

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Abou Bekr Belkaid
Tlemcen Algérie



جامعة أبي بكر بلقايد

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE DE PROJET DE FIN D'ETUDE

Pour Obtenir le Diplôme de

Master En Alimentation et Nutrition

Présenté Par : Belabid Zahra

Soutenu le **22 Septembre 2014**, devant le jury composé de :

Mr. ARIBI. M
Mr. REBIAHI. S. A
Mr. Haddouche. M

Professeur
M.C.A
M.C.B

Président.
Encadreur.
Examineur.

Année Universitaire: 2014 /

2015

**Con
tribut
ion à
l'étu
de
de la
cont
amin
ation
des
ovop
rodu
its
par
*Salm
onell
a
typhi*
dans
la
régio
n de
Tle
mce**

I. Historique :

Eberth en 1880 découvre l'agent responsable de la fièvre typhoïde dont la culture de la bactérie a été possible en 1884 par Gaffky.

Le genre *Salmonella* a été utilisé après que le bactériologiste américain Daniel Salmon eut isolé en 1886 (**Encyclopédie ENCARTA 2004**), avec quelques collègues, une bactérie provenant du porc (maintenant connu comme *Salmonella Choleraesuis*) qui était considérée comme étant la cause de la fièvre porcine (choléra du porc). En 1896 Widal a mis en évidence la diversité antigénique des souches de salmonelles. A ce jour on a isolé plus de 2500 sérotypes de salmonelles.

Depuis les premières observations rapportées par Eberth jusqu'à nos jours, le genre *Salmonella* n'a pas cessé de présenter une importance considérable dans les domaines vétérinaires et sur le plan médical, tant par les pertes économiques dues à la maladie animale, que par la forte incidence chez l'homme ; des fièvres typhoïdes et des toxi-infections alimentaires à salmonelles (**Bornert, 2000**).

II. Taxonomie :

- Domaine: *Bacteria*.
- Phylum: *Proteobacteria*.
- Classe : Gammaproteobacteries.
- Ordre : Enterobacteriales.
- Famille : *Enterobacteriaceae*.
- Genre : *Salmonella*.
- Espèce : *Salmonella typhi*.

La nomenclature des salmonelles est particulièrement complexe car elle a fait l'objet de controverses et de confusions liées, principalement, à un avis de la "Commission Judiciaire". Le nouveau système (utilisation des nomenclatures validement publiées par l'opinion 80, couplée à l'interprétation taxonomique de (**Le Minor et Popoff, 1987**) et à l'interprétation taxonomique de (**Reeves et al., 1989**) est employée par un nombre toujours croissant de bactériologistes.

Il apparaît clairement que la "Commission Judiciaire" recommande l'utilisation du nouveau système. Ce nouveau système reconnaît que le genre *Salmonella* possède trois espèces :

- *Salmonella bongori*
- *Salmonella enterica* ou *Salmonella choleraesuis*.
- *Salmonella subterranea* (**Shelobolina et al., 2004**), qui est une souche bactérienne isolée d'un sédiment acide et contaminé par des nitrates et de l'uranium.

La seconde espèce la plus importante comprend six sous-espèces que sont (**Grimont et al., 2000**):

- I. *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*.
- II. *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*
- III. *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.
- IV. *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*.
- V. *Salmonella enterica* subsp. *indica*
- VI. *Salmonella enterica* subsp. *salamae*.

99.8% des souches isolées appartiennent à la sous-espèce III.

III. Salmonelles et poulets :

Le poulet, la dinde, le porc, le bœuf, les autres viandes et volailles constituent des sources importantes de protéine et d'autres nutriments. Malheureusement, ces aliments comme les œufs, le lait cru et tous les aliments crus d'origine animale peuvent aussi transporter la *Salmonella* et d'autres bactéries. La bonne nouvelle est que ces bactéries ne causent pas forcément de maladies. Parmi les sérotypes les plus fréquemment incriminés lors des toxi-infections à salmonelles *Salmonella Enteritidis*, Hadar et Virchow sont considérés comme assez typiques de la filière aviaire. Quoique moins spécifique des volailles, le sérotype Typhimurium est aussi très fréquemment rencontré dans les élevages de poulets, de dindes et de canards (**Rajashekra et al., 2000**). Le fort taux d'infection salmonellique des oiseaux d'élevage est la cause de la fréquente contamination des produits avicoles par les salmonelles (**Bornert, 2000**).

IV. L'origine exacte de la contamination des volailles par les salmonelles est encore mal connue mais l'on pense qu'elle serait liée à leur alimentation, à l'eau de boisson et à l'environnement.

Au cours des deux dernières décennies, *Salmonella Enteritidis* est devenu l'une des principales causes d'infection humaine, les œufs de poule étant l'une des sources majeures du pathogène. Ce fait est attribué à la capacité inhabituelle de ce sérovar à coloniser le tissu ovarien des poules et à être présent dans le contenu des œufs en coquille intacts (**FSIS, 1988**). Le poulet est le principal type de volaille consommé dans de nombreux pays à un pourcentage élevé. Ces poulets sont colonisés par des salmonelles durant la croissance, la peau et la chair des carcasses sont fréquemment contaminées par le pathogène pendant l'abattage et la transformation.

V. Microflore du tractus digestif :

Le gésier a une fonction importante comme un organe de barrière, qui empêche des bactéries pathogènes d'entrer dans le tube digestif distal (**Bjerrum et al., 2005**). Le tractus digestif de la volaille est totalement différent de celui des autres espèces animales en particulier avec un jabot, un intestin grêle très long, un gros intestin très complexe doté de deux ceca en « cul de sac » et d'un colon très court se terminant par le cloaque.

La microflore du jabot, qui compte beaucoup de lactobacilles (**Donald, 2004**), assure non seulement la production d'acides gras volatiles, mais également l'hydrolyse de l'amidon. Dans l'intestin grêle, la flore est beaucoup plus complexe et la recherche n'en est qu'au tout début tant en termes de quantification des souches que de connaissance de la complexité de l'écologie microbienne. La flore anaérobie domine dans la partie basse du tractus digestif. Le colon, très court, contrairement aux autres espèces animales, n'assure qu'un rôle de convoyeur du digesta. Enfin, les deux très longs ceca possèdent un orifice très étroit qui restreint l'entrée des fluides et des grosses particules.

L'ensemble du gros intestin est le siège de fermentations importantes, donc de la production d'acides gras volatiles, mais aussi de la synthèse vitaminique et de la digestion des fibres. Comme chez l'homme, le tractus digestif de la volaille est intimement lié au statut immunitaire et, plus généralement, à la santé de l'organisme dans son ensemble. L'alimentation et les supplémentations influent sur l'écologie microbienne.

L'intérêt pour cette microflore s'explique par trois facteurs :

- La recherche d'une utilisation optimale des nutriments.
- La prévention des pathologies aviaires.
- La sécurité de l'alimentation de l'homme par l'élimination des pathogènes.

L'on peut trouver des salmonelles dans l'intestin du bétail, de la volaille, des chiens, des chats et de beaucoup d'autres animaux.

VI. Biologie des salmonelles :

VI. 1. Définition des salmonelles :

Les salmonelles appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. En microscopie optique, elles apparaissent comme des bâtonnets à Gram négatif de 0,3 µm à 1µm de large et longs de 1 à 6 µm, mobiles grâce à une ciliature péritriche (à l'exception du sérovar Gallinarum-Pullorum). Les salmonelles sont des bactéries mésophiles se développant à des températures comprises entre 5,2°C et 47°C et de manière optimale entre 35 et 37°C, à des pH compris entre 4,5 et 9 avec une activité en eau (A_w) supérieur à 0,93.

La *Salmonella* est une bactérie naturellement présente dans l'intestin des animaux, en particulier chez les volailles et les porcs. Elle vit également dans l'environnement. La salmonelle peut survivre un an ou plus dans les aliments à faible activité d'eau (**ICMSF, 1996**). Les personnes qui consomment des aliments contaminés par *Salmonella* sont susceptibles de contracter la salmonellose.

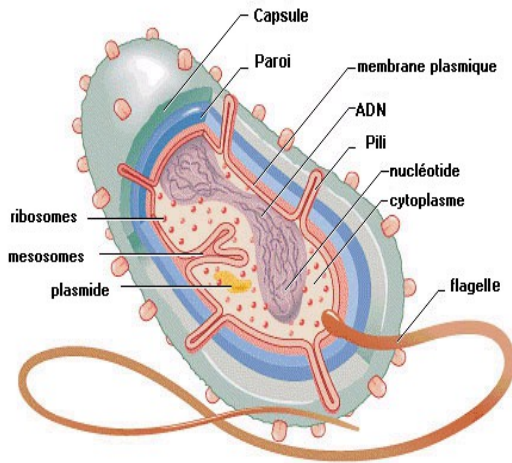


Figure 01 : Coupe de saumonelle
(http://www.interetgeneral.info/article.php3? Id_article=9632).

Figure 02: Salmonella Typhimurium
Envahissant des cellules humaines,
Microscope électronique à balayage
(Source: U.S. National Institute of

Health).

Tableau 01 : Symptomatologie des salmonelloses non typhiques (D'Aoust, 1991).

Symptômes	Salmonellose non typhique
Période d'incubation	8-72 heures
Diarrhée	+++ (liquide)
Douleurs abdominales	+++
Fièvre	+ (<48h)
Infection systémique	(S. Choleraesuis, S. Dublin)

Rare	
Durée	≤5 jours

Tableau 02 : Caractères généraux et classification des Salmonelles
(Le Minor, Popoff *et al.*, 1986).

+ : positif pour 90 à 100% des souches ; -- : négatifs pour 90 à 100% des souches ;

d : variable selon les souches

Propriétés et caractères biochimiques	<i>Salmonella enterica</i>						<i>S. bongori</i>
Habitat	Hommes et animaux à sang chaud			Animaux à sang froid et environnement			22
Sous-espèce	<i>Enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>Diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indiana</i>	
Nombre de sérovars (2005)	1504	502	95	333	72	13	
<u>Caractères biochimiques</u>							
ONPG (2h)	-	-	+	+	-	d	+
Gélatinase à 36°C	-	+	+	+	+	+	-
β-glucuronida	d	d	-	+	-	d	-

se							
γ-glutamyl transférase	d	+	-	+	+	+	+
Culture sur KCN	-	-	-	-	+	-	+
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Galacturona te	-	+	-	+	+	+	+
L(+)-tartrate	+	-	-	-	-	-	-
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-
Lyse par le phage O1	+	+	-	+	-	+	+

VI.2. Pouvoir pathogène des salmonelles :

Le pouvoir pathogène est différent pour les salmonelles typhiques, paratyphiques et pour les salmonelles non typhiques.

VI.2.1. *Salmonella* typhique et paratyphique

Les *Salmonelles* responsables des fièvres typhoïdes ayant l'homme pour seul réservoir, la contamination se fait par ingestion d'eau ou d'aliments ayant subi une contamination fécale d'origine humaine. Comme toutes les maladies à transmission oro-fécale, ces fièvres surviennent le plus souvent dans des zones où l'hygiène est précaire, et frappent principalement les pays en développement en Asie, en Afrique ou en Amérique Latine. Les données mondiales les plus récentes font état de 17 millions de cas annuels de fièvre typhoïde, et de 600 000 morts (**Hu et Kopecko, 2003**).

Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes sont causées par des *Salmonella* strictement adaptées à l'homme, *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi* A et certaines souches de *Salmonella Paratyphi* B.

Après une période d'incubation de une à deux semaines, survient une fièvre continue accompagnée de maux de tête, d'anorexie, d'abattement ("tuphos" torpeur en grec), de douleurs abdominales avec diarrhée ou constipation. Dans les formes bénignes, l'état reste stationnaire pendant une quinzaine de jours puis la convalescence dure plusieurs semaines. Dans les formes plus graves où des complications peuvent survenir au niveau de l'intestin, du cœur ou de la vésicule, la fièvre typhoïde peut être fatale en l'absence de traitement. Le taux de mortalité est de 10% comparé à moins de 1% pour les autres formes de salmonellose. Une antibiothérapie appropriée abaisse le risque de mortalité à moins de 1%, mais on isole de plus en plus de souches résistantes aux antibiotiques : au Vietnam, 75% des souches isolées sont résistantes aux antibiotiques classiquement utilisés, contre moins de 1% en France. Il existe de plus un portage chronique de *Salmonella Typhi* : après guérison d'une fièvre typhoïde, 2 à 5% des individus continuent à excréter ces bactéries. Les symptômes des fièvres paratyphoïdes sont similaires, mais le plus souvent moins sévères, le taux de mortalité de cette salmonellose étant par ailleurs bien plus bas que celui de la fièvre typhoïde.

VI.2.2. *Salmonella* non typhique

La salmonellose est une maladie grave qui peut même parfois être mortelle. La salmonellose est la zoonose la plus fréquente dans les pays européens. L'infection survient habituellement après l'ingestion de produits d'origine animale. Les salmonelles peuvent être présentes dans toute une série de denrées alimentaires telles que les œufs crus, la volaille, le porc, le bœuf, d'autres produits à base de viande et les produits laitiers.

Les gastro-entérites sont provoquées par des *Salmonella* ubiquistes présentes chez l'homme et les animaux. La durée d'incubation est généralement de 1 à 2 jours et dépend de la dose ingérée, de la santé de l'hôte et des caractéristiques de la souche

de *Salmonella*. Les salmonelloses provoquent une forte fièvre accompagnée de diarrhées, vomissements et douleurs abdominales. Chez des adultes de condition physique normale, une gastro-entérite disparaît sans traitement après 3 à 5 jours en moyenne. En revanche, une antibiothérapie doit être prescrite chez les personnes âgées, les nourrissons, ou les personnes immunodéprimées chez lesquelles l'infection peut être plus sévère, voire mortelle.

Les principaux symptômes de la salmonellose (infections non typhoïdiques) sont la diarrhée non sanglante, les douleurs abdominales, la fièvre, les nausées et des vomissements qui surviennent généralement 12-36 heures après l'ingestion. Toutefois, les symptômes peuvent varier considérablement depuis une maladie grave rappelant la typhoïde jusqu'à l'infection asymptomatique. La maladie peut également entraîner des complications plus sérieuses. Chez les sujets en bonne santé, la dose infective varie selon les sérovars, les aliments incriminés et la sensibilité des individus. Alors que certains (**Varnam et Evans, 1991**) ont pu montrer que 20 cellules pouvaient suffire à constituer une dose infective minimale, d'autres études ont régulièrement fait état d'un ordre de grandeur supérieur à 10^6 cellules (**Korsak et al., 2004**).

VI.2.3. Caractères biochimiques des *Salmonella*

Les *Salmonella* possèdent les caractères généraux de la famille des *Enterobacteriaceae* et des caractères différentiels intrinsèques.

VI.2.3.1. Caractères de famille

Huit principaux caractères déterminent la famille des *Enterobacteriaceae*, ce sont :

1. bacilles à coloration de Gram négatif ;
2. souvent mobiles grâce à leur ciliature péritriche (rarement immobiles), non sporulés ;

3. bacilles qui cultivent sur les milieux ordinaires ;
4. bacilles aéro-anaérobies facultatifs ;
5. bacilles qui fermentent le glucose avec ou sans production de gaz ;
6. bacilles qui réduisent les nitrates en nitrites ;
7. bacilles qui ne possèdent pas de cytochrome oxydase (**Hanes, 2003; ICMSF, 1996**) ;
8. bacilles qui possèdent une catalase ;

Certaines souches n'obéissent pas à tous ces caractères, c'est le cas de : *Erwinia* qui ne réduit pas les nitrates, de *Shigella dysenteriae* sérotype 1 (SD1) qui ne possède pas de catalase, de *Salmonella galinarum-pullorum* qui est immobile.

VI.2.3.2. Caractères différentiels du genre *Salmonella*

Les principaux caractères biochimiques permettant l'identification du genre *Salmonella* (**Humbert et al., 1998**) sont :

- L'absence d'une uréase active, de tryptophane ou de phénylalanine désaminase ;
- l'absence de production d'indole et d'acétoïne (test de Voges-Proskauer négatif) ;
- La production d'hydrogène sulfureux à partir du thiosulfate (présence d'une thiosulfate réductase) ;
- La décarboxylation fréquente de la lysine et de l'ornithine ;
- La pousse fréquente sur le milieu au citrate de Simmons.

Tableau 03: Caractères biochimiques d'identification de *Salmonella*.

Milieux	Caractères biochimiques	<i>Salmonella</i> non typhiques	<i>Salmonella</i> typhiques	
			S.Typhi	S.Paratyphi A
Milieu Hajna-Kligler	Glucose	+	+	+
	Gaz	+	-	
	H ₂ S	+	+(faible)	
	Lactose	+/-		
Milieu urée-indole	Uréase	-	-	-
	Indole	-	-	
Milieu glycérol	Glycérol	-	-	
Milieu LDC	LDC	+	+	

VI.2.4. Antigènes des *Salmonella*

Les *Salmonella* peuvent posséder trois types d'antigènes présentant un intérêt diagnostique (**Dumas, 1958**).

VI.2.4.1 Antigène somatique O (Ag O)

L'antigène O est un antigène de la paroi. Les antigènes O sont portés par les chaînes spécifiques du lipopolysaccharide (LPS). L'antigène O possède des propriétés immunisantes, c'est un complexe contenant une protéine, un polysaccharide et un composé phospholipidique. On distingue 67 facteurs O selon la nature des sucres entrant dans la constitution des unités oligosaccharidiques du polysaccharide (**Humbert et al., 1998**).

Les antigènes O sont formés d'une fraction lipidique appelée lipide A qui est responsable des effets toxiques, du core ou partie basale et du polysaccharide support de la spécificité (**Gledel et Corbion, 1991**).

Les antigènes sont classés en facteurs O majeurs et en facteurs O accessoires. Les facteurs majeurs sont liés à la présence de certains sucres (abéquose pour O : 4, tyvélose pour O : 9) (**Humbert et al., 1998**).

L'antigène somatique est stable ; il résiste à l'alcool et au phénol pendant deux heures et demi à la température de 100°C (**Dumas, 1958**).

VI.2.4.2 Antigène flagellaire (Ag H)

C'est un polymère de flagelline (protéine de structure des flagelles). Cet antigène est thermolabile, détruit par la chaleur à 100° C, par l'action de l'alcool et par les ferments protéolytiques. Il résiste au formol et perd son agglutinabilité par les anticorps en présence d'alcool et d'acide phénique. Son développement optimum s'obtient sur les milieux liquides mous après un séjour de 8 heures à 37 °C (**Dumas, 1958**). La grande majorité des sérovars possèdent deux systèmes génétiques et peut exprimer alternativement deux spécificités différentes pour leur antigène flagellaire. On dit que les antigènes flagellaires de *Salmonella* sont diphasiques (**Humbert et al., 1998**).

VI.2.4.3 L'antigène de virulence (Ag Vi)

C'est un antigène de l'enveloppe, il a été identifié chez trois types de sérovars : Typhi, Paratyphi C et Dublin mais toutes les souches de ces sérovars ne possèdent pas forcément cet antigène (**Humbert et al., 1998**).

Cet antigène est considéré comme un antigène de surface (**Dumas, 1958**), il est distinct de l'antigène somatique et de l'antigène flagellaire. L'antigène Vi rend les germes inagglutinables par les anticorps O quand il est abondant. Il ne se développe pas si les cultures sont effectuées au dessous de 25°C et au dessus de 40°C. Un chauffage à 100°C le détruit et les germes deviennent agglutinables par les anticorps O. Il est de nature glucidolipidopolypeptidique.

A côté de ces antigènes il existe dans le genre *Salmonella*, des structures protéiques de surface : les pilis qui se différencient en pilis communs (intervenant dans l'hémagglutination mannose dépendante) et en pilis sexuels (intervenant dans la conjugaison bactérienne) et dont la présence est codée par des plasmides (**Gledel et Corbion, 1991**).

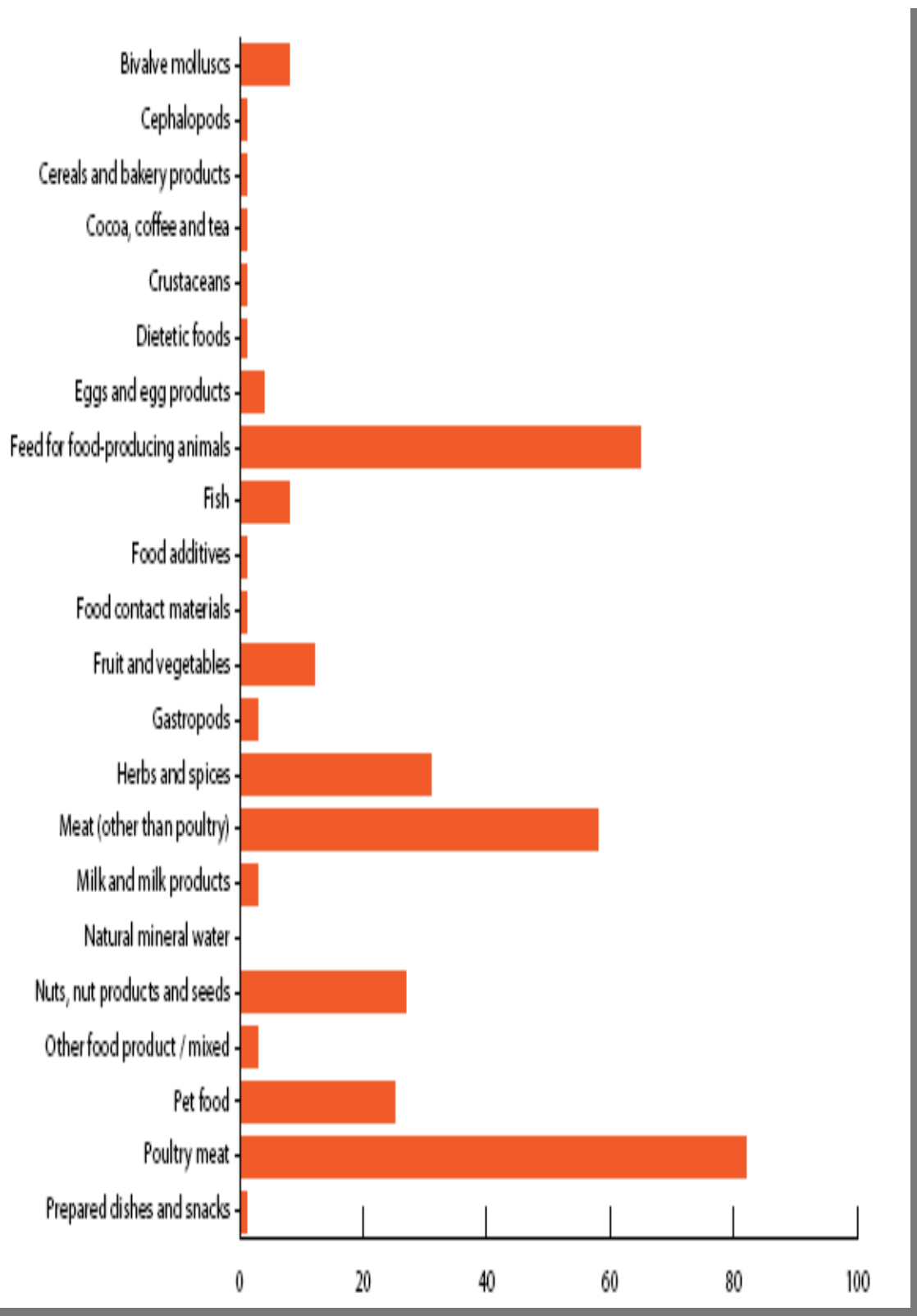
VI.2.5. Voies de transmission :

La principale voie de contamination pour l'homme est alimentaire (**D'Aoust 1994; Angulo et Johnson, 2000**). **Mead (1999)** estime en effet que l'alimentation est, aux Etats-Unis, la cause de 95% des infections à salmonelles (**Mead et Slutsker, 1999**). L'infection résulte alors de la consommation d'aliments contaminés. Pour ceux-ci, la contamination peut être intrinsèque, comme cela peut être le cas pour les œufs (**Tauxe 1997; Rabsch, Tschäpe et al., 2001**), ou secondaire, suite au contact avec des matières fécales lors de l'abattage pour les aliments issus d'animaux contaminés, ou encore avec une surface ou un autre aliment contaminé lors de la préparation ou de la transformation des denrées ; on parle alors de contamination croisée.

Cependant, la contamination peut également avoir lieu par contact avec des animaux infectés, notamment avec des animaux de compagnie et des NAC (Nouveaux Animaux de Compagnie) (**Woodward et Khakhria, 1997 ; De Jong et Andersson, 2005; Swanson, Snider et al., 2007**). Une équipe américaine a ainsi attiré l'attention sur la nécessité de tenir compte de ces voies de transmission non alimentaires dont l'importance serait sous-estimée selon eux (**Barber, Miller et al., 2003**).

Une étude d'attribution récente (**Evers, Van Der Fels-Klerx et al., 2008**) concernant *Campylobacter*, autre pathogène zoonotique majeur, vient à l'appui de cette idée. Il y apparait que la transmission par contact direct avec des animaux serait une voie majeure de transmission de ce pathogène. Ces derniers résultats sont cependant à prendre avec précaution en raison de fortes incertitudes liées à la méthode utilisée.

Figure



03 : Nombre de notifications auprès du RASFF (Rapid Alert System for Food and

Feed) selon le type de produits pour *Salmonella* en 2008 (**Anonyme 2009**).

VI.2.6. Thermorésistance de salmonella dans les produits alimentaires :

La contamination par *Salmonella* des produits alimentaires est pauci microbienne (faible contamination) et superficielle, ce qui fait que la cuisson adéquate permet une élimination totale de ces germes. La cuisine inadéquate a été citée comme un contribuant facteur dans 67% des premières manifestations dans lesquelles la *Salmonella* était agent de l'étiologie (**Bean et Griffin, 1990**). Ces premières manifestations ont impliqué une variété de nourritures, y compris viande et volaille, lait, glace, fromage, œufs et produits de l'œuf, chocolat, et épices, comme véhicules de transmission (**D'aoust, 1989**).

La salmonelle est reconnue comme étant la cause principale des fièvres entériques et des gastro-entérites. Elle est sensible à la chaleur, et capable de se développer à une température maximale de 49,5°C. Les pratiques de sécurité alimentaire ordinaires sont capables de détruire la *Salmonella* et les autres bactéries. Comme chez toutes les autres viandes ou poissons, l'on peut trouver des bactéries dans le poulet cru ou peu cuit. La majorité d'entre elles se multiplient rapidement au cours du stockage en dehors du réfrigérateur et avant la cuisson. La congélation ne tue pas les bactéries, seule une cuisson au-delà de 100°C les élimine (**FSIS, 1998**). Le poulet cru doit être manipulé avec précaution afin d'éviter les contaminations croisées.

Cela peut arriver si le poulet cru ou ses sucs sont mis en contact avec des aliments cuits ou crus (salade) qui vont être consommés. Par exemple, cela arrive si l'on coupe des tomates sur une planche à découper non nettoyée sur laquelle on a préalablement découpé du poulet cru. *Salmonella Enteritidis*, un des sérovars des salmonelles, est en particulier associé à la volaille et aux œufs avec leur coquille. Une cuisson adéquate la tue mais cette bactérie se trouve dans des aliments faits à la main, comme une salade au poulet par exemple. Les souches thermorésistantes de *Salmonella* sont rares et la thermorésistance est influencée par l'activité de l'eau. Elle augmente quand l'activité de l'eau du substrat diminue (**ICMSF, 1996**).

Ainsi des études effectuées (**Denis et al., 1992**), ont montré que la thermorésistance de *Salmonella Enteritidis* est multipliée par un facteur de 7 à 60°C dans l'œuf entier salé à 11% ($A_w = 0,91$) par rapport à l'œuf entier nature ($A_w = 0,98$). Des *Salmonella* "habituées" à des milieux relativement secs (A_w , de 0,95) ont une résistance thermique plus élevée.

La persistance de l'exposition à une faible activité en eau réduit cependant la thermorésistance (**Mattick, 2000**).

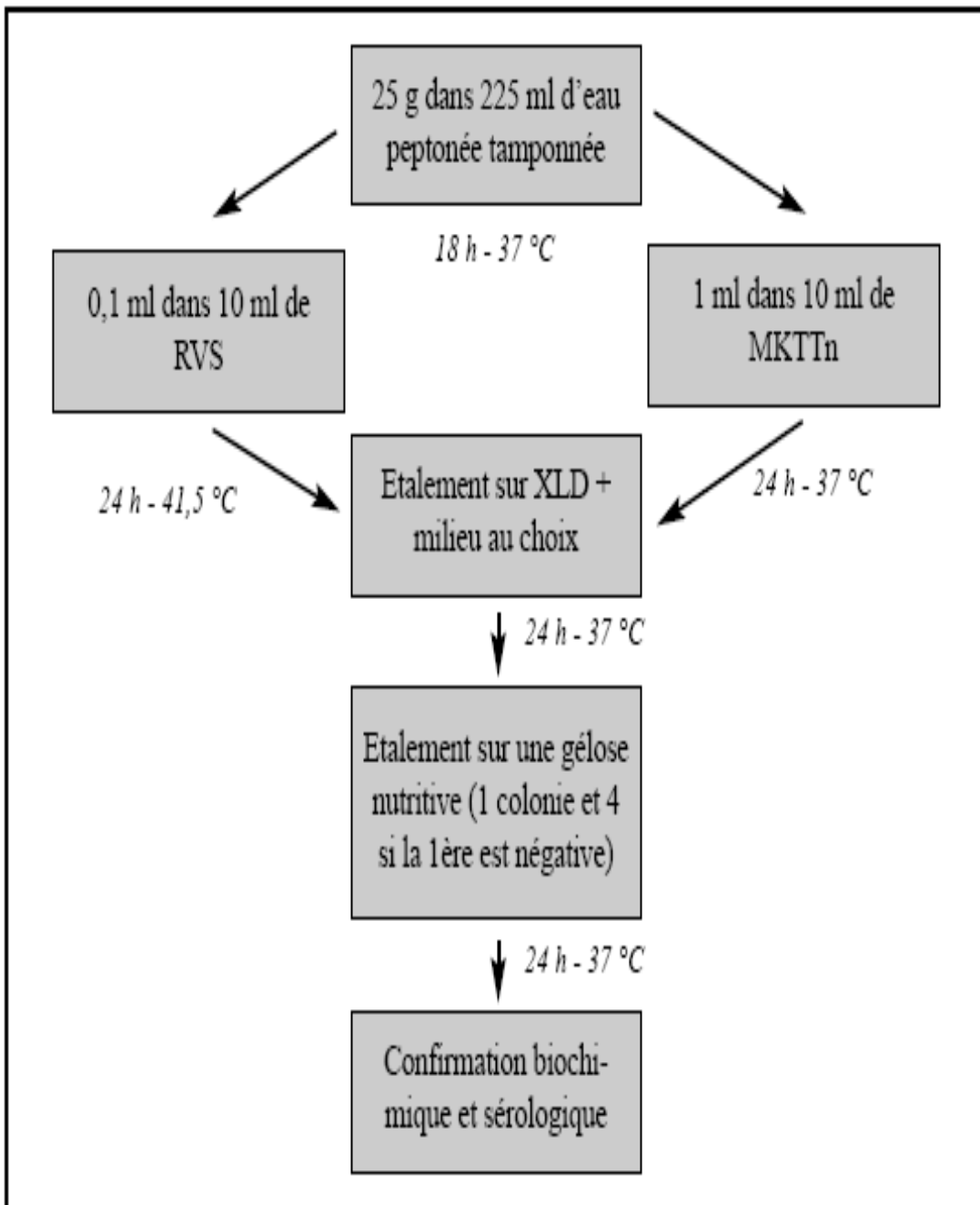


Figure 04 : Détection de *Salmonella* spp. dans les aliments selon la méthode normalisée ISO 6579 :2002 – Mode opératoire (Korsak 2004) (RVS, MKTTn, XLD désignent des milieux de culture de composition spécifique).

VI.2.7. Dynamique de la contamination humaine :

Les salmonelles sont à l'origine soit d'infections en apparence isolées, dites sporadiques, les plus nombreuses (**Tauxe 1997**), soit de phénomènes épidémiques : cas groupés ou foyers appelés encore toxi-infections alimentaires collectives (TIAC, définies comme au moins deux cas d'infection d'une même maladie survenant chez des personnes ayant partagé le même repas). Les **TIAC** ont évolué ces dernières décennies (**Tauxe 1997**), avec l'industrialisation et la globalisation des approvisionnements.

Aux foyers restreints, liés à un aliment fortement contaminé consommé par un petit groupe de personnes (lors d'un rassemblement familial par exemple), se sont ajoutées des épidémies de plus grande ampleur, diffuses, pouvant impliquer plusieurs pays et des centaines de cas (**Ammon et Tauxe 2007**), et qui sont liées à une plus faible contamination d'aliments largement distribués. Ces dernières sont beaucoup plus difficiles à détecter.

Différents facteurs jouent sur la contamination humaine : dose ingérée (**Bollaerts, Aerts et al., 2008**), Susceptibilité de la personne (degré d'immunité), mais également virulence et pathogénicité de la souche ingérée qui dépend notamment du sérotype (**Coleman, Marks et al., 2004**). Ainsi, la contamination d'un aliment seule ne suffit pas à prédire les infections qui vont résulter de sa consommation. Et ceci d'autant moins que tous les aliments ne vont pas avoir la même capacité à véhiculer les salmonelles ; celle-ci varie selon leurs propriétés physico-chimiques, selon le process de fabrication mais aussi selon le mode de consommation (**D'Aoust 1989**). Ainsi, une mayonnaise à base d'œufs crus sera potentiellement plus « contaminante » qu'un morceau de bœuf consommé en ragoût.

Globalement la relation dose-réponse (en termes d'infections), sera à considérer pour un couple sérotype-aliment (**Bollaerts, Aerts et al., 2008**).

VI.2.8. Evolution des infections à salmonelles :

Salmonella est un danger en constante évolution, doté d'une forte capacité adaptative. Dans les dernières années, deux phénomènes majeurs illustrent cela (**Rabsch, Tschäpe et al., 2001**).

Ainsi, dans les années 80, émerge aux Etats-Unis et en Europe le sérotype Enteritidis qui est particulièrement associé aux espèces aviaires et à la capacité de provoquer une infection Trans-ovarienne et par conséquent de contaminer les œufs. Rapidement, l'épidémie devient une pandémie mondiale et depuis des années, Enteritidis caracole en tête des classements de sérotypes parmi les cas humains (**Rabsch, Tschäpe et al., 2001**). C'est également le sérotype le plus souvent identifié lors de cas groupés ou foyers épidémiques.

Les raisons de l'émergence et du succès fulgurant de ce sérotype ne sont à l'heure actuelle pas connues. L'hypothèse d'introduction d'une souche d'Enteritidis par un rodenticide (Salmonella étant utilisée comme agent biologique pour lutter contre les rongeurs) a été écartée et les hypothèses vont plutôt vers l'occupation d'une niche écologique restée vacante suite à l'éradication des salmonelles de sérotype Gallinarum chez le poulet (**Rabsch, Tschäpe et al., 2001**). Il reste que ce sérotype particulièrement pathogène demeure le plus représenté parmi les cas humains avec Typhimurium dans la majorité des pays occidentaux (**Galanis, Lo Fo Wong et al., 2006; Maraki, Samonis et al., 2006; Kirk, McKay et al., 2008; Anonyme 2009**).

Plus récemment, Salmonella a acquis le statut de risque émergent par l'acquisition de résistances aux antibiotiques (**Sofos 2008**). Deux points sont ici en cause : d'une part la multi-résistance, et d'autre part l'émergence et la diffusion de résistances aux quinolones

(**Molbak, Gerner-Smidt et al., 2002**) et aux céphalosporines de troisième génération (C3G)

(**Miriagou, Tassios et al., 2004; Devasia, Varma et al., 2005**), classes d'antibiotiques critiques pour les traitements thérapeutiques chez les populations à risques et notamment les enfants (**Dupont, 2007**).

En effet, outre le risque d'échec thérapeutique en cas de résistance, il a été montré que la multi-résistance et/ou les résistances aux quinolones et C3G sont associées chez les salmonelles à une morbidité et une mortalité accrues (**Molbak, 2005**).

Les mécanismes qui y sont associés seraient un avantage sélectif en cas de traitement antibiotique préalable (**Glynn, Reddy et al., 2004**), et une virulence accrue liée à des co-sélections de gènes de virulence avec les gènes de résistance (**Molbak, 2005**). La multi-résistance, associée ou non aux résistances au fluor quinolones et C3G, est particulièrement associée au sérotype Typhimurium et au clone DT104, qui représente une part importante des souches de tel- Typhimurium (**Rabatsky-Ehr, Whichard et al., 2004**). Pour ce clone, les gènes de la pentarésistance sont situés sur le chromosome, dans l'îlot génomique SGI1 (**Velge, Cloeckert et al., 2005**), et non sur des éléments génétiques mobiles, et la multi-résistance y est donc très stable.

Ainsi, les salmonelles restent une cause majeure de gastro-entérites sévères, malgré un nombre de cas stables (**Anonyme 2005**) voire en décroissance (**Anonyme 2009**) sur les dernières années. Elles représentent de plus un danger en constante mutation. L'incidence importante des salmonelloses ainsi que l'émergence de la multi-résistance et de résistances à des antibiotiques critiques en thérapeutique humaine, dans un contexte où le danger de l'antibiorésistance fait l'objet de toutes les attentions, notamment en France (**Sabuncu, David et al., 2009**), en font un enjeu sanitaire de premier ordre.

VI.2.8. Enjeux commerciaux :

Les salmonelles sont la première cause de signalement de contamination par des microorganismes pathogènes dans les aliments au niveau européen en **2008 (Anonyme 2009)**.

Or, en raison de l'obligation réglementaire d'absence de salmonelles dans certains aliments, dont les produits d'origine animale (**Règlement 2073/2005/EC**), la détection d'une contamination se traduit par le retrait de l'aliment incriminé.

Par ailleurs, les critères de contamination microbiologique peuvent donner lieu à des restrictions concernant les importations. Ainsi, la Commission Européenne a mis en place une politique de lutte contre les agents zoonotiques, dont *Salmonella*, qui lui permettra d'exiger des pays tiers qu'ils fournissent des denrées présentant des garanties sanitaires équivalentes à celles exigées dans l'Union Européenne (**Beloeil 2007**).

La Suède, précurseur en matière de lutte contre les salmonelles en élevage, bénéficie d'ores et déjà d'un statut « *Salmonella free* » qui lui permet d'imposer des tests supplémentaires sur les denrées d'origine animale importées.

Enfin, le risque alimentaire est parfois mis en lien avec des enjeux identitaires, comme c'est le cas au Danemark (**Delavigne 2001**), ce qui est à l'origine de réflexes protectionnistes. D'une part, des interventions de grande ampleur et dans plusieurs filières (poule pondeuse, poulet de chair et porc) ont été mises en place afin d'éradiquer le risque domestique de salmonelles (**Wegener, Hald et al., 2003**).

D'autre part, des publications scientifiques issues du Danemark, mais aussi de pays scandinaves, pointent le danger *Salmonella* lié aux voyages ou encore aux produits importés (**Kapperud, Lassen et al., 1998; Hald, Vose et al., 2004; Sahlstrom, de Jong et al., 2006; de Jong et Ekdahl 2006; Hald, LoFo Wong et al., 2007**). Tout comme les communiqués des autorités nationales, elles alimentent le rejet des produits étrangers (**Delavigne 2001**) et elles peuvent être utilisées pour justifier la volonté d'appliquer des

mesures restrictives aux frontières, justification scientifique exigée par les accords SPS (sanitaires et phytosanitaires) de l'OMC et la Food Law européenne.

Pour un pays comme la France, pays d'élevage et grand producteur de denrées animales, les enjeux commerciaux relatifs à la problématique salmonelles sont importants : image des filières, contraintes à l'export, coût des mesures préventives. En effet, les mesures à mettre en place tout au long de la chaîne alimentaire, de l'élevage à la distribution afin de limiter le risque salmonelles (dépistage, gestion des porteurs, mesures d'hygiène, auto-contrôles...) ont un coût qui se répercute sur le prix de production (**Wegener, Hald et al., 2003**) et donc sur la compétitivité des filières.

VI.2.9. La lutte contre les salmonelles :

Les salmonelles, comme souligné précédemment, sont des pathogènes zoonotiques ubiquitaires, présents tout au long de la chaîne alimentaire, de l'élevage à l'assiette. De nombreux pays ont mis en place des plans de lutte contre ce pathogène, ciblant divers points du continuum de la chaîne alimentaire avec un certain succès (**Edel 1994; Wegener, Hald et al., 2003; Gillespie et Elson 2005; Rostagno, Hurd et al., 2005; Poirier et Watier 2008**).

II.1 Définition

Après la ponte, il est possible que les œufs soient contaminés par *S. Enteritidis* à travers la coquille de l'œuf quand l'œuf est contaminé par des matières fécales (**Gast et Beard, 1990 ; Barrow et Lovell, 1991 ; Humphrey et al., 1991**). Il est également possible que la contamination ait lieu directement dans le jaune d'œuf, le blanc d'œuf, la membrane interne de la coquille ou la coquille même avant la ponte de l'œuf, suite à l'infection du système de reproduction de la poule pondeuse (**Timoney et al., 1989 ; Shivaprasad et al., 1990**).

II.2 La contamination de la surface de l'œuf et la pénétration à travers la coquille

Une multitude de sérotypes a été isolé de la coquille des œufs (**de Louvois, 1993**) y compris *S. Enteritidis* (**Humphrey 1994 ; Schutze et al., 1996**). La présence de *Salmonella* sur la surface extérieure de la coquille de l'œuf et contamination du contenu de l'œuf présente une menace pour la santé publique. La surface peut être contaminée soit dans la partie distale de l'oviducte, soit par le biais d'une contamination fécale. Plusieurs chercheurs ont investigué la possibilité d'une pénétration à travers la coquille de l'œuf dans des conditions de laboratoire avec différents sérotypes de *Salmonella* tels que, par exemple, *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* (**Javed et al., 1994 ; Miyamoto et al., 1998 ; Wang et Slavik, 1998 ; Berrang et al., 1999**).

Sur base de ces expérimentations, on a émis l'hypothèse que le contenu de l'œuf pouvait être contaminé immédiatement après la ponte par des bactéries passant à travers les pores ou des fissures dans la coquille. Dans la pratique cependant, ce phénomène ne semble pas très fréquent puisque la panoplie de sérotypes que l'on trouve à la surface de la coquille, n'est pas du tout semblable à celle retrouvée à partir du contenu de l'œuf. En effet, à l'intérieur de l'œuf, on retrouve presque exclusivement *S. Enteritidis* (**De Buck et al., 2004**). Quelques rapports dans la littérature scientifique suggèrent que le contenu de l'œuf serait contaminé surtout pendant le passage dans le cloaque plutôt que par infection de l'ovaire (**Barrow et Lovell, 1991**).

Afin de faire une distinction entre une contamination de la surface de l'œuf provenant de l'environnement, et une contamination qui a lieu durant la formation de l'œuf, on ne peut pas se contenter de faire des cultures de la coquille entière. Certains auteurs ont approfondi cette problématique en immergeant l'œuf entier dans le milieu de culture et en faisant ensuite des cultures de coquilles après avoir assuré la désinfection préalable de leur surface (**Okamura et al., 2001**).

Cette approche a permis de faire une distinction entre une contamination de la surface et une contamination de la membrane de la coquille qui elle a lieu pendant la formation de l'œuf.

3. Contamination de l'œuf pendant sa formation :

Etant donné que *S. Enteritidis* est le sérotype prépondérant dans le contenu de l'œuf (**Mawer et al., 1989**) et que le rapport entre la fréquence de contamination du contenu de l'œuf et de l'extérieur de la coquille par *S. Enteritidis* est faible (**Humphrey et al., 1994**) il est probable que la contamination du contenu de l'œuf ait lieu pendant sa formation dans le tractus reproducteur de la poule. Par ailleurs, des études sur la contamination des œufs pondus par des poules infectées expérimentalement n'ont pas permis de mettre en évidence une relation entre le portage intestinal/fécal et la présence de la bactérie dans le contenu de l'œuf (**Humphrey et al., 1991**). De plus, des *S. Enteritidis* peuvent être isolées du système reproducteur de poules pondeuses en l'absence de colonisation intestinale (**De Buck et al., 2004**). *S. Enteritidis* a été isolé du jaune aussi bien que du blanc d'œuf provenant de poules infectées (**Humphrey et al., 1991**). La plupart des auteurs concluent que l'albumen constitue le compartiment de l'œuf le plus fréquemment contaminé (**Shivaprasad et al., 1990 ; Humphrey et al., 1991 ; Humphrey, 1994**).

Cette contamination du blanc d'œuf aurait lieu pendant le passage de l'œuf dans l'oviducte (**Gast and Beard, 1990 ; Shivaprasad et al., 1990 ; Humphrey et al., 1991**). Plusieurs auteurs suggèrent même que *S. Enteritidis* passerait dans les œufs le plus

fréquemment au niveau de la partie supérieure de l'oviducte, associé à l'albumen (**Gast et Beard, 1990 ; Shivaprasad et al., 1990**).

Après coloration immunohistochimique, on a même retrouvé *S. Enteritidis* associée aux cellules sécrétoires du magnum supérieur et inférieur (**Hoop et Pospischil, 1993**), ce qui pourrait expliquer pourquoi la bactérie contamine le blanc de l'œuf. Par contre, la contamination du jaune d'œuf indiquerait une contamination de l'ovaire.

La coquille de l'œuf et la membrane interne de la coquille sont produites dans la partie plus distale de l'oviducte.

Il est tout à fait possible que ces segments de l'oviducte soient également contaminés. Plusieurs chercheurs y ont trouvé une contamination fréquente de la coquille et de la membrane interne de la coquille (**Humphrey et al., 1991 ; De Buck et al., 2004**).

Certains auteurs sont même arrivés à la conclusion que ce sont les endroits les plus fréquemment contaminés (**Miyamoto et al., 1998 ; Okamura et al., 2001**). Étant donné que *S. Enteritidis* peut pénétrer à travers la coquille, il reste néanmoins difficile de faire la distinction entre une contamination pendant la formation de l'œuf ou après la ponte de celui-ci. Dans le cas des œufs fécondés, une contamination de la membrane interne de la coquille peut mener à la situation que le poussin ne sera contaminé que tardivement et, parfois même, seulement au moment de l'éclosion.

4. Mesures de prévention et de contrôle Mesures à prendre au niveau de la production :

Toute une série de mesures de prévention et de traitement sont disponibles à l'heure actuelle chez la volaille. La première mesure est de n'introduire que des poussins indemnes dans

les bâtiments, ce qui implique que les parentales et les grands parentales soient indemnes de *Salmonella* afin d'éviter la transmission verticale. La mesure préventive la plus répandue est sans doute la vaccination. La vaccination est certainement efficace pour les

Chapitre II

La contamination des œufs

poules pondeuses, tandis que pour les poulets à l'engraissement, l'utilité de la vaccination peut être mis en doute, vu la courte durée de vie de ces animaux. On trouve sur le marché des vaccins atténués et inactivés qui permettent de réduire l'excrétion et la circulation de *Salmonella* (Nassar et al., 1994 ; Feberwee et al., 2001 ; Holt et al., 2003). Ces vaccins ont été développés avec des méthodes plutôt empiriques et il manque encore des données scientifiques pour savoir si ceux-ci sont capables de réduire également le taux de contamination des œufs.

Les développements récents en génétique et en biologie moléculaire permettent de construire des souches mutées de *Salmonella* qui ne persistent pas dans les tissus de l'hôte tout en induisant une protection maximale. De tels vaccins génétiquement modifiés ont été testés chez la volaille en conditions expérimentales. Leur autorisation de mise sur le marché est attendue (Zhang-Barber et al., 1999). La vaccination des parentales et des poules pondeuses est sans aucun doute une mesure importante de prévention et de contrôle qui permet de réduire le niveau de contamination de l'ensemble du secteur de la volaille.

A côté des vaccins, on retrouve également sur le marché une gamme impressionnante d'additifs alimentaires anti-*Salmonella* utilisés chez la volaille et grâce auxquels une réduction du niveau de contamination de *Salmonella* est espérée. Ces produits sont destinés à réduire l'excrétion fécale et à réduire aussi la colonisation du tractus digestif. Cette réduction de l'excrétion fécale amènera une diminution des taux de contamination de l'environnement et par conséquent le risque de contamination horizontale devrait diminuer. Des mesures hygiéniques doivent nécessairement être prises simultanément, de sorte que l'hygiène et les additifs puissent agir de concert sur les taux de contamination de l'environnement. Ces produits sont généralement surtout utiles pour les poussins et pour les jeunes animaux.

Pour beaucoup d'additifs alimentaires, peu de données scientifiques prouvant leur efficacité sont toutefois disponibles. Tout ceci rend le choix des produits à utiliser difficile pour les éleveurs. A l'heure actuelle, on emploie souvent des préparations à base d'acides, qui sont ajoutés soit à l'eau de boisson, soit aux aliments.

Dans ce contexte, l'acide butyrique est un produit prometteur, puisqu'on a prouvé qu'il réduit l'invasion de *Salmonella* dans les cellules épithéliales de l'intestin. Il a été démontré que, même à des concentrations très basses, l'acide butyrique inhibe l'expression des gènes de virulence impliqués dans le phénomène d'invasion. De plus, on a trouvé que l'administration d'acide butyrique «protégé» par un enrobage (*coating*) dans les aliments réduit la colonisation de l'intestin des poussins par *Salmonella* (**Van Immerseel et al., 2005**).

Des acides gras à chaîne moyennement longue (C8–C12) ont les mêmes effets favorables (**Van Immerseel et al., 2005**).

Par ailleurs, ces derniers produits ont un effet antibactérien assez puissant. Parmi les additifs anti-*Salmonella* disponibles sur le marché, on retrouve également des prébiotiques. Par définition, les prébiotiques sont des ingrédients des aliments non-digestibles qui ont un effet favorable par la stimulation sélective de la croissance ou de l'activité d'un nombre restreint d'espèces bactériennes déjà présentes dans l'intestin (**Gibson et Roberfroid, 1995**). La flore intestinale peut transformer ces prébiotiques par fermentation en acides gras volatiles, ce qui peut conduire à une modification de l'ensemble de la flore.

Les fructo-oligosaccharides sont, par exemple, des prébiotiques qui stimulent les bifidobactéries et qui stimulent également la production d'acide butyrique. Chez la volaille, on sait depuis bon nombre d'années que supplémenter la ration avec des fructo-oligosaccharides permet de réduire la colonisation intestinale par *Salmonella* (**Bailey et al., 1991**).

Les manno-oligosaccharides sont un autre exemple de prébiotique qui, après administration par l'aliment, peut réduire le niveau de colonisation par *Salmonella*. Ce dernier manifeste son effet par l'inhibition de l'adhésion de *Salmonella* à la cellule épithéliale. *Salmonella* s'attache à la cellule le plus souvent par l'intermédiaire de fimbriae de type 1, qui peuvent s'attacher sur des résidus mannose au niveau de la cellule intestinale (**Spring et al., 2000**).

Chapitre II

La contamination des œufs

Les probiotiques constituent encore une autre classe d'additifs employés contre les *Salmonella*. Par définition, les probiotiques sont des micro-organismes vivants inclus dans les aliments qui ont un effet favorable sur l'hôte par une amélioration de l'équilibre de la flore intestinale (**Fuller, 1989**). Chez la volaille, des tests avec des probiotiques ont déjà été réalisés, en particulier avec des lactobacilles (**Mulder et al., 1997 ; Pascual et al., 1999**). Ces produits ne sont cependant pas encore employés en pratique en Belgique. Tous ces additifs sont destinés à réduire le niveau de colonisation de l'intestin par *Salmonella*. Leurs effets sur la contamination des œufs reste à déterminer. On peut trouver de plus des acides gras à chaîne moyennement longue (C8–C12) ont les mêmes effets favorables (**Van Immerseel et al., 2004**). Par ailleurs, ces derniers produits ont un effet antibactérien assez puissant. Parmi les additifs anti-*Salmonella* disponibles sur le marché, on retrouve également des prébiotiques. Par définition, les prébiotiques sont des ingrédients des aliments non-digestibles qui ont un effet favorable par la stimulation sélective de la croissance ou de l'activité d'un nombre restreint d'espèces bactériennes déjà présentes dans l'intestin (**Gibson et Roberfroid, 1995**).

La flore intestinale peut transformer ces prébiotiques par fermentation en acides gras volatiles, ce qui peut conduire à une modification de l'ensemble de la flore. Les fructo-oligosaccharides sont, par exemple, des prébiotiques qui stimulent les bifidobactéries et qui stimulent également la production d'acide butyrique. Chez la volaille, on sait depuis bon nombre d'années que supplémenter la ration avec des fructo-oligosaccharides permet de réduire la colonisation intestinale par *Salmonella* (**Bailey et al., 1991**).

Les produits dits « d'exclusion compétitive » constituent une dernière classe de produits destinés à réduire la colonisation de l'intestin par *Salmonella* (**Nurmi and Rantala, 1973**). Ces produits sont composés d'un mélange de bactéries non-déterminées, isolées de l'intestin de volailles saines. L'efficacité de ces produits a été démontrée, mais l'incertitude concernant la composition de ceux-ci freine leur emploi dans la pratique.

Toutes les mesures mentionnées ci-dessus seraient vaines si on n'appliquait pas en même temps des pratiques hygiéniques dans les exploitations (**Nassar et al., 1994**). Le nettoyage et la désinfection après chaque lot, l'application d'un système d'entrée et de sortie des volailles dans les locaux en une seule fois (*all in–all out*) et le contrôle régulier des exploitations sont des mesures complémentaires, essentielles pour garantir le succès des vaccinations et des autres mesures citées. Dans ce contexte, il y a des différences

Chapitre II

La contamination des œufs

importantes entre poules pondeuses et poulets à l'engraissement, puisque pour les poulets à l'engraissement, la recontamination peut venir aussi bien de l'intérieur des locaux que de l'extérieur, tandis que pour les poules pondeuses, la recontamination provenant de l'intérieur constitue le facteur de risque le plus important. Un programme de lutte contre les *Salmonella* doit également nécessairement inclure des mesures contre les rongeurs et les insectes en tant que vecteurs des salmonelles.

On peut également faire des décontaminations physiques ou chimiques de l'eau de boisson et des aliments. L'acidification de l'eau de boisson est une mesure de décontamination qui peut être prise dans les fermes, tandis que l'irradiation et la pasteurisation des aliments sont des mesures à prendre par les firmes d'aliments. La décontamination des œufs à l'aide de désinfectants, qui vise à réduire la contamination de la surface des œufs, est toutefois interdite dans la CE.

5. Mesures à prendre au niveau de la commercialisation et la consommation :

L'objectif d'un programme de lutte contre *Salmonella* est la prévention de la maladie chez l'homme. Étant donné que la grande majorité des cas humains provient de la consommation d'œufs contaminés, il est impératif de prendre toutes les mesures visant une réduction des taux de contamination des œufs. Refroidir les œufs et maintenir une chaîne de froid évite la multiplication des *Salmonella* éventuellement présentes dans les œufs. Il est étonnant de voir qu'une mesure si simple et efficace n'est toujours pas respectée ni dans les grands magasins, ni dans les cuisines. Des campagnes d'information telles que celles mises en œuvre par l'**AFSCA (Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire, 2004)** et l'introduction de certaines obligations dans la chaîne de commercialisation pourraient éviter beaucoup de problèmes. Pour les personnes âgées, les bébés et les personnes immunodéprimées, des précautions particulières devraient être prises.

Même si les niveaux de contamination par *Salmonella* chez la volaille ont graduellement baissé ces dernières années, le nombre de cas sporadiques et d'épidémies de salmonellose chez l'homme où les œufs sont impliqués comme source de contamination reste très élevé. Ce sont surtout les contaminations des œufs par le sérotype

Enteritidis qui posent problème. C'est la raison pour laquelle les efforts et les mesures à prendre dans le cadre d'un programme de lutte doivent être dirigés, en premier lieu, sur *S.*

Chapitre II

La contamination des œufs

Enteritidis et, en deuxième lieu, sur les autres sérotypes qui sont fréquemment impliqués dans les cas de salmonellose chez l'homme, comme *S. Typhimurium*. L'éradication des salmonelles chez la volaille est probablement une utopie.

Cependant l'objectif à long terme des programmes de lutte est sans aucun doute l'élimination de toute infection à *Salmonella* dans les œufs et, si possible, aussi dans la viande de volaille.

Ceci devrait fortement réduire les cas humains de salmonellose. Des mesures de protection, telles que la vaccination, contribueront certainement à réduire les niveaux de contamination.

De telles mesures n'auront cependant d'effet que dans le cadre d'une approche globale qui inclut également des mesures hygiéniques et d'autres mesures complémentaires.

Les bonnes pratiques d'hygiène de l'abattage sont très importantes à cet égard. Aussi des mesures simples comme la réfrigération des œufs durant la conservation seraient très avantageuses. Ceci constitue un challenge dont la responsabilité incombe au secteur avicole et à son entourage, y inclus les vétérinaires, les éleveurs, les chercheurs, les décideurs et les consommateurs. Tous doivent collaborer pour que la lutte contre ce pathogène majeur devienne un succès.

I. Matériels :

I.1. Matériel biologique :

Comme matériel biologique nous avons utilisés les œufs de poulet et la viande hachée commercialisés à Tlemcen.

I.2. Matériel de manipulation :

Le matériel de manipulation est constitué de matériel usuel, régulièrement utilisé pour les manipulations en microbiologie des aliments. Ce sont: un autoclave, un bec bunsen, des boîtes de Pétri de 90mm de diamètre, du papier aluminium, deux étuves de 37 et 42 °C, des bains maries, des flacons stériles, des Erlenmeyers, des éprouvettes graduées, des tubes à essais avec ou sans vis, une balance électronique, un distillateur, un réfrigérateur, des portoirs, un marker, de l'eau de javel (12°chl), des fourchettes et des couteaux, des pipettes, une plaque chauffante, un four pasteur, des barreaux aimantés, une spatule, des pinces, des lames et lamelles, une anse de platine, un microscope optique, une galerie API à 20 E, etc...

I.3. Les milieux de culture :

Les milieux de cultures utilisés pour l'étude sont:

- L'eau peptonée tamponnée, le bouillon nutritif et de l'eau distillée stérile ;
- Les milieux sélectifs : géloses SS et Hektoen, bouillon Rappaport de Vassiliadis ;
- Les milieux d'identification de *Salmonella* (milieu TSI, milieu Stuart (Urée), milieu Schubert (indole), milieu à la lysine de Moeller « LDC », milieu à l'Arginine de Moeller « ADH », milieu à l'Ornithine de Moeller « ODC »).

I.4. Les réactifs :

Les réactifs utilisés pour notre étude, sont ceux qui ont servi à effectuer la coloration de Gram. Ce sont: le violet de gentiane phéniqué, le Lugol, La Fuschine de Ziehl dilué, le réactif de Kovacks, l'éthanol est utilisé comme solvant.

II. Methodes :

II.1.Echantillonnage :

Nous avons mené une enquête préliminaire qui nous a permis de recenser les vendeurs de poulet dans la commune d'Ain Yousef à Tlemcen. Parmi ces vendeurs nous avons retenu ceux qui vendaient le plus grand nombre de poulets.

Un prélèvement de 5 échantillons (œufs) est effectué pendant le mois de Mai et Juin chez le vendeur retenu, vingt cinq grammes de viande hachée par prélèvement.

Une fois collectés, les échantillons sont transportés immédiatement au laboratoire (environ 20 minutes) dans des sachets plastiques stériles pris individuellement.

Les œufs entiers en coquilles sont ouverte aseptiquement après lavage rapide, l'œuf est immergé pendant 10 minutes à l'éthanol puis sa coquille est ouverte au scalpel ; l'intérieur de l'œuf est prélevé à l'aide d'une pipette stérile (**Guiraud, 2003**).

Vingt cinq grammes sont prélevés à partir de chaque prélèvement (viande hachée) pour ainsi constituer l'unité d'analyse ou la prise d'essai. La viande est manipulée avec du matériel stérile. Entre deux dissections les mains sont soigneusement lavées avec de l'eau de Javel à 12° diluée au dixième et abondamment rincées avec de l'eau de robinet, tandis que les couteaux sont stérilisés par flambage à l'alcool. Le support utilisé comme tare au niveau de la balance (papier aluminium) est utilisé une seule fois par pesée. Les mains, ne rentrent jamais en contact avec l'unité d'analyse pour éviter toute contamination par le manipulateur. Le nombre d'échantillon analysé est de 25 effectué pendant 1 mois.

II.1. Au niveau de la Direction de commerce de la wilaya de Tlemcen :

Nous avons effectué une enquête au niveau de la direction de commerce de la wilaya de Tlemcen (DCP) au niveau du service du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes le mois de juin 2014 qui nous a permis d'obtenir des données concernant la contamination des différents produits alimentaire par les salmonelles.

II.2.Méthode de recherche de *Salmonella* :

Plusieurs normes régissent la recherche de *Salmonella* en hygiène des aliments (**Humbert et al., 1998**).

La recherche de *Salmonella* a été faite en 4 étapes selon la norme **ISO 6579**: le pré-enrichissement, l'enrichissement, l'isolement et enfin l'identification (**Larpent, 1997**).

II.2.1. Le pré-enrichissement :

La prise d'essai 5 œufs, 1 ml de chaque échantillon est directement mis dans 9 ml d'eau peptonée tamponnée, puis placée à l'étuve à 37°C pendant 20 heures. Ceci permet aux salmonelles (éventuellement présentes) de se multiplier en abondance ; elles deviennent ainsi facilement détectables par la suite.

Selon la Norme **AFNOR**, 25g de chaque échantillon de viande hachée est mis dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée, puis placée à l'étuve à 37°C pendant 16 à 20 heures.

Les écouvillons sont placés directement dans le bouillon nutritif avec deux ou trois gouttes d'eau peptonée tamponnée, ensuite placées à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.

Le pré-enrichissement permet la croissance des salmonelles soumises à un stress ou endommagées par des facteurs comme l'exposition à la chaleur, la congélation, la déshydratation, les agents de conservation, une forte pression osmotique ou d'importantes fluctuations de température (**Andrews, 1989**).

Les milieux utilisés sont des milieux liquides, le plus souvent on utilise l'eau peptonée tamponnée ou le bouillon lactosé (**Humbert et al., 1998**). Pour les produits laitiers on peut utiliser la solution de Ringer ou la solution tampon phosphate.

II.2.2.Enrichissement :

Matériels et méthodes

Dans 10 ml de bouillon de Rappaport de Vassiliadis contenus dans chaque tube à vis stérile, nous mettons 1 ml de milieu de pré-enrichissement de chaque échantillon (oeuf, viande hachée et prélèvement par écouvillons) à l'aide d'une pipette stérile. Les bouillons sont ensuite incubés à l'étuve à 42°C pendant un temps de 18 à 24 heures. La sélectivité du bouillon et la température d'incubation relativement élevée entraînent l'élimination d'une grande partie de la flore d'accompagnement et favorisent la croissance des salmonelles (**Humbert *et al.*, 1998**).

Les milieux d'enrichissement sont classés en trois familles (**Humbert *et al.*, 1998**) :

- les bouillons au sélénite ;
- les bouillons à base de tétrathionate (le bouillon Müller Kauffmann) ;
- les bouillons qui contiennent du vert de malachite et du chlorure de magnésium (bouillon Rapaport de Vassiliadis).

II.2.3. Isolement :

C'est une phase sélective qui utilise des milieux solides coulés en boîtes de pétri. Les milieux d'isolement contiennent une variété d'association de facteurs sélectifs (**Humbert *et al.*, 1998**).

Deux géloses sélectives ont été utilisées : les géloses SS et Hektoen. Elles sontensemencées par technique de stries d'épuisement, par 1 ml de chaque prélèvement dilué à un centième à partir d'un même bouillon d'enrichissement et mis en incubation à l'étuve 37 °C pendant 48 heures (**Humbert *et al.*, 1998**).

Après incubation, les colonies isolées sur les géloses présentant les caractéristiques macroscopiques des salmonelles (colonies incolores à centre noir sur SS et colonies verdâtre ou bleuâtres à centre noir sur Hektoen) sont repiquées sur gélose Hektoen pour être soumises à une identification plus fine. Pour chacune des deux géloses six colonies caractéristiques sont prélevées pour l'identification (**Andrews, 1989**).

II.2.4. l'identification :

Réaliser un repiquage des colonies suspectes, sur de la gélose sélective (gélose Hektoen), dans le but d'obtenir des souches pures. Nous avons mis à incuber 24 heures à 37 °C (**Humbert *et al.*, 1998**).

Matériels et méthodes

- Identification de la famille des Entérobactéries.

Cette identification est rendue possible, après avoir vérifié que les souches en question sont réellement des Entérobactéries (**Andrews, 1989**).

Nous avons par la suite effectué la coloration de Gram et l'observation de l'état frais en vue d'obtenir les caractères majeurs des Entérobactéries.

- Identification du genre *Salmonella* :

La souche de *Salmonella* sp peut être confondue avec certaines Entérobactéries, et par la similitude de certains de leurs caractères biochimiques. Ce sont *Citrobacter*, *Edwardsiella tarda*, *Proteus vulgaris* et *mirabilis* (**D'aoust, 1998**).

Pour éliminer donc ces souches proches des salmonelles, des tests de présomption sont effectuées, dans le but d'identifier les caractères de genre des *Salmonella* sp. (**Andrews, 1989**).

- Identification de l'espèce *Salmonella typhi* :

Pour effectuer cette identification de l'espèce nous avonsensemencé une galerie **Api à 20 E**.

- **Présentation de la galerie API 20E :**

Le système API 20E est une version miniaturisée des tests biochimiques classiques. destinés à l'identification des Enterobacteriaceae (bactéries Gram négatif et anaérobies facultatives) dont font partie les salmonelles.

Il regroupe 23 tests biochimiques. Des microtubes contiennent des substrats déshydratés, lesquels sont mis en solution par l'addition d'une suspension de la bactérie à identifier.

Une période d'incubation de 24 heures à 37°C permet à la bactérie de réagir avec les substrats. La compilation des résultats de l'utilisation des substrats par la bactérie à identifier permet de déterminer un code de 7 chiffres (**Lyse V et Michel L., 2005**).



Figure 05 : Présentation de la galerie API 20 E.

- **Préparation de l'inoculum pour ensemer la galerie API 20 E :**

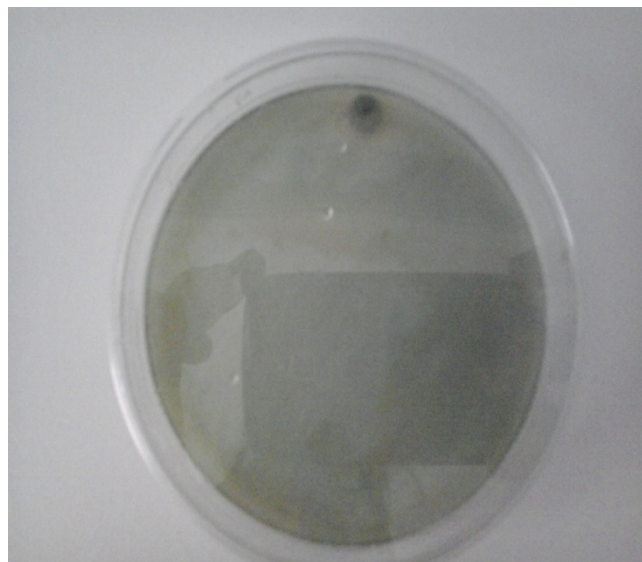


Figure 06 : Isolement d'une colonie de *Salmonella.spp.*

Les colonies bactériennes isolées à partir du milieu Hektoen et présentant les caractéristiques de *Salmonella* sont mises en culture pure sur gélose nutritive puis dans 5 ml d'eau distillé stérile ensuite, nous avons Introduit la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ouverte avec une pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles.

Matériels et méthodes

Ensuite nous avons rempli le tube et la cupule par la suspension bactérienne pour les tests : CIT VP, GEL et pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE nous avons recouvert avec l'huile de paraffine.



Figure 07 : Les 10 premiers tests avant ensemencement de la suspension bactérienne de *Salmonella.spp*.



Figure 08: Les 10 derniers tests avant ensemencement de la suspension bactérienne de *Salmonella.spp*.

Après 24h d'incubation à 37°C, les réactifs que nous avons rajouté aux microtubes sont :

- Chlorure de fer III pour la recherche de la TDA.
- Réactif de Kovacs pour la recherche d'Indole.
- NaOH ou KOH et Napht-1-ol pour la voie fermentative butane-diole pour le test de VP.
- Acide sulfanilique pour la recherche du nitrate réductase dans le test de GLU (Lise V et Miche L., 2005).
- Lecture sur la galerie api 20 E :

La lecture de la galerie se fait généralement au bas de chaque microtube sauf CIT (citrate) et IND (indole). Il faut Lire les réactions de la façon suivante :

Matériels et méthodes

- VP (pyruvate de sodium) : Ajouter une goutte d'hydroxyde de potassium (40%) et une goutte d'alpha-naphtol (6%). Attendre 10 minutes avant de faire la lecture de la réaction.
- Faire la lecture des autres microtubes à l'exception de TDA (tryptophane désaminase) et IND (indole). Noter la couleur et la réaction (+ ou -) de chaque microtube.
- TDA (tryptophane désaminase) : Ajouter une goutte de chlorure ferrique (10%). Lire la réaction immédiatement.
- IND (indole) : Ajouter une goutte du réactif de James. Lire la réaction immédiatement (**Lise V et Michel L., 2005**).

Nous avons comparé la couleur obtenue pour chaque cupule et inscrit le résultat sur la fiche de résultats. Pour déterminer le code de 7 chiffres, il faut additionner les résultats des réactions, lesquelles sont regroupées par ensemble de trois microtubes. Une réaction négative donne 0 point tandis qu'une réaction positive donne 1, 2 ou 4 points (**Lise V et Michel L., 2005**).

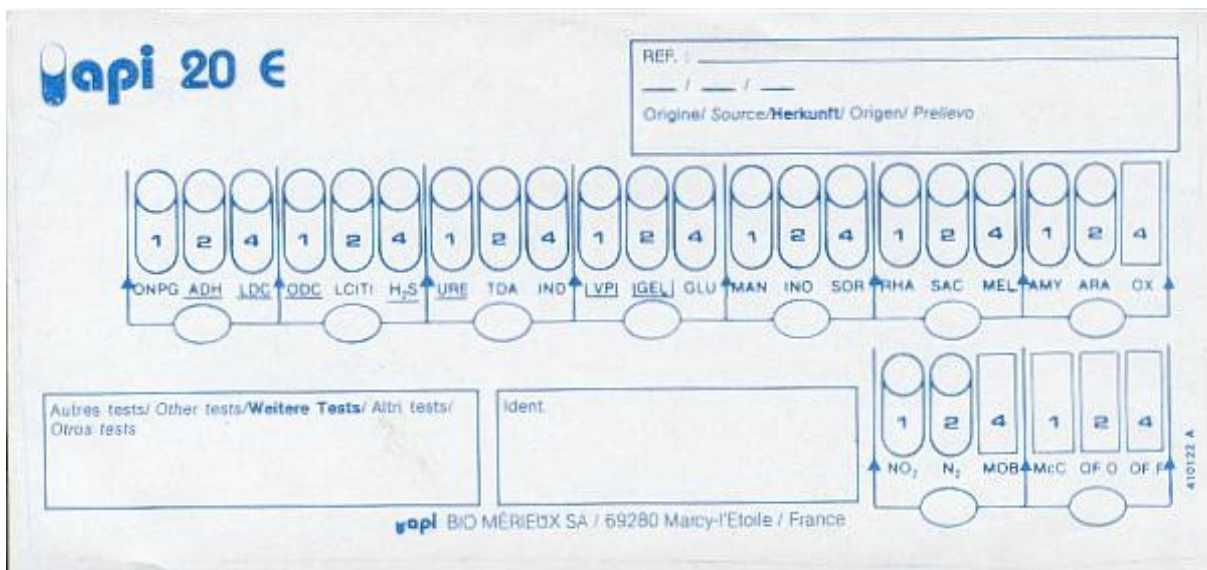


Figure 09: Lecture selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20 E.

- **Légende :**

ONPG : Détermination de la présence de l'enzyme β -galactosidase.

Matériels et méthodes

ADH : Transformation de l'arginine (acide aminé) par l'arginine désydrolase.

LDC : Transformation de la lysine (acide aminé) par la lysine décarboxylase.

ODC : Transformation de l'ornithine (acide aminé) par l'ornithine décarboxylase.

CIT : Utilisation du citrate comme seule source de carbone.

H₂S : Production du sulfure d'hydrogène (H₂S) à partir du thiosulfate (S₂O₃).

UR: Libération de l'ammoniac à partir de l'urée grâce à l'uréase.

TDA: Formation de l'acide indolepyruvique à partir du tryptophane (acide amine) grâce à la tryptophane désaminase.

IND: Formation d'indole à partir du tryptophane (acide aminé).

VP: Formation d'acétone à partir du pyruvate de sodium.

GEL: Liquéfaction de la gélatine (protéine).

GLU (glucose), **MAN** (mannitol), **INO** (inositol), **SOR** (sorbitol), **RHA** (rhamnose), **SAC** (sucrose), **MEL** (mélbiose), **AMY** (amygdaline), **ARA** (L+ arabinose) – formation d'acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de carbone (**Lise V et Michel L., 2005**).

- **La coloration de Gram**

La coloration de Gram est une technique qui permet de mettre en évidence les caractères morphologiques (forme et taille) des bactéries.

- **Principe de la coloration de Gram.**

La coloration de Gram mise au point en **1884**, s'effectue en trois temps :

- Dans un premier temps, les bactéries sont colorées en violet par un colorant basique tel que le violet de gentiane puis par une solution de lugol (mordançage).
- Dans un deuxième temps, qualifié de temps de différenciation, les bactéries sont soumises à l'action de l'alcool ou d'un mélange alcool + acétone. Les bactéries se répartissent en deux

Matériels et méthodes

catégories : celles qui conservent la coloration violette et qui sont qualifiées de bactéries à Gram positif et celles qui sont décolorées et qui sont appelées bactéries à Gram négatif.

- Dans un troisième temps, afin de mieux visualiser les bactéries décolorées, on procède à un traitement par la fuchsine ou par la safranine. Les bactéries à Gram positif apparaissent alors violettes et les bactéries à Gram négatif se recolorent en rouge ou en orange.

Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool (ou le mélange alcool + acétone) qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

Pour ce faire, nous avons réalisé des frottis avec chacune des colonies suspectes, sur des lames propres. Sur ces frottis, nous avons ajouté le violet de gentiane que nous avons laissé reposer pendant 2 minutes. Après ces 2 minutes, nous avons rincé les lames à l'eau de robinet. Par la suite, nous avons recouvert les différentes lames de quelques gouttes de Lugol que nous avons laissé reposer pendant 45 secondes. Après avoir renversé le Lugol, nous effectuons la même opération avec l'alcool. Enfin, nous ajoutons quelques gouttes de fuschine sur les frottis, que nous laissons aussi reposer pendant 2 minutes. La lame est observée après rinçage à l'eau de robinet, et séchage à la flamme.

L'observation se fait au microscope optique, à l'objectif 100, après ajout de quelques gouttes d'huile à immersion sur les différents frottis.

Toutes les souches suspectées et observées sont de petits bacilles à coloration rouge ou orange caractérisant les bactéries Gram négatif.

II.5. Milieux d'identification :

II.5.1. Le milieu Stuart (uréase) :

Introduire environ **1 ml** de ce milieu dans le microtube de la galerie api stérile (**URE**). Par la suite ensemencer avec une souche pure, prélevée sur Hektoen. Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, une lecture est faite (**Andrews, 1989**).

Matériels et méthodes

La couleur du milieu reste inchangé pour les souches suspectes, et sont dites uréase négative (non productrices d'uréase). Dans le cas contraire, il vire au rose.

L'uréase hydrolyse l'urée pour donner du carbonate et de l'ammoniac responsables de l'alcalinisation du milieu qui vire au rose. La couleur jaune demeure pour les souches qui ne possèdent pas d'uréase active (uréase -). Ce milieu permet de distinguer l'espèce *Salmonella typhi* (uréase négative donc pas de changement de coloration) du genre *Proteus* qui possède une uréase active et fait virer le milieu au rose (**Marchal et al., 1982**).

II.5.2. Le milieu Schubert (production d'indole) :

Introduire environ **1 ml** de ce milieu dans le microtube de la galerie api stérile (**IND**). Par la suite,ensemencer avec une souche pure, prélevée sur gélose Hektoen. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, une lecture est faite (**Andrews, 1989**).

Pour la mise en évidence de la production d'indole, ajouter quelque goutte du réactif de Kovacs dans les microtubes du milieu Schubert (indole). La dégradation du tryptophane est marquée par l'apparition d'un anneau jaune, pour les salmonelles qui sont dites indole négatif. Dans le cas contraire, nous avons un anneau rouge (**Andrews, 1989**).

La tryptophanase dégrade le tryptophane pour donner l'indole. Après addition du réactif de Kovacs, le dimethyl-amino-4-benzaldehyde qu'il contient réagit avec l'indole et forme un composé coloré en rouge (anneau rouge). Les souches incapables de provoquer une telle réaction parce qu'elles sont dépourvues de tryptophanase le cas de *Salmonella typhimurium* seront dites indole (-) (**Marchal et al., 1982**).

II.5.3. Le milieu TSI :

Ensemencer la gélose par piqure centrale dans le culot et par stries d'épuisement au niveau de la pente, avec une suspension de bactérie suspecte. Les tubes sont mis à incuber à 37 °C pendant 24 heures (**Marchal et al., 1982**).

Matériels et méthodes

Le milieu TSI a une couleur rouge carmin. Ce milieu n'est valable que pour les germes fermentaires. Il entre dans le cadre de l'étude du métabolisme glucidique et permet l'exploitation de quatre paramètres (**Andrews, 1989**) :

➤ La fermentation du glucose : lorsque en anaérobiose la souche fermente le glucose, il y a formation d'acides organiques qui acidifient le milieu et entraînent le virage du culot du rouge au jaune (**Joffin et Leyral., 1998**).

➤ La fermentation du lactose (sur la pente) : Elle se traduit aussi par une coloration jaune du milieu. Cette fermentation témoigne de la production d'une bêta-galactosidase qui hydrolyse le lactose en galactose et en glucose qui est ensuite utilisé comme source d'énergie. Les souches qui ne produisent pas de bêta-galactosidase (lactose -) ne peuvent acidifier le milieu, par conséquent ne peuvent faire virer la couleur de la pente qui reste rouge (**Joffin et Leyral., 1998**).

➤ Production de gaz (CO₂) : Dans le processus fermentaire du glucose, la décarboxylation du pyruvate est à l'origine d'un dégagement de dioxyde de carbone (CO₂) dont la pression dans le tube décolle la gélose ; la souche est ainsi dite gaz (+). Par contre les bactéries gaz (-) ne produisent aucune trace de gaz (**Joffin et Leyral., 1998**).

➤ Production d'Hydrogène sulfuré H₂S : Elle est marquée par une coloration noire de la gélose issues de sa combinaison avec les ions ferriques. L'absence de production de H₂S ne provoque pas de coloration noire du milieu (**Joffin et Leyral., 1998**).

II.5.4. Le milieu Moeller +lysine (LDC) :

Ensemencer ce milieu, en anaérobiose dans le microtube de la galerie api (**LDC**), à partir des mêmes souches pures suspectées; et incubés à 37°C à l'étuve pendant 24 heures.

La coloration reste inchangée pour les souches de *Salmonella*, et sont dites Lysine décarboxylase positive (LDC+).

En effet la bactérie fermente le glucose dans un premier temps, ce qui acidifie le milieu (virage du violet au jaune). Dans un second temps, la salmonelle qui possède une décarboxylase se met en

Matériels et méthodes

action ; et les métabolites formés à partir des aminoacides alcalisent le milieu, qui fait virer l'indicateur de pH au violet (formation de la cadavérine à partir de la lysine).

II.3.5. Le milieu Moeller +arginine (ADH) :

Ensemencer ce milieu, en anaérobiose dans le microtube de la galerie api stérile (ADH), à partir des mêmes souches pures suspectées ; et incubés à 37 °C à l'étuve pendant 24 heures (**Joffin et Leyral., 1998**). Un changement de la couleur du violet vers le jaune puis vers le violet reflète la présence de l'enzyme « argininine dihydrolase ». Cet enzyme est absent chez la plupart des souches si la couleur du milieu moeller est restée jaune (**Marchal et al., 1982**).

II.3.6. Le milieu Moeller + ornithine (ODC) :

Ensemencer ce milieu, en anaérobiose dans le microtube de la galerie (**ODC**), à partir des mêmes souches pures suspectées ; et incubés à 37 °C à l'étuve pendant 24 heures (Joffin et Leyral., 1998). Le test montre la présence de l'enzyme « ornithine décarboxylase » confirmée par le virage de l'alcalinité (violet). La couleur du milieu moeller reste jaune après la fermentation du glucose, cela confirme l'absence de l'enzyme « ornithine décarboxylase » (**Marchal et al., 1982**).

I. Résultats :

I.1. Résultats de prélèvements :

Les résultats des prélèvements effectués pendant les deux mois sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau 01: Résultats des prélèvements des œufs du mois de Mai 2014.

Type de prélèvement	Nombre d'échantillons	Résultats
P1	5	-
P2	5	+
P3	5	-
P4	5	+
P5	5	-

Tableau 02: Résultats des prélèvements des œufs du mois de Juin 2014.

Type de prélèvement	Nombre d'échantillons	Résultats
P1	5	+
P2	5	-
P3	5	-
P4	5	+
P5	5	+

Tableau 03: résultats des prélèvements de viande hachée du mois de Juin 2014.

Type de prélèvement	Nombre d'échantillons	Résultats
P1	5	-
P2	5	-
P3	5	-
P4	5	-
P5	5	-

I.2. Isolement :

Dans le but de la mise en évidence de la contamination des œufs par *Salmonella. typhi*, des prélèvements ont été réalisés. Sur l'ensemble des échantillons testés pendant une durée de deux mois, seulement deux échantillons qui ont présenté des colonies suspectes (colonies incolores sur

Résultats et discussion

SS et colonies verdâtre ou bleuâtres à centre noir sur Hektoen) comme il est représenté ci-dessous (figure 01).

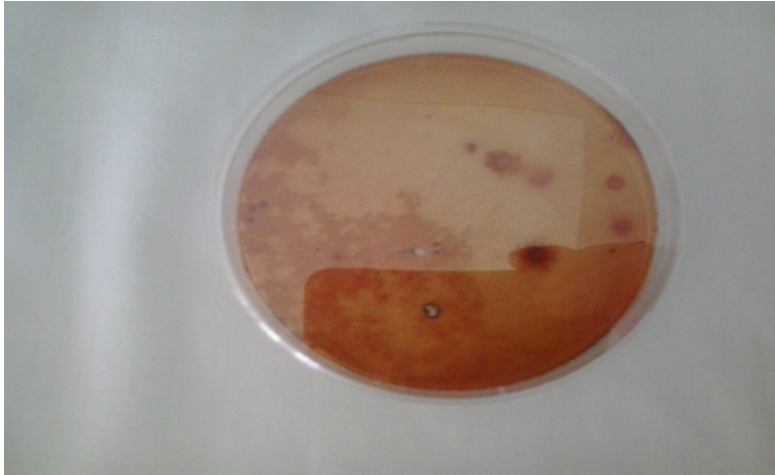


Figure 10 : Aspect des colonies de *Salmonella. spp* sur gélose SS.

II.4.2.Repiquage :

Après avoir repiqué les colonies suspectes de *Salmonella.spp* dans cinq boites de pétri, contenant la gélose Hektoen afin d'obtenir des souches pures. Les résultats sont comme il est montré dans la figure suivante :



Figure 11: photo personnel illustrant l'aspect d'une colonie de *S. typhi*

II.4.3. Identification :

Les résultats des cinq souches ont présenté des ressemblances et des différences qui nous a permis de les répartir sur cinq catégories (voir tableau 05) :



Figure 12 : Les 10 premiers tests avant ensemencement de la suspension bactérienne de *S. typhi*.

II.4.3.1. Explication des résultats :

- **Uréase (-)** : La couleur du milieu reste inchangé (rouge) pour les souches suspectes, et sont dites uréase négative (non productrice d'uréase) (Joffin et Leyral., 1998)
- **La production d'Hydrogène sulfuré H₂S :**
Les souches à H₂S (+) sont : **01 et 02.**
- **Indole (-)** : La couleur est restée jaune, absence d'un anneau rouge ce qui signifie qu'elles ne produisent pas d'indole (Voir figure 04) (Joffin et Leyral., 1998).
- **Citrate (-)** : les souches à citrate (-) sont : **01, 02, 03, 04, 05.**

Résultats et discussion

Tableau 05: Résultats des tests biochimiques effectués sur les cinq souches isolées.

microtube	Substrat	S.01	S.02	S.03	S.04	S.05
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	-	-	-	-	+
ADH	Arginine		-	-	+	-
LDC	Lysine	+	+	+	-	+
ODC	Ornithine	-	+	+	+	-
CIT	Citrate	-	+	-	-	-
H₂S	Thiosulfate de sodium	+	+	+	+	+
URE	Urée	-	-	-	-	-
TDA	Tryptophane		-	-	-	-
IND	Tryptophane	-	-	-	-	+
VP	Pyruvate de sodium		-	-	-	-
GEL	Gélatine		-	-	-	-
GLU	Substrat carboné (glucide)	+	+	+	+	+
		(sans gaz)	Avec dégagement du gaz	avec dégagement du gaz		
NO₂-/N₂	Nitrate NO ₃ -	-	+	+	-	-

Souche 01 : A gazogène, LDC+, ODC -, H₂S faible, Citrate - ;

Souche 02 : LDC -, ODC +, H₂S-, citrate - ;

Souche 03 : ONPG -, ADH -, LDC +, ODC+, CIT -, H₂S +, URE-, TDA- , IND-, VP-, GEL- , GLU+, NO₂/N₂ + ;

Résultats et discussion

Souche 04 : ONPG -, ADH +, LDC -, ODC+, CIT -, HES +, URE-, TDA- , IND-, VP-, GEL- ,
GLU+, NO₂/N₂ - ;

Souche 05 : ONPG +, ADH -, LDC +, ODC-, CIT -, HES +, URE-, TDA- , IND+, VP-, GEL- ,
GLU+, NO₂/N₂ + ;

Tableau 06 : Comparaison des résultats obtenus à partir des tests biochimiques.

	<i>S. Typhi</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella spp</i>	Non identifiées
S. 01	+			
S.02				
S.03		+		
S.04			+	+
S.05				+

II.3.Résultats du ministère de l'Agriculture et du développement Rural de l'Année 2013 :

II.3.1.Bilan Annuel 2013 :

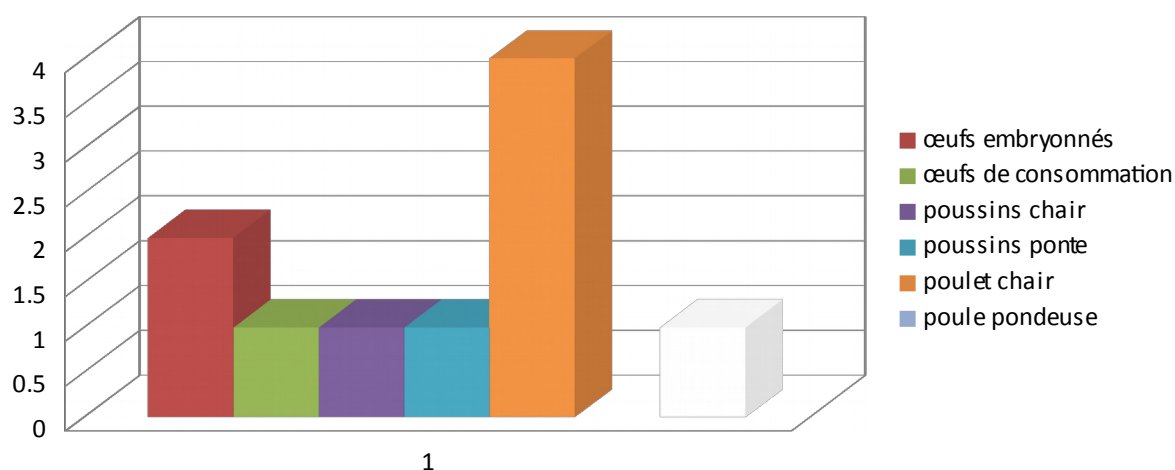


Figure 13 : Représentation des résultats du bilan annuel 2013 du ministère de l'Agriculture et du développement rurale de la région de Tlemcen.

II.3.Résultats de la direction de commerce de la wilaya de Tlemcen de l'Année 2014:

Service : Contrôle de Qualité Alimentaire et répression des fraudes.

Origine de la Contamination : Salmonelles.

Origine : Locale.

Document officiel obtenu le : 30 Juin 2014.

• **Prélèvements :**

- ✓ 64 Echantillons à partir de différents aliments (En premier lieu : pâtisserie, laits et des dérivés).
- ✓ Plus (+) : 24 Echantillons.
- ✓ En tous 88 Echantillons.
 - 40 غير مرضية Echantillons non acceptable (Refusés).
 - 35 مرضية Echantillons satisfaisante.
 - 03 مقبولة Echantillons acceptables.
 - Et 10 Echantillons au cours des analyses في طور التحاليل.

• **Résultats final :**

Concernant les Salmonelles (Absence).

• **Conclusion :**

عدم وجود بكتيريا السلمونيلا.

II. Discussion :

Selon les données du ministère de l'agriculture et du développement rurale et selon le bilan Annuel 2013 concernant la maladie de salmonellose aviaire origine locale de la wilaya de Tlemcen, d'après la **figure 08** le poulet de chair destiné à la consommation est le plus attaqué par *Salmonella Enteritidis* (04) et présence d'une seul *Salmonella lindenburg* sachant que le Nombre d'échantillon analysés (NEA) est de 779 tandis que Nombre d'échantillons positifs (NEP) est de 32 par contre les œufs embryonnés après l'analyse des échantillons, le NEP est de 60 et *Salmonella enteritidis* est présente (2 *S. enteritidis*), les œufs de consommation viennent en troisième position concernant la présence des salmonelles (01 *S. enteritidis*) qui est présente après avoir analysé un nombre d'echatillon de 1740.

Selon **Ghafir et Daube (2007)**, après la ponte, il est possible que les œufs soient contaminés par *S. Entertidis* à travers la coquille de l'œuf quand l'œuf est contaminé par des matières fécales il est également possible que la contamination ait lieu directement dans le jaune d'œuf, le blanc d'œuf, la membrane interne de la coquille ou la coquille même avant la ponte de l'œuf, suite à l'infection du système de reproduction de la poule pondeuse.

En France, en **2001**, *Salmonella* a été responsable de 57,7 % des 2.993 cas confirmés de toxi-infection alimentaire collective (TIAC), répartis au sein de 272 foyers. La répartition des sérotypes était habituelle avec une majorité de cas imputables à *S. Entertidis* (**57,5%**) (**Haeghebaert et al., 2002**).

En thèmes de comparaison les analyses effectuées au niveau du laboratoire de la direction du commerce (**CAQUE**) montrent dans le bilan annuel 2014 l'absence total des salmonelles dans les différents produits alimentaire analysés laits et ses dérivés et pâtisseries préparés à base d'œufs.

Résultats et discussion

Les analyses de nos prélèvements des œufs montrent l'apparition d'une seule souche de *S. Typhi* (souche 01) (voir la figure **03**). Par contre une absence totale de salmonelles dans les échantillons de viande hachée.

Plusieurs chercheurs ont investigué la possibilité d'une pénétration à travers la coquille de l'œuf dans des conditions de laboratoire avec différents sérotypes de *Salmonella* tels, par exemple *S. Entertidis* et *S. Typhimurium*. Sur base de ces expérimentations, nous avons émis l'hypothèse que le contenu de l'œuf pouvait être contaminé immédiatement après la ponte par des bactéries passant à travers les pores ou des fissures dans la coquille (**Van Immerseel, 2005**).

Les Normes algériennes, selon le **JOURNAL OFFICIEL N°35** correspondant au **27 mai 1998** exige dans les critères microbiologiques des ovoproduits des pâtisseries et des crèmes pâtisseries dans le produit œufs en coques un seuil d'acceptabilité d'un critère microbiologique absent avec une limite de tolérance égale à 0 et un nombre d'échantillon égale à 5.

Comme tous les produits alimentaires, les œufs doivent subir des traitements efficaces afin de réduire la flore pathogène et les rendre conforme aux normes alimentaires avant d'être consommé.

Norme de l'**ISO 3565** : absence des salmonelles dans 25g.

Normes du codex alimentaire : dans 10 ml il ya moins d'une **UFC** de *salmonella*.

Mesures de prévention et de contrôle sanitaire :

Il est possible de prévenir et lutter efficacement contre les salmonelles en respectant de bonnes pratiques d'élevage, en adoptant l'approche **HACCP** (Analyse des risques et points critiques à maîtriser) et en appliquant les procédures générales décrites dans le *chapitre 6.4.* relatif aux procédures d'hygiène et de sécurité biologique dans les élevages de volailles et en les combinant, le

Résultats et discussion

cas échéant, avec les mesures complémentaires présentées ci-dessous. Aucune procédure isolée ne permet à elle seule d'éradiquer les salmonelles.

Les autres mesures de prévention et de contrôle sanitaire sont la vaccination, l'exclusion compétitive, la réforme anticipée des troupeaux, les acides organiques et les traitements d'inactivation de l'agent pathogène.

Les antibiotiques ne doivent pas être utilisés contre les infections causées par des salmonelles chez les volailles car l'efficacité du traitement est limitée, et ils sont susceptibles de masquer la présence d'une infection lors de la réalisation de tests. Ces produits peuvent par ailleurs donner lieu à des résidus dans la viande et les œufs, et risquent de contribuer au développement d'antibiorésistance. Les antibiotiques peuvent également réduire la flore intestinale normale et augmenter la probabilité de colonisation par *Salmonella*. Dans certaines circonstances particulières, des antibiotiques peuvent être utilisés pour sauver des oiseaux à haute valeur génétique **(OIE, 2010)**.

- Les oiseaux d'un jour utilisés pour le repeuplement d'un poulailler doivent provenir de troupeaux de volailles de reproduction et de couvoirs au minimum indemnes de *S. enteritidis* et *S. typhimurium* et faire l'objet d'un suivi conformément aux dispositions prévues par le présent chapitre et dans lesquels n'a été détecté aucun signe de *S. enteritidis* ni de *S. Typhimurium* **(OIE, 2010)**.