

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES
ET MEDECINE VETERINAIRES DE DAKAR



ANNEE 2014

N° 20

**CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUCHES DE
SALMONELLA ISOLEES DANS LES FERMES DE POULETS
DE CHAIR DE LA ZONE PERI-URBAINE DE DAKAR (SENEGAL)**

MEMOIRE DE MASTER EN QUALITE DES ALIMENTS DE L'HOMME

Spécialité : Produits d'Origine Animale

Présenté et soutenu publiquement le 30 juillet 2014 à Dakar

Par

Mlle Sitraka Arilalaina ANDRIANONY

Née le 25 mars 1987 à Mahajanga (Madagascar)

..... JURY

PRESIDENT :

M. Louis Joseph PANGUI

Professeur à l'EISMV de Dakar

MEMBRES :

M. Bhen Sikina TOGUEBAYE

Professeur à la FST de l'UCAD

M. Germain Jérôme SAWADOGO

Professeur à l'EISMV de Dakar

M. Adama SOW

Maître assistant à l'EISMV de Dakar

CO-DIRECTEUR DE

RECHERCHE :

Mme Rianatou BADA ALAMBEDI

Professeur à l'EISMV de Dakar

DIRECTEUR DE

RECHERCHE:

Mme Amy GASSAMA SOW

Maître de conférences agrégé à l'ESP de l'UCAD

REMERCIEMENTS

A notre Maître et Président de Jury, Mr Louis Joseph PANGUI, Professeur à l'EISMV de Dakar, vous nous faites un honneur de présider le jury de ce mémoire. Sincères remerciements.

A notre Maître et Juge, Mr Bhen Sikina TOGUEBAYE, Professeur à la FST de l'UCAD, vous nous faites un honneur de juger ce travail. Profonde reconnaissance.

A notre Maître et Juge, Mr Germain Jérôme SAWADOGO, Professeur à l'EISMV de Dakar, vous nous faites un honneur de siéger parmi les membres du jury de ce mémoire. Grande considération.

A notre Maître et Juge, Mr Adama SOW, Maître assistant à l'EISMV de Dakar, nous sommes honorés que vous consacrez du temps à examiner scrupuleusement ce travail. Sincères appréciations.

A notre Maître et Co-Directeur de Recherche, Mme Rianatou BADA ALAMBEDJI, Professeur à l'EISMV de Dakar, vous nous avez guidés avec beaucoup de gentillesse et de disponibilité. Avec toute notre reconnaissance.

A notre Maître et Directeur de Recherche, Mme Amy GASSAMA SOW, Maître de conférences agrégé à l'ESP de l'UCAD, vous nous avez accueillis en stage dans votre Unité de Bactériologie Expérimentale (UBE) de l'Institut Pasteur de Dakar (IPD). Vous avez également accepté la direction de ce travail. Nous vous remercions de la confiance que vous nous avez accordée. Toute notre gratitude.

Un merci spécial aussi :

A Manu et Bee, *de m'avoir soutenue et encouragée*

A Bou et Dou, *affection et tendresse*

A T. Davi, T. Mary, Kou, Behoririka & Cie, *reconnaissance infinie*

A T. Hari, T. Noeli, Tiana, Antsa-kira et AMS, *pour leur générosité*

A la famille SEMBENE : Papa Malick, Mama Awa, Ndeye, *pour leur amabilité*

A Alima jolie et les ami(e)s du Sénégal, *pour les bons souvenirs*

A l'équipe de l'UBE : Khota, Bissoume, Aissatou, Timbine, Wane, Gueye

A l'équipe de LSAHE et au personnel de l'IPD, *pour leur collaboration*

A tous mes enseignants du Master et au personnel de l'EISMV,

A mes collègues du Master 2013, *pour la conviviale année*

A toutes les personnes qui ont contribué à réaliser ce travail.

RESUME

Le but de la présente étude était principalement de caractériser génétiquement 59 souches de salmonelles, récoltées à partir des fèces de volailles au niveau de deux agglomérations périurbaines de Dakar entre juillet 2012 et juin 2013.

Tous les échantillons ont été testés pour déterminer la prévalence de cinq gènes de virulence. Les gènes *invA*, *spiC* et *pipD* ont été détectés dans tous les isolats, et *orfL* dans 57 isolats. Tandis que le gène de virulence *spvR*, détecté dans un isolat, était associé au sérovar Nitra.

La présence des intégrons de classes 1, 2 et 3 a été déterminée pour tous les isolats. L'analyse moléculaire a révélé que 22,03% de la collection portaient un gène codant l'intégrase *intII*. Les régions variables des intégrons amplifiés ont été de tailles variables suggérant la diversité des cassettes de gènes de résistance aux antibiotiques. Deux isolats portaient le gène *int2* avec les cassettes *dfrA1-sat-aadA1*. Aucun intégron de classe 3 n'a été identifié.

Par ailleurs, les souches antibiorésistantes ont été étudiées selon les mécanismes de résistance les plus observés phénotypiquement. Sept gènes de résistance aux antibiotiques ont été recherchés. Les gènes plasmidiques de résistance aux quinolones *qnrA* et *qnrS* n'ont pas été détectés dans les 19 isolats ayant un profil de résistance à l'acide nalidixique. Toutefois, le gène *qnrB* a été identifié dans 15 isolats parmi ces 19 isolats. En outre, 38 isolats ont été testés pour la détection des gènes de résistance aux tétracyclines. Une plus forte prévalence a été obtenue pour le gène *tetC* (50%), suivie de *tetB*, *tetA* et *tetG*. Ainsi, 99,95% des isolats résistants phénotypiquement aux tétracyclines possédaient au moins un gène *tet*.

La présence de plusieurs gènes de virulence traduit le degré de pathogénicité des souches de *Salmonella* et donc leur aptitude à provoquer des maladies sévères chez les poulets. L'identification des intégrons de classes 1 et 2 montre la capacité des souches à diffuser plusieurs gènes de résistance dans les élevages de poulets. La présence des gènes *qnr* codant la résistance aux quinolones nécessite la mise en place de mesures préventives d'usage rationnel des antibiotiques afin de limiter leur diffusion. D'autres travaux sont nécessaires pour élucider le support chromosomique de la résistance aux quinolones des salmonelles aviaires au Sénégal et leur propagation dans l'environnement.

Mots clés : *Salmonella* aviaire, gènes de virulence, intégrons, gènes de résistance aux antibiotiques, Dakar

ABSTRACT

The purpose of this study was to characterize genetically 59 *Salmonella* strains collected from poultry feces at two peri-urban areas of Dakar between July 2012 and June 2013.

All samples were tested to determine the prevalence of five virulence genes. *InvA*, *spiC* and *pipD* genes were detected in all isolates and *orfL* in 57 isolates. Meanwhile *spvR* virulence gene detected in one isolate was associated with serovar Nitra.

The presence of classes 1, 2 and 3 integron was determined for all isolates. Molecular analysis showed that 22.03% from the collection encoded an integrase gene *intI1*. The variable regions amplified were in variable sizes suggesting the diversity of antibiotic resistance gene cassettes. Two isolates carried *intI2* gene with *dfrA1-sat-aadA1* cassettes. No class 3 integron was identified.

In addition, antibiotic-resistant strains have been studied in the most resistance mechanisms observed phenotypically. Seven antibiotic resistance genes have been sought. Plasmid resistance quinolones genes *qnrA* and *qnrS* were not detected in 19 isolates with nalidixic acid resistance profile. However, *qnrB* gene was identified in 15 isolates among these 19 isolates. In addition, 38 isolates were tested for the detection of tetracycline resistance genes. A higher prevalence was obtained for *tetC* gene (50%), followed by *tetB*, *tetA* and *tetG*. Thus, 99.95% isolates phenotypically resistant to tetracyclines had at least one *tet* gene.

The presence of several virulence genes reflects the pathogenicity degree of *Salmonella* strains and therefore their ability to cause severe disease in chickens. Identification of integrons 1 and 2 classes shows the ability of the strains to broadcast multiple resistance genes in poultry farms. The presence of *qnr* genes encoding quinolone resistance requires the preventive implementation measures of antibiotics rational use to limit their spread. Further work is needed to clear up the quinolone resistance chromosomal support of avian *Salmonella* in Senegal and their propagation in the environment.

Keywords: avian *Salmonella*, virulence genes, integrons, antibiotics resistance genes, Dakar

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	2
CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS.....	2
I.1. Salmonellose.....	2
I.1.1. Maladie chez l’homme	2
I.1.2. Maladie chez les animaux	2
I.2. Salmonelles.....	3
I.2.1. Classification	3
I.2.2. Sérotypes de <i>Salmonella</i>	3
I.2.3. Déterminants génétiques de la virulence.....	3
CHAPITRE II. ANTIBIORÉSISTANCE DES SALMONELLES	5
II.1. Antibiorésistance	5
II.1.1. Résistance intrinsèque et résistance acquise	5
II.1.2. Mécanismes et transfert de résistance	5
II.2. Support génétique de l’antibiorésistance	6
II.2.1. Chromosome	6
II.2.2. Plasmides.....	6
II.2.3. Transposons.....	6
II.2.4. Intégrons.....	7
II.2.5. Gènes de résistance aux antibiotiques.....	8
II.3. Surveillance de la salmonellose et de l’antibiorésistance	9
II.4. Virulence et antibiorésistance	10
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	11
CHAPITRE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	11
I.1. Matériel.....	11
I.1.1. Matériels biologiques	11
I.1.2. Matériel d’étude de laboratoire	11
I.2. Méthodes.....	11
I.2.1. Cadre, type et durée de l’étude.....	11
I.2.2. Critères d’inclusion et d’exclusion.....	11
I.2.3. Extraction de l’ADN génomique total.....	11
I.2.4. Définition des témoins et des amorces utilisées	12

I.2.5. Préparation du mélange réactionnel	15
I.2.6. Paramétrage du thermocycleur	15
I.2.7. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.....	16
I.2.9. Visualisation des produits de PCR	16
CHAPITRE II : RÉSULTATS ET DISCUSSION	17
II.1. Résultats	17
II.1.1. Résultat de la recherche des gènes de virulence	17
II.1.2. Résultat de la recherche des intégrons	17
II.1.3. Résultats de la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques .	18
II.2. Discussion.....	21
II.2.1. Méthodes	21
II.2.2. Résultats	21
CONCLUSION	25
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	26
ANNEXE.....	31

LISTE DES ABREVIATIONS

%	: pour cent
°C	: degré Celsius
AGISAR	: Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance
<i>attI</i>	: site de recombinaison d'un intégron
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CNRS	: Centre National de la Recherche Scientifique
dNTP	: désoxynucléotide triphosphate
F	: forward
g	: gramme
GTS	: gélose trypticase soja
h	: heure
ICE	: éléments d'intégration et de conjugaison
<i>intI1</i>	: intégrase de classe 1
<i>intI2</i>	: intégrase de classe 2
IPD	: Institut Pasteur de Dakar
mix	: mélange réactionnel
mg	: milligramme
MgCl ₂	: chlorure de magnésium
mM	: millimole
NA	: non applicable
OMS	: Organisation mondiale de la santé
OIE	: Organisation mondiale de la santé animale
ORF	: Open Reading Frame
Pc	: promoteur de la région conservée 5' d'un intégron
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pb	: pair de base
PPI	: pour préparation injectable
qsp	: quantité suffisante pour
R	: reverse
RQMP	: résistance aux quinolones à médiation plasmidique
<i>S.</i>	: <i>Salmonella</i>
SPI	: <i>Salmonella</i> Pathogenicity Island
TAE	: tampon Tris, Acétate, EDTA
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
Tn	: transposon
UBE	: Unité de Bactériologie Expérimentale
μl	: microlitre
μM	: micromole

LISTE DES FIGURES

Figure 1	: Résultat de PCR spiC	17
Figure 2	: Logigramme de la caractérisation des intégrons de classe 1	18
Figure 3	: Résultat de PCR qnrB	18
Figure 4	: Résultat de PCR qnrS	18
Figure 5	: Résultat de PCR tetB	19

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	: Liste des amorces utilisées pour le typage de la virulence de <i>Salmonella</i> par PCR	13
Tableau II	: Liste des amorces pour la recherche des intégrons dans les isolats de <i>Salmonella</i> d'origine aviaire	13
Tableau III	: Liste des amorces pour caractériser les intégrons de classes 1 et 2...	14
Tableau IV	: Liste des amorces pour rechercher des gènes de résistance...	14
Tableau V	: Composition du mélange réactionnel pour une PCR simplex.	15
Tableau VI	: Programme de la PCR pour détecter les facteurs de virulence.	16
Tableau VII	: Programme de la PCR pour détecter les gènes de résistance...	16
Tableau VIII	: Phénotypes et déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques	20

ANNEXE

Matériels d'étude de laboratoire	31
--	----

INTRODUCTION

Provoquée par des entérobactéries du genre *Salmonella*, la salmonellose est une maladie infectieuse, parmi les zoonoses majeures en raison de sa fréquence, de sa gravité et de ses conséquences économiques [1]. Les salmonelloses d'origine animale se présentent sous deux formes dont la gastro-entérite à *Salmonella* (à risque zoonotique) et la toxi-infection alimentaire collective [1]. Bien que la bactérie soit d'origine intestinale, les salmonelles diffusent largement dans l'environnement. Elles peuvent être retrouvées dans les effluents d'élevage, les eaux usées d'origine humaine et au niveau de matériels pouvant être sujets à une contamination fécale [2]. D'une part, *Salmonella* possède un mécanisme complexe de déterminants génétiques pour envahir, reproduire et survivre dans l'hôte. Les gènes de virulence peuvent être répartis sur des réseaux dénommés îlots génomiques de pathogénicité de *Salmonella* ou portés par des éléments génétiques mobiles. L'activation de ces gènes sont la base de sa pathogénicité chez l'hôte [3]. D'autre part, l'émergence et le développement croissant de la résistance bactérienne aux antibiotiques constitue un problème mondial. Cette résistance pourrait nuire à l'efficacité des traitements des maladies chez l'homme. L'utilisation massive et abusive des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire contribue à ce problème [4].

Ainsi, la surveillance en laboratoire de la virulence des sérovars circulants et la caractérisation de la résistance aux antibiotiques doivent être développées pour améliorer la prestation des soins, prévenir et contrôler la salmonellose. Dans le cadre du projet AGISAR, des échantillons de fèces de poulets de chair ont été prélevés dans la zone péri-urbaine de Dakar pour en isoler des salmonelles éventuelles. Une première étude a testé la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Salmonella* isolées. Parmi ces isolats, des souches résistantes à quatre familles d'antibiotiques ont suscité des interrogations quant à leur virulence et aux déterminants génétiques responsables du phénotype de résistance observé. Face à cette problématique, la technique de PCR permet de détecter la présence ou non de gènes de virulence et d'antibiorésistance dans ces souches. En conséquence, l'objectif principal de ce travail est de caractériser ces souches par des techniques de biologie moléculaire ; les objectifs spécifiques étant d'identifier les supports génétiques de la virulence de tous les isolats et de déterminer les mécanismes associés au phénotype de résistance aux antibiotiques des isolats. Ce travail comprend deux parties. La première partie est une synthèse bibliographique notamment sur la salmonellose, les facteurs de virulence et la résistance aux antibiotiques. La deuxième partie porte essentiellement sur les travaux de caractérisation moléculaire des souches de *Salmonella* sélectionnées. Elle présente le cadre de l'étude, le matériel et les méthodes, les résultats et la discussion.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS

I.1. Salmonellose

I.1.1. Maladie chez l'homme

La salmonellose est l'une des maladies bactériennes d'origine alimentaire la plus répandue dans le monde [5]. C'est une infection diarrhéique et systémique chez l'homme. Il existe plusieurs formes cliniques de salmonellose humaine. Les salmonelloses typhique et paratyphique ont pour seul réservoir l'homme [4]. Tandis que les salmonelloses humaines non typhiques sont considérées comme des maladies zoonotiques. En général, la maladie chez l'homme fait suite à une infection subclinique d'animaux entraînant une contamination de la viande, des œufs, des carcasses lors de l'abattage [6], ou une contamination secondaire des fruits et des légumes dont les plants ont été fertilisés par des matières fécales animales ou irrigués avec des eaux usées [2, 5]. L'évolution générale de cette gastro-entérite est bénigne mais des sujets restent porteurs sains de *Salmonella* et vont favoriser la transmission interhumaine par la voie féco-orale [5, 7]. En outre, les toxi-infections alimentaires collectives à *Salmonella* sont dues à la consommation simultanée par plusieurs personnes d'aliments massivement contaminés. Les personnes immunodéprimées, les jeunes enfants et les personnes âgées sont plus susceptibles d'avoir une maladie grave [1].

I.1.2. Maladie chez les animaux

La salmonellose peut atteindre toutes les espèces d'animaux domestiques ; les jeunes et les animaux en gestation ou lactation sont les plus sensibles [2]. En fonction de l'hôte, les salmonelles peuvent induire un large spectre de maladies telles qu'une gastroentérite ou des infections asymptomatiques. Dans la forme subclinique, l'animal peut soit développer une infection latente, soit devenir porteur temporaire, intermittent ou durable excréant l'agent pathogène dans ses fèces. Les plus dangereux sont les porteurs sains, à l'origine de contamination par les fèces [1]. Ces sujets, en particulier les volailles, jouent un rôle important dans la diffusion de l'infection entre les différents élevages et également en tant que source de contamination des aliments et à l'origine de l'infection humaine. Les salmonelles peuvent aussi être trouvées dans l'alimentation animale, entraînant un portage gastro-intestinal asymptomatique ou des maladies infectieuses chez l'animal, notamment chez les volailles [2].

La salmonellose reste une maladie qui provoque des grandes pertes économiques pour l'industrie avicole. Le succès de la thérapie de cette maladie dépend de la sélection des traitements antibiotiques appropriés. Des méthodes prophylactiques, telle que l'utilisation d'antibiotiques permettent de mieux maîtriser le statut des troupeaux [8]. Par conséquent, la surveillance périodique de la résistance aux antibiotiques des souches de *Salmonella*, ainsi que la

compréhension des mécanismes moléculaires de diffusion de cette résistance seraient des mesures importantes dans la détection de l'apparition et de la propagation de la résistance aux antibiotiques [9].

I.2. Salmonelles

I.2.1. Classification

Les salmonelles sont des bacilles à coloration de Gram négative. Le genre *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, hôtes habituels du tube digestif. Il est subdivisé en deux espèces : *S. bongori* et *S. enterica* qui est divisée en 6 sous-espèces (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houteanae* et *indica*) [10].

Les salmonelles sont des pathogènes intracellulaires facultatifs responsables de zoonoses. *Salmonella spp.* est classé dans le groupe de risque 2 des microorganismes pouvant provoquer une maladie humaine ou animale, mais ne diffusant pas ou peu dans les populations et pour laquelle une prophylaxie et un traitement efficaces sont disponibles [11].

I.2.2. Sérotypes de *Salmonella*

La sérologie, basée sur la caractérisation des antigènes somatiques et des protéines flagellaires, permet de classer les sous-espèces en sérovars. Une part importante de la diversité existant dans ces deux antigènes entraîne la reconnaissance régulière de nouveaux sérotypes. Le sérotypage est donc une composante essentielle de la surveillance épidémiologique et d'investigation des épidémies de salmonellose [12]. Actuellement, plus de 2600 sérovars connus sont répertoriés au sein du schéma de Kaufmann- White-Le Minor. Ce schéma est maintenu par le Centre de Référence et de Recherche sur les *Salmonella* à l'Institut Pasteur, collaborateur de l'OMS [10]. Les sérovars impliqués les plus fréquemment dans les infections humaine et animale appartiennent à la sous-espèce *enterica* [2].

I.2.3. Déterminants génétiques de la virulence

I.2.3.1. Facteurs de virulence

La virulence constitue l'aptitude relative d'une bactérie à induire l'apparition d'une pathologie infectieuse [13]. Les facteurs de virulence sont des produits nécessaires aux microorganismes pour provoquer une maladie. Les caractéristiques essentielles de la pathogénie des salmonelles sont leur capacité à entrer dans les cellules-hôtes et à y demeurer comme parasite intracellulaire facultatif [14].

I.2.3.2. Îlots de pathogénicité

Les étapes essentielles de la pathogénie sont sous la dépendance de facteurs de virulence codés par des gènes organisés en blocs sur le chromosome, qualifiés « d'îlots de pathogénicité » ou SPI (*Salmonella* Pathogenicity Island) et constituant une des caractéristiques essentielles de la virulence des salmonelles

[14, 15]. Il est important d'identifier les gènes de virulence qui sont responsables de l'établissement de l'infection par *Salmonella spp* chez les volailles. Cinq SPI ont été bien caractérisés [16]. SPI1 et SPI2 encodent des systèmes de sécrétion de type III qui confèrent les principales caractéristiques de virulence de *S. enterica* [15]. SPI1 est impliqué dans l'invasion des cellules de l'hôte et de l'inflammation. Présent dans SPI1 [17], le gène d'invasion *invA*, existe chez la plupart des souches de *Salmonella*. Il est lié à l'invasion des cellules phagocytaires ou non phagocytaires de la muqueuse intestinale [18]. SPI2 est nécessaire pour coder les protéines impliquées dans la survie intracellulaire et la réplication au sein de phagocytes. Il contribue également à la dissémination systémique des salmonelles [3]. *SpiC* est un gène de SPI2 codant pour les composants structuraux et de sécrétion. Il contribue à initier la production de médiateurs ayant une fonction considérable dans la virulence de *Salmonella*. Le gène *spiC* est aussi impliqué dans l'expression d'un composant du filament des flagelles jouant un rôle important après l'infection à *Salmonella* [19]. SPI3 est présent dans toutes les lignées. Toutefois, les distributions des SPI4 et SPI5 n'ont pas été établies [20]. SPI4 joue un rôle lors de l'interaction initiale avec l'épithélium intestinal et contribue à la persistance à long terme [16]. Le gène *orfL* de SPI4 est nécessaire à la survie intra-macrophages et porte éventuellement un système impliqué dans la sécrétion de toxines [15]. SPI5 est impliqué dans la réalisation de plusieurs processus pathogènes lors de l'infection [16]. *PipD*, premier gène de l'îlot SPI5, a une cible à la surface ou à l'intérieur des cellules hôtes [21].

I.2.3.3. Plasmide de virulence

Salmonella dispose d'autres facteurs de virulence qui ne sont pas localisés dans des SPI. Ils peuvent être observés sur des supports génétiques mobiles comme des plasmides. Le plasmide de virulence de *Salmonella*, composé de cinq gènes (*spvRABCD*), potentialise la propagation systémique de l'agent pathogène et l'aide à se répliquer dans les sites extra-intestinaux [18]. En effet, l'expression de ces gènes pourrait jouer un rôle dans la multiplication intracellulaire de *Salmonella*. Le produit de la *spvR* est une protéine de régulation positive essentielle pour l'expression des autres gènes *spv* [14, 15].

CHAPITRE II. ANTIBIORÉSISTANCE DES SALMONELLES

II.1. Antibiorésistance

Un antibiotique est un composé chimique, naturellement produit par un micro-organisme ou, produit de synthèse dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose et d'une manière spécifique. Il a le pouvoir d'inhiber la croissance voire de détruire d'autres bactéries [22]. Ainsi, l'antibiorésistance est la capacité d'un micro-organisme à résister aux effets des antibiotiques. Cette résistance confère donc à celui-ci un avantage sélectif qui lui permet de se multiplier en présence de l'antibiotique.

II.1.1. Résistance intrinsèque et résistance acquise

- La résistance intrinsèque aux antibiotiques est due aux propriétés intrinsèques physiologiques, biochimiques ou structurales de la bactérie qui sont indépendantes de tout contact avec un antibiotique. Il s'agit donc d'une résistance naturelle si toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. Elle est à transmission verticale.

- La résistance acquise survient lorsqu'un individu d'une population de bactéries normalement sensibles devient résistant en raison d'une pression environnementale. Elle fait suite à des modifications génétiques acquises par mutation spontanée de gènes chromosomiques ou par transfert horizontal de matériel génétique qui permet une diffusion des gènes de résistance [23]. L'exposition à des antibiotiques conduit à une multiplication sélective de bactéries résistantes qui peuvent persister et remplacer les bactéries sensibles [4].

II.1.2. Mécanismes et transfert de résistance

Il existe plusieurs mécanismes de résistance contre un large spectre d'antibiotiques ou spécifiques d'un seul antibiotique. Les mécanismes peuvent aboutir à une action réduite ou à une perte d'effet de l'antibiotique sur sa cible. Une grande variété de mécanismes d'action existe dont le développement d'une voie enzymatique alternative, la diminution de l'accumulation cellulaire des antibiotiques, la modification de la cible des antibiotiques, la réduction de la perméabilité membranaire et l'efflux des antibiotiques [24].

Les mécanismes de transfert d'ADN entre espèces bactériennes permettent la propagation de gènes de résistance aux antibiotiques. Le système de transfert vertical transmet l'acquisition de nouvelles résistances à la descendance suite aux divisions cellulaires. Tandis que le transfert horizontal des éléments génétiques contribue à la propagation des gènes de résistance par trois mécanismes principaux.

Par conjugaison, un élément génétique mobilisable est transféré d'une bactérie à une autre. La bactérie émettrice porte un pilus au travers duquel l'ADN est injecté pour passer dans une autre bactérie de la même espèce ou d'espèces voisines.

Le processus de transduction permet à un segment d'ADN d'être transféré d'une bactérie à une autre via un bactériophage. En se répliquant, le phage intègre une partie du génome bactérien. En quittant la cellule, il emporte des gènes bactériens supplémentaires qui pourront être transférés dans une autre bactérie. Enfin, la transformation est un processus au cours duquel la bactérie acquiert et incorpore de l'ADN exogène nu présent dans son environnement. L'ADN d'une bactérie, une fois capté, permet l'expression de ses gènes par la nouvelle bactérie [24].

En outre, le transfert horizontal de gènes est un processus par lequel des fragments d'ADN et des éléments génétiques mobiles peuvent être transférés entre les bactéries de même ou de différentes espèces. Ces éléments comprennent entre autres les éléments d'intégration et de conjugaison (ICE) incluant les transposons, les intégrons, les îlots génomiques, et d'autres éléments non classés intégrés dans les chromosomes [25].

La facilité de transfert du matériel génétique joue un rôle important dans la propagation de l'antibiorésistance d'une souche bactérienne à une autre. Les gènes de résistance ont par conséquent un fort potentiel de diffusion parmi les bactéries. Il en découle que les antimicrobiens peuvent être responsables de la multiplication des bactéries résistantes, aussi bien parmi les souches virulentes que dans la flore bactérienne normale [4].

II.2. Support génétique de l'antibiorésistance

Les gènes de résistance sont codés soit par les chromosomes, soit par des éléments génétiques tels que les plasmides, les transposons et les intégrons [4].

II.2.1. Chromosome

La résistance chromosomique, événement rare, apparaît spontanément après une mutation dans le chromosome. L'antibiotique n'est pas l'agent mutagène mais il sélectionne les mutants devenus résistants. Cette résistance est confinée verticalement à l'espèce chez laquelle elle apparaît.

II.2.2. Plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN extra-chromosomiques, capables de répllication autonome dans les bactéries. Vecteurs de mobilité pour les transposons et les intégrons, ils diffusent souvent des gènes qui confèrent aux bactéries certaines caractéristiques telles que la résistance, la virulence, la capacité de métaboliser des substances rares, et la persistance dans des conditions extrêmes [25]. Ils portent également des gènes de transfert permettant le passage du plasmide d'une bactérie à une autre de la même espèce ou d'espèces différentes.

II.2.3. Transposons

Un transposon est une séquence d'ADN capable de se déplacer et de se multiplier de manière autonome dans un génome. Il peut donc s'intégrer au

chromosome de la bactérie et permet la dissémination des gènes de résistance [23].

II.2.4. Intégrons

L'intégron est une structure portée par des plasmides, des transposons rarement sur le chromosome des bactéries. Les intégrons constituent un système de capture, d'expression et de dissémination de gènes sous forme de cassettes. Ils sont impliqués dans la dissémination de la multirésistance des bactéries aux antibiotiques [23, 26].

II.2.4.1. Structure des intégrons

Les intégrons sont des structures génétiques constituées de deux segments (région 5' conservée et région 3') encadrant une région centrale dans laquelle vont pouvoir être capturées des gènes de résistance insérés dans des cassettes.

II.2.4.1.1. Région 5' conservée

La région conservée en 5' est commune à tous les intégrons. Elle est constituée par l'association de trois éléments. Premièrement, un gène *intI* code une intégrase qui est une recombinase spécifique de site. Cette enzyme catalyse l'insertion et l'excision de gènes contenus dans des cassettes de gènes [27]. Puis, un site *attI* constitue le site spécifique de recombinaison, d'intégration préférentielle des cassettes. Enfin, un promoteur *P_C*, orienté dans le sens inverse du gène de l'intégrase, permet la transcription donc l'expression des gènes de cassettes. La cassette intégrée en premier, donc la plus éloignée du promoteur, est la plus faiblement exprimée.

II.2.4.1.2. Cassettes

Dans la majorité des cas, la région conservée est suivie en 3' d'un réseau de cassettes orientées dans le sens inverse du gène *intI*. Les cassettes de gènes sont des unités fonctionnelles indépendantes, mobiles, non répliquatives, sous forme circulaire ou intégrée au site *attI*. Elles sont constituées d'une séquence codante et d'un site de recombinaison *attC* reconnu par l'intégrase. Des cadres ouverts de lecture (ORF : Open Reading Frame) ne codant pour aucune fonction connue sont associés à des sites *attC* sous forme de cassettes [23]. Maintenues au cours de la division cellulaire, plusieurs cassettes peuvent exister en tandem sur un même intégron conférant ainsi une multirésistance à la bactérie qui l'héberge.

II.2.4.1.3. Région 3' variable

Cette partie n'est pas toujours présente d'un intégron à un autre. Elle peut être constituée d'un gène conférant un phénotype de résistance aux antibiotiques comme le gène *sulI* responsable de la résistance aux sulfamides [28].

II.2.4.2. Principales classes d'intégrons de résistance

Les intégrons impliqués dans la résistance aux antibiotiques sont regroupés en plusieurs classes en fonction de la nature de leur intégrase. Les intégrons de classe 1, 2 et 3 sont les mieux caractérisés et reconnus impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques.

Les intégrons de classe 1 sont très répandus. Ils ont été surtout décrits chez les entérobactéries et autres bactéries à Gram négatif chez des souches d'origine humaine, animale et environnementale [23]. Chez ces intégrons, il existe un cadre de lecture ouvert ORF1 dont la présence permet d'augmenter l'efficacité de la première cassette [26].

Les intégrons de classe 2 ont une structure similaire à celle des intégrons de classe 1 et sont associés au transposon Tn7 [29]. Ce transposon contient trois cassettes de résistance : *dfrA1* conférant la résistance au triméthoprim, *sat* à la streptothricine, *aadA1* à la streptomycine et à la spectinomycine. Des intégrons de classe 2 ont été aussi retrouvés chez des souches de bacille à Gram négatif d'origine humaine, animale ou environnementale [23].

L'intégron de classe 3, présentant 61% d'homologie avec *intI1*, est constitué également dans sa région 5' d'un gène *intI* associé à un promoteur et recombinaison à un site *attI*. En outre, il possède un site de recombinaison *attI3* et deux régions promotrices [23].

II.2.5. Gènes de résistance aux antibiotiques

De nombreux gènes impliqués dans l'antibiorésistance ont été décrits [23, 30-34]. Toutefois, les gènes déterminant la résistance à quatre antibiotiques seront développés pour pouvoir expliquer les phénotypes d'antibiorésistance les plus retrouvés dans l'étude précédente qui a permis l'isolement des souches [35].

II.2.5.1. Quinolones (acide nalidixique)

Les cibles d'action des quinolones sont les enzymes bactériennes ADN gyrase et topoisomérase IV. Les sous-unités de l'ADN gyrase sont codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*, celles de la topoisomérase IV par les gènes *parC* et *parE*. La résistance acquise aux quinolones implique surtout des mutations chromosomiques par substitution d'acides aminés dans une région des sous-unités des *gyrA* ou *parC* [30]. La résistance aux quinolones peut également être médiée par des plasmides produisant une protéine codée par les *qnr* qui protège les cibles des quinolones. Le premier gène à médiation plasmidique impliqué dans la résistance aux quinolones (*qnrA*) a été rapporté en 1998. Des gènes de résistance aux quinolones à médiation plasmidique supplémentaires (*qnrB*, *qnrS*) et leurs homologues chromosomiques ont par la suite été découverts [31].

II.2.5.2. Tétracyclines

Les mécanismes de résistance codés par des gènes résistants à la tétracycline comprennent entre autres l'inactivation enzymatique et la protection du

ribosome. Plus de 35 classes de gènes résistants à la tétracycline ont été décrites. Les gènes de résistance à la tétracycline des classes A à D et G sont les plus fréquemment détectés chez les Entérobactéries. Le gène *tetA* a été trouvé sur les plasmides et les chromosomes, tandis que *tetB*, *tetC* et *tetD* ont été détectés sur les chromosomes de différents sérotypes de *Salmonella*. Le gène *tetG* a été identifié sur des îlots génomiques et d'autres types de phages [32].

II.2.5.3. Sulfaméthoxazole-Triméthoprim

La résistance transférable à cette association d'antibiotiques est largement répandue. La résistance aux sulfamides est surtout médiée par deux enzymes codées par des gènes *sul1* ou *sul2*, trouvés à peu près à la même fréquence parmi les bactéries Gram-négatifs entéropathogènes résistantes aux sulfamides. Le gène *sul1* est aussi lié à d'autres gènes de résistance transférables [33].

La résistance au triméthoprim résulte généralement d'une mutation comme la modification de la perméabilité de la cible *dihydrofolate reductase*. La présence de gènes de résistance *dfp* codés par les plasmides est le mécanisme le plus commun, responsable de l'acquisition de la résistance au triméthoprim [34].

II.3. Surveillance de la salmonellose et de l'antibiorésistance

La surveillance des salmonelloses au laboratoire permet une identification rapide des cas et un suivi de l'émergence de la pharmaco-résistance au sein de la population. Il est important de détecter l'apparition de nouveaux profils de résistance et de surveiller l'impact des interventions visant à réduire au minimum la propagation de cette résistance. Dans de nombreux pays d'Afrique, les antibiotiques vendus sur le comptoir, sont largement utilisés dans l'industrie de la volaille pour réduire la mortalité et accroître la productivité [36]. Les tétracyclines et les sulfamides, relativement peu coûteux, sont les antibiotiques les plus utilisés au Sénégal [37, 38]. Cependant, le recours aux antibiotiques en médecine vétérinaire et pour les besoins de l'élevage peuvent se répercuter sur la santé humaine en cas de développement de bactéries résistantes chez les animaux et de transfert éventuel à l'homme par la chaîne alimentaire ou l'environnement [4]. En effet, la flore intestinale des animaux destinés à la consommation humaine, y compris les volailles, constitue le réservoir probable de souches antibiorésistantes particulières. Les résistances peuvent donc passer de l'animal à l'homme par transmission de bactéries antibiorésistantes, ou par transfert de gènes de résistance dans le tube digestif humain après ingestion de produits contaminés [4]. L'antibiorésistance de *Salmonella* est devenue ainsi une préoccupation sérieuse qui menace la capacité de traiter des infections chez les humains et les animaux [39]. La lutte contre l'émergence des antibiorésistances nécessite une compréhension de leurs mécanismes et des phénomènes moléculaires impliqués dans la dissémination des gènes correspondants. Toutefois, peu de rapports ont été publiés sur la base moléculaire des

phénotypes d'antibiorésistance chez les *Salmonella* d'origine animale par rapport aux données sur les cas retrouvés chez l'homme.

II.4. Virulence et antibiorésistance

La virulence et l'antibiorésistance partagent des caractéristiques communes. Le développement de facteurs de virulence et l'évolution des déterminants de la résistance se chevauchent considérablement, et il est difficile de les considérer comme des processus indépendants. La recombinaison a un rôle important dans l'évolution des déterminants de la résistance aux antibiotiques. De même, la construction d'un îlot de pathogénicité nécessite le recrutement de différents gènes qui se recombinent pour produire un élément génétique unique contenant plusieurs gènes de virulence. De l'autre côté, les mutations et la sélection croisée sont parmi les mécanismes qui favorisent la sélection et la persistance des agents pathogènes les plus virulents et les plus résistants. Cependant, la résistance est associée dans la plupart des cas à une diminution de la virulence.

En outre, les déterminants génétiques des gènes de virulence et d'antibiorésistance pourraient être hébergés par le même élément transférable. D'une part, les plasmides sont d'importants vecteurs de diffusion de l'antibiorésistance et des déterminants de virulence. Cette association pourrait avoir un impact sur la propagation des clones de *Salmonella* plus résistants. En effet, le port des plasmides codant pour des facteurs de résistance et de virulence conduit à la sélection de déterminants de la résistance des bactéries dans des environnements non infectieux soumis à la pression sélective des antibiotiques. D'autre part, les ICE sont des éléments génétiques mobiles auto-transmissibles qui aident à la diffusion horizontale de gènes situés sur des plasmides ou des chromosomes. En théorie, ils peuvent capturer des gènes de virulence et les propager conjointement avec des gènes de résistance [13, 25].

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.1. Matériel

I.1.1. Matériels biologiques

Il s'agit de souches de *Salmonella enterica* provenant de la soucheotèque du projet AGISAR, une étude sur la surveillance intégrée de l'antibiorésistance de souches de salmonelles isolées des aliments, animaux et humains. Au total, 59 isolats d'origine aviaires ont été utilisés dans notre étude. Ils ont été isolés à partir des fientes de poulets de chair, prélevés dans des fermes avicoles localisées à Keur Massar et à Sangalkam. Leur isolement et leur sérotypage étaient les objectifs d'une étude précédente [35].

I.1.2. Matériel d'étude de laboratoire

Le matériel utilisé pour l'extraction d'ADN, l'amplification génique, l'électrophorèse et la révélation des produits amplifiés est listé dans l'annexe.

I.2. Méthodes

I.2.1. Cadre, type et durée de l'étude

L'étude expérimentale prospective a été réalisée dans l'Unité de Bactériologie Expérimentale (UBE) de l'Institut Pasteur de Dakar. Il s'agit d'une étude quantitative et qualitative par des analyses moléculaires des souches de *Salmonella* d'origine aviaire. La conception de l'étude, les mises au point des PCR et les travaux de recherche se sont déroulés de décembre 2013 à mai 2014.

I.2.2. Critères d'inclusion et d'exclusion

Pour la recherche des gènes de virulence, tous les isolats de salmonelles ont été inclus. Tandis que le critère d'inclusion pour la recherche des gènes de résistance dépend du profil d'antibiorésistance de chaque souche ; le critère d'exclusion était donc la sensibilité à l'antibiotique. Toutefois, parmi les 59 isolats, plusieurs ont été phénotypiquement multirésistants au moins à deux antibiotiques. Ainsi, 38 isolats phénotypiquement résistants à la tétracycline, 19 isolats ayant un profil phénotypique résistants à l'acide nalidixique et 23 isolats résistants à l'association sulfaméthoxazole-triméthoprimine ont été retenus pour les caractérisations génétiques.

I.2.3. Extraction de l'ADN génomique total

I.2.3.1. Remise en culture des souches

Les cultures bactériennes purifiées stockées à -26°C ont été décongelées dans un bac à glace pour éviter un choc thermique. Afin de favoriser le rendement, 500 µl de chaque culture ont été incubés dans 5 ml de bouillon nutritif puis placés dans une étuve réglée à 37°C pendant 20h. Le lendemain, une goutte du bouillon turbide prise avec une anse a été inoculée sur de la Gélose Trypticase Soja

fraîchement préparée. Les souches remises en culture ont été ensuite incubées à la température optimale requise de 37°C pendant une nuit.

I.2.3.2. Extraction par thermolyse

L'extraction d'ADN bactérien a été réalisée par thermolyse libérant l'ADN bactérien par choc thermique. Quatre à cinq colonies bien isolées de la culture bactérienne ont été remises en suspension avec 200 µl d'eau distillée stérile. Le mélange a été chauffé dans de l'eau portée à ébullition pendant 10 minutes. Ensuite, il a été centrifugé à 12 000 tours par minute pendant 5 minutes. Le surnageant, ultérieurement utilisé comme matrice d'ADN, a été récupéré et conservé à -20°C.

I.2.4. Définition des témoins et des amorces utilisées

I.2.4.1. Définition des souches de référence et du témoin négatif

Pour toutes les réactions d'amplification génique, le témoin négatif a été constitué par le mélange réactionnel et de l'eau pour préparation injectable (PPI). Tandis que le témoin positif varie selon le gène à caractériser. Les souches constituant les témoins positifs étaient des souches de référence :

- P1 : *Salmonella* Typhimurium 4/74 ATCC
- P2 : *Salmonella* Abortusovis
- P3 : *Salmonella* Concord 05-5343
- P4 : *Salmonella* Havana 07-319
- P5 : *Enterobacter cloacae* AME
- P6 : *Salmonella* Typhimurium 02-8213
- P7 : *Shigella dysenteriae* CAR 10

I.2.5.2. Définition des amorces utilisées pour l'étude

Les amorces ont été utilisées en simplex. Des solutions filles d'amorces ont été préparées à partir de la solution mère afin de limiter les phases de congélation/décongélation pouvant altérer la qualité des amorces. Toutes ces solutions sont conservées à -20°C.

I.2.5.2.1. Pour la détection des gènes de virulence

Afin d'évaluer le potentiel de virulence des 59 souches, la distribution des cinq gènes associés à la virulence de *Salmonella* a été déterminée. Des PCR ont été réalisées avec les paires d'amorces *invA1/invA2*, *spiC1/spiC2*, *orfL1/orfL2*, *pipD1/pipD2* et *spvR1/spvR2* (Tableau I).

I.2.5.2.2. Pour la détection des intégrons

Tous les isolats de la collection ont été examinés pour la présence du gène de l'intégrase associé à une classe d'intégron. Ils ont été testés pour la présence des intégrases de classe 1 (*intI1*), 2 (*intI2*) et 3 (*intI3*) en utilisant spécifiquement les paires d'amorces *int1F/int1R*, *int2F/int2R* et *int3F/int3R* (Tableau II).

La détection de la région 3' des intégrons de classe 1 a été réalisée avec les couples d'amorces *ofr4/sul1* et *orf6/sul3*. Ensuite, les amorces 36854/36855, 36854/*sul1* et 36854/36856 ont été utilisées pour détecter la région variable des intégrons de la classe 1. D'autres amorces ont été utilisées pour caractériser la région 3' (*Int7S/sat1*) et les cassettes (*Hep51/dfr1*; *Hep74/Sat2*; *aadA1-F/aadA1-R*) de la région variable des intégrons de classe 2 (Tableau III).

Tableau I : Liste des amorces utilisées pour le typage de la virulence de *Salmonella* par PCR

Amorces	Séquence nucléotidique (5' → 3')	Température d'hybridation	Taille attendue
InvA 1	TGCCTACAAGCATGAAATGG	58°C	450 pb
InvA 2	AAACTGGACCACGGTGACAA		
SpiC 1	CCTGGATAATGACTATTGAT	54°C	301 pb
SpiC 2	AGTTTATGGTGATTGCGTAT		
orfL1	GGAGTATCGATAAAGATGTT	60°C	332 pb
orfL2	GCGCGTAACGTCAGAATCAA		
pipD1	CGGCGATTCATGACTTTGAT	56°C	399 pb
pipD2	CGTTATCATTCCGGATCGTAA		
SpvR 1	CCCCGGGAATTCGCTGCATAAGGTCAGAAGG	47°C	820 pb
SpvR 2	CCCCGGGATCCATGGATTTCTTGATTAATAAA		

Tableau II : Liste des amorces pour la recherche des intégrons dans les isolats de *Salmonella* d'origine aviaire

Amorces	Séquence nucléotidique (5' → 3')	Température d'hybridation	Taille attendue
int1	F: ATTTCTGTCCTGGCTGGCGA R: ACATGTGATGGCGACGCACGA	58°C	580 pb
int2	F : CACGGATATGCGACAAAAAGGT R: GATGCAAACGACTGACGAAATG	62°C	806 pb
int3	F: GCCCCGGCAGCGACTTTCAG R: ACGGCTCTGCCAAACCTGACT	62°C	1200 pb

F : forward (sens); R : reverse (anti-sens)

Tableau III : Liste des amorces pour caractériser les intégrons de classes 1 et 2

Amorces	Séquence nucléotidique (5' → 3')	Température d'hybridation
ORF4	CAAACATCAGGTCAAGTCTGCTT	58°C
Sul1	GTCCGACATCCACGACGTCTGATC	
ORF6	GTCGCTGCAACTCGCGACT	
Sul3	CCTGGAGATCTGCGAAGCGCAATC	
36854	GGCATGCAAGCAGCAAGCGCGTTA	
36855	AACCGAACTTGACCTGATAGTTTG	
36856	GAGCAATTATGTGCTTAGTGCA	
INT7S	TGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACA	62°C
Sat1	AGTCGCGCACAGTCTCATCGA	
Hep74	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA	
Hep51	GATGCCATCGCAAGTACGAG	
dfr1	TGAATCAATGGGAGCATTAC	
Sat2	TCGATGAGACTGTGCGCGACT	
AadA1-F	TATCAGAGGTAGTTGGCGTCAT	
AadA1-R	GTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATT	

I.2.5.2.3. Pour la détection des gènes de résistance**Tableau IV** : Liste des amorces pour rechercher des gènes de résistance

Amorces	Séquence nucléotidique (5' → 3')	Température d'hybridation	Taille attendue
qnrA	F: TCAGCAAGAGGATTTCTA R: GGCAGCACTATTACTCCC	55°C	657 pb
qnrB	F : GATCGTGAAAGCCAGAAAGG R : ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	55°C	469 pb
qnrS	F : ACGACATTCGTCAACTGCAA R : TAAATTGGCAACCTGTAGGC	55°C	417 pb
TetA	F: GTAATTCTGAGCACTGTCGC R: CTGCCTGGACAACATTGCTT	58°C	956 pb
TetB	F: CTCAGTATTCCAAGCCTTTG R: ACTCCCCTGAGCTTGAGGGG	58°C	470 pb
TetC	F: GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC R: CCTCTTGCGGGAATCGTCC	59°C	700 pb
TetG	F: GCAGCGAAAGCGTATTTGCG R: TCCGAAAGCTGTCCAAGCAT	59°C	230 pb

La recherche des gènes de résistance a été fonction du profil d'antibiorésistance de chaque isolat. L'amplification par PCR a été utilisée pour détecter les gènes codant pour la résistance aux quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) parmi les isolats résistant à l'acide nalidixique. Les gènes de résistance aux tétracyclines ont été détectés en utilisant les paires d'amorces *tetA*, *tetB*, *tetC* et *tetG* pour les isolats ayant un profil phénotypique résistant à la tétracycline (Tableau IV).

I.2.5. Préparation du mélange réactionnel

Le volume et la concentration finale de chaque réactif à utiliser ont été déterminés en fonction de la concentration initiale de la solution utilisée. Tous les produits nécessaires à la PCR ont été dégelés sur glace. Les éléments en contact avec les réactifs sont à usage unique. Le mélange réactionnel, appelé communément mix, est calculé pour l'ensemble des isolats à tester. Il a été préparé en ajoutant les réactifs les uns après les autres : les dNTPs, le couple d'amorces sens/anti-sens, le tampon, l'eau PPI, le chlorure de magnésium et l'enzyme (*Taq polymerase*) qui est introduite en dernier dans le mix. Le mélange réactionnel a été ensuite redistribué entre le témoin positif, les échantillons et le témoin négatif. L'ADN à amplifier est ajouté par la suite au mélange réactionnel. La réaction PCR a été réalisée dans des microtubes de 0,1 ml, pour un volume réactionnel de 25 µl dont la composition est donnée dans le tableau V.

Tableau V : Composition du mélange réactionnel pour une PCR simplex

Réactif	Concentration initiale	Volume par puits (µl)
H ₂ O	NA	14, 25
Tampon	10X	2, 5
MgCl ₂	25 mM	2
Amorce sens	10 µM	1, 5
Amorce anti-sens	10 µM	1, 5
dNTPs	10 mM	0, 5
Taq polymérase	5 U/µl	0, 25
Répartition du mix		22, 5
Ajout d'ADN matrice		2, 5

I.2.6. Paramétrage du thermocycleur

Les différentes étapes d'amplification de l'ADN se déroulent par cycles successifs dans un thermocycleur programmé manuellement. Les paramètres variables sont le temps, la température de chaque étape d'amplification ainsi que le nombre de cycles. Le programme d'amplification, notamment la température d'hybridation, varie pour chaque amorce (Tableaux VI ; VII).

Tableau VI : Programme de la PCR pour détecter les facteurs de virulence

	Température (°C)	Durée (minute)		Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	5		1
Dénaturation	95	1	}	30
Hybridation	*	1		
Elongation	72	1		
Elongation finale	72	7		1

* varie en fonction du couple d'amorces

Tableau VII : Programme de la PCR pour détecter les gènes de résistance

	Température (°C)	Durée (seconde)		Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94	300		1
Dénaturation	94	30	}	35
Hybridation	*	60		
Elongation	72	60		
Elongation finale	72	600		1

* varie en fonction du couple d'amorces

I.2.7. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Le gel préparé a été un gel d'agarose à 1% (m/v) soit 1 g d'agarose en poudre dissous dans 100 ml de solution de TAE, 1 fois concentrée. Le mélange a été chauffé au four à micro-onde pendant environ 3 minutes jusqu'à ébullition et obtention d'une phase homogène limpide. Puis dans l'agarose refroidie encore liquide, 2 gouttes de bromure d'éthidium étaient ajoutées. La solution obtenue a été coulée dans un support sur lequel était fixé un peigne formant les puits nécessaires au dépôt des amplicons obtenus après la PCR. Après environ une heure de polymérisation, le gel a été placé dans la cuve à électrophorèse, contenant le tampon d'électrophorèse. Le dépôt des échantillons a été réalisé selon un plan ; chaque puits a été chargé avec 12 µl d'amplicons et 3 µl de tampon de charge coloré au bleu de bromophénol. Pour chaque peigne, un puits a été également chargé avec 12 µl de marqueur de poids moléculaire d'ADN (de 200 paires de base) mélangé avec du tampon de charge coloré, comportant plusieurs fragments d'ADN de taille connue et servant d'échelle de repères. Un courant électrique de 120 volts a été appliqué à la cuve pendant 60 minutes.

I.2.9. Visualisation des produits de PCR

Après la migration, le gel et son support ont été retirés de la cuve. Le gel a été placé sur une plaque de révélation. Les produits d'amplification ont été visualisés par fluorescence du bromure d'éthidium sous ultraviolets à 312 nanomètres. La photo du gel a été ensuite imprimée.

CHAPITRE II : RÉSULTATS ET DISCUSSION

II.1. Résultats

La méthode de PCR classique a été appliquée sur les isolats de *Salmonella* d'origine aviaire. Des résultats positifs et négatifs ont été obtenus dans la recherche des gènes de virulence et de résistance.

II.1.1. Résultat de la recherche des gènes de virulence

Sur les 59 isolats testés, tous se sont révélés positifs à la fois au gène d'invasion *invA*, au gène de *spiC* et à *pipD* de SPI5. Cependant, une souche n'a pas été positive à la détection du gène *orfL*. Par ailleurs, seul un isolat (1,69%) a porté le gène *spvR*.

La présence des bandes à 301 pb témoigne de l'amplification des gènes de *Salmonella* positifs en *spiC* (Figure 1).



Figure 1 : Résultat d'une PCR *spiC* (Source : UBE)

Légende : M : marqueur de taille des fragments d'ADN (200 pb)

N : contrôle négatif

P1 : contrôle positif pour *spiC* (taille attendue : 301 pb)

1 à 9 : amplicons de *Salmonella*

II.1.2. Résultat de la recherche des intégrons

Tous les isolats de la collection ont été examinés par PCR pour la présence des intégrases associées aux intégrons de classe 1, 2 et 3. Les PCR ont identifié treize isolats portant des intégrons de classe 1 (22,03% ; 13/59) dont 4 ont été positifs à la détection de la région 3' (*ofr4/sull* et *orf6/sul3*) et de la région variable (36854/36855). Parmi les neuf isolats ayant une région 3' instable, trois ont été positifs avec les amorces 36854/*sull*. Les six restants ont été négatifs avec la PCR 36854/36856 (Figure 2). Ainsi au total, sept isolats ont été retenus pour être séquencés ultérieurement. Les régions variables des intégrons amplifiés de ces isolats allaient de 680 à 4000 pb.

L'intégron de classe 2 a été retrouvé dans deux isolats (3,39%) parmi les 59 souches. Ils ont été positifs à la détermination de la région *Hep74/Hep51* et à la détection de la région 3' (*INT7S/sat1*). Aussi, les deux isolats portaient les cassettes de gènes *dfrA1-sat-aadA1*.

Enfin, aucun intégron de classe 3 n'a été détecté dans les 59 isolats.

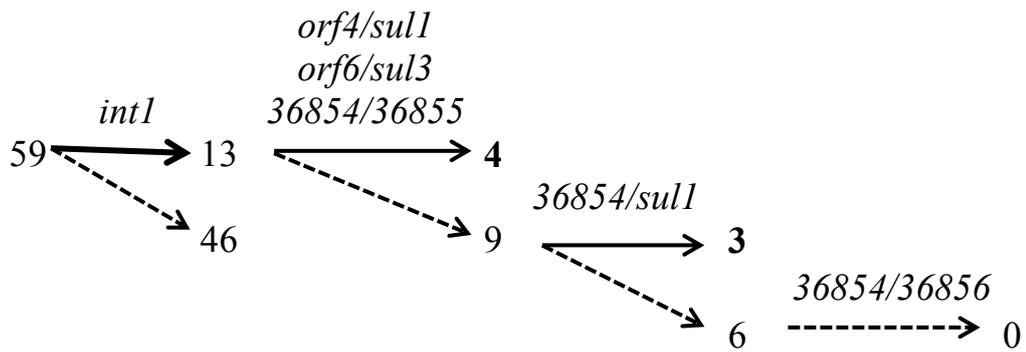


Figure 2: Logigramme de la caractérisation des intégrons de classe 1

II.1.3. Résultats de la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques

II.1.3.1. Acide nalidixique

Dix-neuf (19/59) isolats ont été les cibles de détection des gènes *qnr*. Les résultats du criblage de l'ADN des amplicons PCR ont montré que 15 isolats (78,95%) contenaient les gènes *qnrB*. Sur la figure 3, la bande à 469 pb observée pour six produits d'amplification confirme la spécificité des ADN amplifiés par les amorces *qnrB*-F/*qnrB*-R et justifiée par le contrôle positif P4. Tandis pour la recherche du gène *qnrS*, seul le contrôle positif P5 a donné une bande (Figure 4). En effet, les gènes *qnrA* et *qnrS* n'ont pas été détectés parmi les 19 isolats.

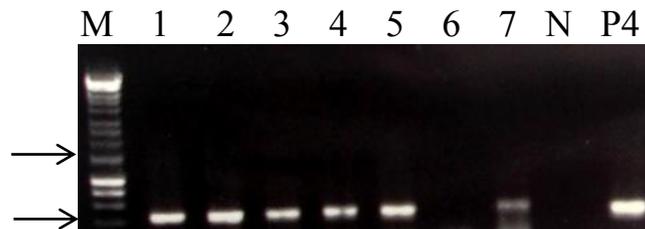


Figure 3 : Résultat de PCR *qnrB* (Source : UBE)

Légende : M : marqueur de taille des fragments d'ADN (200pb)
 1 à 7 : résultat de l'amplification avec *qnrB*-F/*qnrB*-R
 N : contrôle négatif = blanc (H₂O)
 P4 : contrôle positif pour *qnrB* (taille attendue : 469 pb)



Figure 4: Résultat de PCR *qnrS* (Source : UBE)

Légende : M : marqueur de taille des fragments d'ADN (200 pb)
 1' à 7' : résultat de l'amplification avec *qnrS*-F/*qnrS*-R
 N : contrôle négatif = blanc (H₂O)
 P5 : contrôle positif pour *qnrS* (taille attendue : 417 pb)

II.1.3.2. Tétracycline

Sur les 38 isolats testés pour les gènes de résistance à la tétracycline, 36 (94,73%) ont été porteurs d'au moins un gène recherché. Le gène *tetC* a été le plus détecté (50%) suivi des gènes *tetB* (47,37%), *tetA* (42,11%) et *tetG* (36,84%).

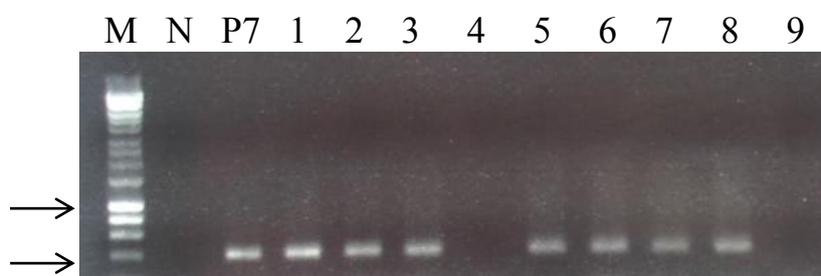


Figure 5: Résultat d'une PCR *tetB* (Source : UBE)

Légende : M : marqueur de taille (200 pb)

N : contrôle négatif = blanc (H₂O)

P7 : contrôle positif pour *tetB* (taille attendue : 470 pb)

1 à 3 & 5 à 8 : résultats positifs à l'amplification génique spécifique

4 et 9 : résultats négatifs de l'amplification avec TetB-F/TetB-R

II.1.3.3. Sulfaméthoxazole-Triméthoprime

Le support génétique de cette résistance est situé sur l'intégron qui contient le gène *sul*. Il est présent chez toutes les souches positives pour *ORF4-SulI*. Ainsi, quatre souches sur treize *intI1* positifs ont porté ce déterminant de résistance. Le gène *dfr* est identifié par séquençage qui n'a pas été réalisé.

II.1.3.4. Support génique par phénotype d'antibiorésistance

Parmi les 59 isolats de *Salmonella*, 42 souches ont été phénotypiquement résistantes à un antibiotique au moins. Les gènes de résistance les plus détectés pour la résistance à l'acide nalidixique et aux tétracyclines ont été respectivement *qnrB* et *tetC*. Toutes les souches résistantes aux quinolones ne présentaient aucun mécanisme de résistance exprimé par les gènes *qnrA* et *qnrS*. Le tableau VIII représente les supports géniques de résistance détectés pour chaque phénotype de résistance retrouvé dans notre collection.

Tableau VIII : Phénotypes et déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques

Nombre	Phénotype de résistance	Intégrons	Gènes de résistance détectés
1	TE ^R	<i>Int1</i>	- <i>tetA</i>
10	TE ^R	-	<i>tetB, tetC, tetG</i>
1	GM ^R , TE ^R	-	<i>tetG</i>
1	AMC ^R , TIC ^R , GM ^R , TE ^R	<i>Int1</i>	- <i>tetB, tetC</i>
1	TE ^R , SXT ^R	<i>Int1</i>	- <i>tetA, tetC</i>
5	TE ^R , SXT ^R	-	<i>tetA, tetB, tetC, tetG</i>
1	TE ^R , SXT ^R , C ^R	<i>Int1</i>	- <i>tetA</i>
1	AMC ^R , TIC ^R , TE ^R , SXT ^R	<i>Int1</i>	<i>tetA, tetG</i>
1	AMC ^R , TIC ^R , TE ^R , SXT ^R	-	-
1	AM ^R , CF ^R , GM ^R , TE ^R , NOR ^R , SXT ^R	-	<i>tetB</i>
3	NA ^R	-	<i>qnrB</i>
1	AM ^R , FOX ^R , NA ^R , NOR ^R , CIP ^R , C ^R	-	-
1	AM ^R , TIC ^R , CF ^R , FOX ^R , CTX ^R , AMC ^R , CAZ ^R , NA ^R , TE ^R , NOR ^R , CIP ^R	-	<i>qnrB, tetA, tetC</i>
1	AM ^R , TIC ^R , CF ^R , FOX ^R , CTX ^R , AMC ^R , CAZ ^R , GM ^R , NA ^R , TE ^R , NOR ^R , CIP ^R	<i>Int1</i>	- <i>qnrB, tetA, tetC</i>
7	NA ^R , TE ^R , SXT ^R	-	<i>qnrB, tetA, tetB, tetC, tetG</i>
3	NA ^R , TE ^R , NOR ^R , SXT ^R	-	<i>qnrB, tetA, tetB, tetC, tetG</i>
1	AMC ^R , TIC ^R , NA ^R , TE ^R , SXT ^R	<i>Int1</i>	- <i>qnrB, tetA, tetC</i>
1	NA ^R , TE ^R , NOR ^R , CIP ^R , SXT ^R	<i>Int2</i>	<i>dfrA1-sat- aadA1</i> <i>tetC</i>
1	AM ^R , AMC ^R , CAZ ^R , GM ^R , NA ^R , TE ^R , NOR ^R , CIP ^R , SXT ^R , C ^R	<i>Int1</i> <i>Int2</i>	- <i>dfrA1-sat- aadA1</i> <i>qnrB, tetA, tetC</i>

AM : amoxicilline ; **AMC** : amoxicilline + acide clavulanique ; **CAZ** : ceftazidime ; **GM** : gentamicine ; **NA** : acide nalidixique ; **NOR** : norofloxacin ; **CIP** : ciprofloxacine ; **TE** : tétracycline **TIC** : ticarcilline ; **CF** : céfalotine ; **FOX** : céfoxitine ; **SXT** : sulfaméthoxazole-triméthoprime ; **CTX** : céfotaxime ; **C** : chloramphénicol

II.2. Discussion

II.2.1. Méthodes

La qualité de la recherche dépend directement de la qualité des prélèvements biologiques. Des équipements sûrs et les bonnes pratiques du laboratoire diminuent le risque de contamination microbiologique. Les prélèvements primaires étaient des isolats de *Salmonella* conservés dans la souchothèque de l'Unité de Bactériologie Expérimentale. La technique d'extraction d'ADN est maîtrisée. Les extraits ont été conservés et peuvent être utilisés en cas de besoin. Les étapes de la PCR suivent un protocole strict. Le protocole de diagnostic par PCR classique utilisé, a été celui communément appliqué à l'Unité de Bactériologie Expérimentale de l'Institut Pasteur de Dakar. Toutefois, aucun protocole ne pourra convenir à toutes les applications possibles de la PCR. Une optimisation a été ainsi nécessaire afin d'obtenir le protocole le plus adapté en ajustant la programmation du thermocycleur. Les bandes spécifiques révélées sur gel correspondent à la taille du fragment d'ADN amplifié attendu pour chaque gène (Figures 1 ; 3 ; 5). Les réactions PCR avec les ADN servant de témoins positifs ainsi que les témoins négatifs garantissent les règles de spécificité et de la non-contamination lors de la détection (Figure 4).

II.2.2. Résultats

II.2.2.1. Facteurs de virulence

Toutes les 59 souches ont été sérotypées dans les travaux précédents. Dix-sept sérovars différents ont été identifiés ; les plus prévalents ont été *S. Brancaster*, *S. Urbana*, *S. Kentucky* et *S. Sandiego* [35]. Nos résultats ont montré que les gènes *invA* et *spiC* sont présents chez les souches isolées dans les élevages avicoles de la zone périurbaine de Dakar. Ces gènes ont été trouvés avec une prévalence élevée (100%) par rapport au gène *spvR* (1,69%). La détection du gène *invA* concorde avec le résultat d'autres auteurs [40, 41] qui ont constaté que ce gène est une bonne cible pour détecter les salmonelles. Peterson *et al* [42] ont aussi indiqué que ce gène a été utilisé en tant que marqueur génétique pour les *Salmonella* pathogènes. Alors que la plupart des souches de *Salmonella* contiennent le gène *invA*, le gène de virulence associé au plasmide *spv* a une distribution limitée [20]. De plus, Oliveira *et al* [41] ont précisé que les gènes *spv* ne sont pas présents dans tous les isolats et ne sont donc pas des cibles appropriées pour la détection spécifique du sérotype Enteritidis. Toutefois, dans notre étude, la seule souche caractérisée par *spvR* avait comme sérotype *S. Nitra*. En 2013, une étude a déterminé une gamme de gènes de virulence parmi des souches non typhiques isolées à partir de différentes régions géographiques et de différentes années. Quinze gènes dont *invA*, *spiC*, *orfL* et *pipD* ont été trouvés dans toutes les souches. Le typage de la virulence est une méthode de criblage rapide pour identifier le profil des gènes de virulence dans les souches de *Salmonella*, permettant ainsi d'améliorer la compréhension des risques potentiels pour les infections humaines et animales [43]. Au Sénégal et en Gambie, des

associations significatives ont été trouvées entre la présence des gènes de virulence (*orfL* ; *pipD*) et la résistance à des antibiotiques couramment utilisés. Ces associations pourraient être expliquées par les mécanismes impliqués dans la pathogénicité et l'acquisition de gènes de résistance par *Salmonella* [13, 44].

II.2.2.2. Intégrons

Les intégrons jouent un rôle important dans la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries Gram-négatif [26]. La majorité des publications s'intéresse à la description des intégrons de classe 1 puisqu'ils sont plus prévalents. De plus, la variabilité en cassettes des intégrons de classe 1 leur permet de conférer des résistances diverses [45]. Dans cette étude, les intégrons de classe 1 ont été identifiés dans 22,03% des isolats. Les descriptions d'intégrons chez les volailles sont nombreuses. Une étude rapporte une prévalence en intégron de classe 1 de 36,2 % chez des salmonelles isolées d'animaux de la ferme [46]. Des intégrons de classe 1 d'origine aviaire ont été rapportés précédemment à Bangkok dans 26% des souches isolées à partir de fèces de poulet apparemment sains [47]. L'incidence totale des intégrons trouvée dans notre travail est plus élevée que celle d'une étude sur 33 isolats de *Salmonella* isolés à partir de viande de poulet en Corée [48], mais inférieure à celle d'un rapport sur des salmonelles en Tunisie [49] et des *Salmonella* isolées à partir de poulet de chair cliniquement malade en Egypte [50].

Dans le cadre de ce travail, les réactions PCR établies à partir de sept isolats ont permis de mettre en évidence un signal correspondant à des cassettes. Les régions variables des intégrons amplifiés ont montré une diversité de taille (de 680 à 4000 pb), suggérant la diversité des types d'antibiorésistance codés par les cassettes de gènes. Des interrogations subsistent encore sur l'identité de ces bandes tant que la vérification par séquençage n'est pas réalisée. Les intégrons de classe 2 ont une organisation analogue à celle de la classe 1. Ils sont associés au transposon Tn7 et ses dérivés [29, 50, 51]. Dans cette étude, des intégrons de classe 2 (avec les cassettes de gènes *dfrA1-sat-aadA1*) ont été identifiés dans deux isolats et l'un d'eux contenait également un intégron de classe 1. Des intégrons de classe 2 ont également été identifiés chez des salmonelles isolées de volailles au Japon [46], des *Salmonella spp.* isolés d'animaux aux Pays-Bas [52] et dans une souche de *Salmonella* isolée d'un poulet malade en Egypte [50]. Par ailleurs, un intégron de classe 2 a été identifié dans un isolat de *Salmonella* qui contenait également un intégron de classe 1 [53].

L'ADN des isolats suscitant des intérêts pourrait être cloné permettant de disposer de matériels suffisants pour les analyses ultérieures et apporter des éléments de réponse. En effet, au-delà de l'antibiorésistance, les intégrons seraient des structures permettant l'adaptation des bactéries à leur environnement par l'acquisition de gènes indispensables à leur survie [23, 26].

II.2.2.3. Gènes de résistance à l'acide nalidixique

En raison de l'absence d'une barrière écologique des écosystèmes humains et animaux ainsi que la propriété zoonotique de *Salmonella*, le transit de *Salmonella* résistant aux quinolones est un problème de santé majeur [54]. Depuis des années, la résistance aux quinolones à médiation plasmidique (RQMP) a émergé chez *Salmonella* avec une prévalence croissante. Les mécanismes de la RQMP comprennent les gènes *qnr* qui codent pour des protéines protégeant l'ADN gyrase de l'inhibition par les quinolones [55]. Dans ce travail, la prévalence et la base moléculaire de la résistance aux quinolones ont été étudiées chez des souches de *Salmonella* isolées à partir des fientes de poulet de chair entre 2012 et 2013. Au cours de cette période, 19 (32,20%) des 59 isolats étaient résistants à l'acide nalidixique. Théoriquement, la résistance à l'acide nalidixique signifie également une résistance croisée aux fluoroquinolones, en raison des sites cibles identiques [54]. Selon le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, les souches de *Salmonella* résistantes à l'acide nalidixique doivent être catégorisées résistantes aux fluoroquinolones en raison d'un risque élevé d'échec clinique [56].

Des chercheurs ont signalé que la prévalence des gènes RQMP varie de moins de 1% à plus de 50% dans le monde en fonction de mécanismes de résistance de l'organisme [30, 31]. Dans cette étude, seuls les gènes liés aux *qnrB* ont été identifiés dans 32,2% des isolats testés. En 2013, par contre, des gènes *qnrB* et *qnrS* ont été identifiés respectivement dans 1,1% (deux isolats) et 2,2% (quatre isolats) des 185 isolats d'origine aviaire en Corée [57]. L'apparition de RQMP parmi les isolats de *Salmonella* d'origine animale ou alimentaire a été aussi rapportée avec des taux également faibles [58], contrairement à un autre rapport indiquant l'absence totale de PMQR dans tous les isolats de *Salmonella* résistants à l'acide nalidixique [59]. La présence des gènes *qnrB* chez les isolats d'animaux ouvre la possibilité d'échange génétique. L'acquisition du plasmide de ce gène *qnrB* pourrait se produire dans la flore fécale des animaux [60].

Même si le gène *qnr* ne produit qu'une faible résistance, sa présence facilite la sélection de mutations de résistance de niveau supérieur, contribuant ainsi à l'augmentation alarmante de la résistance aux quinolones [61]. Par ailleurs, ces résultats sont importants parce que la présence de gènes *qnr* peut faciliter le développement de mutations dans la région *gyrA*, augmenter ainsi la résistance aux fluoroquinolones et, par conséquent, réduire leur utilisation clinique [62]. En effet, la propagation de RQMP parmi les isolats de *Salmonella* d'origine animale pourrait avoir de graves conséquences pour le traitement aux fluoroquinolones de l'infection à *Salmonella* non typhoïdes chez les humains et les animaux [58].

Dans ce travail, l'objet des PCR était d'avoir une idée globale de la prévalence des gènes *qnr* dans les souches d'origine animale car le coût biologique de la résistance aux quinolones dépend du niveau et du nombre de mutations de résistance. Le problème dans un avenir proche concerne la co-évolution de la

résistance aux quinolones et une virulence accrue, ce qui favorisera le développement de génotypes virulents, notamment aux environnements riches en quinolones [25].

II.2.2.4. Gènes de résistance aux tétracyclines

Les principaux mécanismes de résistance aux tétracyclines sont des systèmes d'efflux codés par les gènes *tet* [25]. Les gènes *tetA*, *tetB*, *tetC* et *tetG* codent pour une pompe membranaire qui a la capacité d'exporter la tétracycline vers l'extérieur de la cellule [24, 63]. Des gènes de résistance à la tétracycline ont été détectés dans 36 isolats avec la répartition suivante : *tetC* (50%), *tetB* (47,37%), *tetA* (42,11%) et *tetG* (36,84%). Des combinaisons de gènes ont également été trouvées telles que *tetA* + *tetC*, *tetA* + *tetG*, *tetB* + *tetC* et *tetB* + *tetG*. Il est possible qu'en plus de ces gènes, les 38 isolats possèdent d'autres mécanismes de résistance à la tétracycline. Bien que plus de 35 différents gènes de résistance à la tétracycline ont été décrits, *tetA*, *tetB*, *tetC* et *tetG* sont parmi les plus communs chez les bactéries à Gram-négatif [64]. Dans une étude menée en 2008, le gène *tetA* a été noté pour être largement diffusé parmi les isolats de *Salmonella* d'origine animale [32]. Deux travaux de recherche ont détecté une présence importante de *tetA* chez *Salmonella spp* isolé à partir de carcasses de poulets sains et malades [50, 65]. De plus, Hur *et al* [66] ont identifié une corrélation entre la présence de la *tetA* du gène de résistance et de son phénotype. Des études récentes sur des *S. enterica* isolées de volailles ont présenté une incidence importante de *tetB* par rapport à *tetA* [67, 68]. Un autre travail a rapporté l'expression de *tetB*, *tetC* avec la combinaison de 2 gènes *tet* différents parmi les souches de *Salmonella* isolées des animaux et dans l'alimentation animale [53]. Par ailleurs, même si des études portant sur les liens entre les mécanismes de résistance à la tétracycline et la virulence sont rares, l'activation des gènes *tetA* et *tetB* augmenterait l'expression des gènes de virulence [25].

II.2.2.5. Gène de résistance aux sulfaméthoxazole-triméthoprim

L'association sulfaméthoxazole-triméthoprim est l'un des antibiotiques les plus utilisés en médecine humaine et vétérinaire grâce à ses avantages tels un large spectre d'activité et un prix bas. L'inconvénient reste la résistance bactérienne. Dans cette étude, quatre souches ont porté le support de résistance à la sulfaméthoxazole. Pour la sulfaméthoxazole, le nombre des différents gènes de résistance transférables est seulement 3, mais pour le triméthoprim, il est supérieur à 20 [33]. La résistance aux sulfaméthoxazole-triméthoprim est associée aux intégrons de classe 1 en raison de la présence fréquente d'une cassette *dfr* et du gène *sulI* de la région 3'. Ce lien a été souligné par une étude sur les entérobactéries [69]. De plus, Peirano *et al* [53] ont indiqué que le gène de résistance au triméthoprim le plus répandu chez les bactéries à Gram négatif semble être *dfrA1*, retrouvé comme cassette dans les intégrons de classe 1 et 2.

CONCLUSION

La base moléculaire de la virulence et de l'antibiorésistance des salmonelles isolées à partir des animaux du Sénégal est peu publiée. Néanmoins, ce travail a permis de déterminer plusieurs supports moléculaires de la virulence et de l'antibiorésistance des isolats de *Salmonella* d'origine aviaire provenant de deux zones péri-urbaines de Dakar. Tous les isolats possèdent des supports génétiques de virulence, indiquant une importante pathogénicité réelle des souches circulantes. Cette étude fournit aussi des données utiles sur l'incidence et la caractérisation des intégrons dans la collection de souches de *Salmonella*. La détection de ces intégrons suppose la complexité de la situation actuelle parce qu'ils peuvent diffuser à la fois les gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques. De plus, des marqueurs génétiques associés aux profils de résistance ont été identifiés parmi ces souches. Diverses catégories de gènes de résistance aux antibiotiques ont été détectées, particulièrement ceux codant pour la résistance aux quinolones et aux tétracyclines. Des travaux ultérieurs permettront d'explorer davantage la résistance aux quinolones et au sulfaméthoxazole-triméthoprime.

Toutefois, le fait qu'un grand nombre de supports de résistance aux antibiotiques ait été démontré, souligne l'importance des études de surveillance, en particulier dans les pays en développement. En effet, les conséquences sur la santé publique de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques des bactéries d'origine animale pourraient être compatibles avec une augmentation du risque d'échec du traitement suite à l'activité des agents pathogènes aussi virulents. Ainsi, il est nécessaire d'améliorer l'hygiène des fermes avicoles et de contrôler l'utilisation des antibiotiques dans ces fermes. Et la surveillance continue de la virulence et la caractérisation des gènes de résistance aux antibiotiques dans les élevages restent essentielles pour identifier leur émergence et pour améliorer les interventions en santé publique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. CNRS, *Salmonellose*. 2005, Centre National de la Recherche Scientifique. p. 2.
2. OIE, *Salmonelloses*, in *Manuel terrestre de l'OIE*. 2008a. p. 1387-1405.
3. Hensel, M., *Evolution of pathogenicity islands of Salmonella enterica*. Int J Med Microbiol, 2004. 294(2-3): p. 95-102.
4. van Vuuren, M., *Résistance aux antibiotiques, notamment en aviculture*, in *Conférence OIE*. 2001. p. 123-134.
5. OMS, *Infections à Salmonella (non typhiques)*. 2013.
6. Rasschaert, G., et al., *Contamination of carcasses with Salmonella during poultry slaughter*. J Food Prot, 2008. 71(1): p. 146-52.
7. Gopinath, S., S. Carden, and D. Monack, *Shedding light on Salmonella carriers*. Trends Microbiol, 2012. 20(7): p. 320-7.
8. Fofana, A., *Etude de la résistance aux antibiotiques des souches de Salmolnella spp et Echerichia coli isolées de la viande de poulet de chair au Sénégal*, in *E.I.S.M.V.* 2004, UCAD Dakar. p. 43.
9. Murphy, B.P., et al., *Investigation of a global collection of nontyphoidal Salmonella of various serotypes cultured between 1953 and 2004 for the presence of class 1 integrons*. FEMS Microbiol Lett, 2007. 266(2): p. 170-6.
10. Grimont, P.A.D. and F.-X. Weill, *Formules antigéniques des sérovars de Salmonella - 9ème édition*. 2007, Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche sur les *Salmonella* - Organisation Mondiale de la Santé, Institut Pasteur. p. 167.
11. OIE, *Biosécurité et biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire*, in *Manuel terrestre de l'OIE*. 2008b. p. 16-28.
12. CDC, *National Enteric Disease Surveillance: Salmonella surveillance overview*, CDC, Editor. 2011: Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services.
13. Martínez, J.L. and F. Baquero, *Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance*. Clin Microbiol Rev, 2002. 15(4): p. 647-79.
14. Millemann, Y., *[Pathogenic power of Salmonellae: virulence factors and study models]*. Vet Res, 1998. 29(5): p. 385-407.
15. van Asten, A.J. and J.E. van Dijk, *Distribution of "classic" virulence factors among Salmonella spp.* FEMS Immunol Med Microbiol, 2005. 44(3): p. 251-9.
16. Fàbrega, A. and J. Vila, *Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation*. Clin Microbiol Rev, 2013. 26(2): p. 308-41.

17. Campioni, F., A.M. Moratto Bergamini, and J.P. Falcão, *Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of Salmonella Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil*. Food Microbiol, 2012. 32(2): p. 254-64.
18. Zou, M., S. Keelara, and S. Thakur, *Molecular characterization of Salmonella enterica serotype Enteritidis isolates from humans by antimicrobial resistance, virulence genes, and pulsed-field gel electrophoresis*. Foodborne Pathog Dis, 2012. 9(3): p. 232-8.
19. Uchiya, K., A. Sugita, and T. Nikai, *Involvement of SPI-2-encoded SpiC in flagellum synthesis in Salmonella enterica serovar Typhimurium*. BMC Microbiol, 2009. 9: p. 179.
20. Fluit, A.C., *Towards more virulent and antibiotic-resistant Salmonella?* FEMS Immunol Med Microbiol, 2005. 43(1): p. 1-11.
21. Wood, M.W., et al., *Identification of a pathogenicity island required for Salmonella enteropathogenicity*. Mol Microbiol, 1998. 29(3): p. 883-91.
22. Bentley, R. and J.W. Bennett, *What is an antibiotic? Revisited*. Adv Appl Microbiol, 2003. 52: p. 303-31.
23. Ploy, M., et al., *Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques*. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, 2005. 20(6): p. 343–352.
24. Michael, G.B., et al., *Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in Salmonella: an update*. Microbes Infect, 2006. 8(7): p. 1898-914.
25. Beceiro, A., M. Tomás, and G. Bou, *Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?* Clin Microbiol Rev, 2013. 26(2): p. 185-230.
26. Cambray, G., A.M. Guerout, and D. Mazel, *Integrans*. Annu Rev Genet, 2010. 44: p. 141-66.
27. Mazel, D., *Integrans: agents of bacterial evolution*. Nat Rev Microbiol, 2006. 4(8): p. 608-20.
28. Antunes, P., et al., *Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese Salmonella enterica strains and relation with integrans*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. 49(2): p. 836-9.
29. Hansson, K., et al., *IntI2 integron integrase in Tn7*. J Bacteriol, 2002. 184(6): p. 1712-21.
30. Poirel, L., V. Cattoir, and P. Nordmann, *Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies*. Front Microbiol, 2012. 3: p. 24.
31. Rodríguez-Martínez, J.M., et al., *Plasmid-mediated quinolone resistance: an update*. J Infect Chemother, 2011. 17(2): p. 149-82.
32. Nde, C.W. and C.M. Logue, *Characterization of antimicrobial susceptibility and virulence genes of Salmonella serovars collected at a*

- commercial turkey processing plant*. J Appl Microbiol, 2008. 104(1): p. 215-23.
33. Huovinen, P., *Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole*. Clin Infect Dis, 2001. 32(11): p. 1608-14.
 34. Sáenz, Y., et al., *Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant Escherichia coli strains of human, animal, and food origins*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. 48(10): p. 3996-4001.
 35. Combari, A., *Niveau de contamination par les salmonelles antibiorésistantes des élevages de poulet de chair en zone péri-urbaine de Dakar*, in *E.I.S.M.V. 2014*, UCAD: Dakar. p. 57.
 36. Schwarz, S. and E. Chalus-Dancla, *Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance*. Vet Res, 2001. 32(3-4): p. 201-25.
 37. Cardinale, E., et al., *Epidemiological analysis of Salmonella enterica ssp. enterica serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility*. J Appl Microbiol, 2005. 99(4): p. 968-77.
 38. Alamedji, R.B., et al., *Contrôle des résidus : exemples des antibiotiques dans les aliments au Sénégal* in *Conférence de l'OIE sur les médicaments vétérinaires en Afrique 2008*: Dakar, 25-27 mars 2008.
 39. McEwen, S.A., et al., *Antimicrobial resistance*. Can J Vet Res, 2008. 72(2): p. 81.
 40. Gassama-Sow, A., et al., *Integrans in Salmonella Keurmassar, Senegal*. Emerg Infect Dis, 2004. 10(7): p. 1339-41.
 41. Oliveira, S.D.d., et al., *Detection of virulence genes in Salmonella Enteritidis isolated from different sources*. Brazilian Journal of Microbiology, 2003. 34(Suppl.1): p. 123-124.
 42. Peterson, G., et al., *Development of microarray and multiplex polymerase chain reaction assays for identification of serovars and virulence genes in Salmonella enterica of human or animal origin*. J Vet Diagn Invest, 2010. 22(4): p. 559-69.
 43. Elemfareji, O.I. and K.L. Thong, *Comparative Virulotyping of Salmonella typhi and Salmonella enteritidis*. Indian J Microbiol, 2013. 53(4): p. 410-7.
 44. Dione, M.M., et al., *Antimicrobial resistance and virulence genes of non-typhoidal Salmonella isolates in The Gambia and Senegal*. J Infect Dev Ctries, 2011. 5(11): p. 765-75.
 45. Partridge, S.R., et al., *Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrans*. FEMS Microbiol Rev, 2009. 33(4): p. 757-84.
 46. Ahmed, A.M., Y. Ishida, and T. Shimamoto, *Molecular characterization of antimicrobial resistance in Salmonella isolated from animals in Japan*. J Appl Microbiol, 2009. 106(2): p. 402-9.

47. Khemtong, S. and R. Chuanchuen, *Class 1 integrons and Salmonella genomic island 1 among Salmonella enterica isolated from poultry and swine*. Microb Drug Resist, 2008. 14(1): p. 65-70.
48. Dessie, H.K., D.H. Bae, and Y.J. Lee, *Characterization of integrons and their cassettes in Escherichia coli and Salmonella isolates from poultry in Korea*. Poult Sci, 2013. 92(11): p. 3036-43.
49. Soufi, L., et al., *Phenotypic and genotypic characterization of Salmonella enterica recovered from poultry meat in Tunisia and identification of new genetic traits*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2012. 12(1): p. 10-6.
50. Ahmed, A.M. and T. Shimamoto, *Genetic analysis of multiple antimicrobial resistance in Salmonella isolated from diseased broilers in Egypt*. Microbiol Immunol, 2012. 56(4): p. 254-61.
51. Gassama-Sow, A., et al., *Class 2 integron-associated antibiotic resistance in Shigella sonnei isolates in Dakar, Senegal*. Int J Antimicrob Agents, 2006. 27(3): p. 267-70.
52. van Essen-Zandbergen, A., et al., *Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in Escherichia coli, Salmonella and Campylobacter spp. in the Netherlands*. J Antimicrob Chemother, 2007. 59(4): p. 746-50.
53. Peirano, G., et al., *Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among Salmonella enterica from Brazil*. J Antimicrob Chemother, 2006. 58(2): p. 305-9.
54. Ruiz, J., *Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection*. J Antimicrob Chemother, 2003. 51(5): p. 1109-17.
55. Strahilevitz, J., et al., *Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat*. Clin Microbiol Rev, 2009. 22(4): p. 664-89.
56. Bonnet, R., et al., *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2013*. 2013. p. 60.
57. Kim, J.H., J.K. Cho, and K.S. Kim, *Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in Salmonella isolated from poultry in Korea*. Avian Pathol, 2013. 42(3): p. 221-9.
58. Al-Gallas, N., et al., *Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and rmtB gene in Salmonella enterica serovar enteritidis and Typhimurium isolated from food-animal products in Tunisia*. Foodborne Pathog Dis, 2013. 10(9): p. 813-9.
59. Thai, T.H. and R. Yamaguchi, *Molecular characterization of antibiotic-resistant Salmonella isolates from retail meat from markets in Northern Vietnam*. J Food Prot, 2012. 75(9): p. 1709-14.
60. Fortini, D., et al., *Novel genetic environment of plasmid-mediated quinolone resistance gene qnrB2 in Salmonella Bredeney from poultry*. J Antimicrob Chemother, 2009. 64(6): p. 1332-4.
61. Jacoby, G.A., *Mechanisms of resistance to quinolones*. Clin Infect Dis, 2005. 41 Suppl 2: p. S120-6.

62. Ferrari, R., et al., *Plasmid-mediated quinolone resistance by genes qnrA1 and qnrB19 in Salmonella strains isolated in Brazil*. J Infect Dev Ctries, 2011. 5(6): p. 496-8.
63. Roberts, M.C., *Update on acquired tetracycline resistance genes*. FEMS Microbiol Lett, 2005. 245(2): p. 195-203.
64. Ng, L.K., et al., *Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes*. Mol Cell Probes, 2001. 15(4): p. 209-15.
65. Glenn, L.M., et al., *Analysis of antimicrobial resistance genes detected in multidrug-resistant Salmonella enterica serovar Typhimurium isolated from food animals*. Microb Drug Resist, 2011. 17(3): p. 407-18.
66. Hur, J., et al., *Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant Salmonella Enteritidis strains isolated from poultry*. Vet J, 2011. 189(3): p. 306-11.
67. Bacci, C., et al., *Phenotypic and genotypic features of antibiotic resistance in Salmonella enterica isolated from chicken meat and chicken and quail carcasses*. Int J Food Microbiol, 2012. 160(1): p. 16-23.
68. Abraham, S., et al., *Salmonella enterica isolated from infections in Australian livestock remain susceptible to critical antimicrobials*. Int J Antimicrob Agents, 2014. 43(2): p. 126-30.
69. Dahmen, S., et al., *Distribution of cotrimoxazole resistance genes associated with class 1 integrons in clinical isolates of Enterobacteriaceae in a university hospital in Tunisia*. Microb Drug Resist, 2010. 16(1): p. 43-7.

ANNEXE

Matériels d'étude de laboratoire

L'extraction d'ADN à partir des isolats de *Salmonella* a nécessité divers matériels tels que :

- des pipettes (Eppendorf 247377 ; Gilson U607296 ...)
- du milieu GTS (Bio-Rad 64554, lot 2J2163)
- de l'eau distillée stérile
- une étuve à température régulée (Memmert 840821)
- un bain-marie (Bioblock 601944)
- une centrifugeuse (Sigma 50425).

Le matériel nécessaire à la technique PCR incluait des amorces et des réactifs, entre autres :

- le tampon réactionnel
(GE Healthcare - illustra™ 31799, lot 9455095)
- la solution de dichlorure de magnésium
(illustra™ 93-71167, lot 9485999)
- les désoxyribonucléotides triphosphates
(illustra™ 28-4065-51, lot 5324570A)
- l'ADN polymérase
(illustra™ 27-0798-05, lot 9485524).

Les amorces ont été commandées chez GeneCust Europe - Audrey Lejeune, 6 rue Dominique Lang, 3505 Dudelange, Luxembourg. Elles ont été conditionnées sous forme lyophilisée accompagnée d'une fiche technique mentionnant la méthode de mise en solution.

La liste des réactifs utilisés pour l'électrophorèse et la révélation des produits d'amplification comportait :

- de la poudre d'agarose (Bio-Rad 162-0138)
- du tampon TAE (Sigma)
- du bromure d'éthidium (Mérieux)
- du bleu de bromophénol (Bioline)
- des marqueurs de masse moléculaire (Bioline).

Les autres matériels nécessaires comprenaient également :

- des gants en nitrile (Kimtech)
- un vortex (Bioblock Scientific 35213 by IKA)
- une machine à glace pilée (Scotsman® AF 80)
- une hotte (Hotlen laminaire 23404C, 17-019L)
- un réfrigérateur-congélateur (Philco +8°C, -20°C ± 2)
- un congélateur (Westpoint -30°C ± 2)

- une balance (Sartorius 60605849)
- un four à micro-ondes (Concord MW21L)
- des thermocycleurs
(AB applied biosystem 2720, séries 272S7102585 / 272S6060148)
- des systèmes d'électrophorèse horizontale
(Fisher Bioblock Scientific HU13W)
- un générateur de courant (Consort EV243)
- un transilluminateur à ultra-violet (Bioblock Scientific)
- un appareil de visualisation (Doc-Print VX2)
- une imprimante (Sony Digital Graphic Printer UP-D897)
- des papiers films (Sony UPP-110S)
- du papier aluminium
- poubelles étanches conformes à la norme NF X30-507
- etc.

<p style="text-align: center;">CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUCHES DE <i>SALMONELLA</i> ISOLEES DANS LES FERMES DE POULET DE CHAIR DE LA ZONE PERIURBAINE DE DAKAR (SENEGAL)</p>	<p style="text-align: center;">MOLECULAR CHARACTERIZATION OF <i>SALMONELLA</i> STRAINS ISOLATED FROM BROILER FARMS IN PERIURBAN AREA OF DAKAR (SENEGAL)</p>
<p>Résumé: Le but de la présente étude était principalement de caractériser génétiquement 59 souches de salmonelles, récoltées à partir des fèces de volailles au niveau de deux agglomérations périurbaines de Dakar entre juillet 2012 et juin 2013.</p> <p>Tous les échantillons ont été testés pour déterminer la prévalence de cinq gènes de virulence. Les gènes <i>invA</i>, <i>spiC</i> et <i>pipD</i> ont été détectés dans tous les isolats, et <i>orfL</i> dans 57 isolats. Tandis que le gène de virulence <i>spvR</i>, détecté dans un isolat, était associé au sérovar Nitra.</p> <p>La présence des intégrons de classes 1, 2 et 3 a été déterminée pour tous les isolats. L'analyse moléculaire a révélé que 22,03% de la collection portaient un gène codant l'intégrase <i>intI1</i>. Les régions variables des intégrons amplifiés ont été de tailles variables suggérant la diversité des cassettes de gènes de résistance aux antibiotiques. Deux isolats portaient le gène <i>int2</i> avec les cassettes <i>dfrA1-sat-aadA1</i>. Aucun intégron de classe 3 n'a été identifié.</p> <p>Par ailleurs, les souches antibiorésistantes ont été étudiées selon les mécanismes de résistance les plus observés phénotypiquement. Sept gènes de résistance aux antibiotiques ont été recherchés. Les gènes plasmidiques de résistance aux quinolones <i>qnrA</i> et <i>qnrS</i> n'ont pas été détectés dans les 19 isolats ayant un profil de résistance à l'acide nalidixique. Toutefois, le gène <i>qnrB</i> a été identifié dans 15 isolats parmi ces 19 isolats. En outre, 38 isolats ont été testés pour la détection des gènes de résistance aux tétracyclines. Une plus forte prévalence a été obtenue pour le gène <i>tetC</i> (50%), suivie de <i>tetB</i>, <i>tetA</i> et <i>tetG</i>. Ainsi, 99,95% des isolats résistants phénotypiquement aux tétracyclines possédaient au moins un gène <i>tet</i>.</p> <p>La présence de plusieurs gènes de virulence traduit le degré de pathogénicité des souches de <i>Salmonella</i> et donc leur aptitude à provoquer des maladies sévères chez les poulets. L'identification des intégrons de classes 1 et 2 montre la capacité des souches à diffuser plusieurs gènes de résistance dans les élevages de poulets. La présence des gènes <i>qnr</i> codant la résistance aux quinolones nécessite la mise en place de mesures préventives d'usage rationnel des antibiotiques afin de limiter leur diffusion. D'autres travaux sont nécessaires pour élucider le support chromosomique de la résistance aux quinolones des salmonelles aviaires au Sénégal et leur propagation dans l'environnement.</p> <p>Mots clés : <i>Salmonella</i> aviaire, gènes de virulence, intégrons, gènes de résistance aux antibiotiques, Dakar</p>	<p>Abstract: The purpose of this study was to characterize genetically 59 <i>Salmonella</i> strains collected from poultry feces at two peri-urban areas of Dakar between July 2012 and June 2013.</p> <p>All samples were tested to determine the prevalence of five virulence genes. <i>InvA</i>, <i>spiC</i> and <i>pipD</i> genes were detected in all isolates and <i>orfL</i> in 57 isolates. Meanwhile <i>spvR</i> virulence gene detected in one isolate was associated with serovar Nitra.</p> <p>The presence of classes 1, 2 and 3 integron was determined for all isolates. Molecular analysis showed that 22.03% from the collection encoded an integrase gene <i>intI1</i>. The variable regions amplified were in variable sizes suggesting the diversity of antibiotic resistance gene cassettes. Two isolates carried <i>intI2</i> gene with <i>dfrA1-sat-aadA1</i> cassettes. No class 3 integron was identified.</p> <p>In addition, antibiotic-resistant strains have been studied in the most resistance mechanisms observed phenotypically. Seven antibiotic resistance genes have been sought. Plasmid resistance quinolones genes <i>qnrA</i> and <i>qnrS</i> were not detected in 19 isolates with nalidixic acid resistance profile. However, <i>qnrB</i> gene was identified in 15 isolates among these 19 isolates. In addition, 38 isolates were tested for the detection of tetracycline resistance genes. A higher prevalence was obtained for <i>tetC</i> gene (50%), followed by <i>tetB</i>, <i>tetA</i> and <i>tetG</i>. Thus, 99.95% isolates phenotypically resistant to tetracyclines had at least one <i>tet</i> gene.</p> <p>The presence of several virulence genes reflects the pathogenicity degree of <i>Salmonella</i> strains and therefore their ability to cause severe disease in chickens. Identification of integrons 1 and 2 classes shows the ability of the strains to broadcast multiple resistance genes in poultry farms. The presence of <i>qnr</i> genes encoding quinolone resistance requires the preventive implementation measures of antibiotics rational use to limit their spread. Further work is needed to clear up the quinolone resistance chromosomal support of avian <i>Salmonella</i> in Senegal and their propagation in the environment.</p> <p>Keywords: avian <i>Salmonella</i>, virulence genes, integrons, antibiotics resistance genes, Dakar</p>
<p>Auteur/Author: Sitraka Arilalaina ANDRIANONY Email : sitraka.andrianony@gmail.com</p>	