HAL
open science

Réduction du portage des salmonelles chez les animaux de rente : une approche multidisciplinaire

Philippe Velge, Isabelle Virlogeux-Payant, Anne-Christine Lalmanach, Catherine C. Belloc, P. Fravalo, Alain Vignal, Catherine C. Beaumont

To cite this version:

Philippe Velge, Isabelle Virlogeux-Payant, Anne-Christine Lalmanach, Catherine C. Belloc, P. Fravalo, et al.. Réduction du portage des salmonelles chez les animaux de rente : une approche multidisciplinaire. Productions Animales, 2008, 21 (1), pp.117-126. hal-02655195

HAL Id: hal-02655195

https://hal.inrae.fr/hal-02655195

Submitted on 29 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

INRA Prod. Anim.,
2008, 21 (1), 117-126

Réduction du portage des salmonelles chez les animaux de rente : une approche multidisciplinaire

P. VELGE[1], I. VIRLOGEUX-PAYANT[1], A.-C. LALMANACH[1], C. BELLOC[2], P. FRAVALO[3], A. VIGNAL[4], C. BEAUMONT[5]
[1] INRA, UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France
[2] INRA, ENVN Atlanpole, UMR1300 Bioagression, Epidémiologie et analyse de risques, F-44307 Nantes, France
[3] AFSSA, Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, Zoopôle Beaucemaine, F-22440 Ploufragan, France
[4] INRA, UR444 Génétique Cellulaire, F-31326 Castanet-Tolosan France
[5] INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France
Courriel : velge@tours.inra.fr

Face à la première cause de toxi-infection alimentaire collective en France, les chercheurs de l'INRA et de l'AFSSA se sont regroupés, au sein de réseaux nationaux et européens, pour améliorer la sécurité alimentaire, notamment en réduisant le risque de portage asymptomatique de salmonelles par les animaux. Cette approche pluridisciplinaire allie bactériologie, immunologie, biologie cellulaire et moléculaire, génétique, infectiologie, épidémiologie et modélisation.

Les toxi-infections alimentaires restent d'actualité dans l'Union Européenne ; dans la majorité des cas, elles sont dues aux salmonelles et Campylobacters avec une incidence moyenne de 10 à 100 cas déclarés pour 100 000 habitants (de Jong et Ekdahl 2006). Chez l'Homme et les animaux, les salmonelles peuvent être responsables, selon leur sérotype (au nombre de 2540 actuellement), de conséquences très variées allant d'une colonisation intestinale asymptomatique à une infection généralisée, parfois mortelle, en passant par une gastro-entérite. La sous-espèce *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, est la seule pathogène pour l'Homme. Elle est responsable des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, dues notamment à *S.* Typhi, dont l'origine est rarement alimentaire dans les pays industrialisés mais qui restent responsables de plus de 17 millions de cas par an dans le monde. Nous restreindrons ici notre propos aux sérotypes *S.* Enteritidis et *S.* Typhimurium, responsables à eux seuls des deux tiers des toxi-infections alimentaires collectives en France (33% et 32% respectivement) (Velge *et al* 2005). Les oeufs et les produits à base d'œufs (mayonnaises en particulier) sont, avec les viandes de volailles, les principaux aliments à l'origine des contaminations humaines.

Les répercussions économiques de ces contaminations alimentaires sont d'autant plus importantes que leur détection se fait en aval de l'élevage, c'est-à-dire au niveau de la chaîne de production, de transformation et de commercialisation du produit. Ainsi, la maîtrise des risques en amont de la chaîne (donc chez les animaux) est un enjeu non seulement de santé publique mais aussi économique. Toutefois, la contamination des animaux est difficile à repérer en raison de l'absence de symptômes, tout particulièrement chez les volailles et les porcs. Ce portage dit asymptomatique peut entraîner une excrétion fécale importante (de 10 à plus de 10^7 bactéries par gramme de matière fécale) et être responsable de la dissémination des bactéries aux animaux sains, dans l'environnement d'élevage mais aussi dans les abattoirs et ateliers agroalimentaires, en particulier lors de la découpe des animaux. Une des spécificités de *S.* Enteritidis est de coloniser l'appareil génital des volailles et donc de se transmettre de façon verticale (de la poule à l'œuf).

Même si la fréquence des infections humaines dues aux salmonelles a diminué de 16,9% entre 2001 et 2003, 10 472 souches de *Salmonella* d'origine humaine et 382 foyers de cas groupés de salmonellose ont encore été répertoriés en France en 2003 et 192 703 cas de salmonellose humaine ont été notifiés dans les 25 états de l'Union Européenne en 2004 (EFSA 2006). Ces progrès ont été en grande partie rendu possibles par une meilleure maîtrise du risque de contaminations microbiennes lors des différentes phases de préparation des aliments, notamment dans les ateliers de transformation. Du fait de la diminution des contaminations durant la transformation, la matière première, en particulier d'origine animale, est devenue l'une des principales sources de contamination microbienne des filières alimentaires. Pour améliorer la sécurité alimentaire humaine, Il est donc désormais capital d'améliorer la santé des animaux et en particulier de diminuer le portage asymptomatique par les animaux de rente.

La contamination d'un hôte par des salmonelles se faisant principalement par voie orale, l'intestin est le lieu privilégié de la colonisation et de la persistance des bactéries. Le devenir d'une infection (maladie, persistance asymptomatique du pathogène ou guérison) dépend ensuite de l'équilibre entre les moyens de défense de l'hôte et les facteurs de virulence du pathogène. Les facteurs de virulence de la bactérie lui permettent de coloniser son hôte en

détournant ou en échappant à la réponse immune tandis que des mécanismes de défense mis en place par l'hôte réduisent la multiplication et la survie de la bactérie. C'est pour cette raison que les salmonelles infectent principalement les sujets âgés, très jeunes ou présentant un trouble des défenses immunitaires. Etudier les facteurs de cet équilibre est donc nécessaire au développement de vaccins ou de traitements et à la sélection d'animaux résistants.

Cet article fait le point des recherches menées sur les possibilités de diminution du risque de toxi-infections humaines dues aux salmonelles à travers la réduction du réservoir animal et par suite du portage asymptomatique de ces bactéries par les volailles et le porc. Ces travaux couvrent également des aspects plus fondamentaux visant à comprendre les rôles respectifs dans le portage intestinal aviaire, des facteurs de l'hôte (en particulier ceux de la réponse innée) et de la bactérie notamment ceux impliqués dans le pouvoir invasif de *S.* Enteritidis. Ces approches permettent d'aborder la question du développement de vaccins ; elles faciliteront de plus l'identification de gènes impliqués dans la résistance au portage et par la suite leur utilisation en sélection commerciale. Enfin, des travaux de modélisation permettent de prévoir l'efficacité de stratégies d'éradication des salmonelles chez les volailles et les porcs.

1 / Fréquence de l'infection

La maîtrise des zoonoses d'origine alimentaire est un objectif prioritaire de l'Union Européenne pour améliorer la santé publique mais également en raison des risques de limitations, pour des raisons sanitaires, d'échanges commerciaux de denrées alimentaires. Le programme de surveillance et maîtrise de *Salmonella* dans l'Union Européenne a été mis en place par étapes successives.

Etablir un état des lieux objectif a d'abord impliqué d'harmoniser les plans d'échantillonnage, grâce aux travaux de l'AESA (Autorité Européenne de Sécurité sanitaire des Aliments) en lien avec le règlement 2160/03 (EU 2003) puis les méthodes de détection utilisées dans les différents états membres, grâce au Laboratoire Communautaire de Référence (RIVM Pays-Bas), dont la création était inscrite dans la directive CE 92/117 et qui permet de disposer de l'annexe D de la norme ISO 6579. Le tout assure la comparaison des résultats produits entre les différents laboratoires en charge de ces études dans toute l'Europe. La surveillance repose sur l'utilisation de tests biologiques permettant l'identification des animaux infectés. Si des recherches bactériologiques sur les matières fécales permettent de détecter les animaux excréteurs, les méthodes sérologiques, moins coûteuses et plus faciles à mettre en œuvre à grande échelle, (en particulier celles utilisables sur le «jus de viande» à l'abattoir), sont privilégiées. Elles permettent la détection d'animaux excréteurs intermittents ou porteurs latents, pour lesquels l'examen bactériologique des matières fécales est négatif (Lo Fo Wong *et al* 2004).

Des enquêtes communautaires ont été menées pour évaluer la prévalence de la maladie, c'est-à-dire le nombre d'animaux atteints dans une population déterminée et à un moment donné, sans distinction entre les nouveaux et les anciens cas. La première, mise en place en 2001, concernait les parquets de poules pondeuses. Les résultats placent la France dans le peloton de tête des pays grands producteurs d'œufs de consommation avec une prévalence de *Salmonella* Enteritidis inférieure à 4% des troupeaux (EFSA 2007a). La prévalence de *Salmonella* dans les troupeaux de poulets de chair avant l'abattage a été établie en 2005 et 2006. Les chiffres (8% de troupeaux contaminés) témoignent d'un positionnement favorable de la France, et de l'efficacité des mesures sanitaires mises en place. En effet, dans quatre pays de l'Union Européenne, la prévalence dépasse encore 50% (EFSA 2007b). Le traitement des données de prévalence au sein des productions dinde et porc charcutier est actuellement en cours.

En parallèle, dès 1992, la directive CE 92/117 promeut deux actions complémentaires : la mise place d'une épidemio-surveillance de la contamination chez l'Homme et l'application de programmes de maîtrise dans la chaîne de production intégrant des actions dans le secteur amont des productions animales. La directive vise l'éradication de *S.* Enteritidis et *S.* Typhimurium dans les étages de sélection et de multiplication, tant en production chair que dans la filière ponte, afin d'assainir le sommet de la pyramide de la filière avicole, à l'origine des animaux d'élevage. (EU 2003).

Après onze années d'application de cette stratégie basée sur la bonne volonté des états, et suite à un retard important dans la mise en place de programmes de maîtrise dans de nombreux états membres, l'Europe a adopté le règlement CE 2160/2003 (EU 2003). Celui-ci par nature s'impose à tous les états membres pour les reproducteurs de *Gallus gallus* en 2006, pour la production d'œufs en 2007, pour les poulets de chair en 2008, la dinde et les porcs charcutiers en 2009 et les cheptels de reproducteurs porcins en 2010. Cette réglementation harmonisée se base sur la mise en place obligatoire de programmes de maîtrise des agents zoonotiques.

2 / Développement des modèles de portage

Afin de combattre le portage asymptomatique, il est nécessaire d'en étudier les mécanismes et donc de développer des modèles expérimentaux. Chez les volailles, une infection systémique est souvent observée avant l'établissement du portage proprement dit. Ainsi, les premiers modèles d'infection expérimentale ont été développés pour comprendre les premières étapes de l'infection : colonisation intestinale, phase de multiplication rapide des bactéries dans les *caeca* et les organes internes, puis plateau de contamination caractérisé par une stabilisation du nombre de bactéries et enfin élimination du germe (au moins au niveau des organes internes). Ils ont permis de déterminer quels étaient les organes colonisés et ont été utilisés pour analyser chez le jeune et chez l'adulte les moyens d'éradiquer les salmonelles par chimiothérapie, exclusion compétitive ou vaccination (Brownell *et al* 1970). Toutefois ces modèles ne permettent pas d'étudier le portage asymptomatique. C'est pourquoi, d'autres modèles ont été développés.

Actuellement, deux principaux types de modèles sont utilisés chez le jeune. Le premier consiste en une inoculation par voie orale du poussin d'un jour avec des doses très variables en fonction de la souche (entre 10^2 et 10^8) (Bohez *et al* 2006, Nakamura *et al* 1993). Ce modèle a l'intérêt d'être proche du terrain où les animaux sont souvent infectés à la naissance ; mais il est fréquemment à l'origine d'un taux de mortalité non négligeable (Duchet-Suchaux *et al* 1995). Le second concerne l'inoculation par voie orale d'animaux d'une semaine par une dose assez

faible (5 x 10^4) (Duchet-Suchaux *et al* 1995). Ce modèle est à la base de la très grande majorité des études réalisées à l'INRA. Il est reproductible et n'induit aucune mortalité ou symptôme. La durée de l'excrétion fécale, variable suivant les lignées de volailles, peut être supérieure à 12 semaines (Duchet Suchaux *et al* 1997).

La majorité des modèles sur animaux adultes utilisent une inoculation par voie orale au pic de ponte (Protais *et al* 1996). Dans ces modèles, on observe un passage des salmonelles dans les organes profonds (foie, rate) dès le deuxième jour *post inoculation* avec une élimination plus ou moins rapide (entre 1-4 semaines). Toutefois la persistance intestinale et en particulier caecale peut durer très longtemps.

Un autre type de modèle expérimental d'étude des infections à *Salmonella* utilise la souris et l'infection par des sérotypes ubiquistes de *Salmonella* (tels que *S.* Typhimurium ou *S.* Enteritidis). Ce modèle dans lequel les souris peuvent être inoculées par voie orale, intrapéritonéale ou intraveineuse, reproduit la phase aiguë de la fièvre typhoïde humaine causée par *S.* Typhi. Il utilise des souris, dites sensibles c'est-à-dire développant la maladie, et notées *Slc11a1-/-* car n'exprimant pas le facteur de résistance *Slc11a1* (anciennement Nramp1) qui contrôle la réplication intracellulaire de certains pathogènes bactériens ou parasitaires. Ce modèle a permis de grandes avancées dans la compréhension des interactions entre germes intracellulaires et leurs hôtes (mycobactéries, leishmanies, salmonelles…) mais aussi des mécanismes de pathogénicité des *Salmonella* (Mastroeni et Sheppard 2004*)*. Plus récemment, des modèles murins ont été développés pour étudier les mécanismes de persistance des *Salmonella*. Plusieurs groupes de recherche ont inoculé des souris sensibles *Slc11a1-/-* avec des souches de *Salmonella* dites atténuées, car présentant un pouvoir pathogène moindre (Kingsley et Baumler 2000, Sukupolvi *et al* 1997). Dans ces conditions, les souris restent contaminées pendant deux mois ce qui permet une étude du développement de la réponse immunitaire protectrice anti-*Salmonella*. Cependant, ces modèles ne permettent pas la compréhension des mécanismes de pathogénie des *Salmonella*, les souches atténuées pouvant avoir un comportement chez l'hôte différent de celui d'une souche sauvage (plus grande sensibilité aux molécules anti-infectieuses par exemple), d'où l'intérêt de modèles d'infection de souris résistantes *Slc11a1+/+* par des souches sauvages de *Salmonella* (Monack *et al* 2004). Dans ce cas, les souris ne présentent pas de symptômes et l'infection persiste (jusqu'à un an post-inoculation) au niveau de granulomes et des ganglions mésentériques, malgré la présence d'un taux élevé d'anticorps anti-*Salmonella*. Ces souris résistantes excrètent, de manière intermittente mais sur une longue période, des bactéries dans leurs fèces (Monack *et al* 2004). Ces modèles de persistance ont le mérite de reproduire sur de nombreux points le portage chronique observé chez l'Homme chez 1 à 6% des patients infectés par *S.* Typhi. Ils ne constituent par contre pas de bons modèles pour l'étude des mécanismes de portage asymptomatique des *Salmonella* chez les volailles puisque, dans ces espèces, les bactéries persistent au niveau intestinal et non pas au niveau systémique.

Tous ces modèles ont permis depuis plus de dix ans d'étudier soit les facteurs bactériens impliqués dans la colonisation intestinale et la multiplication intracellulaire, soit les facteurs immunitaires qui permettent l'élimination des bactéries. Plus récemment, ont été conduites des recherches sur le dialogue moléculaire entre l'hôte et la bactérie et ceci grâce à des modèles cellulaires. Depuis quelques années, de nombreuses études prennent en compte un nouveau partenaire, la microflore intestinale, qui semble jouer un rôle très important dans le portage intestinal en dialoguant également avec l'hôte et le pathogène (Stecher *et al* 2007, Lawley *et al* 2008).

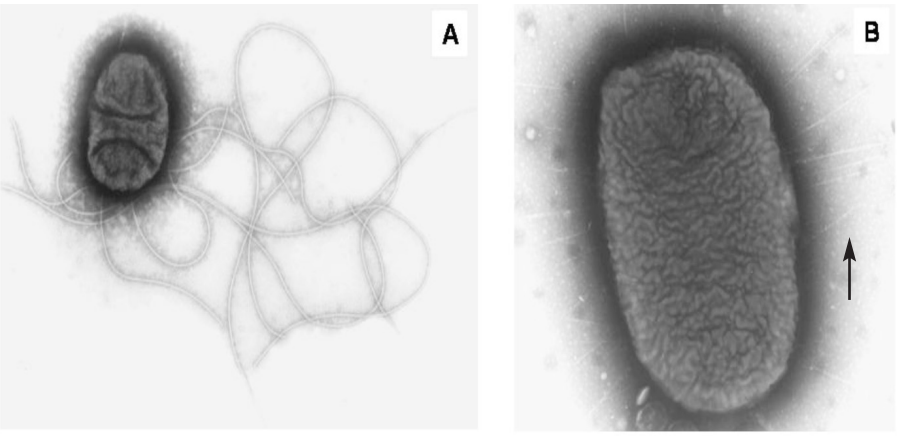
3 / Facteurs bactériens impliqués dans le portage

Les facteurs bactériens impliqués dans l'infection ont été majoritairement identifiés par des modèles cellulaires. Si les mécanismes impliqués dans le portage intestinal des salmonelles demeurent très mal connus, cela est en particulier lié à l'absence de modèles cellulaires permettant d'étudier le portage. Néanmoins, le développement des modèles expérimentaux développés ci-dessus a permis d'aborder l'étude des facteurs bactériens impliqués dans la colonisation et/ou la persistance dans les *caeca*, site privilégié de persistance des *Salmonella* chez les volailles.

Les travaux, réalisés sur le modèle de persistance utilisant les souris résistantes *Slc11a1+/+*, ont permis de mettre en évidence le rôle de deux protéines membranaires, ShdA et MisL dans la persistance intestinale et l'excrétion fécale des *Salmonella* (Dorsey *et al* 2005, Kingsley *et al* 2000). De plus, des protéines codées par des gènes présents sur des régions acquises par transfert horizontal et des protéines de fonction encore inconnue jouent un rôle dans la persistance systémique des *Salmonella* dans ce modèle murin. Cependant, le rôle de ces gènes n'est pas systématiquement transposable aux autres espèces animales notamment le porc (Boyen *et al* 2006) et devra donc être démontré dans les espèces d'intérêt.

Chez le poulet, le criblage de banques de mutants aléatoires a permis de mettre en évidence le rôle, dans la colonisation intestinale, du constituant majeur de la paroi bactérienne, le lipopolysaccharide, de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme, les systèmes de transport ou de régulation ou encore de fonction inconnue (Morgan *et al* 2004, Turner *et al* 1998). Les gènes codés par le plasmide de virulence participent également à la persistance caecale de *S.* Enteritidis chez les poussins. En effet, nous avons montré que l'absence de ce plasmide n'empêche pas la colonisation précoce de l'intestin mais réduit fortement la persistance de cette souche dans les *caeca* (Virlogeux-Payant *et al* 2003). Des stratégies plus ciblées basées notamment sur l'utilisation de mutants dépourvus d'un ou plusieurs gènes ont montré que les flagelles nécessaires à la mobilité de *Salmonella,* favorisent la colonisation des *caeca* (figure 1), Le rôle des *fimbriae* est moins évident : seul un rôle *ex vivo* dans la formation des biofilms sur du tissu intestinal de poulet a en effet été mis en évidence (Allenvercoe et Woodward 1999). Les systèmes de sécrétion de type III (T3SS) capables d'injecter directement des molécules dans la cellule hôte, notamment le T3SS-1 et le T3SS-2 qui jouent un rôle majeur dans la virulence des *Salmonella,* interviennent également dans la colonisation et la persistance intestinale ainsi que dans la colonisation systémique des poussins (Bohez *et al* 2007). Cependant, l'effet du T3SS-2 sur la colonisation intestinale n'est pas retrouvé chez des poussins inoculés à l'éclosion (Bohez *et al* 2007). Enfin, la protéine de membrane externe TolC joue également un rôle important dans la colonisation intestinale des poussins

Figure 1. *Image en microscopie électronique (fond noir) d'une* Salmonella *Enteritidis flagellée (A) et de son mutant non-flagellée (B). On peut observer les fimbriae qui sont des facteurs d'attachement de la bactérie (B, flèche).*



(Baucheron *et al* 2005). En effet, la mutation du gène *tolC* réduit *in vitro* les capacités d'entrée de *Salmonella* dans les cellules intestinales en raison d'une moindre expression du T3SS-1 (Virlogeux-Payant sous presse). L'ensemble de ces travaux montre donc que la colonisation et la persistance intestinale de *Salmonella* chez les oiseaux requièrent un répertoire important de facteurs bactériens qui n'est pas encore entièrement connu.

4 / Réponse de l'hôte

Pour développer des stratégies de contrôle de la salmonellose basées notamment sur la stimulation de l'immunité, différentes équipes analysent les mécanismes immunitaires de l'hôte qui permettent l'élimination de la bactérie. L'identification des gènes des facteurs immunitaires impliqués dans la résistance est complémentaire de la recherche systématique de marqueurs génétiques polymorphes (approche QTL) utilisables dans un processus de sélection d'animaux résistants.

Chez l'hôte, la première ligne de défense mise en jeu fait appel à l'immunité innée médiée par les macrophages et les neutrophiles. Ces cellules phagocytaires à fort pouvoir bactéricide sont les premières recrutées au site d'infection par les chimiokines produites par les cellules de la barrière intestinale (IL-8, MIP…). Elles sont activées par les cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-12…). L'étude de ces facteurs permet donc de connaître l'état d'activation de la réponse immune voire le type de réponse induite.

Le niveau d'expression des gènes des chimiokines et cytokines a d'abord été étudié chez la souris en fonction de la résistance à l'infection systémique par *Salmonella* (Lalmanach et Lantier 1999) puis chez les ovins (Lalmanach 2001, Montagne 2001). Avec la même approche, nous avons comparé, chez les oiseaux, l'expression de huit gènes de la réponse immune innée au niveau du tissu lymphoïde associé au site du portage (tonsilles caecales) entre deux lignées consanguines de poulets présentant de fortes différences phénotypiques vis-à-vis du portage asymptomatique de *Salmonella* Enteritidis. Le gène de l'interféron gamma (INF γ) s'avère plus fortement exprimé chez les poulets résistants au portage (Sadeyen *et al* 2004). Cette cytokine stimulant l'activité bactéricide des phagocytes pourrait ainsi jouer un rôle important dans la résistance au portage chez les jeunes animaux. Ces données sont à rapprocher de celles montrant une plus grande capacité des macrophages (Wigley *et al* 2006) et des neutrophiles (appelés hétérophiles chez les oiseaux) (Swaggerty *et al* 2006), issus d'animaux résistants, à répondre à la stimulation par une plus forte production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines.

Etant donné que les macrophages et les neutrophiles combattent l'invasion bactérienne par la production de peptides anti-microbiens, nous avons étudié l'expression des gènes des β-défensines qui représentent la plus grande famille de peptides anti-microbiens chez les oiseaux (Lehrer et Ganz 2002). Nous avons observé une forte différence d'expression des gènes des β-défensines aviaires 1 et 2 dans le tissu lymphoïde associé au site de portage entre les deux lignées aviaires consanguines. Chez le poussin, l'expression accrue des deux β-défensines ne réduit pas la colonisation bactérienne (Sadeyen *et al* 2004). Cependant chez la poule, l'expression de ces β-défensines est corrélée à la résistance (Sadeyen *et al* 2006). Ces résultats sont en accord avec les données de génomique positionnelle montrant une forte association entre le niveau de colonisation caecale de *S.* Enteritidis et le polymorphisme au sein du cluster de gènes des β-défensines (Hasenstein et Lamont 2007). Une hypothèse pour expliquer l'inefficacité des deux β-défensines à réduire la charge bactérienne chez le jeune pourrait être une immaturité de leur système immunitaire. En effet, nos travaux montrent clairement que les mécanismes protecteurs chez le poussin sont différents de ceux mis en place chez les adultes (Sadeyen *et al* 2006).

A présent, des données d'expression de gènes à grande échelle émergent grâce au développement d'outils performants (puces ADN multi-tissus, généralistes ou thématiques). Elles permettent de démontrer l'importance de gènes à fonction connue, mais aussi d'identifier l'effet de gènes dont le rôle dans la résistance intestinale aux pathogènes était jusque là insoupçonnée (Hooper *et al* 2003). En comparant deux lignées de poulets à croissance lente et rapide, Van Hemert *et al* (2006) ont détecté lors de la réponse intestinale précoce à *S.* Enteritidis une différence importante entre les deux lignées. Celle à croissance rapide montre, dès le premier jour, l'induction d'un ensemble de gènes reliés à l'activation des lymphocytes T alors que la réponse de la lignée à croissance lente est reliée aux macrophages (van Hemert *et al* 2006). Ces données ont été confirmées par une autre étude établissant une relation entre les variations du niveau d'expression de gènes et celles, en nombre et activités, des populations cellulaires (van Hemert *et al* 2007). La comparaison entre cellules infectées et non infectées permet d'obtenir des informations fiables et directement reliés aux évènements moléculaires et cellulaires qui ont lieu au cours de l'infection (Lillehoj *et al* 2007) mais sans toutefois être systématiquement attribuables au contrôle de l'infection *in vivo*. Dans l'ensemble, une analyse critique des données, une connaissance des mécanismes d'interaction et des systèmes de régulation de l'homéostasie intestinale peuvent amener à des découvertes fondamentales avec applications thérapeutiques potentielles. Ces études permettent, en effet, de prédire le type de réponse immunitaire qu'il faut induire par un vaccin

pour avoir une bonne protection. Elles faciliteront également l'identification des gènes contrôlant la résistance génétique des animaux et par suite la sélection de lignées résistantes (cf. § 5.3).

5 / Méthodes de prévention

La prévention des cas humains de salmonelloses passe d'abord par l'amélioration des conditions d'hygiène dans les différents échelons de la filière (élevages, abattoirs, usines de transformation...) mais aussi des ménages. Elle implique aussi la réduction des taux de contamination des animaux par le développement de vaccins, la sélection d'animaux résistants et l'utilisation de flore digestive de barrière bloquant l'implantation des bactéries.

5.1 / Hygiène

En France, en raison notamment de l'amélioration des conditions d'hygiène, les *Salmonella* agents de fièvres typhoïdes et paratyphoïdes ne comptent plus que pour 1,5% des isolats ; ils proviennent presque exclusivement de cas d'importation. Pour contrôler avec efficacité dans les exploitations, les infections à *Salmonella* dites ubiquistes responsables de toxi-infections alimentaires, il faut avant tout respecter les bonnes pratiques d'élevage et d'hygiène. La réduction de la prévalence implique la mise en œuvre d'un ensemble de mesures visant tout d'abord à prévenir l'introduction de ces bactéries lors de l'arrivée de nouveaux animaux (EFSA 2006). L'aliment est également considéré comme une source majeure de contamination, en particulier dans les pays, comme la France présentant une faible prévalence en élevage. Son importance épidémiologique peut être considérable car il peut contaminer un grand nombre d'élevages. Enfin, l'environnement de l'élevage est une autre source importante de contamination *via* les rongeurs, le matériel commun et les visiteurs (Velge *et al* 2005). Il convient également de limiter la transmission des salmonelles à l'intérieur du troupeau. A ce niveau, les mesures de biosécurité interne, en particulier le respect de la conduite en bandes, la conduite des locaux en tout plein/tout vide associée à un nettoyage et désinfection des salles entre bandes constitue un point essentiel de cette maîtrise (Lo Fo Wong *et al* 2000).

Pour le consommateur enfin, les règles de prévention des salmonelloses sont principalement axées sur le respect de la chaîne du froid, sur la cuisson adéquate, la propreté des personnes et du matériel. Pour les œufs, il importe de vérifier l'état de la coquille (qui doit être propre et intacte) et de les stocker au froid après leur achat et ce, jusqu'à leur consommation. Il en est de même de toutes les préparations à base d'œufs crus ou peu cuits (mayonnaise et crèmes).

Par contre les traitements antimicrobiens préventifs sont désormais interdits au vu des risques d'augmentation de la résistance aux antibiotiques observée chez les salmonelles et d'autres bactéries (Arlet *et al* 2006). La transmission de ces résistances est étudiée au centre INRA de Tours (Velge *et al* 2005). Les conséquences de la résistance à certains antimicrobiens, notamment les fluoroquinolones et les céphalosporines, sont particulièrement inquiétantes car ces substances sont très importantes pour le traitement des infections bactériennes systémiques chez l'homme (Giraud *et al* 2006). De plus, des résultats récents suggèrent que l'acquisition de la résistance à certains antibiotiques pourrait favoriser la virulence de *S.* Typhimurium. En effet, la pompe d'efflux liée à TolC qui favorise la résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones, augmenterait l'expression des facteurs de virulence impliqués dans l'entrée cellulaire (T3SS-1) (Virlogeux-Payant sous presse).

5.2 / Vaccins et flore compétitive

La vaccination est une des méthodes de prévention des infections à *Salmonella* qui a fait et continue de faire l'objet d'un grand nombre de recherches. L'objectif est de développer le vaccin idéal qui, inoculé aux volailles, permettrait de réduire fortement l'incidence des infections à *Salmonella* chez l'homme. Les propriétés du vaccin idéal sont :

– une protection efficace contre l'infection systémique, la colonisation de la muqueuse intestinale et l'infection des œufs (pour *S.* Enteritidis) et ce, dès les heures qui suivent l'éclosion,

– une atténuation de la virulence chez l'Homme et les animaux,

– une réduction de l'excrétion des *Salmonella* dans l'environnement,

– une compatibilité avec d'autres mesures de contrôle (présence d'un marqueur permettant de différencier la souche vaccinale),

– un bon rapport coût-efficacité.

La vaccination des volailles a permis de réduire l'incidence des infections à *S.* Enteritidis chez l'Homme, démontrant ainsi qu'elle était un moyen de lutte efficace contre les infections à *Salmonella*. De plus, avec les nouvelles réglementations européennes, la vaccination des poules pondeuses va devenir obligatoire dans les pays les plus contaminés.

Les recherches conduites jusqu'à maintenant ont montré que, quelle que soit la forme de vaccin utilisée (tué, vivant atténué ou sous-unité), une protection est observée mais de niveau variable et souvent liée à un sérotype. Si tous les vaccins chez la volaille protègent les animaux contre *S.* Enteritidis, seuls certains sont efficaces vis-à-vis d'une infection à *S.* Typhimurium ou à *S.* Gallinarum et aucun ne protège contre tous les sérotypes (Van Immerseel *et al* 2005). La réponse immunitaire protectrice ne se développant qu'à partir du 10ème jour après éclosion, seuls les vaccins vivants atténués sont capables d'induire une protection très précoce des poussins et ce, grâce à leur propriété d'inhibition de colonisation. Ils présentent donc un intérêt particulier puisqu'ils permettent de bloquer la colonisation intestinale par des salmonelles virulentes. Mais ils sont à l'heure actuelle interdits en France.

Cette notion d'inhibition de colonisation ou d'exclusion compétitive (la souche vaccinale empêchant la croissance ou l'attachement de la souche pathogène) est observée également lors de l'administration d'une flore intestinale d'un animal adulte à des poussins. En effet, la sensibilité des poussins est liée à l'immaturité de leur système immunitaire mais aussi à l'absence de flore intestinale à la naissance. Cette dernière cause peut être levée par l'administration d'une culture de la flore d'un animal adulte élevé en condition dite SPF pour *Specific Pathogen Free* ou exempte de pathogènes spécifiques, ce qui diminue fortement la sensibilité à l'infection (Nurmi et Rantala 1973) mais aussi au portage asymptomatique (Virlogeux *et al* résultats non publiés). Toutefois, de nombreux pays n'autorisent pas l'utilisation d'une telle flore : non définie et pouvant transmettre des pathogènes (Mead 2000). Différentes études sont consacrées actuellement à l'identification des souches responsables de cet effet barrière ainsi qu'à la compréhension des mécanismes sous-jacents. Cet effet protecteur est uniquement observé avec

des bactéries vivantes et est plus élevé avec des souches isogéniques de la souche pathogène. Nous avons montré au sein d'un projet européen qu'il est lié à :

– une inhibition de la multiplication de la souche pathogène par des mécanismes encore inconnus,

– une compétition au niveau de l'intestin pour les sites d'adhésion et de colonisation,

– une stimulation de la réponse immune non spécifique (Van Immerseel *et al* 2005).

De plus, des résultats très récents montrent que la flore commensale qui stimule la réponse immune de l'hôte et empêche la colonisation intestinale par les pathogènes, peut être fortement modifiée lors du dialogue moléculaire entre le pathogène et son hôte. Ainsi, il est suggéré que les salmonelles possèdent des facteurs qui stimulent la réponse inflammatoire de l'hôte : celle-ci inhiberait alors la flore commensale et donc favoriserait en retour la multiplication des salmonelles (Stecher *et al* 2007).

En conséquence, l'avenir est très certainement au développement de vaccins vivants atténués. Ces vaccins sont, en effet, plus immunogènes chez les souris et les volailles que les vaccins tués ou à base de protéines purifiées. De plus, il est maintenant démontré que la colonisation massive de l'intestin par des souches atténuées peut induire le recrutement, dans la paroi de l'intestin, des neutrophiles/hétérophiles et inhiber la colonisation intestinale d'une souche virulente de *Salmonella* et ce dans les heures qui suivent l'éclosion. Ces deux propriétés augmentent la résistance des animaux à la colonisation et à l'infection systémique par une souche virulente de *Salmonella* (Van Immerseel *et al* 2005). Même si la réglementation n'impose pas actuellement de tester l'efficacité des vaccins vivants atténués sur ces deux critères, identifier des mutations diminuant la virulence de *Salmonella* sans affecter ces propriétés est un des challenges actuels. Dans le cadre de contrats européens, nous avons pu obtenir un mutant prometteur car fortement atténué chez la souris dans le modèle de référence pour l'évaluation de la virulence des souches (Amy *et al* 2004) ; son défaut de mobilité constitue de plus un marqueur permettant de le différencier d'une souche sauvage (Fardini *et al* 2007) et il conserve ses capacités d'inhibition de colonisation. Toutefois, l'impact des vaccins vivants sur la microflore commensale devra être pris en compte dans les prochaines études.

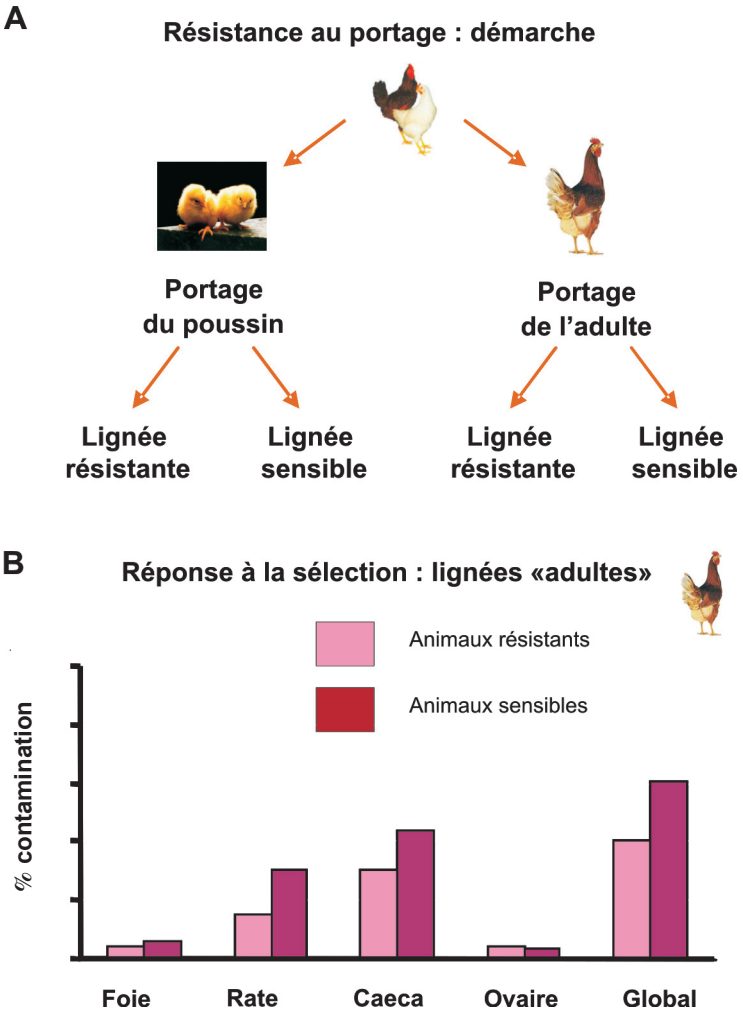
5.3 / Sélection d'animaux résistants : faisabilité de la démarche et recherche des gènes en cause

Si les premières expériences visant à améliorer la résistance génétique des poules aux salmonelles datent des années 30 (Beaumont *et al* 2003), elles avaient alors pour but de réduire les pertes animales. Leur intérêt s'est donc réduit avec la maîtrise de cette maladie. C'est la recrudescence des cas humains de salmonelloses à la fin des années 80 jointe au développement de la génétique moléculaire qui a suscité un nouvel intérêt pour l'étude du contrôle génétique de la résistance à cette bactérie.

Le rôle de la génétique a été démontré en trois étapes. L'existence de différences de résistance entre lignées a d'abord été identifiée en terme de mortalité (Bumstead et Barrow 1988) puis de portage du poussin (Duchet Suchaux *et al* 1997) et de l'adulte (Protais *et al* 1996). Ces premières études ont été confirmées par les estimations de l'héritabilité de différentes mesures de la résistance. Ce paramètre, qui caractérise les possibilités de sélection a en effet été estimé à 0,20 chez les jeunes oiseaux (Berthelot *et al* 1998) et à plus de 0,35 chez les pondeuses (Beaumont 1999). Suite à ces résultats, nous avons entrepris deux expériences de sélection divergente à partir d'une même population commerciale, sur le niveau de portage du poussin et de l'adulte (figure 2).

L'ensemble des données recueillies a permis de préciser les relations entre différentes mesures de résistance. Ainsi, chez le poussin, les mesures réalisées pendant les phases d'élimination de la bactérie ou de plateau d'infection semblent pratiquement indépendantes Mais surtout ils montrent une forte indépendance, voire un léger antago-

Figure 2. *A. Expérience de sélection divergente de poussins et d'adultes sensibles (faible taux de portage) ou résistants (fort taux de portage) au portage de* S. *Enteritidis. B. Résultats obtenus dans les deux lignées adultes après 4 générations de sélection.*



nisme entre les gènes de résistance du poussin d'une semaine dont le système immunitaire est encore immature et ceux de la poule. Ce résultat apparaît d'autant plus important que la plupart des études menées jusqu'ici l'ont été sur des poussins. Ces résultats sont d'ailleurs cohérents avec ceux obtenus par une approche transcriptomique (cf. § 4).

Le caractère de résistance au portage des salmonelles étant difficile et coûteux à mettre en application à large échelle en sélection, des efforts importants ont été mis en œuvre, afin de découvrir des marqueurs génétiques utilisables en SAM (Sélection Assistée par Marqueurs). Les deux approches, par gènes candidats et par recherche de QTL (*Quantitative Trait Loci*), ont été entreprises. Les gènes candidats sont choisis en fonction de leur implication possible dans l'expression du caractère ; les premiers gènes testés ont été les homologues de deux gènes identifiés chez la souris et ayant un effet sur la résistance aux salmonelles : *SLC11A1* impliqué dans la résistance aux germes intracellulaires dans les macrophages et *TLR4* qui contrôle la résistance à certaines bactéries Gram-, dont font partie les salmonelles. Chez la poule, tous deux interviennent dans la résistance à la maladie, appréciée par le taux de mortalité dans la semaine suivant une inoculation intraveineuse réalisée avec une dose élevée de bactéries (Hu *et al* 1997). La région chromosomique contenant *Slc11A1* intervient également dans le niveau de contamination d'animaux plus âgés (Beaumont *et al* 2003, Girard Santosuosso *et al* 1998). Plusieurs autres gènes intervenant dans la défense de l'hôte ont été étudiés pour leur effet sur la réponse vaccinale (Kaiser *et al* 2002) ou le niveau de colonisation caecale peu après l'infection (Lamont *et al* 2002).

Parallèlement aux tests de gènes candidats, plusieurs recherches de QTL par criblage systématique du génome ont été entreprises, dont le but est de repérer des régions chromosomiques impliquées dans le caractère. Cette démarche a été réalisée en utilisant des croisements entre lignées partiellement consanguines, choisies en fonction de différences importantes de sensibilité à la mortalité (Bumstead et Barrow1988) ou au portage de salmonelles (Tilquin *et al* 2005). Une première étude a montré l'existence d'un QTL, dit SAL1, impliqué dans le niveau de colonisation de la rate 2 jours après une inoculation intraveineuse, une autre a identifié onze QTL répartis sur cinq chromosomes (Tilquin *et al* 2005) pour leurs effets sur la résistance du poussin 5 jours ou 5 semaines après inoculation. L'un d'eux pourrait correspondre au QTL identifié par Mariani *et al* (2001) les autres ouvrent de nouvelles voies de recherche.

Les limites actuelles de la démarche de la SAM pour le caractère de portage des salmonelles tiennent à l'imprécision de la localisation chromosomique des QTL. Même dans le cas de l'approche par gènes candidats, l'association observée entre la région qui contient le gène et le caractère ne permet pas d'exclure la possibilité de l'implication d'un autre gène. Si la plupart des zones QTL couvrent des régions contenant potentiellement plusieurs centaines de gènes, l'étude la plus avancée sur le locus SAL1, n'en couvre plus que quelques dizaines (Kaiser, communication personnelle). Si les efforts à fournir sont encore importants, de nouveaux outils nous permettent d'entrevoir des progrès rapides. Des dispositifs animaux originaux (croisements avancés entre lignées) ont été développés pour obtenir des populations présentant un brassage génétique important. Le séquençage du génome et le développement de méthodes de génotypage de SNP (S*ingle Nucleotide Polymorphism*) à grande échelle permettent d'accélérer les recherches. Elles devraient mener à l'identification des polymorphismes de l'ADN responsables des variations phénotypiques. Idéalement, ce sont ces derniers qui devront être utilisés comme marqueurs pour la sélection d'animaux résistants, afin de bénéficier d'une précision optimale.

Si, dès à présent, les résultats obtenus permettent d'envisager une application à l'échelle commerciale, celle-ci ne pourra avoir d'effets significatifs sur le terrain avant plusieurs années du fait du temps nécessaire à la sélection de lignées commerciales et à la diffusion du progrès génétique. Mais les calculs de modélisation montrent que ceux-ci seront amplifiés par les synergies avec les autres méthodes de prophylaxie.

6 / Impact des démarches prophylactiques : apport de la modélisation épidémiologique

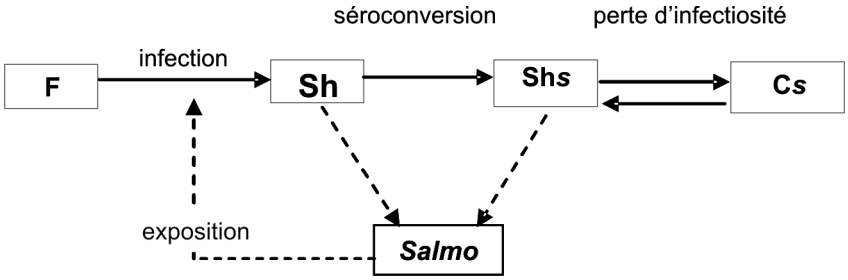
La modélisation mathématique, dont l'utilisation est de plus en plus fréquente en épidémiologie, permet d'évaluer *ex-ante* des mesures de maîtrise peu utilisées ou non encore disponibles en pratique. Elle permet de plus une approche intégrative complémentaire des études expérimentales et observationnelles de terrain. Sa validité implique de prendre en considération les spécificités des populations animales dans lesquelles les salmonelles se propagent : ainsi, les troupeaux porcins sont des populations ouvertes, de petite taille et structurées en bandes (de truies et de porcelets). Un modèle de troupeau porcin naisseur-engraisseur (ce qui est le cas de la majorité des troupeaux français) a donc été élaboré pour représenter la gestion démographique du troupeau par l'éleveur. Pour livrer des porcs charcutiers de format homogène, l'éleveur est en effet fréquemment conduit à mélanger des animaux de différents lots. Le modèle a permis de décrire l'influence des modalités de cette gestion démographique sur les contacts entre animaux et les risques d'introduction d'agents pathogènes au sein de l'élevage (Lurette *et al* 2008).

Les risques de transmission dépendant également du statut immunitaire de l'animal, un modèle d'infection considérant les différents statuts infectieux des animaux ainsi que les transitions entre états (figure 3) a été mis au point et couplé au modèle démographique précédent. Il permet d'étudier la propagation des salmonelles au sein d'un troupeau après introduction de la bactérie par des truies de renouvellement et de déterminer la prévalence de l'infection en sortie d'élevage.

Ce modèle a été ensuite utilisé pour évaluer l'efficacité de mesures de maîtrise concernant la biosécurité interne (respect plus ou moins strict de la conduite en bandes et efficacité du processus nettoyage-désinfection-vide sanitaire) sur la prévalence des porcs séropositifs dans les lots envoyés à l'abattoir. Il en ressort par exemple qu'une amélioration de 10% de l'efficacité de la désinfection des élevages se traduit par une réduction de 5% environ du taux d'infection des truies reproductrices. Par ailleurs, des mesures peu utilisées telles que la vaccination (actuellement non autorisée en France) ont été envisagées de manière exploratoire (Lurette *et al* 2008).

Une approche analogue a été menée en parallèle pour modéliser la transmission des salmonelles dans un troupeau de poules pondeuses en distinguant les

Figure 3. *Etats des porcs vis-à-vis de l'infection par les salmonelles et transitions entre états pris en compte dans notre modèle (F : sensible ; SH : porteur excréteur ; Shs : porteur excréteur séropositif ; Cs : porteur non excréteur positif ; Salmo : quantité de salmonelles excrétées dans l'environnement).*



différentes étapes de contamination de la poule : contamination digestive, contamination systémique (lorsque les organes tels que le foie, la rate sont contaminés après translocation de la barrière digestive) et élimination des bactéries de l'organisme (Prevost *et al* 2006). D'après ce modèle, l'amélioration génétique de la résistance observée lors de l'expérience de sélection résulte principalement d'une augmentation de la vitesse d'élimination des bactéries. Introduire une proportion d'animaux résistants peut permettre de ralentir ou d'éviter le développement d'une épizootie ; l'association entre vaccination et sélection apparaît particulièrement efficace (Prévost *et al* 2008, accepté).

Conclusions

La réduction actuelle du nombre de cas de salmonelloses humaines démontre l'efficacité des mesures d'hygiène et de la lutte contre le portage asymptomatique des salmonelles chez la poule et à terme le porc. Jusqu'ici cette dernière s'est beaucoup appuyée sur des mesures de prophylaxie sanitaire par la détection puis l'élimination des animaux et cheptels infectés. Mais l'éradication totale de la maladie animale implique une démarche intégrée utilisant l'ensemble des méthodes de prévention à l'étude. Le développement de vaccins est particulièrement d'actualité puisque l'Union Européenne impose le recours à la vaccination aux états présentant une fréquence d'infection trop importante. La sélection d'animaux résistants est une voie complémentaire qui devrait renforcer l'efficacité des vaccins. Au-delà de ces démarches, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes de l'hôte et de la bactérie qui permettent la colonisation intestinale mais aussi la transmission de la bactérie. De plus, les études très récentes suggèrent un rôle important de la microflore intestinale dans la résistance aux pathogènes voire de l'hôte sur cette microflore. Il nous faudra donc analyser le dialogue moléculaire non seulement entre le pathogène et son hôte mais aussi avec la microflore intestinale. L'ensemble de cette démarche est d'autant plus prometteuse que nous disposons des modèles animaux et bactériens mais aussi de la séquençe des génomes de l'hôte (poule, bientôt porc…) et de la bactérie pathogène, ainsi que des outils de métagénomique pour caractériser la microflore intestinale.

Remerciements

Les auteurs remercient tous ceux qui ont rendu ce travail possible. Ces études ont pu être réalisées grâce aux projets européens AIR3-CT94-2433, FAIR-PL98-4311, FAIR6-CT98-4006, FP6-Food-CT-2003-505523, au réseau d'excellence EADGENE (Food-CT-2004-506416), aux projets financés par le Ministère de l'Agriculture (Aliment Demain R98/06 et Aliment Qualité Sécurité SF20) et aux contrats Région Centre.

Références

Allenvercoe E., Woodward M.J., 1999 The role of flagella, but not *fimbriae*, in the adherence of *Salmonella* enterica serotype enteritidis to chick gut explant. J. Med. Microbiol., 48, 771-780.

Amy M., Velge P., Senocq D., Bottreau E., Mompart F., Virlogeux-Payant I., 2004. Identification of a new *Salmonella* enterica serovar Enteritidis locus involved in cell invasion and in the colonisation of chicks. Res. Microbiol., 155, 543-552.

Arlet G., Barrett T.J., Butaye P., Cloeckaert A., Mulvey M.R., White D.G., 2006. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. Microbes Infect., 8, 1945-1954.

Baucheron S., Mouline C., Praud K., Chaslus-Dancla E., Cloeckaert A., 2005. TolC but not AcrB is essential for multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium colonization of chicks. J. Antimicrob. Chemother, 55, 707-712.

Beaumont C., Protais J., Guillot J.F., Colin P., Proux K.,1999. Genetic resistance to mortality of day-old chicks and carrier-state of hens after inoculation with S*almonella* enteritidis. Avian Pathol., 28, 131-135.

Beaumont C., Protais J., Pitel F., Leveque G., Malo D., .2003. Effect of two candidate genes on the *Salmonella* carrier state in fowl. Poult. Sci., 82, 721-726.

Berthelot F., Beaumont C., Mompart F., Girard Santosuosso O., Pardon P., Duchet-Suchaux M., 1998. Estimated heritability of the resistance to cecal carrier state of *Salmonella* enteritidis in chickens. Poult. Sci., 77, 797-801.

Bohez L., Ducatelle R., Pasmans F., Botteldoorn N., Haesebrouck F., Van Immerseel F., 2006. *Salmonella* enterica serovar Enteritidis colonization of the chicken caecum requires the HilA regulatory protein. Vet. Microbiol., 116, 202-210.

Bohez L., Ducatelle R., Pasmans F., Haesebrouck F., Van Immerseel F., 2007. Long-term colonisation-inhibition studies to protect broilers against colonisation with *Salmonella* Enteritidis, using *Salmonella* Pathogenicity Island 1 and 2 mutants. Vaccine, 25, 4235-4243.

Boyen F., Pasmans F., Donne E., Van Immerseel F., Morgan E., .2006. The fibronectin binding protein ShdA is not a prerequisite for long term faecal shedding of *Salmonella* typhimurium in pigs. Vet. Microbiol., 115, 284-290.

Brownell J.R., Sadler W.W., Fanelli M.J., 1970. Role of *caeca* in intestinal infection of chickens with *Salmonella* typhimurium. Avian Dis., 14, 106-116.

Bumstead N., Barrow P.A., 1988. Genetics of resistance to *Salmonella* typhimurium in newly hatched chicks. Br. Poult. Sci., 29, 521-529.

de Jong B., Ekdahl K., 2006. The comparative burden of salmonellosis in the European Union member states, associated and candidate countries. BMC Public Health, 6, 4.

Dorsey C.W., Laarakker M.C., Humphries A.D., Weening E.H., Baumler A.J., 2005. *Salmonella* enterica serotype Typhimurium

MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. Mol.. Microbiol., 57, 196-211.

Duchet-Suchaux M., Lechopier P., Marly J., Bernardet P., Delaunay R., Pardon P., 1995. Quantification of experimental *Salmonella* enteritidis carrier state in B13 leghorn chicks. Avian Dis., 39, 796.

Duchet-Suchaux M., Mompart F., Berthelot F., Beaumont C., Lechopier P., Pardon P., 1997. Differences in frequency, level, and duration of cecal carriage between four outbred chicken lines infected orally with *Salmonella* enteritidis. Avian Dis., 41, 559-567.

EFSA, 2006. Opinion of the scientific panel on biological hazards on «risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production». EFSA J., 341,1-131.

EFSA, 2007a. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks of *Gallus gallus*, in the EU, 2005-2006. EFSA J., 98, 1-85.

EFSA, 2007b. Report on the analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. EFSA J., 97.

EU, 2003. Regulation (ec) nº 2160/2003 of the european parliament and of the council of 17 november 2003 on the control of *Salmonella* and other specified food-borne zoonotic agents. Official J. Eur. Union, 12/2003.

Fardini Y., Chettab K., Grepinet O., Rochereau S., Trotereau J., 2007. The YfgL lipoprotein is essential for Type III secretion system expression and virulence of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. Infect. Immun., 75, 358-370.

Girard Santosuosso O., Menanteau P., Duchet-Suchaux M., Berthelot F., Mompart F., 1998. Variability in the resistance of four chicken lines to experimental intravenous infection with *Salmonella* enteritidis phage type 4. Avian Dis., 42, 462-469.

Giraud E., Baucheron S., Cloeckaert A., 2006. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. Microbes Infect., 8, 1937-1944.

Hasenstein J.R., Lamont S.J., 2007. Chicken gallinacin gene cluster associated with *Salmonella* response in advanced intercross line. Avian Dis., 51, 561-567.

Hooper L.V., Stappenbeck T.S., Hong C.V., Gordon J.I., 2003. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. Nat. Immunol., 4, 269-273.

Hu J.X., Bumstead N., Barrow P., Sebastiani G., Olien L., 1997. Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to NRAMP1 and TNC. Genome Res., 7, 693-704.

Kaiser M.G., Dee N., Lamont S.J., 2002. Microsatellite markers linked to *Salmonella enterica* serovar enteritidis vaccine response in young F1 broiler-cross chicks. Poult. Sci., 81, 193-201.

Kingsley R.A., Baumler A.J., 2000a. Microreview: host adaptation and the emergence of infectious disease: the *salmonella* paradigm. Mol. Microbiol., 36, 1006-1014.

Kingsley R.A., van Amsterdam K., Kramer N., Baumler A.J., 2000b. The shdA gene is restricted to serotypes of *salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding. Infect. Immunol., 68, 2720-2727.

Lalmanach A.C., Lantier F., 1999. Host cytokine response and resistance to *Salmonella* infection. Microbes Infect., 1, 719-726.

Lalmanach A, Montagne A, Menanteau P, Lantier F. 2001 Effect of the mouse Nramp1 genotype on the expression of IFN-gamma gene in early response to *Salmonella* infection. Microbes Infect 3:639-44.

Lamont S.J., Kaiser M.G., Liu W., 2002. Candidate genes for resistance to *Salmonella* enteritidis colonization in chickens as detected in a novel genetic cross. Vet. Immunol. Immunopathol., 87,423-428.

Lawley T.D., Bouley D.M., Hoy Y.E., Gerke C., Relman D.A., Monack D.M., 2008. Host transmission of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota. Infect. Immunol., 76, 403-416.

Lehrer R.I., Ganz T., 2002. Defensins of vertebrate animals. Curr. Opin. Immunol., 14, 96-102.

Lillehoj H.S., Kim C.H., Keeler C.L. Jr., Zhang S., 2007. Immunogenomic approaches to study host immunity to enteric pathogens. Poult. Sci., 86, 1491-1500.

Lo Fo Wong D.M.A., Dahl J., Stege H., van der Wolf P.J., Leontides L., 2004. Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. Prev. Vet. Med., 62, 253-266.

Lurette A., Belloc C., Touzeau S., Hoch T., Seegers H., Fourichon C., 2008. Modelling batch farrowing management within a farrow-to-finish pig herd: influence of management on contact structure and pig delivery. Animal, 2, 105-116.

Mariani P., Barrow P.A., Cheng H.H., Groenen M.M., Negrini R., Bumstead N., 2001. Localization to chicken chromosome 5 of a novel locus determining salmonellosis resistance. Immunogenetics, 53, 786-791.

Mastroeni P., Sheppard M., 2004. *Salmonella* infections in the mouse model: host resistance factors and *in vivo* dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. Microbes Infect., 6, 398-405.

Mead G.C., 2000. Prospects for competitive exclusion treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. Vet. J., 159, 111-123.

Monack D.M., Bouley D.M., Falkow S., 2004. *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nramp1+/+ mice and can be reactivated by IFNgamma neutralization. J. Exp. Med., 199, 231-241.

Montagne A., Grepinet O., Peloille M., Lantier F., Lalmanach A.C., 2001 Quantification of ovine cytokine gene expression by a competitive RT-PCR method. J. Immunol. Methods, 253, 83-93.

Morgan E., Campbell J.D., Rowe S.C., Bispham J., Stevens M.P., 2004. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. Mol. Microbiol., 54, 994-1010.

Nakamura M., Nagamine N., Suzuki S., Norimatsu M., Oishi K., 1993. Long-term shedding of Salmonella enteritidis in chickens which received a contact exposure within 24 hours of hatching. J. Vet. Med. Sci., 55, 649-653.

Nurmi E., Rantala M., 1973. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. Nature, 241, 210-211.

Prevost K., Magal P., Beaumont C., 2006. A model of *Salmonella* infection within industrial house hens. J. Theor. Biol., 242, 755-763.

Prevost K., Magal P., Protais J., Beaumont C., 2008. Effect of genetic resistance of the hen to *Salmonella* carrier-state on incidence of bacterial contamination: synergy with vaccination. Vet. Res., 39, 20.

Protais J., Colin P., Beaumont C., Guillot J.F., Lantier F., 1996. Line differences in resistance to *Salmonella* enteritidis PT4 infection. Brit. Poult. Sci., 37, 329-339.

Sadeyen J.R., Trotereau J., Velge P., Marly J., Beaumont C., 2004. *Salmonella* carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. Microbes Infect., 6, 1278-1286.

Sadeyen J.R., Trotereau J., Protais J., Beaumont C., Sellier N., 2006. *Salmonella* carrier-state in hens: study of host resistance by a gene expression approach. Microbes Infect., 8, 1308-1314.

Stecher B., Robbiani R., Walker A.W., Westendorf A.M., Barthel M., 2007. *Salmonella* enterica serovar *typhimurium* exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. PLoS Biol., 5, 2177-2189.

Sukupolvi S., Edelstein A., Rhen M., Normark S.J., Pfeifer J.D., 1997. Development of a murine model of chronic *salmonella* infection. Infect. Immunol., 65, 838-842.

Swaggerty C.L., Kaiser P., Rothwell L., Pevzner I.Y., Kogut M.H., 2006. Heterophil cytokine mRNA profiles from genetically distinct lines of chickens with differential heterophil-mediated innate immune responses. Avian Pathol., 35, 102-108.

Tilquin P., Barrow P.A., Marly J., Pitel F., Plisson-Petit F., Velge P.,Vignal A., Baret P.V., Bumstead N., Beaumont C., 2005. A genome scan for quantitative trait loci affecting the *Salmonella* carrier-state in the chicken. Genet. Sel. Evol., 37, 539-561.

Turner A.K., Lovell M.A., Hulme S.D., Zhang-Barber L., Barrow P.A., 1998. Identification of *Salmonella typhimurium* genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks. Infect. Immunol., 66, 2099-2106.

van Hemert S., Hoekman A.J., Smits M.A., Rebel J.M., 2006. Gene expression responses to a *Salmonella* infection in the chicken intestine differ between lines. Vet. Immunol., Immunopathol., 114, 247-258.

van Hemert S., Hoekman A.J., Smits M.A., Rebel J.M., 2007. Immunological and gene expression responses to a *Salmonella* infection in the chicken intestine. Vet. Res., 38, 51-63.

van Immerseel F., Methner U., Rychlik I., Nagy B., Velge P., 2005. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. Epidemiol. Infect., 133, 959-978.

Velge P., Cloeckaert A., Barrow P., 2005. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella* enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. Vet. Res., 36, 267-288.

Virlogeux-Payant I., Mompart F., Velge P., Bottreau E., Pardon P., 2003. Low persistence of a large-plasmid-cured variant of *Salmonella* enteritidis in *caeca* of chicks. Avian Dis., 47, 163-168.

Virlogeux-Payant I., Baucheron S., Pelet J., Trotereau J., Bottreau E., 2008. TolC, but not AcrB, is involved in the invasiveness of multidrug-resistant *Salmonella* enterica serovar *Typhimurium* by increasing Type III secretion system-1 expression. Int. J. Med. Microbiol., sous presse.

Wigley P., Hulme S., Rothwell L., Bumstead N., Kaiser P., Barrow P., 2006. Macrophages isolated from chickens genetically resistant or susceptible to systemic salmonellosis show magnitudinal and temporal differential expression of cytokines and chemokines following *Salmonella* enterica challenge. Infect. Immunol., 74, 1425-1430.

Résumé

La majorité des cas de salmonellose humaine dans les pays industrialisés est liée à la consommation d'œufs et de viande de volaille mais aussi de charcuteries contaminées. Pour réduire ce risque alimentaire, la stratégie développée à l'INRA, en collaboration avec l'AFSSA, vise principalement à réduire la contamination des matières premières alimentaires d'origine animale, en particulier celles issues des volailles et du porc. Cela implique d'améliorer l'état sanitaire des animaux et de lutter contre le portage asymptomatique de cette bactérie par des animaux qui abritent, voire excrètent de grande quantité de pathogènes sans signe de maladie. Une telle démarche implique une meilleure compréhension des mécanismes qui permettent à la bactérie de coloniser l'animal, mais aussi des réponses immunitaires mises en place par l'hôte pour résister à ce pathogène. Ces études débouchent sur le développement de vaccins ou de moyens thérapeutiques et sur la sélection d'animaux plus résistants à ce portage asymptomatique. Enfin, une approche intégrative complémentaire des études expérimentales et observationnelles de terrain permet de modéliser la contamination des animaux ou des industries agroalimentaires pour analyser les risques de transmission et l'impact des mesures prophylactiques.

Abstract

Decrease the prevalence of Salmonella carrier state in animals: a multidisciplinary approach

Most human cases of salmonellosis in developed countries are related to the consumption of contaminated eggs, poultry and pig meat. To improve food safety, INRA aims, in collaboration with AFSSA, at decreasing the prevalence of contamination of raw animal material, especially those originating from poultry or pigs. This implies improving animal health and reducing asymptomatic carrier-state (*i.e* animals carrying or shedding bacteria without any clinical signs). This involves increasing the knowledge of mechanisms of animal colonisation by bacteria and also the immune response allowing the host to resist the pathogen. These studies will result in the development of vaccines and drugs but also in the selection of animals more resistant to the *Salmonella* carrier state. Finally, an integrative approach, using results from experiments and field studies, allows modelising the contamination of animals and food industries and in turn evaluating the risk of transmission and the impact of prophylactic means.

VELGE P., VIRLOGEUX-PAYANT I., LALMANACH A.-C., BELLOC C., FRAVALO P., VIGNAL A., BEAUMONT C., 2008. Réduction du portage des salmonelles chez les animaux de rente : une approche multidisciplinaire. INRA Prod. Anim., 21, 117-126.