'autres sérovares hautement adaptés à un hôte particulier causent des pathologies spécifiques de certaines espèces. Ainsi, *S. Typhisuis* est, par exemple, responsable de la fièvre typhoïde chez le porc tandis que *S. Choleraesuis* cause le choléra porcin, *S. Pullorum* est un

agent pathogène très virulent pour le poulet. Les autres sérovars plus ubiquitaires, causent, chez l'humain, des entérites auto-limitatives.

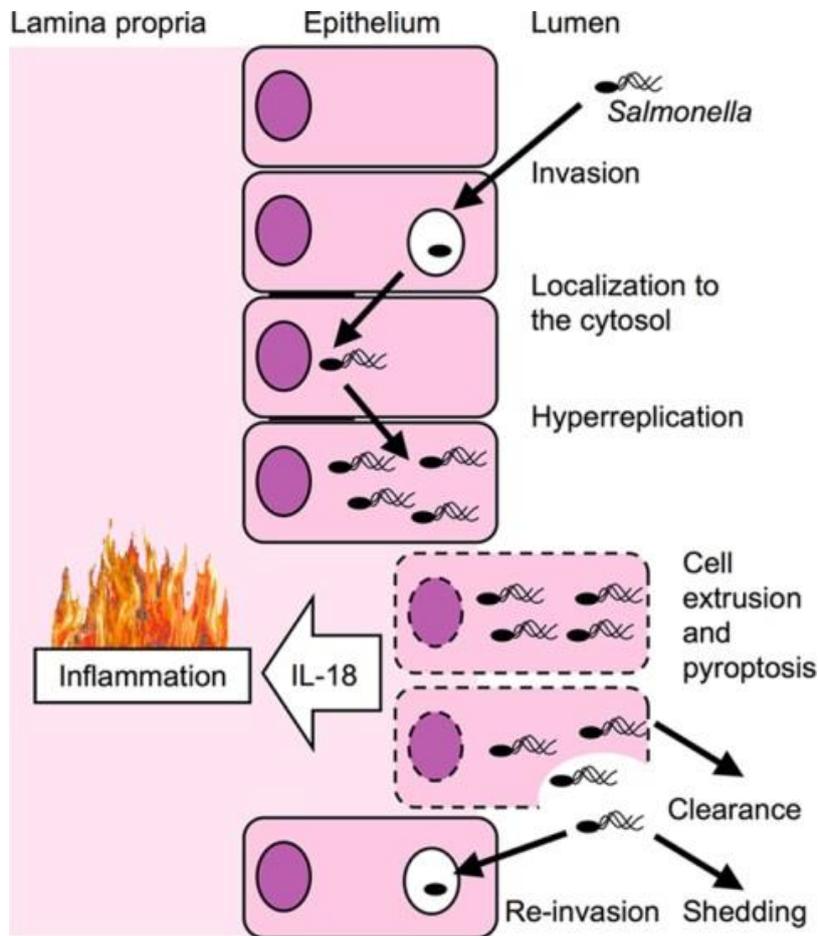


Figure 2 : Mécanisme d'invasion cellulaire de *Salmonella enterica* (Winter and Baumler, 2011).

Salmonella accompagne l'humanité depuis l'Antiquité. La célèbre peste d'Athènes en 420 av JC qui a tué un tiers de la population de la cité est suspectée d'avoir été causée par une souche de *Salmonella* Typhi dont l'ADN a été retrouvé dans un charnier datant de cette époque (Papagrigorakis et al., 2008). Des éléments d'ADN appartenant à une variante de paratyphi C ont également été isolés dans une tombe associée aux morts de l'épidémie de Cocoliztli causant la mort de 5 à 15 millions de natifs au Mexique entre 1545 et 1548 (Acuna-Soto et al., 2002; Vågene et al., 2018).

1.2.1 Transmission et facteur de risques

Les *Salmonella* sont des agents pathogènes intestinaux capables de survivre dans l'eau et le sol pendant plusieurs mois à la suite d'une contamination fécale (Andino and Hanning, 2015). Leur résistance à des conditions environnementales extrêmes et leurs faibles besoins nutritifs expliquent leur caractère ubiquitaire (D'Aoust, 1994).

La grande majorité (95 %) des infections à *Salmonella* chez l'humain sont dues à la consommation d'aliments contaminés, tels que la viande, les œufs, le lait ou les produits de la mer (Foley and Lynne, 2008), mais de nombreux exemples démontrent la capacité de *Salmonella* à :

- survivre et croître dans les plantes et les produits végétaux (Brandl, 2006) ;
- contaminer l'humain par la consommation d'eau contaminée (Palmera-Suarez et al., 2007) ;
- infecter l'humain par contact avec des animaux porteurs de la bactérie (Swanson et al., 2007; Harris et al., 2009).

Les cas de contamination interhumaine sont un facteur de risque important (D'Aoust, 1991) ; certaines *Salmonella* pouvant rester présentes chez un hôte humain plus d'un an après la contamination initiale. Le cas le plus célèbre étant celui de Marie Malone une cuisinière new yorkaise, première porteuse saine de *Salmonella* Typhi identifiée, soupçonnée d'avoir provoqué des centaines de cas de fièvre typhoïde à New York, qui a dû être placée en quarantaine toute la fin de sa vie (Marineli et al., 2013).

1.2.2 Fièvre typhoïde

La fièvre typhoïde est causée par un nombre limité de serovars (*S. Typhi*, Paratyphi A, B et C et Sendai) hautement adaptés à l'humain. La divergence de *Salmonella* Typhi vis-à-vis de *S. Typhimurium* est estimée avoir eu lieu il y a 15 000 à 150 000 ans, soit après l'apparition de l'homme moderne et sa diversification d'avec les autres hominidés (Kidgell et al., 2002). Ces sérovars sont exclusivement adaptés à l'humain et la transmission est assurée essentiellement par des contacts avec des malades ou des porteurs chroniques et par la consommation d'eau ou d'aliments contaminés par les fèces de personnes infectées.

Présente dès l'Antiquité, la fièvre typhoïde est une maladie endémique pendant tout le Moyen Age. Très présente en Amérique du nord au 19^{ème} siècle, la fièvre typhoïde est connue pour avoir provoqué plus de 80 000 cas durant la guerre de sécession américaine causant plus de 27 000 morts (Bollet, 2002; Reilly, 2016). Elle ne reculera qu'avec l'apparition des mesures sanitaires modernes notamment la chloration de l'eau et la vaccination dès 1911 (Crump and Mintz, 2010).

De nos jours, on recense 21 millions de cas de fièvre typhoïde par an causant plus de 220 000 décès (CDC, 2016). Il s'agit d'une maladie endémique en Asie, en Afrique et en Amérique du Sud (Pasteur I, 2012) touchant principalement les zones à forte densité de population où la fièvre typhoïde cause des épidémies de grande ampleur (Crump and Mintz, 2010).

La plupart des cas reportés dans les pays riches sont associés à des voyages dans des régions du monde où la fièvre typhoïde est très présente.

Comme l'illustre la **figure 3**, les manifestations cliniques de la fièvre typhoïde sont liées à ses mécanismes d'infection. Après une période d'incubation de 5 à 21 jours, l'invasion de plusieurs cellules de l'hôte provoque une réaction inflammatoire. Celle-ci va déclencher une fièvre gagnant progressivement en intensité et pouvant durer 4 semaines si l'infection n'est pas traitée. La bactérie va infecter les macrophages et se répandre dans le système sanguin et lymphatique jusqu'aux ganglions mésentériques ce qui peut provoquer l'apparition de plusieurs symptômes : à partir de la deuxième semaine, apparition de céphalée, asthénie, anorexie, insomnie, torpeur, splénomégalie, saignements de nez, blanchiment de la langue et douleurs abdominales accompagnée de diarrhée ou de constipation.

La destruction des salmonelles entraîne la libération d'endotoxines pouvant provoquer des hémorragies ou des perforations intestinales. Ces complications peuvent provoquer la mort dans 10 % des cas en l'absence de traitement (Kaur and Jain, 2012).

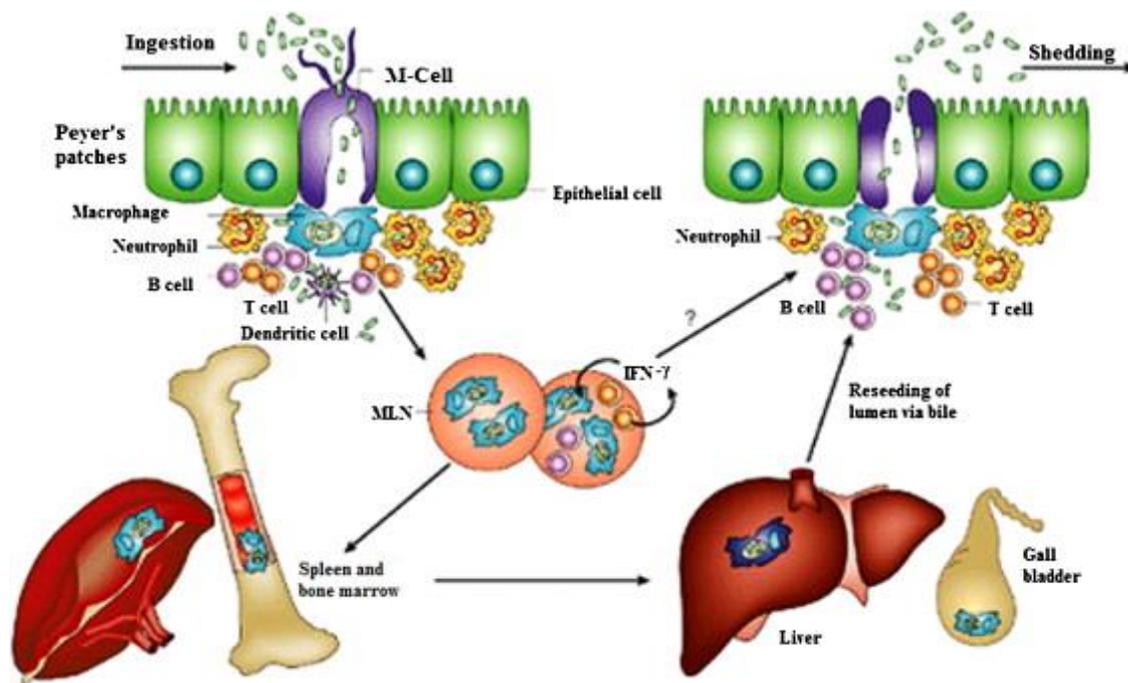


Figure 3. Mécanisme d'infection de *Salmonella Typhi* (Kaur and Jain, 2012).

La bactérie envahit la muqueuse intestinale au niveau des plaques de Peyer par les cellules de type M : des cellules épithéliales spécialisées qui capturent et transmettent les antigènes luminaux au système immunitaire. Il s'ensuit une inflammation qui va mobiliser le système immunitaire de l'hôte et permettre la dissémination de *Salmonella Typhi* dans les ganglions lymphatiques mésentériques (MLN). La bactérie peut ensuite se répandre dans la moelle osseuse et la rate, puis dans le foie et dans la vésicule biliaire.

1.2.3 *Salmonella* non typhiques (SNT)

La plupart des sérovars de *Salmonella* vont provoquer des gastro-entérites de sévérité variable présentant des symptômes de diarrhée, douleurs abdominales, vomissements, nausées, myalgies, fièvre et céphalées. Dans la plupart des cas, la maladie est auto-limitative et évolue spontanément vers une guérison en 3 à 7 jours. Chez les personnes sensibles (personnes âgées, enfants en bas âge, femmes enceintes) ou des sujets immunodéprimés l'infection peut devenir systémique et provoquer des pathologies plus graves pouvant conduire à la mort.

Les infections à *Salmonella* constituent l'une des 4 causes majeures de gastroentérites dans le monde (WHO, 2018). Une étude de 2010 évalue à 93,8 millions le nombre de cas humains de gastroentérites à *Salmonella* pour 155 000 morts annuellement (Majowicz et al., 2010). *Salmonella* causerait la perte de plus de 4 847 000 années d'espérance de vie corrigée de l'incapacité (DALY), (nombre d'années soustraites à l'espérance de vie de la population mondiale) pour la seule année 2010 (Ao et al., 2015). Les complications dues à une invasion systémique par les *Salmonella* non typhiques (SNT) s'évaluent à 3,4 millions de cas pour plus de 680 000 morts chaque année. Ces cas sont majoritairement retrouvés en Afrique (Ao et al., 2015).

En Europe, les salmonelles sont la seconde cause de gastroentérite après *Campylobacter* avec un total de 94 530 cas confirmés, sur l'ensemble des membres de l'Union Européenne (EFSA, 2017) (voir **figure 4**). Par cas confirmés on entend les cas pour lesquels des prélèvements microbiologiques ont été effectués qui confirment la présence de l'agent pathogène et pour lesquels des données épidémiologiques sont disponibles. Si l'incidence des salmonelloses a fortement baissé de 2008 à 2011 grâce à des politiques de lutte ciblées, le nombre de cas s'est stabilisé depuis 2012 (EFSA, 2015; 2016; 2017).

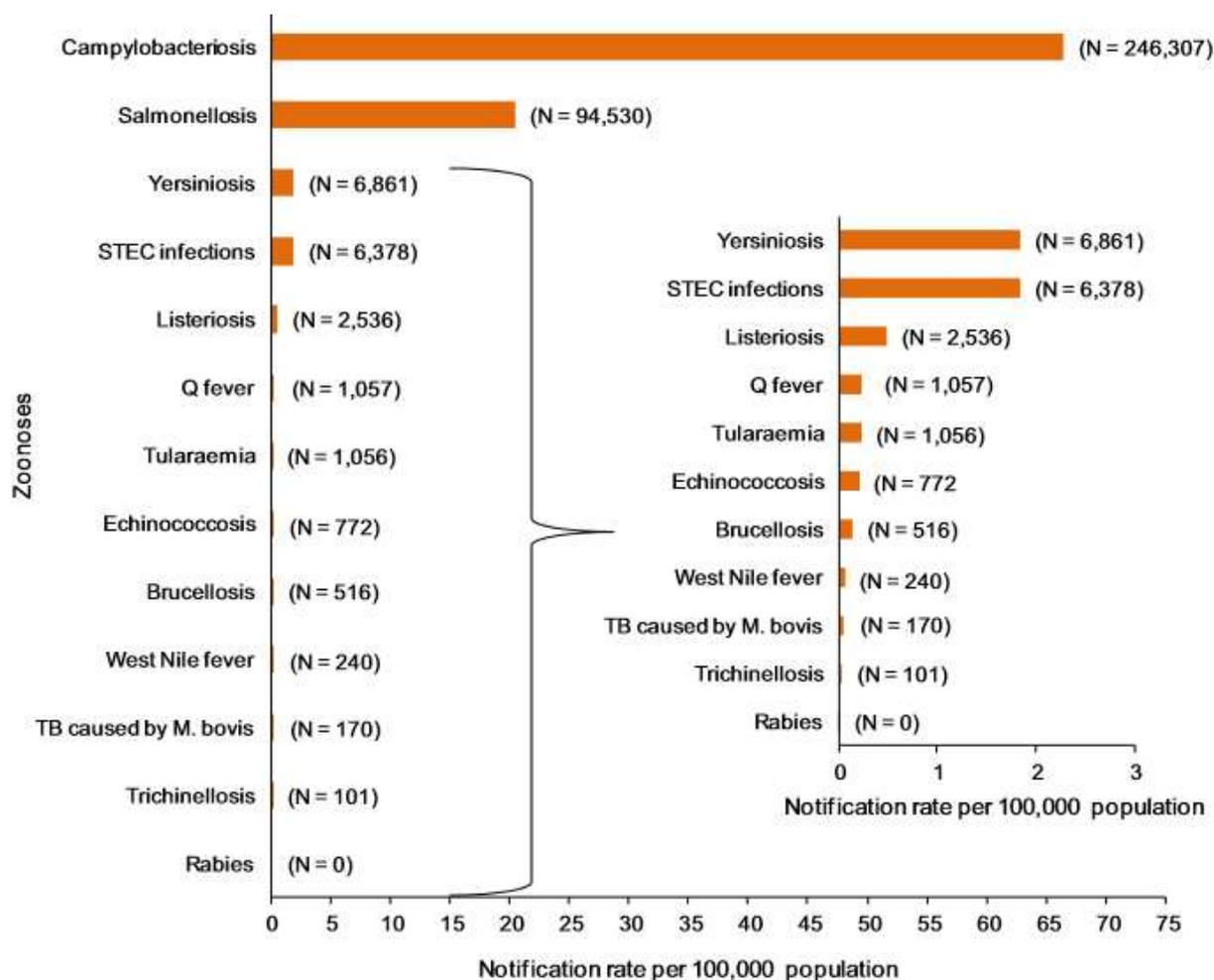


Figure 4. Nombre de cas confirmés reportés et taux de notification des zoonoses humaines dans l'Union Européenne en 2016 (EFSA, 2017).

En France, *Salmonella* cause en moyenne plus de 10 000 cas confirmés par an, ce qui en fait la première cause de toxi-infection alimentaire en 2017. Le nombre de cas réels est estimé à plus de 198 000 cas par an pour un total de 4 415 hospitalisations et 72 morts (Van Cauteren et al., 2017).

La majorité des infections à *Salmonella* sont des cas isolés (cas sporadiques) mais les phénomènes épidémiques ne sont pas rares, on parle alors de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIACs). Une TIAC est identifiée quand au moins deux cas d'infection d'une même maladie similaire surviennent chez des personnes ayant partagé le même repas. L'industrialisation et la globalisation du secteur agroalimentaire ont provoqué une intensification des échanges de denrées alimentaires. Cette intensification a elle-même provoqué une mutation de la typologie des TIAC, qui sont passées d'un groupement de cas localisés à des épidémies de grande ampleur pouvant toucher plusieurs pays (Ammon and Tauxe, 2007).

L'évolution des procédés de contrôle des aliments a également joué un rôle important dans la maîtrise des épidémies liées aux *Salmonella* non-invasives. Ainsi l'éradication dans les années 70 en Europe et aux Etats Unis des sérovars Gallinarum et Pullorum -pathogènes pour

les volailles- a favorisé l'émergence du sérovar Enteritidis asymptomatique chez la volaille mais capable d'infecter les œufs par voie transovarienne. Ce sérovar jusque-là associé à 10 % des cas humains est rapidement devenu le sérovar le plus fréquemment isolé chez l'humain (Cogan and Humphrey, 2003; Velge et al., 2005).

1.2.4 Résistances aux antibiotiques

Le phénomène de résistance aux antibiotiques chez *Salmonella* pose un grave problème de santé publique. L'utilisation des antibiotiques ayant provoqué un phénomène de pression sélective, la résistance aux antibiotiques chez *Salmonella* est en augmentation constante (Su et al., 2004; Hong et al., 2016). L'apparition de souches de salmonelles multirésistantes aux antibiotiques, et de souches résistantes aux antibiotiques de dernière génération tels que les céphalosporines de troisième génération ou les quinolones, a valu à *Salmonella* d'être classée dans la catégorie des risques microbiologiques émergents (Newell et al., 2010). Ces classes d'antibiotiques sont considérées comme critiques pour la santé humaine (Sofos, 2008).

En Europe, la proportion de souches multi-résistantes -c'est-à-dire résistantes à 3 familles d'antibiotiques ou plus- isolée chez l'humain en 2016 s'élève à 26.5% (EFSA and ECDC, 2018).

Chez *Salmonella*, les gènes codant pour la résistance aux antibiotiques sont généralement acquis par transfert horizontal permettant une dissémination rapide de l'antibio-résistance et la pression sélective la croissance rapide des lignées résistantes sur les lignées ancestrales susceptibles (Brown and Wright, 2016). Les plasmides, des éléments d'ADN mobile auto-répliquatifs et transférables d'une bactérie à l'autre sont un vecteur important pour ces gènes de résistance (Parry and Threlfall, 2008; Carattoli, 2013). Les gènes de résistance aux antibiotiques présents sur les plasmides sont généralement situés sur des éléments d'ADN mobile : les transposons qui peuvent se recombiner dans des plasmides ou dans le chromosome bactérien via des séquences d'insertion qui leur permettent de s'intégrer dans l'ADN de l'hôte (Carattoli, 2003).

La multi résistance chez *Salmonella* est généralement associée à la présence d'un locus chromosomique : l'îlot génomique (SGI-1).

Il s'agit d'un élément génomique d'environ 43kb, identifié pour la première fois chez *S. typhimurium* DT104 (Boyd et al., 2001) et dont différentes variantes ont été isolées dans de nombreux autres sérovares (Levings et al., 2005; Amar et al., 2008; Beutlich et al., 2011). L'îlot génomique de *Salmonella* (SGI-1 pour *Salmonella Genomic Island 1*) joue un rôle dans la dissémination et l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques chez *Salmonella*. Il comprend un cluster de gènes d'antibio-résistance porté par un intégron : une région du génome permettant l'intégration de séquences spécifiques. Ces séquences spécifiques appelée cassette de gènes sont souvent porteurs d'un ou plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques qui se retrouvent alors intégrés de façon stable au génome bactérien (Boyd et al., 2001; Doublet et al., 2005; Beutlich et al., 2011).

Depuis sa découverte plusieurs variantes du SGI-1 ont été identifiées chez différents sérovares. Elles sont caractérisées par le contenu de la cassette de gènes de résistance de leur intégrons (Beutlich et al., 2011).

1.2.5 Sécurité des aliments et *Salmonella*

Les Salmonelles ubiquistes sont universellement répandues et peuvent induire un portage asymptomatique dans le tube digestif des animaux. Le portage sain de *Salmonella* dans le système digestif des animaux peut donc être considéré comme fréquent chez le porc et la volaille ce qui rend leur détection ardue au niveau des élevages et des abattoirs (Denis et al., 2013). Des symptômes proches de ceux reportés chez l'humain sont retrouvés chez le bovin après une infection à *Salmonella* (Millemann, 2008). La capacité de survie de la bactérie dans des environnements divers pose de sérieux problèmes pour contrôler les infections alimentaires liées à *Salmonella*.

Pour limiter la prévalence de *Salmonella* dans les aliments il est nécessaire d'identifier les principales sources de contamination par cet agent pathogène via l'alimentation : c'est l'objet des études de source-attribution qui visent à établir la source d'origine des TIACs. De nombreuses études ont cherché à évaluer le poids des différentes filières alimentaires dans le nombre total de cas cliniques humains provoqués par *Salmonella*. Le **tableau 3** résume l'attribution des cas de salmonellose humaine dans le monde (Pires et al., 2014)

Tableau 3 : Tableau résumant les études de « source-attribution » des infections à *Salmonella* dans le monde (Pires et al., 2014).

	Danemark ^a	Suède ^b	UE ^c	Europe de l'est ^{c,*}	Europe du Nord ^{c,*}	Europe de l'Ouest ^{c,*}	Europe du Sud ^{c,*}	Etats Unis ^d	Nouvelle Zélande ^e	Japon ^f
Porcins	15.1	0.08	26.9	22.7	10.6	34.1	43.6	<1	60	5.3
Bovins	0.7	0.1	—	—	—	—	—	29	11.5	0.5
Poule pondeuses	1.8	0.16	43.8	59.4	30	41.8	28.4	6	3.2	63.3
Poulet de chair	0.5	0.09	3.4	7.0	1.2	2.1	3.1	48	21.2	6.4
Canards	0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Dindes	—	—	4.0	2.2	7.4	4.1	7.6	17	—	—
Mouton/agneau	—	—	—	—	—	—	—	—	1.4	—
Aliments importés	—	6.4	—	—	—	—	—	—	—	—
Porcins	5.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bovins	2.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Volailles	2.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Animaux sauvages	—	0.6	—	—	—	—	—	—	—	—
Voyages	46.9	82	9.2	0.8	34.5	4.8	0.7	—	—	—
Inconnu, associé à une TIAC	5.1	2.9	3.6	5.4	4.0	2.2	4.2	—	—	—
Inconnu, sporadique	19.8	7.7	9.0	2.5	12.4	10.9	12.5	—	—	20.8

^aDonnées:2010, Anon., 2011; ^bDonnées : 2004–2006, Whalström et al., 2011; ^cDonnées :2007–2009, Pires et al., 2011a; ^dGuo et al., 2011; ^eMullner et al., 2009; ^fToyofuku et al., 2011. (Pires et al., 2014) Données exprimées en pourcentage

En France, la prévalence à l'attribution des sources a été évaluée en 2014 à 30.8 % pour les poules pondeuses, 18.2 % pour les porcs, 13.7 % pour la dinde, 8.2 % pour les poulets de chair et 2.4 % pour les bovins (David et al., 2013).

Si les pertes économiques directes sont rares dans les filières animales en Europe du fait de la quasi-éradication des sérovars pathogènes de *Salmonella*, les pertes indirectes causées par les cas humains (arrêt maladies, coûts des traitements et des hospitalisations, et dans des cas plus rares, séquelles à long terme voir décès) engendrent des coûts importants mais qui restent difficiles à évaluer. Ainsi les pertes annuelles engendrées par les infections à *Salmonella* sont évaluées à 3 milliards de dollars aux Etats-Unis (HOFFMANN et al., 2012).

Un coût comparable a été constaté dans l'Union Européenne (EFSA, 2014). Les salmonelles provoquent de nombreux retraits de produits et une obligation à prendre des mesures de contrôle et de réduction des risques qui ont également un coût économique important pour l'industrie agro-alimentaire et les distributeurs (Wegener et al., 2003).

Le contrôle des salmonelles est encadré par la directive zoonose de l'Union Européenne 2003/99/CE et par le règlement 2160/2003 du 17 novembre 2003 qui met en place une approche coordonnée entre les Etats membres pour la réduction de la prévalence de *Salmonella* à toutes les étapes de la chaîne alimentaire. La directive CE n°882/2004 impose à chaque état membre la mise en place de contrôles officiels réguliers en fonction du risque et devant correspondre à la réalité du secteur. Ces contrôles ont pour objectif de garantir une qualité microbiologique des produits destinés à la consommation, telle que définie par la directive CE n°2073/2005, qui impose le retrait des aliments contaminés dans certains secteurs (dont les produits d'origine animale).

En France, le règlement EU 2073/2005 impose l'absence de salmonelles dans 25 g pour un grand nombre de produits destinés à l'alimentation humaine. La lutte contre *Salmonella* est encadrée par l'arrêté du 24 avril 2013 pour la volaille, qui souligne la nécessité de la prévention et de la surveillance dans la lutte contre *Salmonella*. En outre, l'arrêté du 11 Juillet 2018 a défini 5 serovars réglementés : *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* et son variant Monophasique : *S. 1,4,[5],12:i:-*, *S. Hadar*, *S. Infantis* et *S. Virchow* auxquels s'ajoute *S. Kentucky* pour lesquels la déclaration, ainsi que la mise en place de mesures de prévention, de surveillance et de lutte, sont obligatoires. Ces mesures entraînent (arrêté du 24 avril 2013):

- La mise en quarantaine de l'élevage concerné
- L'abattage des animaux
- Un nettoyage obligatoire des locaux
- Des contrôles renforcés sur l'élevage contaminé
- Le traitement thermique des produits contaminés est obligatoire. Il doit être réalisé dans un établissement agréé.

Pour le secteur porcin des objectifs non chiffrés incitent à la réduction de la prévalence.

1.2.6 Structure du dispositif français pour la surveillance de *Salmonella* isolée de la chaîne agro-alimentaire

Le système de surveillance français actuel est basé sur un système national dont les fondements remontent à 1947 pour les cas humains et à la fin des années 80 pour les réservoirs animaux principaux. Ce système a évolué sous l'effet combiné de la réglementation européenne et des évolutions des niveaux de prévalence des salmonelles observées dans les différentes sources. La réglementation européenne constitue un support majeur pour la construction d'un système de surveillance institutionnel harmonisé au niveau élevage et facilite l'intégration des données recueillies tout au long de la chaîne agro-alimentaire (David et al., 2011). La surveillance française pour les cas humains est assurée par le Centre National de Référence des Salmonelles (CNR-salm), de l'Institut Pasteur de Paris. Le CNR-salm analyse les souches envoyées par des laboratoires d'analyses de biologie médicale et des laboratoires hospitaliers et il collecte les informations sur les souches dont le sérovar a déjà été déterminé par ces laboratoires. Ces données permettent de suivre l'évolution du nombre de souches de *Salmonella* isolées chez l'homme, et de détecter des cas groupés. Santé publique France (SpF) anciennement nommé Institut de veille sanitaire (InVS) centralise les déclarations obligatoires des TIAC notifiées aux autorités sanitaires départementales, les DDPP (Direction départementale de la protection des populations), ainsi qu'aux Agences Régionales de Santé (ARS).

Le Laboratoire de Référence des Salmonelles et des salmonelloses aviaires de l'ANSES à Ploufragan/Plouzané assure la collecte et les analyses des souches de *Salmonella* issues des filières règlementées (volaille). Dans le cadre de sa mission, il fournit un appui scientifique et technique pour les filières professionnelles et le monde vétérinaire (analyse de prélèvements, fourniture de réactifs de référence, suivi de la qualité des analyses des laboratoires de diagnostic...).

Ces deux systèmes constituent les acteurs de la surveillance active. Cependant, l'existence concomitante de réseaux de surveillance passifs dans les domaines agro-alimentaires et vétérinaires permet d'obtenir des informations complémentaires sur des secteurs ou points de recueil de données non couverts par la surveillance institutionnelle (dite active).

Le Réseau *Salmonella*, géré par le Laboratoire de Santé des Aliments de l'ANSES de Maisons-Alfort, assure une surveillance dite passive (événementielle) très utile pour la détection d'événements émergents ou inhabituels et pour les alertes précoces de foyers épidémiques. Le Réseau *Salmonella* collecte et analyse les souches de *Salmonella* issues des réservoirs animaux règlementés ou non (porc, volaille autre que *Gallus gallus* et *Meleagris gallipavo*, bovin, caprin, équin, reptilien, etc...). Il est constitué de 150 laboratoires répartis sur l'ensemble du territoire national qui ciblent la surveillance des salmonelles d'origine non humaine. Le réseau Salmonelle offre aux laboratoires des prestations de typage pour la détermination et la confirmation des différents sérovars. Le réseau est composé de laboratoires vétérinaires, privés et publics, qui adressent sur la base du volontariat au

Laboratoire de sécurité des aliments, soit leurs souches de salmonelles pour caractérisation, soit les récapitulatifs de leurs propres résultats de caractérisation par sérotypage.

Le Réseau *Salmonella*, collecte et centralise donc les informations épidémiologiques (date d'isolement, filière, matrice, contexte d'isolement, etc...) sur environ 12 000 isolats de *Salmonella* chaque année. Ce réseau produit donc des séries temporelles de cas ou de nombres de souches permettant d'évaluer l'impact des interventions et fournit un appui aux services de SpF pour la recherche des origines de TIAC.

La qualité et la représentativité des données de surveillance active en font des éléments-clés pour appliquer des outils d'analyse de risque comme l'analyse quantitative de risque ou l'attribution des sources. Ainsi, malgré la dispersion des données entre différents acteurs, le système se révèle efficace et apte à remplir ses objectifs de santé publique.

A part le Réseau *Salmonella*, s'ajoute le réseau de l'observatoire épidémiologique pour l'élevage des volailles -créé et géré par le laboratoire ANSES de Ploufragan- (David et al., 2011) et le réseau français pour la surveillance de la résistance aux antibiotiques chez les agents pathogènes vétérinaires gérés par le laboratoire ANSES de Lyon (David et al., 2011).

1.3 Méthode de caractérisation – problématique de source-attribution

Afin de suivre l'évolution de la contamination par *Salmonella*, il est nécessaire de caractériser les souches isolées lors des autocontrôles et des contrôles officiels. Différentes méthodes ont été proposées pour la caractérisation de *Salmonella* en fonction des objectifs scientifiques des études et les besoins de source-attribution liés aux investigations de TIACs et à la démarche qualité des industries agroalimentaire (Hendriksen et al., 2011).

La caractérisation des Salmonelles repose sur différentes méthodes. Il convient de différencier les méthodes de références des méthodes courantes :

- Les méthodes de référence sont des méthodes validées par les autorités réglementaires ou des organisations commerciales afin de mise en application. Ces méthodes ont subi des essais interlaboratoires et ont des performances bien documentées. Leur caractéristique principale est de garantir des résultats comparables pour tous les laboratoires et donc de permettre une bonne communication entre laboratoires. Elles disposent d'une fidélité importante.
- Les méthodes courantes ont également fait l'objet d'essais interlaboratoires mais disposent d'une fidélité moindre par rapport aux méthodes de référence, que ce soit parce qu'elles sont moins bien documentées, moins précises ou plus difficiles à interpréter. Ces méthodes sont considérées comme ayant une précision suffisante pour la plupart des analyses.

1.3.1 Sérotypage

Actuellement la méthode de référence pour la classification des souches de *Salmonella* est le sérotypage par agglutination. Cette méthode, proposée par Fritz Kaufmann et P. Bruce White en 1934, a été considérablement enrichie avec le temps permettant de discriminer plus de 2 500 sérovars différents à l'heure actuelle (Grimont and Weill, 2007).

Cette méthode se base sur l'agglutination des bactéries mises en contact avec des sérums spécifiques contenant des anticorps ciblant différents antigènes exprimés par la bactérie. Les sérums permettent de distinguer les différentes variations des antigènes O (somatiques), H1 et H2 (flagellaires) et des antigènes capsulaires (Vi) spécifiques des sérovars Typhi, ParatyphiC et Dublin. Ces antigènes sont hautement variables : on compte 64 antigènes O et 114 antigènes H.

L'antigène somatique O est un des composants des lipopolysaccharides (LPS) constitutifs de la membrane externe des bactéries à gram négatif et peut jouer un rôle dans la virulence des salmonelles (Jones et al., 2008). L'antigène O est en contact avec le milieu extérieur et constitue l'élément le plus variable du LPS (Szalo et al., 2006). Plusieurs antigènes O peuvent être exprimés à la surface de la bactérie.

Salmonella possède -à la différence d'*E. coli*- deux phases flagellaires H1 et H2 codées respectivement par les gènes *fliC* et *fljB* qui peuvent être ciblées spécifiquement par les sérums (Wattiau et al., 2011). L'expression différentielle de *fliC* ou *fljB* est régulée par le gène *hin* qui promeut le mécanisme d'inversion de phase. L'identification des deux phases est permise par l'utilisation d'antisérums spécifiques et d'un milieu sélectif tel que le Sven Gard (McQuiston et al., 2011).

Selon le chemin de sérotypage (**figure 5**), qui propose de tester de façon séquentielle plusieurs sérums, l'un à la suite de l'autre, on peut attribuer à chaque bactérie une formule antigénique spécifique indiquant la sous-espèce d'appartenance (de I à VI en caractères romains), les antigènes somatiques O qui se sont révélés positifs et les flagellaires H1 et H2. Cette formule antigénique permet l'assignation de la bactérie à un sérovar (par exemple, la formule antigénique S. I.4,5,12:i:1,2 correspond au sérovar Typhimurium).

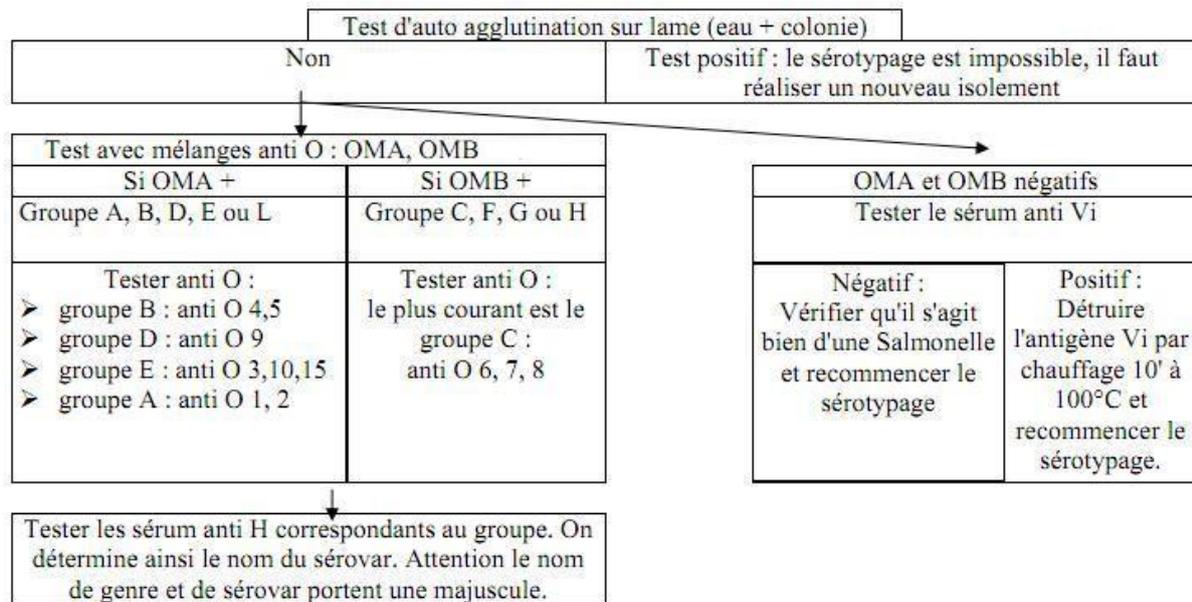


Figure 5 : Chemin de sérotypage pour *Salmonella* (Anonimous, 2009).

Le sérotypage est la méthode de caractérisation la plus utilisée et permet l'identification des sérovars des souches isolées. Cependant dans le cadre d'investigations sur des TIAC et des contrôles sanitaires, il est souvent nécessaire de discriminer les souches collectées au-delà du niveau du sérovar (Kerouanton et al., 2007). Pour répondre à des problématiques où le sérotypage ne dispose pas du pouvoir de discrimination suffisant pour remonter à la source de la contamination, différentes méthodes de sous-typages ont été développées.

1.3.2 Electrophorèse sur gel à champs pulsé - PFGE

La PFGE est la méthode de référence pour le sous typage de *Salmonella*. La **figure 6** détaille son déroulement. Cette méthode repose sur le clivage du chromosome par des enzymes de restriction coupant des positions spécifiques du génome et la séparation des fragments d'ADN par électrophorèse afin d'obtenir des profils de migration de l'ADN dépendant de la composition du génome. Les bactéries sont fixées dans un gel d'agarose avant l'étape de lyse enzymatique qui est effectuée par une combinaison de détergents et d'enzymes (la protéinase K). Le gel d'agarose permet une immobilisation de l'ADN et évite sa dégradation suite à des actions mécaniques lors des lavages du procédé de lyse et de purification de l'ADN. L'enzyme de restriction (l'enzyme XbaI dans le cas de *Salmonella*) permet de découper le génome de la bactérie en fragments de différentes tailles.

Ces fragments pourront ensuite être séparés en utilisant l'électrophorèse en champs pulsé qui consiste à faire varier la direction du champ électrique appliqué sur le gel d'électrophorèse afin d'obtenir une séparation fine des fragments d'ADN en fonction de leur taille. Les résultats de la migration sur gel peuvent ensuite être traités en utilisant un logiciel d'analyse adapté (Foley et al., 2009).

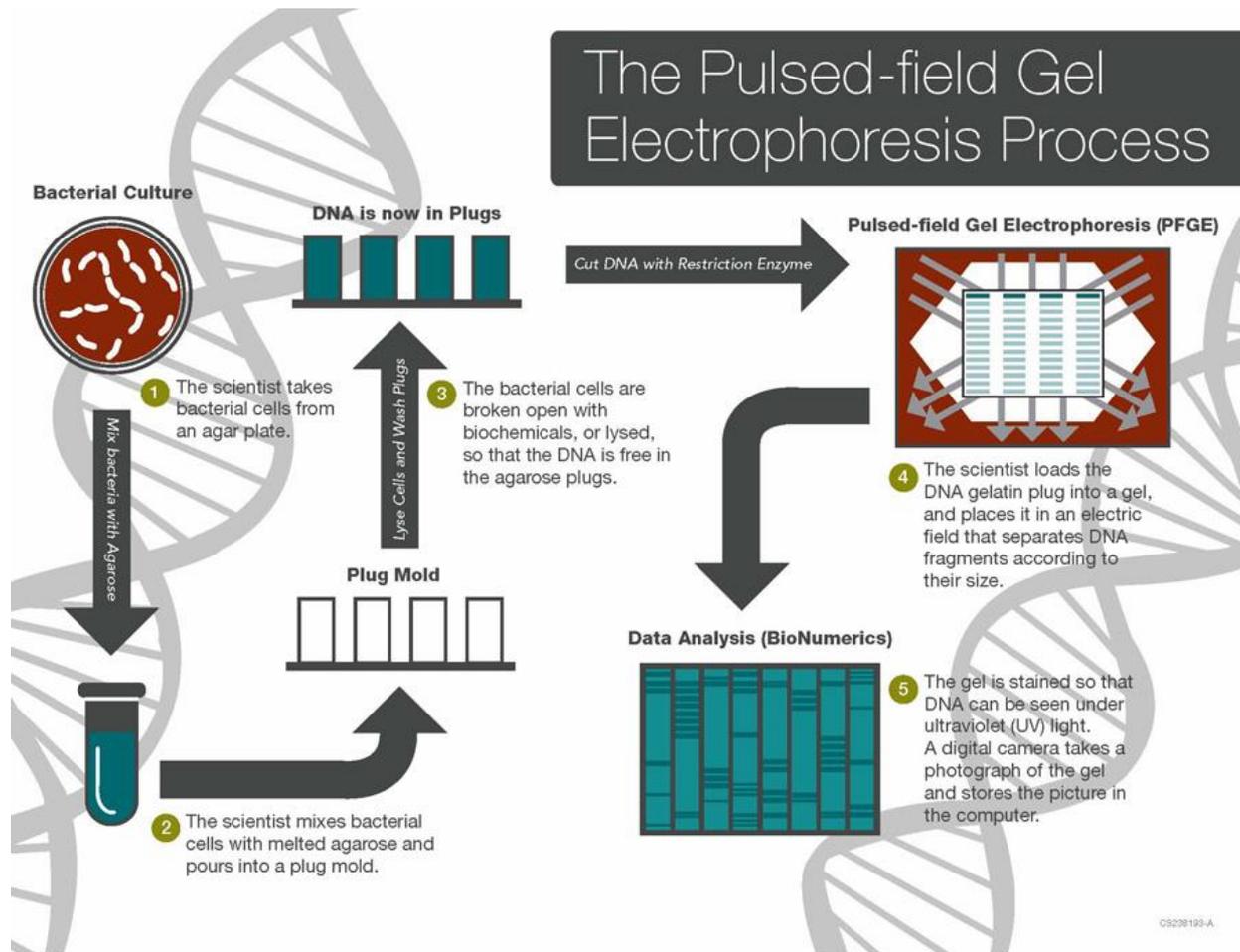


Figure 6 : Principe de la PFGE (CDC, 2013).

Cette technique possède un fort pouvoir de discrimination pour certains sérovars et est utilisée avec succès pour l'identification de la source de contamination en cas de TIAC (Kerouanton et al., 2007; Wattiau et al., 2011). Cependant, cette méthode demande un investissement important en temps et en travail. Elle requiert également des efforts rigoureux de standardisation pour l'interprétation des résultats afin d'en assurer la répétabilité : c'est l'objectif du programme PulseNet conduit par le CDC (*Center for Disease Control and prevention*) depuis 1996 (Gerner-Smidt et al., 2006).

Cette méthode souffre également d'un faible pouvoir de discrimination pour certains sérovars très clonaux tel que *S. Enteritidis* (Gerner-Smidt et al., 2006) ou pour certains sous-groupes d'intérêt tel le sous-groupe *S. Typhimurium* DT104 (Kerouanton et al., 2007). De plus, l'interprétation de profils PFGE relativement proches peut être considérée comme subjective car dépendant de l'œil de l'observateur et du logiciel d'analyse employé pour harmoniser sa lecture (Wattiau et al., 2011).

1.3.3 Analyse Multi-Locus des Variants en tandem – MLVA

Autre technique de sous-typage des salmonelles, la MLVA est une méthode rapide, reproductible et peu coûteuse (Wattiau et al., 2011; Peters et al., 2017) qui repose sur l'analyse de séquences répétées en tandem présentes dans le génome. Elle est proposée à l'origine pour pallier au manque de pouvoir de discrimination de la PFGE sur certains variants de *S. Typhimurium*, notamment le variant DT104 (Lindstedt et al., 2003; Lindstedt et al., 2004) ou pour d'autres sérovars pour lesquels la PFGE n'a qu'un faible pouvoir de discrimination tel que *S. Dublin* (Vignaud et al., 2017).

Des loci présentant des séquences répétées en tandem (VNTR pour l'anglais *Variable Number Tandem Repeat*) sont amplifiées par PCR. Les fragments sont séparés par une électrophorèse capillaire en fonction de leur taille et donc du nombre de répétitions de la séquence (figure 7). Un profil MLVA consiste en un code représentant le nombre de répétitions pour chaque locus VNTR sélectionné. Ainsi le profil 3 - 2 - 3 - 4 indique trois répétitions pour le locus 1, deux répétitions pour le locus 2 et ainsi de suite...

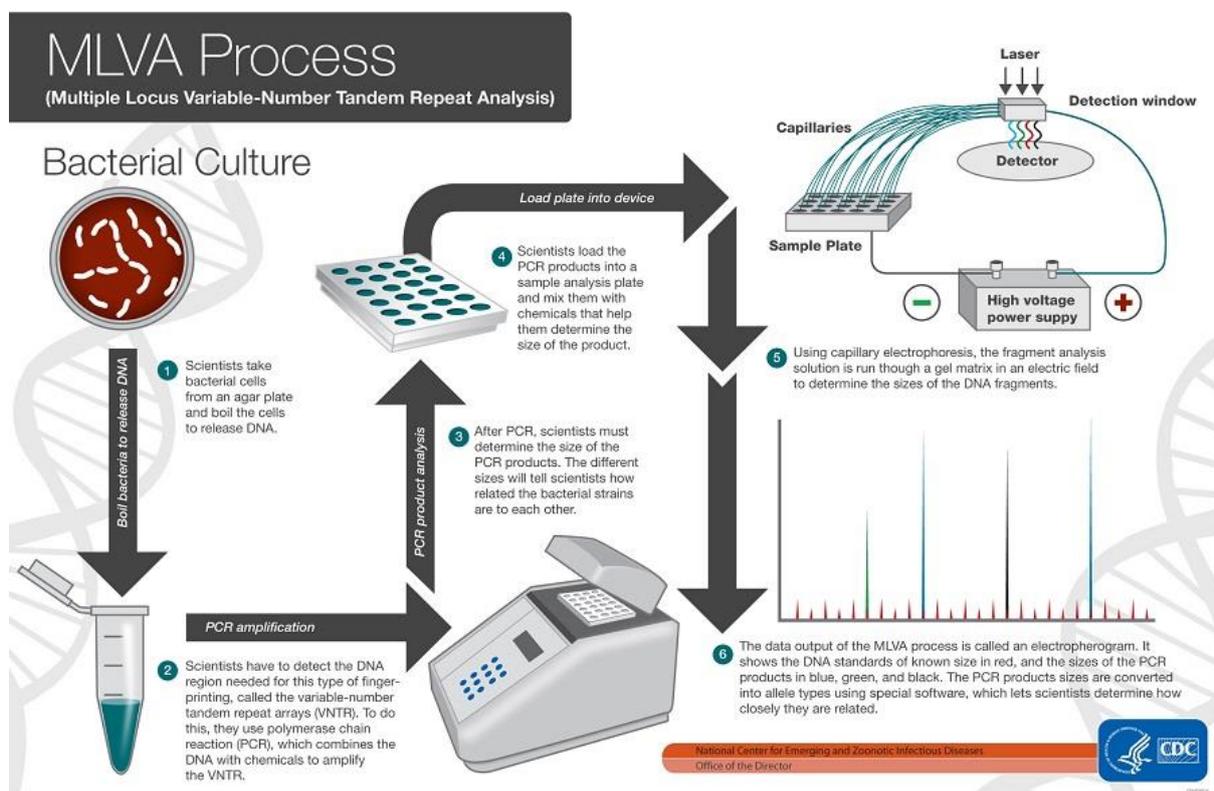


Figure 7 : principe de la MLVA (CDC, 2013).

Cette méthode a été normalisée pour les sérovars Typhimurium (Lindstedt et al., 2004) et Enteritidis (Hopkins et al., 2011) et reste très populaire pour le sous-typage de ces sérovars. D'autres schémas MLVA ont été développés pour quelques sérovars d'intérêt tel que *S. Livinstone* (Ktari et al., 2016) et *S. Derby* (Vignaud et al., en préparation).

La MLVA souffre néanmoins du besoin de développer un schéma spécifique pour chaque sérovar ce qui demande un investissement en temps considérable et nécessite un équipement

dédié onéreux (de l'ordre de 150 000 Euro pour un séquenceur capillaire AB3500). La méthode ne peut donc pas être utilisée pour une étude phylogénétique globale et pour l'assignement d'une souche à un sérovar (Wattiau et al., 2011).

1.3.4 Typage de Séquence Multi-Locus - MLST

La méthode MLST repose sur le séquençage et l'analyse des variations de séquences hautement conservées chez une espèce bactérienne d'intérêt. Différents schémas de MLST ont été développés en fonction des espèces bactériennes étudiées. Concernant *Salmonella* le schéma de référence, illustré dans la **figure 8**, concerne l'analyse des variants de 7 gènes hautement conservés : *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* et *thrA* (Kidgell et al., 2002).

Cette méthode a été popularisée par la création d'une base de données (Enterobase : <https://Enterobase.warwick.ac.uk/>) (Alikhan et al., 2018) regroupant une banque d'allèles pour ces 7 gènes. Chaque allèle se voit assigner un numéro d'identification normalisé et un profil (Achtman et al., 2012).

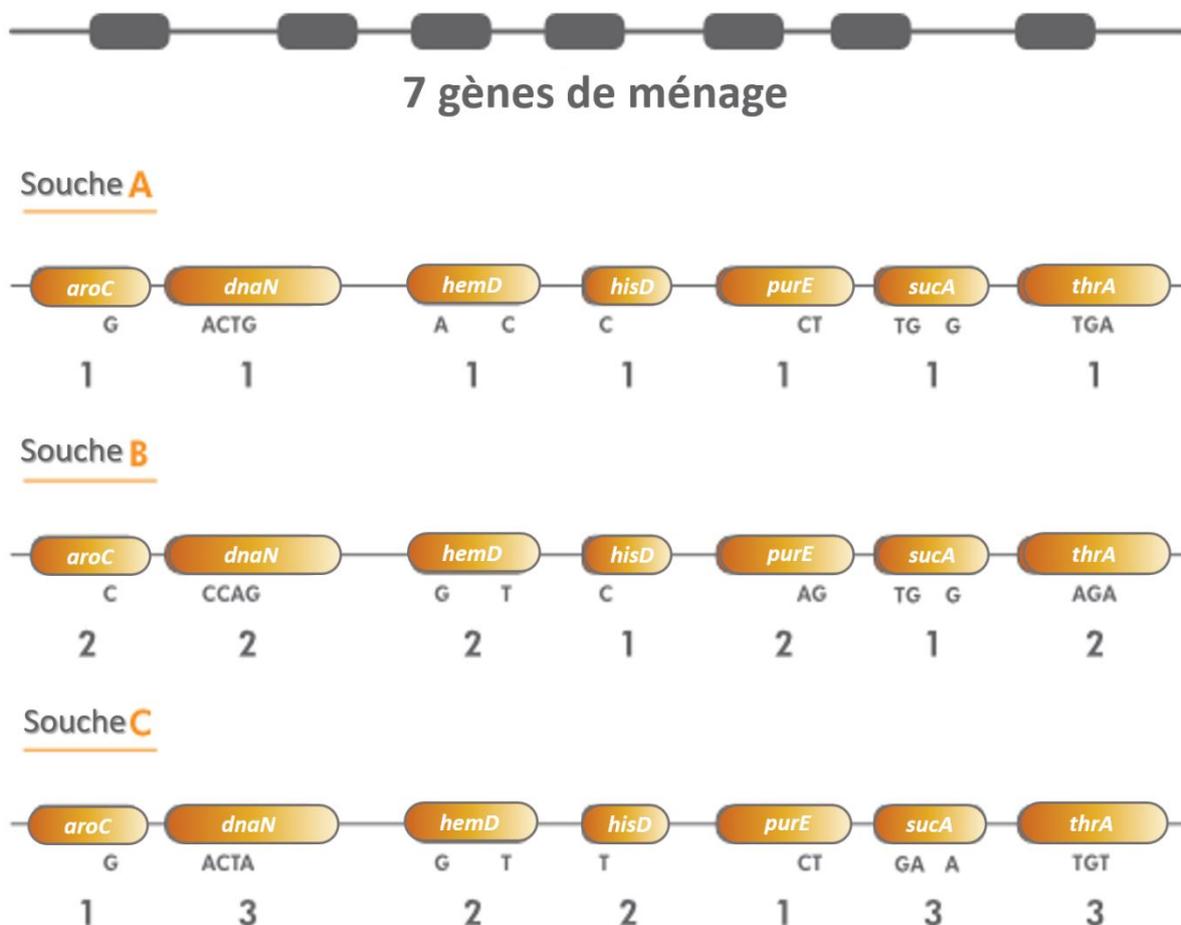


Figure 8 : Principe de la MLST.

Chaque allèle des loci sélectionnés est numéroté. Les numéros des allèles pour l'ensemble des loci du schéma constituent le profil allélique qui donne sa désignation à la souche.

Ce schéma MLST présente cependant un pouvoir discriminant inférieur à la PFGE pour la plupart des sérovars (Wattiau et al., 2011). Néanmoins, cette technique permet une classification facile et rapide des souches à un sérovar ou à sous-groupe au sein d'un sérovar, ce qui représente une alternative au sérotypage traditionnel (Achtman et al., 2012).

1.3.5 CRISPR

La méthode CRISPR se base sur la détection des courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées (en anglais : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Ces régions du génome des Archées et de la plupart des bactéries consistent en des séquences courtes répétées de 24 à 47 pb encadrant des séquences d'espacement plus communément appelées « *spacers* » de taille similaire (21 à 72 pb).

Ces « *spacers* » correspondent à des séquences d'ADN phagique étranger à la cellule. Ces loci CRISPR sont souvent adjacents à des gènes *cas* codant pour les CRISPR associated protein : des protéines impliquées dans la reconnaissance et la destruction d'ADN étranger à la cellule (van der Oost et al., 2014). Il a été démontré que les loci CRISPR jouent un rôle dans la protection des bactéries contre les phages, leur conférant un système de reconnaissance de séquences spécifiques du génome de phages précédemment rencontrés par la bactérie (Barrangou et al., 2007; Shariat and Dudley, 2014).

Chez *Salmonella* deux loci CRISPR sont présents chez l'ensemble des souches (**figure 9**) de *Salmonella enterica* et *bongori*. Des études ont démontré un lien entre le polymorphisme des spacers CRISPR et le sérovar ou le profil MLST d'une souche de *Salmonella* (Weill. et al., 2007; Liu et al., 2011; Fabre et al., 2012). Les micro-variations dans le contenu des *spacers* permet de sous-typer les souches appartenant au même sérovar (Fabre et al., 2012).

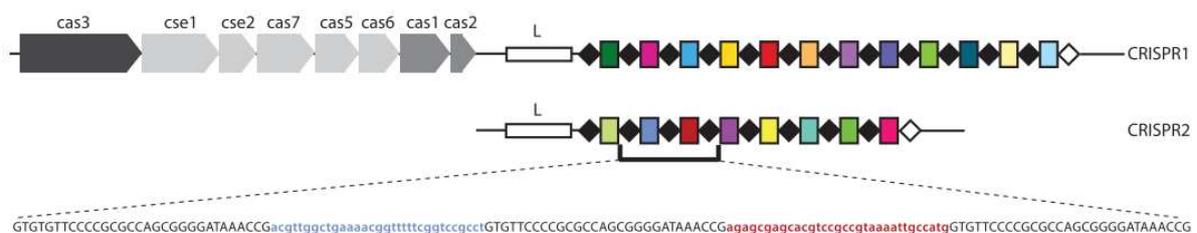


Figure 9 : Structure des locus CRISPR/cas chez *Salmonella* (Shariat and Dudley, 2014).

Les diamants noirs représentent les répétitions et les diamants colorés les spacers.

La méthodologie CRISPOL, développée en France par le CNR, est basée sur le polymorphisme des spacers CRISPR. Cette technique fait partie des analyses réalisées en routine par le laboratoire (Fabre et al., 2012) avec un pouvoir discriminant équivalent à celui de la PFGE (Liu et al., 2011). Cependant, cette méthode ne s'est pas développée à l'international et est essentiellement utilisée en France (Ferrari et al., 2017).