

REMERCIEMENTS

A tous les membres de ma famille !

Merci pour vos prières, vos encouragements. Puisse Dieu nous garder toujours unis
(AMINE)

A ma directrice de mémoire, Professeur Amy Gassama SOW,

Aujourd'hui c'est l'occasion de vous exprimer notre profonde reconnaissance. Nous vous remercions pour nous avoir accueillie dans votre Unité de Bactériologie Expérimentale de l'IPD d'abord pour la gestion des projets (CISAS et TSAP) ensuite de nous avoir initiée à la recherche en acceptant de nous confier ce travail dans le cadre de notre mémoire de MFA.

Sachez aussi que nous sommes très honorée de travailler sous votre direction.

Soyez assurée de tout notre respect et de notre sincère reconnaissance.

Au Dr Abdoulaye Seck

Vous êtes toujours là quand nous avons besoin de vous, malgré vos occupations. Vous avez accepté de façon spontanée de consacrer de votre temps à la lecture et à l'appréciation de ce document : vos corrections, vos remarques et vos critiques ont été constructives. Soyez assuré de nos plus sincères remerciements.

Au Professeur Cheikh Saad Bouh Boye, Président du jury

Vos nombreuses qualités à savoir la clarté de votre enseignement, votre constante disponibilité, votre sympathie forcent l'admiration. Vous avez toujours été un repère, un modèle à suivre. Personnalité de renommée internationale, c'est un privilège exceptionnel d'avoir accepté de présider notre travail.

Hommage respectueux.

Au Professeur Makhtar Camara

Vous nous faites un insigne honneur en acceptant de façon spontanée de siéger dans ce jury.

Soyez assuré de nos sincères remerciements.

Au Docteur Adama TALL

Nous sommes très honorée de votre présence et nous vous sommes très reconnaissante d'avoir accepté de siéger dans ce jury, malgré vos multiples occupations. Soyez en remercié.

A toute l'équipe de l'Unité de Bactériologie Expérimentale de l'IPD :

M. Abdou Aziz WANE, Dr Bissoume, Mme NIANG Khota, Dr Timbiné pour les bons moments passés ensemble. Merci pour les conseils, les encouragements

Mention spéciale au doyen du labo, M. Amadou Makhtar Guèye !

Au personnel de l'Unité d'Epidémiologie Maladies Infectieuses :

- Au Dr. Adama TALL merci pour votre contribution
- M. Joseph Faye, merci pour ton aide précieux, ta disponibilité

A M. Souané et Mme Khadidiatou Sow pour leur participation active à la réalisation de ce travail, merci pour tout.

A M. Bissila du laboratoire de biologie médicale de l'IPD

A M. THIAW du service Informatique de l'IPD

A tout le personnel de l'IPD

A tous mes promotionnaires et aux étudiants de l'IPD

Sommaire

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE :REVUE DE LA LITTERATURE.....	4
I. Les salmonelles	5
I.1. Historique	5
I.2. Classification - Définition	5
I.3. Caractères bactériologiques	5
I.3.1. Caractères morphologiques.....	6
I.3.2. Caractères cultureux	6
I.3.3. Caractères biochimiques	7
I.3.4. Caractères antigéniques	8
I.3.5. Facteurs de virulence	8
II. Epidémiologie des salmonelloses.....	11
III. Portage de salmonelles chez l'homme	11
IV. Symptomatologie	12
IV.1. Salmonelloses typhiques.....	12
IV.2. Gastroentérites	13
V. Antibiorésistance des salmonelles.....	13
V.1. Définition de la résistance aux antibiotiques.....	13
V.2. Mécanismes et types de résistance aux antibiotiques	13
VI. Méthodes de typage des salmonelles	14
VI.1. Le sérotypage des salmonelles selon Kauffman White	14
VI.2. Multi-Locus Sequence Typing des salmonelles (MLST).....	14
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	16
I. Objectifs de l'étude.....	17
II. Type et cadre d'étude	17
III. Matériel et Méthodes.....	17
III.1. Matériels	17

III.2. Méthodes.....	19
III.2.1. Choix des sites d'étude	19
III.2.2. Population d'étude	20
III.2.3. Recueil des prélèvements de selles	21
III.2.4. Analyse bactériologique des selles	21
III.2.5. Sérotypage des salmonelles isolées.....	22
III.2.6. Etude de la sensibilité des salmonelles aux antibiotiques	24
III.2.7. Extraction de l'ADN.....	25
III.2.8. Recherche des gènes de virulence	25
III.2.9. Multi –Locus Sequence Typing (MLST) des salmonelles	27
III.2.10. Saisie et analyse des données	30
IV. Résultats et Discussion.....	32
IV.1. Résultats	32
IV.1.1. Population d'étude.....	32
IV.1.2. Portage des salmonelles	32
IV.1.3. Distribution des sérovars.....	33
IV.1.5. Résultat de la caractérisation moléculaire des salmonelles.....	35
IV.1.5.1. Recherche des gènes de virulence.....	35
IV.1.5.2. Résultat MLST des salmonelles	36
IV.2 Discussion.....	37
CONCLUSION	42
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	45

Abréviations

A :	Adénine
ADH:	Arginine dihydrolase
Ara:	Arabinose
BCP :	Bromocrésol Pourpre
CA-SFM:	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CISAS/ EPSS:	Carriers of Invasive <i>Salmonella</i> in Africa Survey /Etude de porteurs sains de salmonelles
C :	Cytosine
CS:	Citrate de Simmons
DTK:	Djedda Thiaroye Kao
G:	Guanine
Gel:	Gélatinase
GRN:	Guinaw Rail Nord
GRS:	Guinaw Rail Sud
HCUS:	Health Care Utilization Survey
H₂S:	Dihydrogène sulfuré
IPD:	Institut Pasteur de Dakar
KH :	Kliger Hajna
LABM:	Laboratoire d'Analyse de Biologie Médicale
LDC :	Lysine décarboxylase
Mal:	Maltose
Man:	Mannitol
MH :	Mueller Hinton
MLST:	Multi-Locus Sequence Typing
ODC:	Ornithine décarboxylase
ONPG:	Ortho-Nitrophenyl- β -galactoside
Ornit:	Ornithine
PDA:	Phénylalanine désaminase
PE:	Pikine Est
PFGE:	Pulse Field Gel Electrophoresis
PN :	Pikine Nord
PSFTA:	Programme de Surveillance de la fièvre Typhoïde en Afrique

T: Thymine
TSAP: Typhoid Fever Surveillance in Africa Program
RM: Rouge de méthyl
Sacc: Saccharose
SPI: Salmonella Pathogenicity Island

***Spv* :** Salmonellaplasmidvirulence
TDA: Tryptophane désaminase
VP: Voges Proskauer
XLD: Xylose-lysine-Désoxycholate

Liste des tableaux

Tableau I : Identification des espèces du genre <i>Salmonella</i> à partir des caractères biochimiques	7
Tableau II : Description de gènes de virulence chez <i>Salmonella</i>	10
Tableau III : Amorces utilisés pour la recherche des gènes de virulence rajouter une colonne pour les témoins.....	26
Tableau IV : Programme d'amplification des gènes de virulence	27
Tableau V: Amorces utilisées pour la caractérisation des salmonelles par MLST.....	28
Tableau VI: Composition du mix réactionnel pour MLST des salmonelles	29
Tableau VII: Programme d'amplification des gènes de ménage des salmonelles	29
Tableau VIII: Répartition des salmonelles en fonction du site d'étude	33
Tableau IX: Distribution des sérovars dans les différents sites d'étude	34
Tableau X : Résultats MLST des seize (16) sérotypes de salmonelles isolées en portage	37

Liste des figures

Figure 1 : Aspect des salmonelles après coloration de Gram.....	6
Figure 2 : Colonie de salmonelles sur milieu Hecktoen.....	7
Figure 3 : Différents antigènes des salmonelles	8
Figure 4 : Mary Mallon : Première personne identifiée porteur sain de salmonelle.	12
Figure 5 : Localisation des sites d'étude	19
Figure 6 : Cartographie Pikine Est.....	20
Figure 7 : Aspect des salmonelles sur milieu Kliger Hajna	22
Figure 8 : Identification des salmonelles par Api 20E.....	22
Figure 9 : Matériels de sérotypage.....	23
Figure 10 : Résultat du test d'agglutination des salmonelles	24
Figure 11 : Schéma récapitulatif du MLST.....	30
Figure 12 : Répartition des échantillons selon les sites.....	32
Figure 13 : Phénotypes de résistance des seize sérovars isolés	35
Figure 14: Résultat PCR des gènes : <i>InvA</i> , <i>SpiC</i> , <i>SpvR</i>	36

INTRODUCTION

Les salmonelles constituent l'une des principales causes des maladies transmises par les aliments dans le monde et représentent un problème majeur de santé publique avec un coût considérable pour de nombreux pays. *S. Typhi* est responsable d'environ 21, 7 millions de cas d'infections symptomatiques par an avec 17.000 décès dans le monde (Crump et al., 2004). Le réservoir principal de *Salmonella enterica* est le tractus intestinal de diverses espèces animales.

En Afrique subsaharienne, particulièrement en Gambie et au Sénégal, les salmonelles non typhoïdiques sont une cause majeure de maladies invasives chez les nourrissons, les jeunes enfants et les adultes surtout infectés par le virus de l'immunodéficience acquise (VIH) où elles sont associées à une mortalité importante (Dione, 2011).

En Afrique, *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis* sont les premières causes de salmonellose non typhoïdique dues à des toxi-infections alimentaires. Au Sénégal, par contre c'est le sérovar *Enteritidis* qui est le plus incriminé dans ces pathologies (Gassama - Sow, 2007).

Aujourd'hui, l'émergence et la propagation de souches de salmonelles multirésistantes sont devenues une préoccupation des autorités sanitaires et la communauté scientifique.

En Afrique, si beaucoup d'études ont porté sur des salmonelles liées à la salmonellose (malade, aliments souillés), peu de travaux ont été réalisés sur des porteurs sains. Ce portage constitue des menaces par la gravité des conséquences humaines, économiques liées à la salmonellose. De plus, ce portage asymptomatique peut favoriser une dissémination intermittente des salmonelles à l'origine d'une contamination inter-humaine, qui peut être importante surtout chez l'enfant (Gopinath, 2012).

Au Sénégal, la fréquence du portage sain chez l'homme est moins bien connue bien qu'il constitue un facteur favorisant la dissémination de ces bactéries dans la collectivité.

En effet, les salmonelles transportent avec elles des éléments génétiques de virulence et des déterminants de la résistance qui peuvent compromettre l'efficacité de la prise en charge des malades.

C'est dans cette optique qu'une étude multicentrique CISAS/EPISA (Etude de porteurs sains de salmonelles en Afrique) portant sur la surveillance communautaire et hospitalière a été mise en place au Sénégal et dans certains pays d'Afrique sub-saharienne dont les objectifs étaient le contrôle et la prévention de la maladie.

C'est dans ce cadre que nous avons mené cette étude dont l'objectif général était d'étudier les salmonelles isolées de porteurs sains au niveau de certains sites situés dans la banlieue de Dakar.

Les objectifs spécifiques de notre travail étaient de :

- Déterminer le taux de portage de salmonelles de la population étudiée
- Caractériser au plan phénotypique et génotypique les souches de salmonelles isolées de porteurs sains.

PREMIERE PARTIE :
REVUE DE LA LITTERATURE

I. Les salmonelles

I.1. Historique

L'intérêt porté aux salmonelles n'est pas récent. Dès 1875, Koch et Pasteur se sont intéressés à ces germes en mettant en place les bases de la bactériologie (Le Minor et al., 1989).

En 1880, Eberth observa le bacille de la typhoïde sur des coupes de rate et de ganglion lymphatique, mais c'est Gaffky qui parvint à la culture en 1884.

Le bacille d'Eberth (ou *Salmonella* Typhi) fut décrit par SCHROETER en 1886 comme agent de la fièvre typhoïde chez l'homme.

Depuis, de nombreuses bactéries biochimiquement comparables au bacille d'Eberth, mais associées à des diarrhées fébriles ont été inventoriées.

En 1896, Widal ayant eu l'idée d'agglutiner des souches de bacille typhique avec le sérum de malades atteints de typhoïde, découvrit alors la diversité antigénique de ces bacilles.

L'étude séparée des antigènes somatiques (O), flagellaires (H) et de surface (Vi) commença avec les travaux de Weil *et al.* en 1918. L'inventaire de la diversité antigénique de ces bactéries, maintenant regroupées dans le genre *Salmonella*, a été l'œuvre successive de White en 1926, de Kauffman en 1952 puis de Le Minor en 1987 (Freney et al., 2000)

I.2. Classification - Définition

Les espèces bactériennes du genre *Salmonella* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et sont des hôtes habituels du tube digestif de l'homme et des animaux. Le genre *Salmonella* se compose de deux espèces, *S. enterica* et *S. bongori*. Sur la base de caractères phénotypiques, l'espèce *enterica* est elle-même divisée en 6 sous-espèces (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* et *indica*). La très grande majorité (99,7 %) des souches de *Salmonella* isolées en pathologie humaine ou d'animaux à sang chaud appartient à la sous-espèce *enterica*. Au sein de chacune de ses sous-espèces, il est possible de distinguer des sérovars caractérisés par leurs antigènes somatiques (antigène O) et flagellaires (antigènes H) et capsulaire (Vi). Plus de 2579 sérotypes de *Salmonella* ont été identifiés. (Grimont, 2007; Malorny et al., 2011).

I.3. Caractères bactériologiques

L'identification des salmonelles repose sur la détermination de leurs caractères morphologiques, culturels, biochimiques et antigéniques.

I.3.1. Caractères morphologiques

Ce sont des bacilles à Gram négatif sous forme de bâtonnets, de dimension moyenne (0,8 µm de large sur 3,5 µm de long), généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche. ; Il existe deux sérotypes immobiles : Pullorum et Gallinarum.



Figure 1 : Aspect des salmonelles après coloration de Gram

I.3.2. Caractères cultureux

La plupart des salmonelles ne présentent pas d'exigence pour leur croissance.

Les salmonelles sont des bactéries aéro-anaérobies facultatives. A partir de prélèvements monomicrobiens, l'isolement se fait sur des milieux ordinaires (BCP).

Dans le cas de prélèvements polymicrobiens (selles), l'utilisation de milieux sélectifs est indispensable. Il existe des milieux d'enrichissement tels que le milieu Kauffman au tétrathionate et le milieu Rappaport au vert de Malachite qui permettent la multiplication des salmonelles au détriment des autres bactéries présentes.

Les colonies des souches de salmonelles sont généralement lisses de type smooth (S), à bords réguliers, blanchâtres, circulaires, légèrement bombées, translucides. (Freney et al., 2000)

Colonies de salmonelle

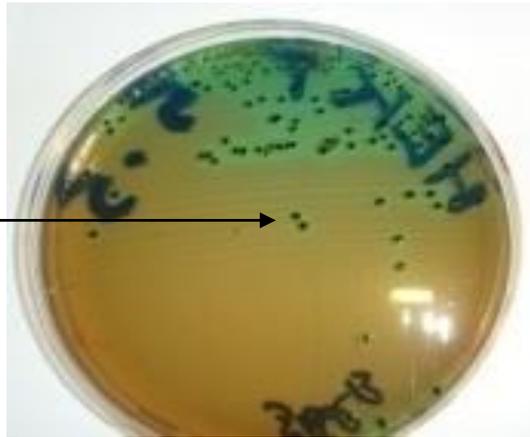


Figure 2 : Colonie de salmonelles sur milieu Hecktoen

I.3.3. Caractères biochimiques

Les espèces appartenant au genre *Salmonella* peuvent être identifiées à partir de leurs caractères biochimiques (cf. Tableau I).

Tableau I : Identification des espèces du genre *Salmonella* à partir des caractères biochimiques (Abulreesh, 2012).

Tests	Résultats	Tests	Résultats
Lactose	-	Man	+
ONPG	-	Mal	-
Uréase	-	Rham	+
Indole	-	Ara	+
VP	-	LDC	+
RM	+	ODC	+
H ₂ S	+	ADH	-
Cit	+	TDA, PDA	-
Gel	-	Ornit	-
Sacc	-	KCN	-

I.3.4. Caractères antigéniques

Les salmonelles peuvent posséder trois types d'antigènes, à l'instar des entérobactéries. On distingue des antigènes somatiques (O), flagellaires (H) et capsulaire (Vi). L'antigène capsulaire n'a été identifié que chez trois sérovars : Typhi, Paratyphi C, et Dublin. Les antigènes flagellaires ne sont présents que chez les souches de salmonelles mobiles.

Il existe des sérotypes qui ne peuvent synthétiser qu'un seul type de flagelle (Enteritidis) : l'antigène H est alors dit monophasique.

Pour la plupart des sérovars, les bactéries possèdent deux systèmes génétiques codant pour des flagellines différentes. Les flagelles existent alors sous deux formes antigéniques qualifiées de phase 1 et de phase 2 : pour ces souches, les antigènes H sont dites diphasiques. Les souches de *Salmonella* sont classées en sérotypes (ou sérovars) sur la base de la diversité du lipopolysaccharide (LPS=antigène somatique O) et des antigènes flagellaires H d'après la classification élaborée d'abord par White en 1926 puis par Kauffman en 1972 et enfin par Le Minor en 1978 (P. A. D. Grimont, 2007).

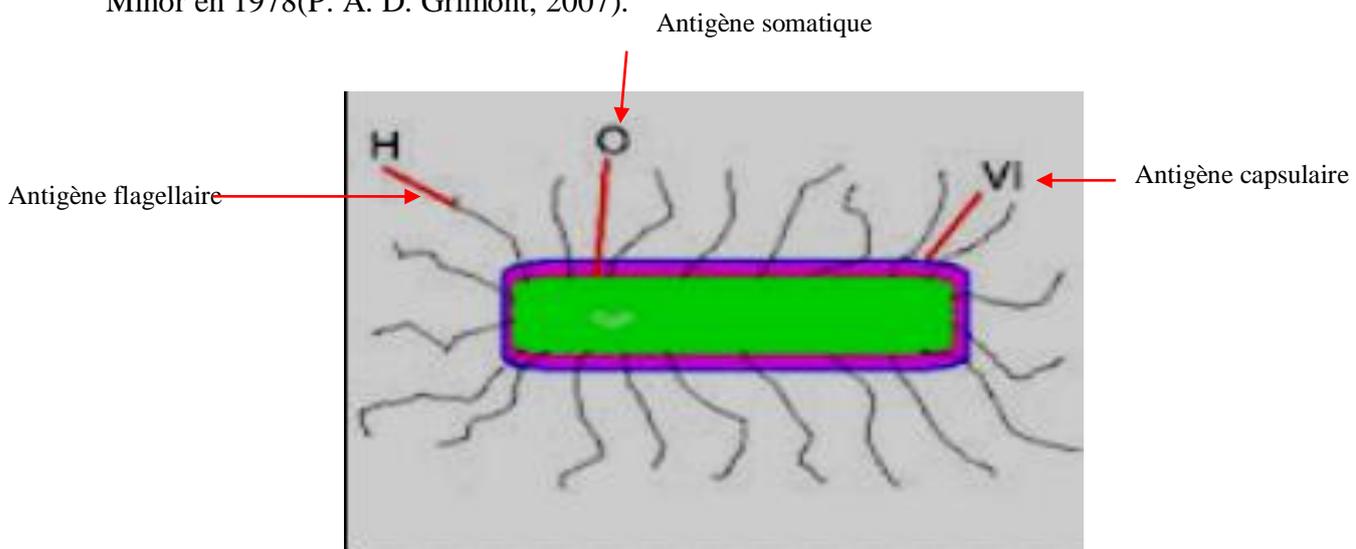


Figure 3 : Différents antigènes des salmonelles

I.3.5. Facteurs de virulence

La plupart des sérotypes de salmonelles connues sont pathogènes pour l'homme et/ou l'animal (Exemple : Typhimurium ou Enteritidis).

Les salmonelles sont des bactéries pathogènes intracellulaires qui, pour provoquer une maladie doivent passer par les cinq étapes de la pathogénicité à savoir :

- 1) adhésion aux tissus de l'hôte,
- 2) envahissement des tissus de l'hôte (habituellement),
- 3) multiplication dans les tissus de l'hôte,

4) Echappement aux défenses de l'hôte

5) Manifestations d'effets pathologiques.

Ces étapes essentielles de la pathogénicité sont sous la dépendance de facteurs de virulence codés par des gènes organisés en blocs sur le chromosome, appelés «îlots de pathogénicité».

Ces facteurs de virulence permettent aux salmonelles de s'adapter aux conditions de l'environnement et à la réponse de l'hôte, et permettent à la bactérie de provoquer la maladie (Millemann, 1998).

Le mécanisme moléculaire du pouvoir pathogène des salmonelles est complexe. Toutefois, des investigations sur les mécanismes moléculaires des facteurs de virulence ont montré que les souches de *Salmonella* se distinguent des non-pathogènes par la présence de gènes de pathogénicité spécifiques (Rowlands, 2014).

De nombreux îlots de pathogénicité (SPI : *Salmonella Pathogenicity Island*) ont été décrits bien que les fonctions des gènes qu'ils contiennent ne sont pas encore complètement élucidées (cf. Tableau II).

Néanmoins, ces SPI sont nécessaires pour la pénétration des bactéries dans les cellules épithéliales de l'intestin, la croissance et la survie des bactéries dans l'hôte.

SPI-1 code pour des protéines effectrices impliquées dans l'invasion des cellules épithéliales de l'hôte et de l'inflammation permettant ainsi l'internalisation de la bactérie. SPI-2 est essentiel pour coder des protéines qui confèrent aux salmonelles la capacité d'induire une infection systémique. Il intervient également dans la prolifération et la survie dans les cellules phagocytaires. SPI3 présente une forte affinité avec le système de transport du magnésium MgtCB qui joue un rôle important dans la survie intracellulaire des salmonelles. SPI4 joue un rôle lors de l'interaction initiale avec l'épithélium intestinal et contribue à la persistance à long terme. SPI-5 est impliqué dans la réalisation de plusieurs processus pathogènes pendant l'infection (Maskell, 2006).

Tableau II : Description de gènes de virulence chez *Salmonella*

(Fàbrega, 2013; Hensel, 2004; Van Asten, 2005).

Ilôt de pathogénicité	Gènes de virulence	Fonctions
<i>SPI-1</i>	<i>invA</i>	Invasion des cellules de l'hôte et de l'inflammation.
<i>SPI 2</i>	<i>spiC</i>	- code des protéines impliquées dans la survie intracellulaire et la réplication au sein de phagocytes. -contribue également à la dissémination systémique des salmonelles
<i>SPI 3</i>	<i>misL</i> (adhesine)	Protéine autotransporteur jouant un rôle dans : - l'adhésion aux cellules Eucaryotes par interaction bactéries/cellules en liant la fibronectine - Survie intra macrophagique
<i>SPI 4</i>	<i>orfL</i>	- Joue un rôle lors de l'interaction initiale avec l'épithélium intestinal et contribue à la persistance à long terme - Est nécessaire à la survie intra-macrophage et porte éventuellement un système impliqué dans la sécrétion de toxine
<i>SPI-5</i>	<i>pipD</i>	Impliqué dans la réalisation de plusieurs processus pathogènes lors de l'infection

Les souches de salmonelles disposent d'autres facteurs de virulence qui ne sont pas localisés dans des SPI mais plutôt portés sur des éléments génétiques transférables dont les plasmides, transposons et bactériophages. Il s'agit du plasmide de virulence de *Salmonella* (*Spv*) dont l'expression de gènes (*SpvRABCD*), potentialise la propagation systémique de l'agent pathogène et l'aide à se répliquer dans les sites extra-intestinaux (Zou, 2012). En effet, l'expression de ces gènes pourrait jouer un rôle dans la multiplication intracellulaire des salmonelles. Le produit du gène *spvR* est une protéine de régulation positive essentielle pour l'expression des autres gènes *Spv*(Millemann, 1998).

II. Epidémiologie des salmonelloses

Les salmonelloses comprennent deux principaux types d'infections :

- Les salmonelloses typhiques (fièvres typhoïde et paratyphoïde)
- les salmonelloses non typhiques

Les salmonelloses typhiques ou paratyphiques sont dues à *S.Typhi* et *S. Paratyphi* encore appelées fièvres typhoïde et paratyphoïde. Ces sérotypes sont strictement adaptés à l'homme.

La contamination peut se faire par voie directe (mains sales) ou indirecte (par l'intermédiaire d'aliments ou d'eau souillés par des déjections humaines)(Weill, 2008).

La fièvre typhoïde est une infection systémique, bactérienne, potentiellement sévère.

Dans de nombreux pays en voie de développement, il s'agit d'une infection endémique liée à la précarité des conditions sanitaires; elle pose alors un véritable problème de santé publique.

L'incidence dans les pays en voie de développement est de 540 cas/100 000 habitants (*versus* 0,2 cas/100 000 dans les pays tempérés). Cette maladie, qui constitue la forme la plus grave des salmonelloses, touche chaque année 22 millions de personnes dans le monde et conduit à 217 000 décès(Crump and Mintz, 2010). Les salmonelloses non typhiques ou mineures sont dues à de nombreux autres sérotypes le plus souvent en cause dans les toxi-infections d'origine alimentaire. Elles entraînent des gastroentérites, des formes invasives étant observées chez les malades à risques, en particulier les malades immunodéprimés. Les réservoirs de virus sont les animaux domestiques ou sauvages.

Comme un grand nombre d'animaux sont porteurs de *Salmonella*, la contamination humaine peut se faire par le biais de divers produits alimentaires (viande, et particulièrement volaille, produits carnés, œufs et produits laitiers). La contamination peut aussi être interhumaine et elle est importante chez l'enfant, favorisée par le phénomène de portage asymptomatique (Bergeron, 2010).

III. Portage de salmonelles chez l'homme

L'état de porteur sain de salmonelle est représenté par un être humain ou animal hébergeant des salmonelles et ne présentant aucune manifestation clinique.

Les porteurs représentent dans certaines conditions un risque pour la collectivité et parfois pour leur propre santé.

Ce phénomène de portage asymptomatique permettant à la bactérie de persister dans les populations humaines constitue une source de contamination pour l'environnement. Certains individus infectés peuvent continuer, après leur guérison, à excréter pendant des dizaines d'années des salmonelles de manière intermittente dans leurs selles (Perron et al., 2007).

Cela contribue à entretenir le réservoir des salmonelles qui pourrait ainsi constituer une source de contamination possible au cours de la préparation et de la conservation de denrée d'origine humaine, liée à des manipulations par un personnel porteur.

En outre, le portage asymptomatique représente un réel problème de santé publique dans la mesure où les salmonelles d'origine animale peuvent se retrouver dans les aliments ainsi que dans les industries agroalimentaires et ainsi être à l'origine de la contamination de l'homme par ingestion ou par contact des produits contaminés.

Le premier cas de porteur sain de salmonelles a été noté aux Etats-Unis chez une cuisinière dénommée Mary Mallon (Figure4), connue sous le nom de Mary Typhoïd qui contaminait les victimes au fil de ses déplacements (Roumagnac, 2006).

Ainsi, dans l'entourage du malade, il ya la nécessité de dépister les porteurs sains afin d'éviter une dissémination de l'infection, principalement chez les personnes travaillant dans le secteur agroalimentaire, en collectivités de jeunes enfants, et des personnes âgées ainsi que chez le personnel soignant.

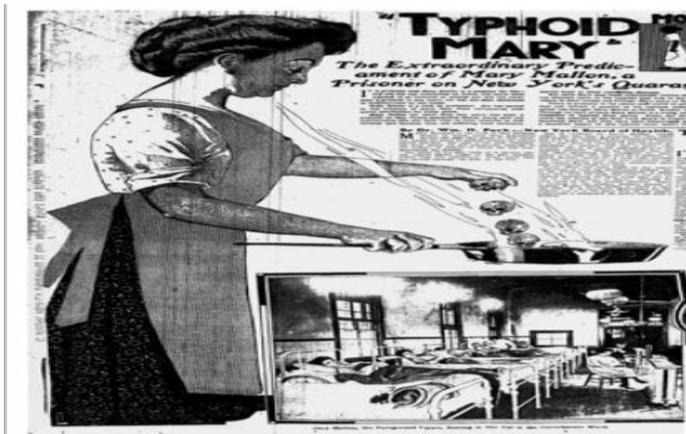


Figure 4 : Mary Mallon : Première personne identifiée porteur sain de salmonelle.

IV.Symptomatologie

IV.1.Salmonelloses typhiques

Après une période d'incubation de 1 à 2 semaines, survient une fièvre continue plus ou moins associée à des signes digestifs : douleurs abdominales, diarrhée ou constipation et un abattement (tuphos = torpeur).

Chez l'enfant, la fièvre typhoïde peut se présenter comme une fièvre isolée ou associée à une obnubilation. dissociation du pouls et de la température

Une particularité de ces pathogènes est l'existence de porteurs sains. En effet, après guérison d'une fièvre typhoïde chronique, 2 à 5% des individus continuent à héberger des *Salmonella*

Typhi (essentiellement au niveau de la vésicule biliaire) qui sont excrétées épisodiquement dans les selles et qui peuvent être à l'origine de cas secondaires (Freney et al., 2000).

IV.2. Gastroentérites à salmonelles non typhiques

Elles sont dues aux autres sérotypes de salmonelles ubiquitaires (Enteritidis, Typhimurium.....) présentes chez l'homme et l'animal. Les symptômes de gastroentérite (diarrhée, fièvre, douleurs abdominales, nausées, etc.) apparaissent entre 6 et 24 heures après l'ingestion d'aliments contaminés. L'évolution de la maladie est en général favorable en 2 à 3 jours chez le sujet immunocompétent.

Cependant, ces bactéries peuvent entraîner des formes invasives chez les nouveaux nés et les malades à risque, en particulier les malades immunodéprimés.

V. Antibiorésistance des salmonelles

V.1. Définition de la résistance aux antibiotiques

Un antibiotique est une substance de nature biologique, produite par des microorganismes (champignons microscopiques et bactéries) ou par synthèse (chimique) capable d'inhiber la multiplication (bactériostatique) ou de tuer des bactéries (bactéricide) (Freney et al., 2000). La résistance aux agents antimicrobiens est définie comme la capacité d'un micro-organisme à résister à l'action inhibitrice d'antibiotiques auxquels il était jusque là sensible (Courvalin et al., 2006).

V.2. Mécanismes et types de résistance aux antibiotiques

Pour s'échapper à l'action des antibiotiques, les bactéries peuvent être capables d'utiliser plusieurs mécanismes de résistance. Il s'agit de:

- la modification des cibles des antimicrobiens pour empêcher leur action,
- l'inactivation de l'antimicrobien par la sécrétion d'enzymes,
- la réduction des concentrations intracellulaires de l'antimicrobien soit par des pompes à efflux, soit par une diminution de la perméabilité de la membrane (Hur, 2012).

La résistance aux antimicrobiens peut être le résultat d'une résistance intrinsèque ou acquise par conjugaison, par transformation ou par transduction, et parfois médiée par des éléments génétiques mobiles (plasmides, intégrons, etc.) (Maskell, 2006).

La résistance est dite naturelle si ce caractère est présent chez toutes les souches d'une espèce ou d'un même genre et délimite de ce fait le spectre d'activité de l'antibiotique. Elle peut être l'expression d'une propriété innée reflétant l'empêchement d'accéder à la cible ou l'absence de la cible. Elle est stable et transmise à la descendance. Elle a pour support génétique le

chromosome bactérien et définit le phénotype « sauvage ». Elle peut être liée aux caractéristiques physiologiques de l'espèce ou à la présence constitutive d'un gène de structure.

La résistance acquise est généralement obtenue par une mutation au niveau des gènes du chromosome ou par acquisition de gènes via un plasmide chez certains isolats de l'espèce.

Les mécanismes génétiques de la résistance acquise peuvent expliquer le caractère épidémique que peut parfois revêtir la résistance aux antibiotiques.

Cette résistance n'apparaît que chez certaines souches d'une espèce donnée normalement sensible. Elle peut résulter de l'emploi abusif des antibiotiques.

VI. Méthodes de typage des salmonelles

VI.1. Le sérotypage des salmonelles selon Kauffman White

Le schéma de Kauffmann-White permet une classification des sérotypes selon leurs formules antigéniques (Freney et al., 2000).

Ce schéma tient compte de la structure antigénique des *Salmonella* ; il repose principalement sur la présence et la mise en évidence de facteurs antigéniques reliés aux antigènes:

- somatiques (O) de type polysaccharidique,
- flagellaires (H) constitués de polymères de flagelline, et possédant
- le plus souvent deux spécificités antigéniques,
- Capsulaire (Vi) éventuellement.

VI.2. Typage moléculaire des salmonelles selon la méthode "Multi-Locus Sequence Typing" (MLST)

Les méthodes de séquençage reposent sur la détection de variations dans la séquence de certains gènes codant pour les enzymes métaboliques afin de mesurer la distance génétique multi-locus (MLST, Multilocus sequence typing).

Le MLST est une méthode de séquençage partiel de l'information génétique de souches bactériennes et de certains eucaryotes unicellulaires, parasites ou champignons.

Il porte sur des portions de gènes constitutifs d'agents pathogènes dits « gènes de ménage » désignant un gène dont l'expression est indispensable et qui est responsable du métabolisme de la cellule. La grande discrimination du MLST combinée au procédé relativement lent d'accumulation de changements dans la séquence des gènes métaboliques au cours du temps rend cette méthode idéale pour des études épidémiologiques globales (Fakhr et al., 2005).

Les gènes séquencés ont la particularité d'être indépendants des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques de l'agent pathogène, ainsi que des caractères phénotypiques cliniques observables chez l'individu qui en est infecté. Ces derniers caractères dépendent d'ailleurs autant de l'individu lui-même que de l'agent pathogène.

L'intérêt de cette méthode standard de séquençage est de permettre l'établissement d'importantes bases de données répertoriant chaque séquence, et à laquelle des laboratoires du monde entier ont l'accès ; mais peuvent également participer en partageant les séquences des souches qu'ils étudient.

Le séquençage puis la comparaison de ces séquences avec les bases de données, sont un moyen pour les épidémiologistes d'analyser la répartition de chaque souche pour ensuite tenter de prévoir leur propagation dans la population(Maiden et al., 1998).

DEUXIEME PARTIE :
TRAVAIL EXPERIMENTAL

I. Objectifs de l'étude

L'objectif général de cette étude était d'étudier les salmonelles isolées de porteurs sains résidant dans la banlieue de Dakar.

Les objectifs spécifiques étaient de :

- Déterminer le taux de portage de salmonelles de la population étudiée
- Déterminer les caractères phénotypique et génotypique des salmonelles isolées de porteurs sains.

II. Type et cadre d'étude

Cette étude prospective a été réalisée sur la population de Pikine, dans la banlieue de Dakar entre Janvier 2013 et Avril 2014.

III. Matériel et Méthodes

III.1.Matériels

Verrerie, milieux et réactifs utilisés pour la caractérisation phénotypique des salmonelles:

- Boîtes de pétri,
- enseigneur,
- tubes à hémolyse,
- étuve,
- logiciel Apiweb
- gélose XLD,
- gélose Hektoen,
- BCP,
- gelose Ordinaire,
- Hajna Kliger,
- Api20E,
- Mueller-Hinton,
- Mueller- Kauffman,
- Urée- Indole,
- disque d'oxydase,
- disques d'antibiotique.

Matériel utilisé pour la caractérisation génotypique des salmonelles

- Tampon réactionnel 10X,
- solution de dichlorure de magnésium,
- désoxyribo nucléotides triphosphates,
- ADN polymérase,
- Amorces spécifiques,
- Poudre d'agarose,
- Tampon TAE,
- Bromure d'éthidium,
- Bleu de bromophénol,
- Marqueurs de masse moléculaire
- Vortex,
- Machine à glace,
- Hotte,
- Balance,
- Four à micro-ondes,
- Thermocycleurs,
- Cuve d'électrophorèse horizontale,
- Générateur de courant,
- Transilluminateur à ultra-violet,
- Appareil de visualisation (Doc-Print VX2).

III.2.Méthodes

III.2.1.Choix des sites d'étude

La sélection des sites a été effectuée sur la base de paramètres épidémiologiques et de la charge escomptée de la fièvre typhoïde ; d'une population cible bien définie ; de l'existence de laboratoire et de sa capacité à mener une surveillance; d'une expérience antérieure dans le domaine. La surveillance a eu lieu dans la zone de Pikine couverte par le contre de santé de Dominique où se tenait une étude antérieure portant sur la surveillance de la fièvre typhoïde. La population de Pikine est de 360 000 personnes et la zone abrite des quartiers pauvres.

Cinq sites ont été choisis : Guinaw Rails Sud(GRS), Guinaw Rails Nord(GRN), Pikine Nord(PN), Pikine Est (PE), Thiaroye Kaw Djeddha (DTK) (cf. figure 5).

Les ménages ont été sélectionnés au hasard via Google Earth qui a permis d'obtenir une cartographie de chaque site d'étude (cf. figure 6) avec leurs coordonnées géographiques précises. Il a été également prévu des ménages en réserve en cas de refus.

Les examens de laboratoire ont été réalisés à l'unité de Bactériologie Expérimentale de l'Institut Pasteur de Dakar.

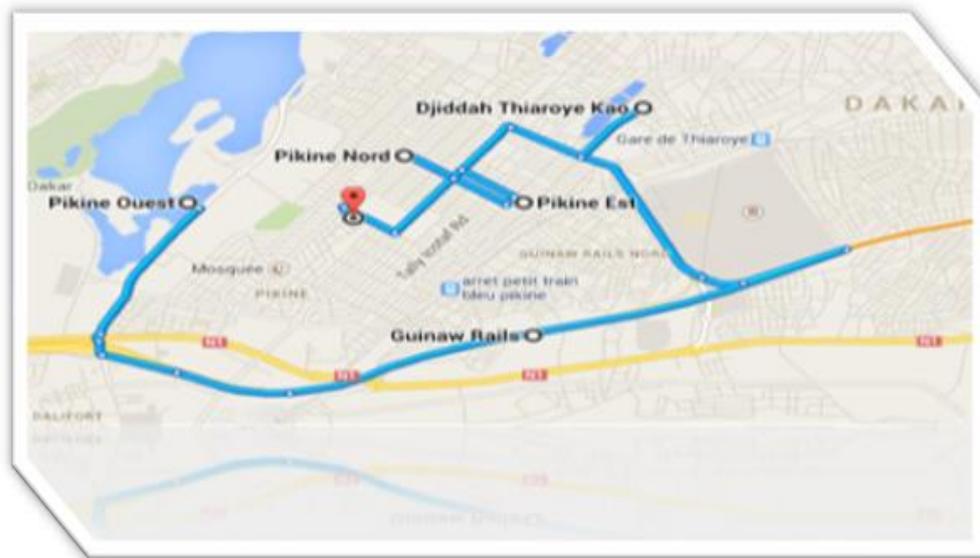


Figure 5 : Localisation des sites d'étude



Figure 6 : Cartographie Pikine Est

III.2.2. Population d'étude

Il s'agit d'une étude communautaire portant sur les porteurs sains de salmonelles.

Les ménages situés dans les sites d'étude ont fait l'objet d'une visite par des enquêteurs recrutés pour recueillir des informations sur l'utilisation des structures sanitaires (EUSS) par les différents participants. L'Enquête d'Utilisation des Structures de Santé permet d'ajuster le dénominateur dans les calculs d'incidence de cas d'infections à *Salmonella* spp. Cette enquête étant nécessaire pour déterminer le comportement de résidents ayant recours aux soins dans la zone d'implantation de l'établissement de santé sentinelle de l'étude.

Les ménages étaient choisis au hasard dans la zone d'étude du Programme de Surveillance de la Fièvre Typhoïde en Afrique : PSFTA (zone couverte par les établissements de soins de santé qui diagnostiquent et traitent les maladies fébriles). Un code d'identification et des coordonnées géographiques (latitude et longitude) obtenues à l'aide d'un système de localisation (GPS : Global Positionnement System) sont attribués à chaque ménage inclus dans l'étude.

Les enquêteurs se rendaient dans les ménages pour avoir le consentement du chef de ménage afin de permettre aux membres de la famille de participer à l'étude. Les enquêteurs ont expliqué clairement dans la langue maternelle l'intérêt et les différentes étapes de l'étude et répondaient aux différentes questions posées par les participants potentiels au projet.

Un consentement écrit et traduit en langue nationale faisait aussi partie du protocole pour une meilleure compréhension du principe de l'étude par les participants.

A tout moment de l'étude, le participant a le droit de poser des questions ou de décider de ne plus y participer.

Tous les sujets qui présentaient un résultat positif à l'isolement de la bactérie étudiée faisaient l'objet d'un suivi. En effet, des suivis journaliers sur une durée d'un mois et mensuels pendant six (06) mois étaient réalisés pour déterminer la durée de l'excrétion intermittente des salmonelles.

- Critères d'inclusion

Etait incluse dans l'étude, toute personne, sans distinction de sexe ou d'âge, asymptomatique habitant dans la zone d'étude et ayant donné son consentement libre et éclairé (voir fiche de consentement éclairé en annexe).

Les sujets âgés de 18 ans ou plus signaient la fiche de consentement éclairé

Les sujets de 12-17 ans donnaient leur consentement éclairé accompagné de celui des parents informés.

Pour les sujets de moins de 12 ans le consentement éclairé était fourni par un parent ou tuteur.

- Critères de non inclusion

N'était pas incluse dans l'étude, toute personne n'habitant pas dans la zone d'étude ou n'ayant pas donné son consentement éclairé.

III.2.3. Recueil des prélèvements de selles

Deux enquêteurs munis de l'appareil de localisation géographique (GPS) se rendaient dans les différents ménages sélectionnés pour remettre aux participants consentants des pots à selles en leur expliquant la procédure de prélèvement. Ils y retournaient le lendemain pour les récupérer. Les échantillons de selles étaient placés dans une glacière et acheminés à l'unité de bactériologie expérimentale de l'IPD, accompagnés des fiches de recrutement et de laboratoire (cf. annexes).

III.2.4. Analyse bactériologique des selles

La culture, l'identification, l'étude de la sensibilité aux antibiotiques et la détection des gènes de virulence des salmonelles ont été effectués à l'Unité de Bactériologie Expérimentale.

Les selles ont été ensemencées sur des milieux gélosés sélectifs (XLD : Xylose Lysine Desoxycholate; Hektoen) et sur bouillon de Mueller Kauffman pour enrichissement qui favorisait la croissance des salmonelles éventuellement présentes en faible quantité.

L'identification des salmonelles a été réalisée sur la base des caractères morphologiques, culturels, biochimiques et antigéniques des colonies suspectes obtenues après mise en culture des échantillons.

Après une incubation de 24h en atmosphère aérobie à 37°C, les colonies suspectes (colonies rose pâle à centre noir) ont fait l'objet de tests à l'uréase suivi d'ensemencement sur mini galerie () et confirmées à l'aide de galeries API 20 E (réf. 20190) (Biomérieux) (cf. Figures 7 et 8).

Le sérotypage des souches isolées a été réalisé au laboratoire d'analyses de biologie médicale de l'IPD qui abrite le Centre National Sénégalais des Entérobactéries (CNSE).



Figure 7 : Aspect des salmonelles sur milieu Kligler Hajna



Figure 8 : Identification des salmonelles par Api 20E

II.2.5. Sérotypage des salmonelles isolées

Les sérotypes ont été déterminés par un test d'agglutination sur lame avec des immun sérums spécifiques dirigés contre les antigènes O, H et Vi des salmonelles (cf. figures 9 et 10).

La formule antigénique était déterminée suivant le schéma de Kauffman -White.

- Typage de l'antigène somatique O

Il a été réalisé à partir des colonies isolées sur Mueller Hinton.

Un test d'agglutination était réalisé avec les antisérums de chaque groupe O : OMA, OMB, OMC, OMD.

- Typage de l'antigène flagellaire H

Il a été réalisé à partir de la suspension bactérienne à la surface du culot.

Les antisérums de groupe H (HMA, HMB, HMC, HMD, HME) étaient testés.

L'antigène H peut exister sous deux phases H1 et H2 qui généralement n'apparaissent pas simultanément.

On procédait ensuite à une inversion de phase qui consistait à bloquer la phase exprimée sur de la gélose Sven Gard afin de révéler l'autre phase : Test de Sven Gard.

Un anticorps dirigé contre la phase à neutraliser est ajouté sur la gélose molle de Sven Gard.

Les antigènes flagellaires de la phase 2 éventuellement présente étaient ensuite recherchés par agglutination sur lame de verre à l'aide d'antisérums spécifiques.

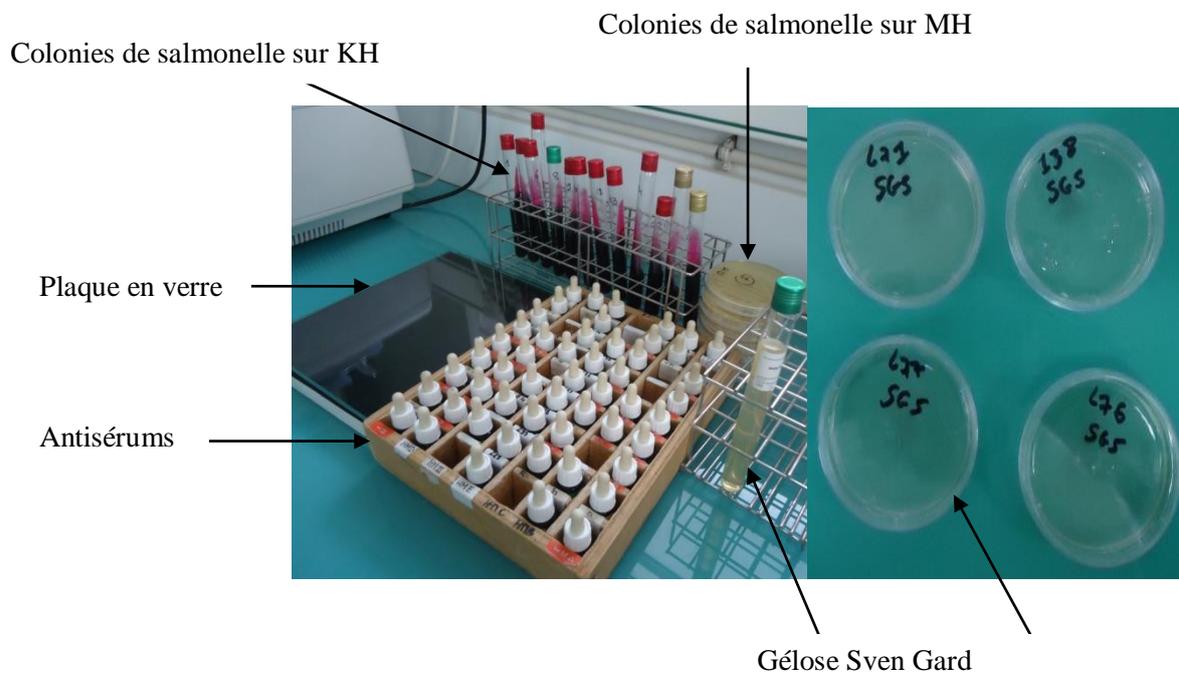


Figure 9 : Matériels de sérotypage

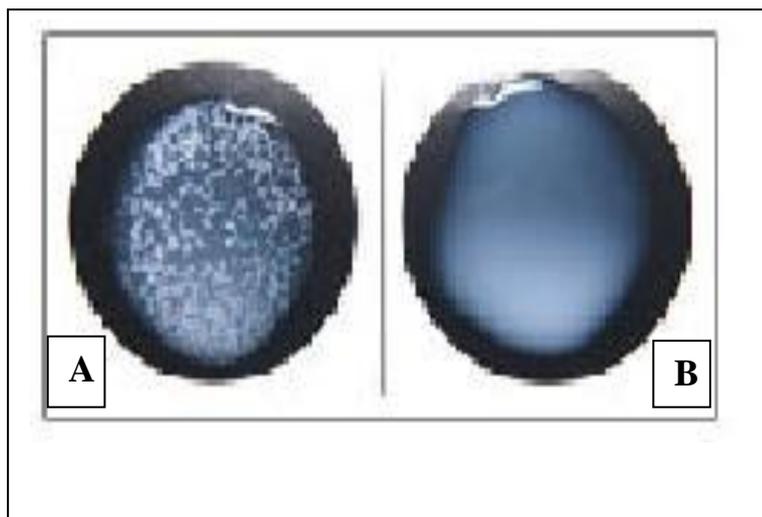


Figure 10 : Résultat du test d'agglutination des salmonelles

A : Réaction positive ; **B** : Réaction négative

III.2.6. Etude de la sensibilité des salmonelles aux antibiotiques

La technique de l'antibiogramme par méthode de diffusion en milieu gélosé a été utilisée pour étudier le profil de sensibilité des salmonelles selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA- SFM, édition 2013).

Seize disques d'antibiotiques ont été testés : l'ampicilline (AMP), la Ticarcilline(TIC), la céfalotine (CF), la céfoxitine (FOX), la céfotaxime(CTX), le ceftazidime(CAZ), l'imipénème(IMP), la gentamicine (GM), l'amikacine(AN), les tétracyclines (TE), l'acide nalidixique (NA), la ciprofloxacine (CIP), la norfloxacine(NOR), la fluméquine (UB), l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT), le chloramphénicol (C). Une suspension bactérienne de 0,5 Mc Farland a été réalisée dans une solution saline 0, 85% NaCl à partir des colonies pures de salmonelles issues d'une culture de 18 à 24 h. Cette suspension a été ensemencée sur une gélose Mueller-Hinton par écouvillonnage.

A l'aide d'un distributeur, des disques d'antibiotiques étaient appliqués sur la gélose incubée à l'étuve 37 °C pendant 24 heures.

Les résultats de l'antibiogramme étaient interprétés suivant les règles du CA-SFM édition 2013.

III.2.7.Extraction de l'ADN

L'ADN des salmonelles isolées a été extrait par la méthode chimique (Qiamp DNA Mini Kit Cat. 51304 Qiagen) à partir des colonies fraîches de 18-24h sur gélose Trypticase Soja (TCS) selon les étapes suivantes:

- Mise en suspension des colonies dans 180µL de Tampon ATL, puis agiter au Vortex.
- Ajout de 20 µL de Protéinase K, agiter au Vortex puis incubé à 56°C pendant 1 heure.
- Centrifuger brièvement (15 secondes).
- Ajout de 200 µl de Tampon AL, agiter au Vortex puis incubé à 70°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger brièvement.
- Ajout de 200 µl d'éthanol absolu, agiter au Vortex.
- Centrifuger brièvement.
- Dépôt de 600 µl de solution sur la colonne Qiagen et centrifuger à 6000g (8000rpm) pendant 1 minute.
- Placer la colonne dans un nouveau tube de 2ml.
- Ouvrir doucement la colonne puis ajouter 500 µl de Tampon AW1, refermer et centrifuger à 6000g (8000rpm) pendant 1 minute.
- Placer la colonne dans un nouveau tube 2ml puis jeter l'ancien.
- Ouvrir la colonne doucement et ajouter 500 µl de Tampon AW2.
- Refermer et centrifuger à 20000g (14 000rpm) pendant 3 minutes.
- Placer la colonne dans un tube eppendorf de 1,5ml et ajouter 200 µl de Buffer AE, incubé à température ambiante pendant 1 minute et centrifuger à 6000g (8000rpm) pendant 1 minute.
- Jeter la colonne puis conserver le tube eppendorf contenant l'ADN à – 20°C.

La qualité de l'ADN était ensuite vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% (135 Volts pendant 30 mn).

III.2.8. Recherche des gènes de virulence

La détection de six gènes de virulence a été réalisée sur toutes les souches de salmonelles isolées durant l'étude par PCR simplex en utilisant des couples d'amorces spécifiques : *invA1/invA2*, *spiC1/spiC2*, *orfL1/orfL2*, *pipD1/pipD2* et *spvR1/spvR2* (cf. Tableau III).

Un mélange réactionnel (mix) a été préparé pour chaque couple d'amorces.

Pour la validation des PCR, des témoins positif (souche de référence présentant le gène à rechercher) et négatif (Eau pour préparation injectable) ont été utilisés.

Souches témoins : 4/74 ATCC *Salmonella* Typhimurium et SS44 *Salmonella* Abortusovis

Tableau III : Amorces utilisés pour la recherche des gènes de virulence rajouter une colonne pour les témoins

Amorces	Séquence d'amorce (5'→3')	Taille attendue	Fonction	Température d'hybridation	Souches témoins	
<i>InvA1</i>	TGCCTACAAGCATGAAATGG	450 pb	Gène Invasif	58°C	4/74 ATCC : <i>Salmonella</i> Typhimurium	
<i>InvA2</i>	AAACTGGACCACGGTGACAA					
<i>SopB-F</i>	CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG	220 pb	SPI-1	55°C		
<i>SopB-R</i>	TAGTGATGCCCGTTATGCGTGAGTGTATT					
<i>SpiC-1</i>	CCTGGATAATGACTATSTGAT	301 pb	SPI-2	54°C		
<i>SpiC-2</i>	AGTTTATGGTGATTGCGTAT					
<i>MisL1</i>	GTCGGCGAATGCCGGAATA	561 pb	SPI-3	60°C		SS44 : <i>Salmonella</i> Abortusovis
<i>MisL2</i>	GCGCTGTTAACGCTAATAGT					
<i>OrfL-F</i>	GGAGTATCGATAAAGATGTT	332 pb	SPI-4	60°C		
<i>OrfL-R</i>	GCGCGTAACGTCAGAATCAA					
<i>PipD-1</i>	CGGCGATTCATGACTTTGAT	399 pb	SPI-5	56°C		
<i>PipD-2</i>	CGTTATCATTCCGATCGTAA					
<i>SpvR-1</i>	CCCCGGAATTCGCTGCATAAGGTCAGAAGG	890 pb	Plasmide de virulence	47°C		
<i>SpvR-2</i>	CCCCGGGATCCATGGATTTCTTGATTAATAA A					

- Préparation du mix réactionnel

Les amplifications des différents gènes de virulence ont été réalisées avec 25 µL de mélange (mix) contenant 2,5 µL d'ADN ; 0,25 µL de Taq ADN polymérase (5UI) ; 1,5 µL d'amorces sens et antisens (10 mM) ; 0,5 µl désoxynucléosides triphosphates (10 mM) ; 2,5 µl de tampon 10X ; 2 µl MgCl₂ (25 mM) et 22,5 µl d'eau pour préparation injectable.

Le mix est ensuite distribué dans des cupules pour PCR à raison de 22,5 µl auquel 2,5 µl d'ADN ont été ajoutés. L'amplification des gènes était réalisée suivant un programme déterminé pour chaque gène cherché (cf. Tableau IV).

Tableau IV : Programme d'amplification des gènes de virulence

Etapes	Température (°C)	Temps (mn)	Cycles
Dénaturation initiale	95	5	1
Dénaturation	95	0,5	} 35
Hybridation*	47-60 ()	1	
Elongation	72	1	
Elongation finale	72	7	1

Température varie selon le gène à rechercher : elle se calcule en fonction du nombre de paire de bases :

$$2(A+T) + 4(G+C)$$

- Migration électrophorétique

Un gel d'agarose à 1% a été utilisé pour la migration électrophorétique des produits PCR.

Le gel a été préparé avec de l'agarose (1g), du tampon TBE 1X, de l'eau distillée, auquel on a ajouté du bromure d'éthidium (1-2 gouttes).

6-8 µl d'amplicon mélangé avec 2-3 µl de bleu de bromophénol a été déposé par puits pour chaque souche testée. Un marqueur de poids moléculaire de 200 paires de base a été utilisé pour la lecture des bandes.

Les conditions de migration électrophorétiques étaient : 135 V pendant 30 mn.

- Visualisation des produits PCR

Après migration, le gel était placé sur une plaque de révélation sous ultra-violet (312 nm) pour visualiser les bandes fluorescentes avec comme référence le marqueur de taille.

III.2.9. Multi-Locus Sequence Typing (MLST) des salmonelles

Il a été décrit pour la première fois par Maiden en 1998 et est basé sur le séquençage de gènes de ménage. Différents gènes de ménages ont été utilisés par différents auteurs pour le typage des salmonelles. Dans cette étude, le typage par MLST a été réalisé sur seize (16) salmonelles isolées selon le procédé décrit dans des études antérieures (Ikumapayi U.N Antonio et al., 2007) basées sur le séquençage de sept gènes de ménage.

Les sept loci (cf. Tableau V) utilisés pour l'analyse des salmonelles sont les gènes de ménage codant pour:

- l'Aspartokinase + Homosérine déshydrogénase (*thrA*)

- la Carboxylase phosphoribosylaminoimidazole (*purE*)
- l'Alpha cétooglutarate déshydrogénase (*sucA*)
- l' Histidinol déshydrogénase (*hisD*)
- la Synthase chorismate (*aroC*)
- l'Uroporphyrinogène III cosynthase (*hemD*)
- la Polymérase III sous-unité bêta de l'ADN (*dnaN*)

L'amplification des sept gènes de ménage a été réalisée par PCR classique dans un mix réactionnel de 50 µl (cf. Tableau VI).

Les amorces utilisées pour l'amplification des gènes de ménage sont répertoriées dans le tableau V.

Tableau V: Amorces utilisées pour la caractérisation des salmonelles par MLST

<i>Loci</i>	Séquence nucléotidique des primers (5'-3')	Taille en pb	Tm
<i>thrA</i>	F : GTCACGGTGATCGATCCGGT R : CACGATATTGATATTAGCCCG	852	55 °C
<i>pure</i>	F1 : GACACCTCAAAGCAGCGT' R2 : AGACGGCGATACCCAGCGG	510	
<i>sucA:</i>	F1 : CGCGCTCAAACAGACCTAC R1 : GACGTGGAAAATCGGCGCC	643	
<i>hisD</i>	F1 : GAAACGTTCCATTCCGCGC R1 : GCGGATTCCGGCGACCAG	894	
<i>aroC</i>	F : CCTGGCACCTCGCGCTATAC R: CCACACACGGATCGTGGCG	826	
<i>hemD</i>	F1 : GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG R : ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA	666	
<i>dnaN</i>	F : ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA R : AATTTCTCATTCGAGAGGATTGC	833	

Tm : Température d'hybridation **F** : Forward **R** : Reverse

Tableau VI: Composition du mix réactionnel pour MLST des salmonelles

Réactifs	Concentration	Volume (µl)
Tampon	10x	5
MgCl ₂	25Mm	2
Eau PPI	-	30
dNTP	2mM	2.5
amorces P1	12,5mM	2,5
amorces P2	12,5mM	2 ,5
Taqpolymérase	5U/µl	0,5
ADN	-	5
Volume final	-	50

Tableau VII: Programme d'amplification des gènes de ménage des salmonelles

Étapes	Température (°C)	Temps (mn)	Cycles
Dénaturation initiale	94	5	1
Dénaturation	94	0,5	} 35
Hybridation	55	1	
Elongation	72	1	
Elongation finale	72	7	1

Les produits PCR obtenus ont été migrés sur un gel d'agarose 1% et les bandes obtenues étaient visualisées sous lampe ultra-violet (312nm).

Le séquençage des produits PCR a été réalisé au centre de Beckman Coulter Genomics (Royaume uni).

Les produits PCR sont purifiés par le kit QIAquick Gel extraction de Qiagen puis séquencés en utilisant le protocole BigDye terminator sur l'automate séquenceur ABI PRISM 3100 suivant les recommandations du fabricant (Perkin-Elmer Applied Biosystems, les Ulis, France).

L'analyse des séquences obtenues a été faite au Centre National de Référence des Salmonelles (Institut Pasteur Paris). Les séquences étaient soumises à la base de données pour MLST : (<http://mlst.ucc.ie/website>) et des numéros d'allèles (existants ou nouveaux) étaient attribués aux séquences étudiées (la séquence type étant définie par la base de données MLST).

La figure ci – après représente le schéma récapitulatif des différentes étapes de la technique de MLST des salmonelles.

Maiden et al. Proc Natl Acad Sci U S A 1998.

MLST
Multilocus
Sequence
Typing

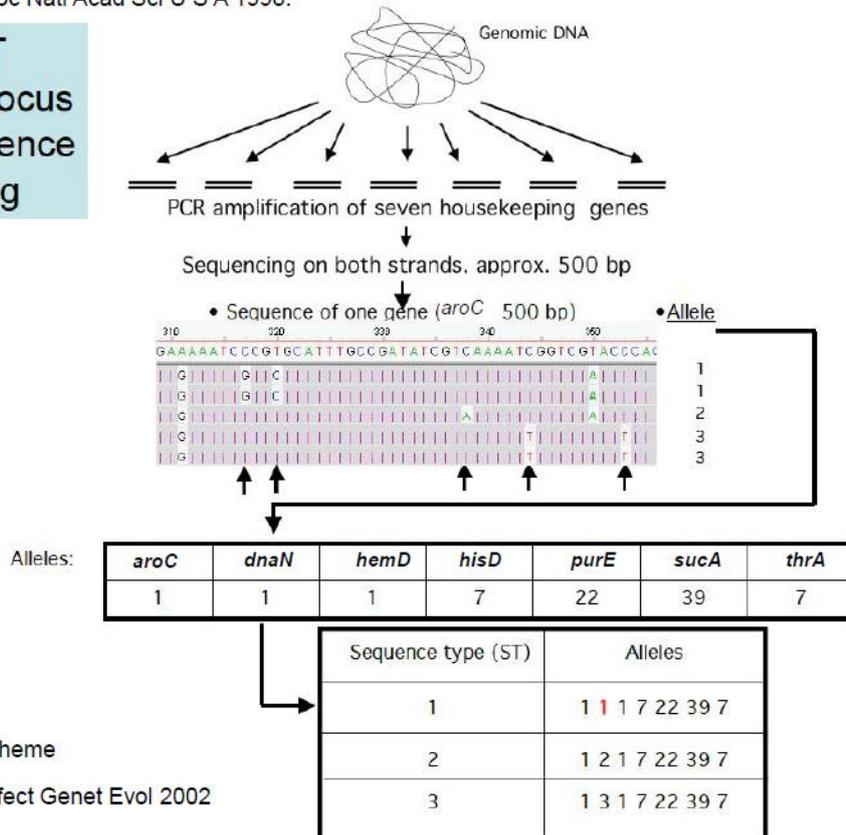


Figure 11 : Schéma récapitulatif du MLST

III.2.10. Saisie et analyse des données

La saisie et l'exploitation des données ont été réalisées au niveau(Dione et al., 2011) de l'Unité d'Epidémiologie de l'Institut Pasteur de Dakar. Le logiciel R et le test de Chi 2 ont été utilisés

RESULTATS - DISCUSSION

IV. Résultats et Discussion

IV.1.Résultats

IV.1.1.Population d'étude

Au total, Google Earth a permis de sélectionner 46510 structures constituées de ménages, de point de vente (boutique...) etc. 592 ménages ont été sélectionnés au hasard et inclus dans l'étude. Avec l'appareil de localisation géographique (GPS), seulement 381 concessions ont été visitées et 2268 sujets ont été pré inclus.

Durant la période d'étude, mille huit cent quatre vingt huit (1888) sujets ont accepté de donner de leurs selles dont la majorité était obtenue au niveau de DTK (669/1888) soit 35% suivie de PW (381/1888) soit 20 % ; de PE (262/1888) soit 13,9 %; de GRN (257/1888) soit 13,6 % ; de PN (195/1888) soit 10,3 % ; de GRS (124/1888) soit 6,6 %. (Fig.12).

La répartition de la population en fonction du sexe a montré que les sujets de sexe féminin étaient majoritaires : 1265 femmes contre 718.

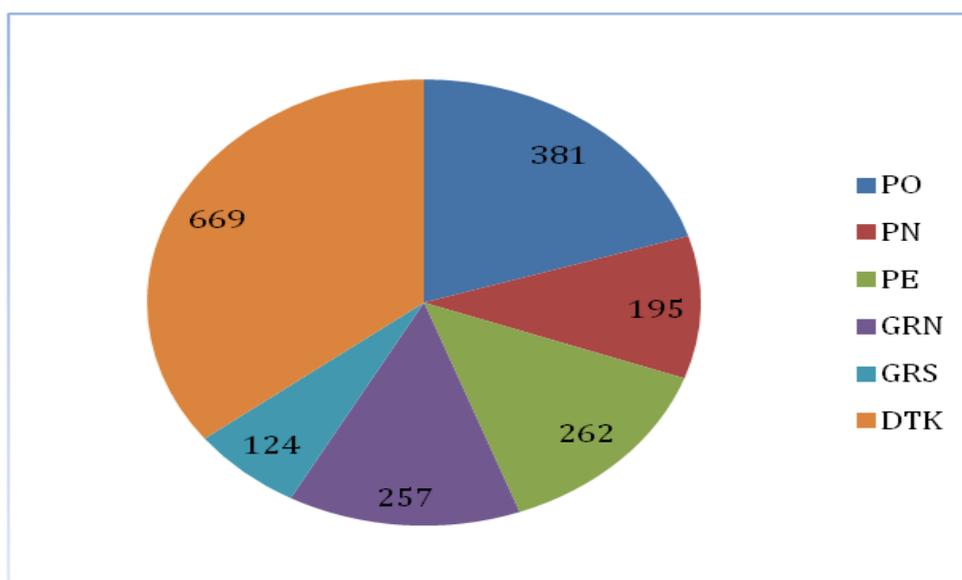


Figure 12 : Répartition des échantillons selon les sites

PW : Pikine Ouest ; PN : Pikine Nord ; PE : Pikine Est ; GRN : Guinaw Rail Nord

GRS : Guinaw Rail Sud ; DTK : Djedda Thiaroye Kao

IV.1.2.Portage des salmonelles

Seize (16) souches de salmonelles non typhiques ont été identifiées sur les mille huit cent quatre vingt huit (1888) échantillons de selles, (16/1888) soit un taux de portage de 0,84% (**P-value = $2,2 \times 10^{-16} < 0.05$ %**).

Onze (11) souches étaient isolées chez les femmes. La répartition des souches de salmonelles isolées était différente en fonction du site d'étude (cf. Tableau VIII).

Tableau VIII: Répartition des salmonelles en fonction du site d'étude

Sites	Nombre de selles collectées	Nombre de salmonelles isolées
DTK	669	5
PW	381	4
PE	262	3
PN	195	4
GRN	257	0
GRS	124	0

IV.1.3. Distribution des sérovars

Neuf (9) sérovars étaient identifiés sur les 16 salmonelles isolées dont les plus dominants étaient représentés par *Salmonella* Corvalis (n=5); suivis des sérotypes Give(n=2), Johannesburg (n=2), Chester(n=2), Poona (n=1), Agona(n=1), Branchaster(n=1), Enteridis(n=1), Istanbul(n=1). Le sérotype Enteritidis, n'a été retrouvé que chez un patient dans le site de Pikine Ouest (PW) alors que le sérovar Corvalis était le seul sérotype isolé à Pikine Nord (cf. Tableau IX).

Tableau IX: Distribution des sérovars dans les différents sites d'étude

Sérotypes		Sites d'isolement			
Noms	Formules antigéniques	DTK	PE	PW	PN
Poona	13 ,22 : z : 1,6	-	-	1	-
Agona	4 : f, g, s :-	-	-	1	-
Brancaster	4 :z ₂₉ :-	-	-	1	-
Enteritidis	9,12 : g, m :-	-	-	1	-
Give	10 : l, v : 1,7	-	2	-	-
Johanesburg	40 : b : e, n, x	2	-	-	-
Istambul	8 :z ₁₀ : e, n, x	1	-	-	-
Chester	4 : e, h : e, n, x	1	1	-	-
Corvalis	8 :z ₄ z ₂₃ :-	1	-	-	4

PW : Pikine Ouest ; **PE** : Pikine Est ; **DTK** : Djeddah Thiaroye Kao ; **PN** : Pikine Nord

IV.1.4. Profil de sensibilité aux antimicrobiens

L'étude de la sensibilité des salmonelles aux antibiotiques a montré que quatre souches de salmonelles étaient résistantes à au moins une molécule d'antibiotique, soit 25 % de l'ensemble. Ainsi, trois profils de résistance ont été observés : TE^R ; Nal^R ; Nal^R-SXT^R-TE^R ; Ces résistances ont concerné différents sérovars. En effet, la résistance a été observée avec la tétracycline (n=3 soit 19 % : Chester, Branchaster et Istanbul) ; à l'acide nalidixique (n=3 (19%) : Chester (2), Istanbul (1)) et à l'association sulfaméthoxazole -triméthoprim (n=2 (13%) : Chester et Istanbul) (Figure 12).

Deux sérotypes Chester isolés dans des sites différents avaient un profil de résistance différent vis-à-vis des antibiotiques. Alors que le sérotype Chester isolé à Pikine Est était résistant à l'acide nalidixique, (Nal^R), celui de Djedda Thiaroye Kao présentait une résistance à la fois à l'acide nalidixique, à la tétracycline et à l'association sulfaméthoxazole-triméthoprim (Nal^R-SXT^R-TE^R).

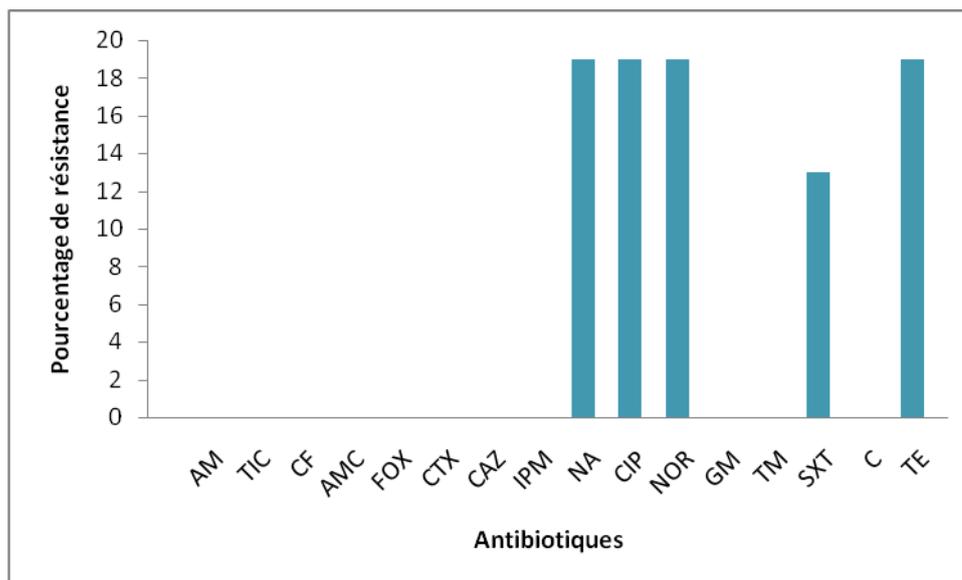


Figure 13 : Phénotypes de résistance des seize sérovars isolés

IV.1.5. Résultat de la caractérisation moléculaire des salmonelles

IV.1.5.1. Recherche des gènes de virulence

Tous les sérotypes isolés dans notre étude hébergeaient la quasi-totalité des gènes de virulence recherchés ($p\text{-value} = 2,2 \times 10^{-16} < 0,05$) (*invA*, *pipD*, *spiC*, *orfL*, *misL*, *spvR* et *sopB*) à l'exception du gène *spvR* retrouvé uniquement chez le sérotype Enteritidis isolé à Pikine Nord (cf. Figure 14).

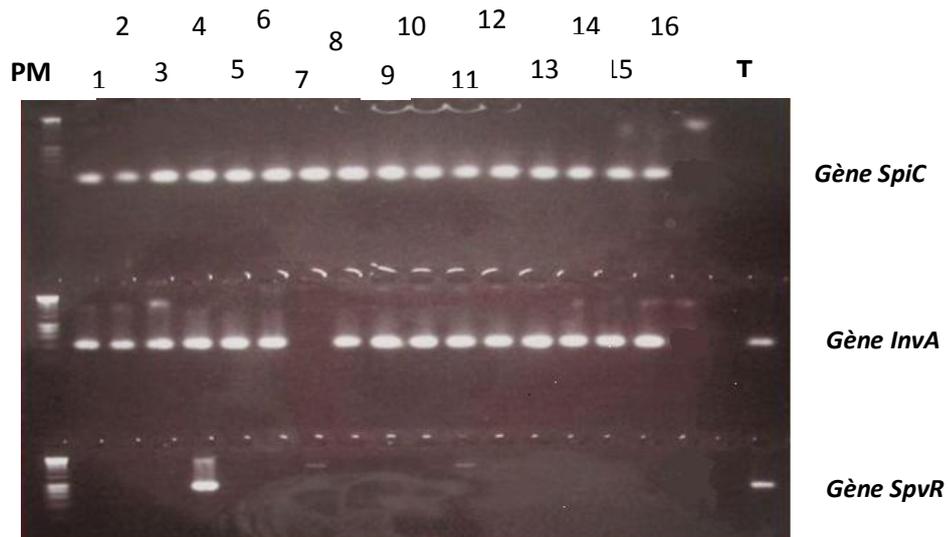


Figure 14: Résultat PCR des gènes : *InvA*, *SpiC*, *SpvR*

PM : Poids moléculaire ; **T :** Témoin = 4/74 ATCC *Salmonella* Typhimurium

IV.1.5.2. Résultat MLST des salmonelles

Chaque sérotype correspondait à un ST unique. Sur les 16 souches réparties en 9 sérotypes, neuf séquences types (ST) ont été identifiées dont deux nouvelles ST découvertes sur les sérotypes *Chester* (n=2) et *Brancaaster*. Les deux sérotypes *chester* qui avaient un profil de résistance différent avaient les mêmes profils alléliques (cf. Tableau X).

Tableau X : Résultats MLST des seize (16) sérotypes de salmonelles isolées en portage**Profil des allèles**

Sérotypes	<i>Aroc</i>	<i>dna</i>	<i>hemD</i>	<i>hisD</i>	<i>purE</i>	<i>sucA</i>	<i>thrA</i>	<i>ST</i>
Johanesburg	13	109	49	157	12	13	4	515
Johanesburg	13	109	49	157	12	13	4	515
Corvalis	39	338	93	429	36	343	48	1357
Corvalis	39	338	93	429	36	343	48	1357
Corvalis	39	338	93	429	36	343	48	1357
Corvalis	39	338	93	429	36	343	48	1357
Corvalis	39	338	93	429	36	343	48	1357
Poona	22	104	25	113	12	83	4	308
Give	13	41	16	42	40	71	4	516
Give	84	11	16	42	40	71	4	516
Brancaster	-	-	10	36	88	108	36	<u>New</u>
Chester	11	10	25	42	337	13	4	<u>New</u>
Chester	11	10	25	42	337	13	4	<u>New</u>
Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11	11
Istanbul	2	5	6	7	5	7	12	33
Agona	2	5	6	7	5	7	12	13

IV.2 Discussion

Cette étude est la première au Sénégal portant sur la caractérisation des salmonelles isolées de porteurs asymptomatiques humains. La faisabilité de cette étude a fait appel à l'intervention de différents acteurs afin d'effectuer le travail de terrain et de laboratoire.

Les situations précaires (inondations, insalubrité) de la plupart des sites ne facilitaient pas l'accès aux concessions pour les enquêteurs venus pour récupérer les prélèvements de selles.

De plus sur le terrain, l'obtention du consentement des participants était difficile malgré les efforts de sensibilisation. Toutefois, les personnes incluses dans l'étude ont bénéficié d'une prise en charge médicale gratuite (consultation, ordonnance, analyses).

L'utilisation de l'outil GPS était nécessaire pour le repérage des ménages inclus dans l'étude.

Les sites étaient caractérisés par la promiscuité et l'insalubrité favorisée par des inondations constituant ainsi un milieu favorable au développement des maladies infectieuses.

Cette étude a été réalisée sur mille huit cent quatre vingt huit (1888) prélèvements de selles. Le taux de portage de salmonelle trouvé dans notre population d'étude était de 0,84 % (16/1888). Le test de Chi 2 utilisé a montré que la prévalence du portage obtenue était significative (**p-value = $2.2 e^{-16} < 0,05$**). Ce taux était relativement plus faible que ceux trouvés dans des études similaires réalisées il y a longtemps dans des pays africains.

Au Sénégal, Baylet et *al.* (1976), dans le cadre d'une étude réalisée chez des enfants en zone rurale avaient trouvé un taux de portage de 4,14% alors qu'en Côte d'Ivoire, P. Le Noc et *al.* (1967) avaient rapporté un taux de 2,6 % chez des enfants d'âge scolaire.

Le faible taux observé dans notre population d'étude pourrait s'expliquer par une faible circulation de la bactérie dans la zone d'étude ou du fait de l'excrétion intermittente de ces germes, raison pour laquelle des recueils successifs seraient intéressants pour détecter plus de porteurs.

Ce portage observé surtout chez les femmes (**p-value =0,672**) était encore plus inquiétante du fait qu'elles constituent une source potentielle de dissémination des salmonelles dans leur entourage à l'occasion de leurs nombreuses activités (cuisine, couchage nouveau-né, allaitement etc.).

L'histoire de Mary Mallon cuisinière, plus connue sous le nom de Mary Typhoïde, porteuse de salmonelle qui contaminait inconsciemment ses clients, au fil de ses déplacements est une parfaite illustration du danger que peut représenter le portage dans la dissémination du germe dans l'environnement (Roumagnac, 2006).

Neuf sérotypes de salmonelles étaient isolés en portage dans la banlieue de Dakar et le sérotype Corvallis était majoritaire (n=5). La plupart des sérotypes isolés dans notre étude sont ubiquistes et étaient retrouvés dans des études antérieures notamment dans la filière avicole et dans les cas d'intoxications alimentaires (Bada-Alambedji et al., 2006).

Les sérotypes, Chester, Brancaster, Agona, Poona avaient été isolés dans des prélèvements de volaille mais aussi en pathologie humaine au Sénégal (Combari, 2014; Dione et al., 2009).

Le sérotype Enteritidis, pathogène majeur en santé publique a été isolé chez un seul porteur.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées n'a montré aucune résistance aux bêta-lactamines et aux aminosides. Cependant, quatre (Brancaster, Istanbul, Chester (n=2)) sur 16 souches soit 25% montraient une résistance à la tétracycline, au sulfaméthoxazole-triméthoprimine et aux quinolones.

L'émergence et la diffusion de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques est un phénomène complexe, et inquiétant, pouvant entraîner de grandes difficultés de prise en charge pour les patients, avec des situations d'impasse thérapeutique (Fofana, 2004).

Ceci, d'autant que les antibiotiques inefficaces à savoir les tétracyclines, les sulfamides et l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole sont les plus utilisés au Sénégal pour traiter les diarrhées infantiles(Toko, 2010).

La résistance des salmonelles à ces molécules pourrait être favorisée par leur vente illicite, leur utilisation incontrôlée augmentant la pression de sélection qui concourt à l'émergence de bactéries résistantes. Ces bactéries peuvent alors conduire à une infection grave ou contaminer d'autres patients. Ainsi, la tétracycline largement utilisée dans le monde du fait surtout de son large spectre d'action, de sa faible toxicité mais aussi de son accessibilité, est largement incriminée dans les cas de résistance de salmonelles.

Les déterminants génétiques de la résistance portés soit par le chromosome soit par des éléments mobiles transférables (plasmides, transposons, intégrons), peuvent être transmis vers d'autres bactéries de même ou d'espèces différentes et induire ainsi une émergence et une propagation de la résistance bactérienne(Beceiro et al., 2013). Ainsi, l'état de portage caractérisé par une excrétion de salmonelles de façon intermittente pourrait constituer une réelle menace pour la collectivité quand elles diffusent dans l'environnement et se transmettent à d'autres sujets. La résistance observée concernait quatre sérotypes différents dont Istanbul qui présentait une multirésistance à l'encontre de l'acide nalidixique, de la tétracycline et du cotrimoxazole ; la fréquente résistance du sérotype Istanbul a été rapportée dans une étude antérieure (Dione et al., 2012).

L'émergence de la résistance des salmonelles aux quinolones constitue un réel problème de santé publique ; ceci est d'autant plus inquiétant que les résultats issus de notre étude concernaient des souches isolées chez des patients sans aucune manifestation clinique et pourrait constituer de ce fait une source de contamination de leur environnement(Roumagnac, 2006).

Le sérotype Chester retrouvé en majorité chez l'animal, a été isolé dans notre étude dans deux sites différents et avaient un profil de résistance différent. Ceci pourrait s'expliquer par une acquisition de gènes de résistance.

Cependant, malgré la bonne sensibilité des souches aux bêtalactamines, elles hébergeaient la presque totalité des gènes de virulence recherchés (*invA*, *spiC*, *pipD*, *misL*, *orfL*) contenus respectivement dans les SPI-1, SPI-2, SPI-5, SPI-3. Ces gènes de virulence situés sur des îlots de pathogénicité jouent un rôle crucial dans la pathogénèse des infections à *Salmonella enterica* et proviennent souvent d'un transfert horizontal entre bactéries (Hensel, 2004)

Malgré leur degré important de pathogénicité, ces souches restent en portage.

Par ailleurs, les facteurs ainsi que les mécanismes impliqués dans le portage asymptomatique sont extrêmement mal connus. Néanmoins, certains facteurs comme la diminution de l'expression de gènes de virulence ou l'expression de facteurs bactériens spécifiques au portage pourraient être incriminés (Amy et al., 2004) .

Ces gènes codés par des îlots de pathogénicité jouent un rôle essentiel dans les différentes étapes de la pathogénie des salmonelles.

Le gène *invA* est responsable de la virulence de *Salmonella* en particulier l'invasion des cellules hôtes par les bactéries (Millemann, 1998). Toutes les souches portant ce gène pouvaient potentiellement envahir les cellules épithéliales et par conséquent être virulentes.

D'autre part, ce gène est un marqueur utile pour la détection moléculaire dans le cadre diagnostique des salmonelles (Amini et al., 2010; Oludairo et al., 2013). Seul le sérotype Enteritidis portait le gène (*spvR*).

L'opéron SPV est situé dans des plasmides de virulence retrouvés chez des sérotypes spécifiques dont Enteritidis (Amini et al., 2010).

Ce gène n'a pas été retrouvé sur les souches de *Salmonella* Enteritidis isolées de sources diverses au sud du Brésil (Oliveira, 2003)

Cependant, le gène *spvR* a été retrouvé sur les souches de *Salmonella* Nitra d'origine animale (Andrianony, 2014).

Le MLST est considéré comme une méthode de choix pour la caractérisation d'un grand nombre d'agents pathogènes (Torpdahl et al., 2005).

Cette technique de typage moléculaire basée sur le séquençage de gènes de ménage permet de déterminer la similarité génétique au sein des sérotypes.

Dans notre étude, cette technique a permis de montrer que les sérotypes identiques sur le plan phénotypique ne présentaient aucune variation allélique c'est-à-dire appartenaient aux mêmes sous-types. C'est le cas de du sérotype Corvalis (ST 1357) majoritairement isolé dans le même site de Pikine nord avec les mêmes caractères phénotypiques et génotypiques. Ce qui laisse supposer une possible contamination interhumaine.

En outre, un autre moyen possible de transmission par les aliments pourrait être incriminé suite à l'isolement, dans deux sites différents de deux sérotypes Chester identiques sur le plan génotypique et ayant un profil de résistance différent, Nos résultats sont compatibles avec ceux issus d'études antérieures utilisant cette même technique MLST et n'ayant pas permis d'établir une distinction entre souches étroitement apparentées au sein du même sérotype (Ross and Heuzenroeder, 2004)

Par ailleurs, il a été reporté que cette même technique présentait un pouvoir discriminant élevé entre les divers isolats de salmonelles. Ainsi, l'étude de (Dione et al., 2012) avait permis de distinguer par cette même technique des sérotypes de Kentucky identiques sur le plan phénotypique mais avec des séquences types (ST) différents : ST 198 et ST 832.

La plupart des sous types de *Salmonella* isolés dans notre étude ont déjà été décrit dans des études antérieures (Dione et al., 2012; Sangal, 2008) portant sur des souches de salmonelles d'origines diverses (animale, humaine et alimentaire).

S. Agona ST13 retrouvé dans notre étude en portage chez l'homme a également été décrit en portage chez l'homme en Allemagne (Sangal, 2008) et chez les poulets au Sud du Sénégal (Dione et al., 2012).

ST33 retrouvé chez le sérotype Istanbul était caractérisé par une multirésistance (Nal- SXT-TE) alors que ce même ST 33 retrouvé dans une étude antérieure (Dione et al., 2012) à partir de poulets était beaucoup plus résistant (plus de cinq antibiotiques). Ceci montre que l'émergence de salmonelles multirésistantes est un phénomène réel. Or, la circulation de ces souches virulentes et multirésistantes constitue un problème de santé publique de par leur possible dissémination dans l'environnement pouvant impacter sur l'efficacité de la prise en charge thérapeutique.

En effet, les supports génétiques de la virulence et de la résistance peuvent être transmis à d'autres bactéries auparavant sensibles et conférer à ces dernières le caractère résistant et/ ou virulent.

Vu la circulation de ces salmonelles dans différents secteurs (humain et alimentaire), il serait intéressant d'une part de faire des investigations quant à l'origine des souches isolées en portage dans cette étude et de déterminer les bases moléculaires de la résistance aux antibiotiques d'autre part.

Toutefois, ce même sous type ST33 a été trouvé avec le sérotype Hadar à partir de diverses sources en Europe (Sangal, 2008). Dans notre étude, l'utilisation du MLST a montré que les sérotypes de salmonelles phénotypiquement identiques et isolées dans la même zone ne présentaient aucune différence génétique c'est-à-dire appartiennent aux mêmes séquences types. Ceci suggère que ces clones ont largement diffusé géographiquement et sont probablement en circulation dans un large éventail d'hôtes.

Cependant, en comparaison avec d'autres techniques de typages moléculaires, des études ultérieures ont montré que le MLST peut être une bonne option épidémiologique moléculaire pour distinguer des isolats génétiquement indiscernables par la technique de PFGE. Ce faible pouvoir discriminant a aussi été rapporté par d'autres auteurs (Stepan et al., 2011).

CONCLUSION

Notre étude portant sur la caractérisation phénotypique et génotypique des salmonelles isolées en situation de portage avait comme objectifs de :

- déterminer la prévalence des porteurs sains de salmonelles au sein de la population étudiée
- réaliser leur typage antigénique et moléculaire
- détecter les supports moléculaires de la virulence des souches
- identifier les ST en portage

Cette étude menée sur 1888 prélèvements de selles provenant de sujets vivant dans la banlieue de Dakar particulièrement à Pikine a mis en évidence:

- un taux de portage de salmonelles relativement faible de 0,84 % pour la population d'étude pouvait être lié au respect des règles d'hygiène, à une faible circulation de germes dans les sites d'étude et/ou à l'excrétion intermittente des salmonelles.

-une répartition hétérogène des sérotypes isolées avec une prédominance du sérovar Corvallis (5/9) alors que le sérotype Enteritidis n'a été retrouvé que chez un patient.

- Une résistance au moins à une molécule d'antibiotique était observée pour quatre sérotypes et concernait la tétracycline, l'association sulfaméthoxazole-triméthoprim, l'acide nalidixique et aux fluoroquinolones. La résistance à ces molécules observées rend encore plus complexe l'impact du phénomène de portage pour la population du fait de la possibilité de diffusion des gènes de résistance et même des gènes de virulence des salmonelles.

- La présence de la totalité des gènes de virulence sur toutes les souches de salmonelles isolées montraient ainsi une importante pathogénicité des souches circulantes.

Le gène *InvA* marqueur de diagnostic des salmonelles a été retrouvé chez tous les isolats; par contre le gène *spvR* n'a été retrouvé que chez un seul sérotype identifié Enteritidis.

-La présence d'un même profil allélique par MLST pour les souches de salmonelles identiques phénotypiquement.

Quelques recommandations nous semblent importantes à formuler, vu les résultats obtenus :

- Surveillance des porteurs sains pour éviter la dissémination de ces souches hébergeant des gènes de virulence et ou de résistance
- Sensibilisation de la population sur les risques liés au portage
- Surveillance moléculaire de souches de salmonelles en portage et en situation pathogène.

En perspective, pour une bonne compréhension du mécanisme lié au portage, il serait intéressant :

- d'étudier l'interaction des facteurs de l'hôte (âge, sexe, état nutritionnel, état immunitaire) dans la survenue de l'infection à salmonelles ;
- de déterminer les mécanismes liés à la persistance des salmonelles chez l'hôte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abulreesh, H.H., 2012. *Salmonellae in the environment*. INTECH Open Access Publisher.
- Amini, K., Salehi, T.Z., Nikbakht, G., Ranjbar, R., Amini, J., Ashrafganjooei, S.B., 2010. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from human and animals in Iran *Afr. J. Microbiol. Res* 4 2202–2210.
- Amy, M.t., Velge, P., Senocq, D., Bottreau, E., Mompert, F., Virlogeux-Payant, I., 2004. Identification of a new *Salmonella enterica* serovar Enteritidis locus involved in cell invasion and in the colonisation of chicks. *Research in microbiology* 155, 543-552.
- Andrianony, S.A., 2014. Caractérisation moléculaire des souches de *Salmonella* isolées dans les fermes de poulets de chair de la zone peri-urbaine de Dakar (Sénégal), Mémoire de Master en qualité des aliments de l'homme. E.I.S.M.V .N°20.
- Bada-Alambédji, R., Fofana, A., Seydi, M., Akakpo, A.J., 2006. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry carcasses in Dakar (Senegal). *Braz. Journal of Microbiol.* 37, 510-515.
- Beceiro, A., Tomás, M., Bou, G., 2013. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 185-230.
- Bergeron, N., 2010. Caractérisation phénotypique et génotypique d'isolats de *Salmonella* Typhimurium provenant de porcs sains ou septicémiques.
- Combari, A., 2014. in E.I.S.M.V. Niveau de contamination par les salmonelles antibiorésistantes des élevages de poulet de chair en zone péri-urbaine de Dakar. in *E.I.S.M.UCAD: Dakar* : 57, p. 57.
- Courvalin, P., Leclercq, R., Bingen, E., 2006. *Antibiogramme*. 2ième Edition. chapitre 3 : 21-32
- Crump, J.A., Luby, S.P., Mintz, E.D., 2004. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ.* 82, 346-353.
- Crump, J.A., Mintz, E.D., 2010. Global trends in typhoid and paratyphoid fever. *Clin. Infect. Diseases* 50, 241-246.
- Dione, M.M., Geerts, S., Antonio, M., 2012. Characterisation of novel strains of multiply antibiotic-resistant *Salmonella* recovered from poultry in Southern Senegal. *J. Infect.Dev.Cttries.* 6, 436-442.
- Dione, M.M., Ieven, M., Garin, B., Marcotty, T., Geerts, S., 2009. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolated from Broiler Farms, Chicken Carcasses, and Street-Vended Restaurants in Casamance, Senegal, *J. Food Protect*, pp. 2423-2427.
- Dione, M.M., Ikumapayi, U., Saha, D., Mohammed, N.I., Adegbola, R.A., Geerts, S., Ieven, M., Antonio, M., 2011. Antimicrobial resistance and virulence genes of non-typhoidal *Salmonella* isolates in The Gambia and Senegal. *The Journal of Infect. in Dev. Cttries.* 5, 765-775.
- Dione, M.M., Ikumapayi, U., Saha, D., Mohammed, N.I., Adegbola, R.A., Geerts, S., Ieven, M., Antonio, M., 2011. Antimicrobial resistance and virulence genes of non-typhoidal *Salmonella* isolates in The Gambia and Senegal. *J Infect Dev Cttries* 5, 765-775.
- Fàbrega, A., and J.Vila, 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* 26, 308-341.
- Fakhr, M.K., Nolan, L.K., Logue, C.M., 2005. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J.Clin. Microbiol.* 43, 2215-2219.
- Fofana, A., 2004. Etude de la résistance aux antibiotiques des souches de salmonella et escherichia coli isolees de la viande de poulet de chair au Sénégal, Mémoire DEA de productions animales. N° 06.
- Freney, J., Renaud, F., Hansen, W., Claude, B., 2000. *Précis de Bactériologie Clinique.*, Eska ed, p. 1137.
- Gassama - Sow, A., Wane, A.A., Diallo, M.H., Boye C.S-B., 2007. Genotypic characterization of antibiotic-resistant *Salmonella* Enteritidis isolates in Dakar, Senegal. *Infect dev Cttries* 1
- Gopinath, S., Carden, S., Monack, D., 2012. Shedding light on *Salmonella* carriers. *Trends Microbiol* 20, 320-327.

- Grimont, P.A.D., Weill, F.X., 2007. Formules antigéniques des sérovars de salmonella, 9 ed. OMS; Institut Pasteur, Paris, p. 167.
- Hensel, M., 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 294, 95-102.
- Hur, J., Jawale, C., 2012 Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from animals. *Food Res. Int* 45, 819–830.
- Le Minor, L., Sansonetti, P., Richard, C., Grimont, F., Mollaret, H.H., Bercovier, H., Alonso, J.M., 1989. Entérobactéries In "Bactériologie Médicale" Flammarion, Paris pp. 389-472.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 3140-3145.
- Malorny, B., Hauser, E., Dieckmann, R., 2011. New approaches in subspecies-level Salmonella classification. *Salmonella From Genome to Function*, 1-23.
- Maskell, D., 2006. *Salmonella infections: clinical, immunological and molecular aspects*. Cambridge University Press.
- Millemann, Y., 1998. Pathogenic power of *Salmonella*: virulence factors and study models. *Vet Res* 29 385-407.
- Oliveira, S.D.d., et al, 2003. Detection of virulence genes in *Salmonella Enteritidis* isolated from different sources. *J. Braz. of Microbiol.* 34, 123-124.
- Oludairo, O., Oladapo, K., K.P, J., Dzikwi, A.A., Junaid, K., 2013. Detection of inv A virulence gene by polymerase chain reaction (PCR) in *Salmonella* spp. isolated from captive wildlife. *Bio-Gen. Journal* 1, 12-14.
- P. A. D. Grimont, F.X.W., 2007. Formules antigéniques des sérovars de salmonella. OMS. Institut Pasteur Paris, p. 167.
- Perron, G.G., Quessy, S., Letellier, A., Bell, G., 2007. Genotypic diversity and antimicrobial resistance in asymptomatic Salmonella enterica serotype Typhimurium DT104. *Infect.Gen.Evol.* 7, 223-228.
- Ross, I.L., Heuzenroeder, M.W., 2004. Discrimination within phenotypically closely related definitive types of Salmonella enterica Serovar Typhimurium by the multiple amplification of phage locus typing technique. *J. Clin. Microbiol* 43, 1604-1611.
- Roumagnac, P., Weill, F-X., Dolecek, C., Baker, S., Brisse, S., Tran Chin N., Thi Anh Hong Le, Camilo J. Acosta, Farrar J., Dougan, G., Achtman, M., 2006. Evolutionary history of *Salmonella* Typhi. *Science*.
- Rowlands, R.E.G., Ristori, C.A., Ikuno, Alice A., Barbosa, M.L., Jakabi, M., Franco B.D.G. de Melo, 2014. Prévalence of drug resistance and virulence features in salmonella spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 56, 461-467.
- Sangal, V., 2008. Multilocus Sequence typing analyses of Salmonella enterica subspecies enterica: population structure, asymptomatic carriage and host association.
- Stepan, R.M., Sherwood, J.S., Petermann, S.R., Logue, C.M., 2011. Molecular and comparative analysis of *Salmonella enterica* Senftenberg from humans and animals using PFGE, MLST and NARMS. *BMC Microbiol.* 11, 153.
- Van Asten, A.J., and Van Dijk, J E, 2005. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44, 251-259.
- Weill, F.X., 2008. *Salmonella* : épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone des Laboratoires* N°400.
- Zou, M., Keelara, S., Thakur, S., 2012. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from humans by antimicrobial resistance, virulence genes, and pulsed-field gel electrophoresis. *Foodborne Pathog Dis.* 9, 232-238.

RESUME

Titre : Caractérisation phénotypique et génotypique des souches de salmonelles isolées de porteurs sains dans la banlieue de Dakar

Les salmonelloses constituent un problème majeur de santé publique surtout avec l'émergence de salmonelles multirésistantes. Le porteur sain, facteur important de dissémination des salmonelles dans l'environnement assure la transmission inter-humaine, importante surtout chez l'enfant.

Au Sénégal, des études sur les salmonelles en portage font défaut. Ainsi, ce travail a été réalisé pour déterminer le taux de portage de salmonelles, caractériser phénotypiquement et génotypiquement les souches de salmonelles isolées de porteurs asymptomatiques à Dakar.

C'est une étude communautaire prospective concernant cinq sites (Djedda Thiaroye Kao, Guinaw Rail Sud, Pikine Nord, Pikine Est, Guinaw Rail Nord) entre Janvier 2013 et Avril 2014. L'analyse phénotypique (Sérotypage, Antibiogramme) et l'analyse moléculaire (détection gènes de virulence par PCR simplex et le typage par Multi-locus Sequence Typing) a été réalisée à l'Unité de Bactériologie Expérimentale de l'Institut Pasteur de Dakar.

Seize (16) salmonelles, sur mille huit cent quatre vingt huit (1888) échantillons de selles, ont été identifiées soit un taux de portage de 0,84 % concernant une variété de sérovars (Brancaster, Chester, Poona, Agona, Johannesburg, Istanbul, Enteritidis, Corvalis).

Si toutes les souches de salmonelles étaient sensibles aux bêta-lactamines, environ 25 % étaient résistants à au moins un antibiotique (Acide nalidixique, Sulfaméthoxazole-Triméthoprim, Tétracycline). Tous les isolats présentaient la totalité des gènes de virulence (*invA*, *orfL*, *pipD*, *spiC*, *misL*) sauf le gène *spvR* retrouvé que chez le sérotype Enteritidis. Ceci traduit leur degré de pathogénicité donc leur capacité à provoquer des maladies.

La technique MLST a permis de constater que les sérotypes identiques phénotypiquement n'avaient aucune variation allélique. Ceci suggère que ces clones sont largement diffusés géographiquement et sont probablement en circulation dans un large éventail d'hôtes.

Deux nouvelles ST ont été découverts avec Chester et Brancaster.

Vu l'impact du portage pour la santé publique, il s'avère nécessaire de surveiller les porteurs asymptomatiques pour éviter la dissémination de ces souches hébergeant des gènes de virulence et / ou de résistance.

Mots clés : *Salmonella*, gènes de virulence, Résistance, Multi-locus Sequence Typing

