



HAL
open science

Salmonella en filière porcine : dynamique d'infection, pouvoir colonisateur et virulence

María Belén Cevallos Almeida

► **To cite this version:**

María Belén Cevallos Almeida. Salmonella en filière porcine : dynamique d'infection, pouvoir colonisateur et virulence. Sciences agricoles. Université de Rennes, 2018. Français. NNT : 2018REN1B013 . tel-01895442

HAL Id: tel-01895442

<https://theses.hal.science/tel-01895442>

Submitted on 15 Oct 2018

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.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Microbiologie, Parasitologie, Virologie

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie, Alimentation

présentée par

María Belén Cevallos Almeida

Préparée au laboratoire de l'Anses de Ploufragan-Plouzané
Unité de recherche HQPAP, Hygiène et Qualité
des Produits Avicoles et Porcins

***Salmonella* en filière
porcine : dynamique
d'infection, pouvoir
colonisateur et
virulence**

**Thèse soutenue à Ploufragan
Le 27 Avril 2018**

devant le jury composé de :

Georges DAUBE

Professeur, Université de Liège / Rapporteur

Simon LE HELLO

Directeur de Recherche, Institut Pasteur Paris /
Rapporteur

Catherine BELLOC

Professeure, Oniris - INRA, Nantes / *Présidente du jury*

Sabrina CADEL-SIX

Chargée de Recherche, ANSES de Maisons-Alfort /
Examinatrice

Martine DENIS

Directrice de Recherche, ANSES de Ploufragan /
Directrice de Thèse

Annaëlle KEROUANTON

Chargée de Recherche, ANSES de Ploufragan /
Co-directrice de Thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier d'abord mon pays, l'Équateur, en particulier au SENESCYT (Programme des Professeurs d'Université) pour avoir financé ce projet de Thèse.

Je remercie les membres de mon Jury : le Professeur Georges DAUBE, le Dr. Simon LE HELLO, le Dr. Catherine BELLOC, le Dr Sabrina CADEL-SIX d'avoir accepté d'évaluer ce travail de Thèse. Je remercie aussi les membres de mon comité de pilotage pour leurs conseils et leur aide tout au long de ce travail : Brice MINVIELLE, Sylvie ROCHE, Bénédicte MARTIN et tout particulièrement Christelle FABLET, qui m'a accompagnée durant ces 3 années pour le traitement statistiques des données.

Un grand merci à Gilles SALVAT pour la confiance que m'a donné pour réaliser ce travail de thèse et pour son accueil au sein de son laboratoire.

Je voudrais remercier aussi à Nicolas ETERRADOSSI et toutes les personnes de la Direction du Laboratoire de Ploufragan Plouzané de l'ANSES, pour leur son aide pendant mon séjour dans cette institution.

Je souhaite remercier aussi Martine DENIS, ma directrice de thèse, de m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien ce projet de Thèse. Je la remercie aussi pour son accueil, sa gentillesse, ses conseils scientifiques, et toute l'aide qu'elle m'a apportée.

De façon particulière, je voudrais remercier Annaëlle KEROUANTON, ma co-directrice de thèse, pour tout le temps qu'elle m'a accordé tout au long de ce travail, et pour son aide dans l'écriture du manuscrit, pour sa patience, pour le partage de ses connaissances, et pour l'amitié qu'elle m'a donnée à moi et à ma famille.

Ce travail a été fait au sein de l'Unité HQPAP, et je voudrais remercier toutes les personnes de cette unité, particulièrement la chef d'unité, Marianne CHEMALY, pour son accueil si gentil. Merci à Catherine, Valérie, Laure, Gaëlle, Brigitte, Aurore, Régine, Muriel, Ségolène, Françoise, Bérengère, Emmanuelle, Sandra, Louise, Florent, Katell, Evelyne, Elisabeth, Emilie, Caroline, Laetitia, Pierre, Amandine et Florent, en dehors de l'aide que vous avez pu m'apporter, vous avez toujours eu pour moi un sourire, un mot gentil. Jamais je n'oublierai mon parcours dans ce laboratoire et toutes ces personnes.

Je voudrais remercier également tout le personnel du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané et spécialement l'Unité SPPAE, sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Merci à Frédéric PABOEUF, Yann BAILLY et Jean-Marie GUILLONET pour leur rôle primordial dans les expérimentations animales.

De façon plus générale je remercie tous les personnes qui ont partagé mon chemin durant ces trois années et qui m'ont donnée leur amitié et leurs conseils pendant les bons et les mauvais moments : Elizabeth COUVELIER, les membres du Rotary Club. Je remercie le Dr Joël GRAVOVAC pour toute son aide et ses conseils. Pensée particulière à Cynthia MINAFRA, ma chère amie Brésilienne, à Sandrine et Jean pour les bons moments partagés. Merci aussi à tous les personnes qui m'ont soutenue à l'Equateur, en particulier María Augusta RIVERA, ma chère cousine et Nidia CORDOVA, ma meilleure amie, et bien sûr ma famille, spécialement mon père Adolfo et ma mère Martha.

Je termine ces remerciements par les personnes les plus importantes de ma vie, d'abord mon mari, Marco, sans toi je n'aurais pas pu finir ce travail, je te remercie pour avoir parcouru ce chemin avec moi, pas seulement durant ces trois ans, mais aussi pour toute la vie que nous partageons ensemble, pour ton amour à toute épreuve, pour ton optimisme, ton soutien chaque jour. A mes chères filles Lia et Maria Isabel, vous êtes incroyablement courageuses, et vous m'avez accompagné pendant ce séjour, vous m'avez soutenu et chaque matin votre amour m'a donné la force de continuer. Merci infiniment.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTES DES ABRÉVIATIONS	VIII
CHAPITRE I:	1
INTRODUCTION	1
1. SALMONELLA	2
1.1. Historique	2
1.2. Taxonomie et nomenclature	2
1.3. Morphologie et caractéristiques	5
1.4. Génome	7
1.5. Distribution	7
1.6. Spécificité de l'hôte	7
1.7. Diagnostic	8
1.7.1. Méthodes de détection conventionnelles pour <i>Salmonella</i>	8
1.7.2. Dénombrement	12
1.7.3. Caractérisation phénotypique et génotypique des souches	14
2. LES SALMONELLOSES	22
2.1. La fièvre Typhoïde	22
2.2. Salmonelloses non typhoïde	23
2.2.1. Épidémiologie	23
2.2.2. Transmission et facteurs de risque	26
2.2.3. Signes cliniques	27
2.2.4. Systèmes de surveillance	28
2.2.5. Réponse immunitaire contre <i>Salmonella</i>	29
3. VIRULENCE	33
3.1. Facteurs de virulence	33
3.1.1. Fimbriae ou pili	33
3.1.2. Flagelles	34
3.1.3. Lipopolysaccharide	34
3.1.4. Plasmides de virulence	35
3.1.5. Toxines	35
3.1.6. Antigène Capsulaire (Vi)	36
3.1.7. Les îlots de Pathogénicité	36

3.2 Mécanismes de virulence et cycle d'infection	39
3.2.1. Adhésion	39
3.2.2. Invasion	40
3.2.3. Formation du SCV (<i>Salmonella</i> containing vacuoles) et réplication	41
3.2.4. Colonisation des macrophages et dissémination	42
4. <i>SALMONELLA</i> EN FILIERE PORCINE	43
4.1. La Filière porcine en France	43
4.1.1. Importance	43
4.1.2. Elevages de porcs en France.....	44
4.2. <i>Salmonella</i> dans la Filière Porcine	46
4.2.1. Les enjeux de Santé Publique	46
4.2.2. Les enjeux réglementaires.....	46
4.2.3. Les enjeux économiques.....	47
4.2.4. Enjeux environnementaux.....	47
4.3. Epidémiologie des infections par <i>Salmonella</i> dans la filière porcine	48
4.3.1. Prévalence de <i>Salmonella</i> dans la filière porcine	48
4.3.2. Sources de contamination	48
4.3.3. Excrétion et portage asymptomatique	49
4.3.3. Sérovars impliqués	50
4.3.4. Facteurs de risque à la ferme	53
4.3.5. Facteurs de risque à l'abattoir	54
4.4. Infection par <i>Salmonella</i> chez les porcs	55
4.4.1. Etapes de la colonisation par <i>Salmonella</i> chez les porcs	55
4.4.2. Génétique de la colonisation par <i>Salmonella</i> chez les porcs	57
4.4.4. Colonisation chez les porcs infectés expérimentalement.....	58
4.4.5. Réponse immunitaire des porcs	59
5. PROBLEMATIQUE DE L'ÉTUDE.....	61
OBJECTIFS DE LA THESE.....	62
CHAPITRE II :	63
DYNAMIQUE DE L'INFECTION PAR <i>SALMONELLA</i> DES PORCS EN ELEVAGE CONVENTIONNEL	63
1. INTRODUCTION.....	64
2. "LONGITUDINAL STUDY ON <i>SALMONELLA</i> AGE-TIME TO SEROCONVERSION IN FARROW-TO-FINISH FARMS"	66
3. CONCLUSION	84
CHAPITRE III :	85
DYNAMIQUE DE L'INFECTION ET DE LA COLONISATION PAR <i>SALMONELLA</i> DES PORCS EN CONDITION EXPERIMENTALE	85
1. INTRODUCTION.....	86

2. DYNAMIQUE DE LA COLONISATION DE PORCS INFECTES EXPERIMENTALEMENT PAR LE VARIANT MONOPHASIQUE DE <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM	88
3. CONTAMINATION EXPERIMENTALE DE PORCS PAR LES 3 SEROVARS MAJEURS DE <i>SALMONELLA</i> RETROUVES DANS LA FILIERE PORCINE EN FRANCE : COLONISATION ET SEROLOGIE	109
4. CONCLUSION	126
CHAPITRE IV :	127
EVALUATION DU POUVOIR PATHOGENE DE SOUCHES DE <i>SALMONELLA</i> ISOLEES DE PORC AU TRAVERS D'UN MODELE INSECTE	127
1. INTRODUCTION.....	128
2. VIRULENCE CHARACTERIZATION OF <i>SALMONELLA</i> DERBY, <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM AND ITS MONOPHASIC VARIANT S. 1,4[5],12:I:- ISOLATED FROM PIGS THROUGH <i>IN VIVO</i> <i>GALLERIA MELLONELLA</i> MODEL AND <i>IN VITRO</i> CACO-2 ASSAY.	130
3. CONCLUSION	151
CHAP V :	153
DISCUSSION GENERALE	153
CHAP VI :	165
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	165
ANNEXES	187
ANNEXE 1: LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	187
ANNEXE 2 : LISTE DES FORMATIONS ET PARTICIPATION A CONGRES OU JOURNEES D'INFORMATIONS.....	189
ANNEXE 3 : RESUME DE LA COMMUNICATION ORALE PRESENTEE AU SYMPOSIUM I3S	190
ANNEXE 4 : RESUME DE LA COMMUNICATION ORALE PRESENTEE AU SYMPOSIUM NATIONALE DE MALADIES ZOONOTIQUES 2016	191
ANNEXE 5 : RESUME LONG DE LA COMMUNICATION ORALE PRESENTEE AU CONGRES SAFEPOK.....	192
ANNEXE 6 : RESUME LONG DE LA COMMUNICATION ORALE PRESENTEE AU CONGRES SAFEPOK.....	197
ANNEXE 7 : POSTER PRESENTE AU CONGRES DE LA SOCIETE FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE (SFM).....	201

LISTE DES FIGURES

Figure 1. La taxonomie de <i>Salmonella</i> et sa classification générale. Le genre <i>Salmonella</i> est classé en espèces, sous-espèces et sérovars sur la base de Kauffman-Le Minor schème (Mac Kenzie et al. 2017)	3
Figure 2. Colonie de <i>Salmonella enterica Subspecies enterica</i> Sérovar Typhimurium. Microscopie électronique en scanner. Bar = 1 µm. Source: Muhsin Özel, Gudrun Holland, Rolf Reissbrodt/Robert Koch Institut.....	5
Figure 3. Mode opératoire pour la détection et l'identification des salmonelles selon la NF-U-47-102.....	10
Figure 4. Présentation simplifiée du protocole sur MSR/V miniaturisé	13
Figure 5. Schéma de la méthode PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) (CDC : https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocol-images.html)	16
Figure 6. Schéma de la méthode MLVA (Multilocus variable-number tandem-repeat (VNTR) Analysis) (CDC : https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocol-images.html)	17
Figure 7. Schéma pour la MLST (Ruppitsch, 2016)	19
Figure 8. Schéma de la méthode WGS (Whole Genome Sequencing) (CDC : https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocol-images.html)	21
Figure 9. Nombre et taux de notification des zoonoses humaines confirmées dans l'UE 2016 (EFSA, 2017)	24
Figure 10. Exemple schématique des facteurs de risque spécifiques pour la salmonellose humaine (Mughini-Gras et al., 2017)	27
Figure 11. Facteurs de Virulence de <i>S. Typhimurium</i> et <i>S. Typhi</i> (De Jong et al, 2012)	33
Figure 12. Invasion de <i>Salmonella</i> dans les cellules hôtes (non phagocytes) médié par SPI-1 (Gerlach & Hensel, 2007)	37
Figure 13. Survie intracellulaire de <i>S. Typhimurium</i> dans les macrophages médiée par SPI-2 (Gerlach & Hensel, 2007)	38
Figure 14. Mécanismes Zipper et Trigger A : Zipper. B : Trigger, <i>S. Enteritidis</i> envahis des fibroblastes via le mécanisme Zipper(C) et Trigger (D). Rosselin et al., 2012	41

Figure 15. Structure pyramidale et classification des types d'exploitations incluant la chaîne d'approvisionnement du porc (IFIP, 2004).....	43
Figure 16. Modèle de la colonisation de la surface intestinal A: <i>Salmonella</i> peut se adapter aux diverses anatomies du tractus gastro-intestinal des différentes animaux B: <i>S. enterica</i> exprime des adhésines alléliques spécifiques pour débiter la colonisation.....	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques biochimiques de <i>Salmonella enterica</i> susp. <i>enterica</i>	6
Tableau 2. Résultats des caractères biochimiques dans le milieu de Kligler	12
Tableau 3. Caractéristiques de la fièvre typhoïde (ANSES, 2011)	23
Tableau 4. Les 20 principaux sérovars de <i>Salmonella</i> en France au cours des années (CNR-ESS, 2017).....	25
Tableau 5. Caractéristiques des salmonelloses non-typhiques (Anses, 2011)	28
Tableau 6. Caractéristiques génomiques de <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Derby</i> et du variant monophasique de <i>S. Typhimurium</i>	53

LISTES DES ABRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de Normalisation

ANSES: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

APC: Antigen Presenting Cells

ARN: Acide ribonucléique

ATR: Acid Tolerance Response

Aw: Water activity

bp: Pair de bases

CDS: Coding DNA sequences

CNR-ESS: Centre National de Référence pour *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DGAL: Direction General de l'Alimentation

ECDC: European Center of Disease Prevention and Control

EFSA: European Food Safety Authority

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay,

EPT: Eau Peptonnée Tamponnée

H₂S: Sulfure d'hydrogène

IL: Interleukine

INF- γ : Interferon Gamma

ISO: International Organization for Standardization

LPS: Lypopolysaccharide

MALDI TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

Mb: Mega Base

MHC: Major Histocompatibility Complex

MKTTn: Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin

MLST: MultiLocus Sequence Typing

MLVA: Multiple Loci VNTR (Variable number tandem repeat) Analysis

MPN: Most Probable Number
MSRV: Modified Semi solid Rappaport Vassidiadis
NFU: Norme Française (matières et objets utilisés en Agriculture)
NGS: Next generation sequencing
NLR: Node Lyke Receptors
NPP: Nombre plus probable
PAI: Pathogenicity Island
PAMPs: Pathogen Associated Molecular Pattern
PCR: Polymerase Chain Reaction
PFGE: Pulse Field Gel Electrophoresis
PRR: Pattern Recognition Receptors
SCV: *Salmonella* Containing Vacuoles
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SPI: *Salmonella* Pathogenicity Island
T3SS: Système de sécrétion de type III
TCR: T cell Receptor
TLR: Toll Like Receptors
TNF- α : Tumoral Necrosis Factor
UE: Union Européenne
UFC : Unité Formant Colonie
USDA: United States Department of Agriculture
VIH: Virus d'Immunodéficience Humain
VNTR: Variable Number Tandem Repeat
WGS: Whole Genome Sequencing
WHO: World Health Organization
XLD: Xylose Lysine Desoxycholate Agar
XLT4: Xylose-Lysine-Tergitol 4 Agar

CHAPITRE I:
INTRODUCTION

1. *Salmonella*

1.1. Historique

Salmonella est une bactérie ubiquitaire, pathogène pour les humains, provoquant des fièvres entériques, gastro-entérites et septicémies. Elle peut également infecter de nombreuses espèces animales en plus des humains.

Salmonella, en particulier *S. Typhi*, accompagne l'humanité depuis l'Antiquité. Des preuves évolutives basées sur l'analyse phylogénétique des souches de *S. Typhi* indiquent qu'un ancêtre de *S. Typhi* existait il y a 15 000 à 50 000 ans (Kidgell et al., 2002). Dans les textes grecs et chinois datant de centaines d'années avant J.C., divers auteurs ont reconnu la présence de cette maladie (Sanchez-Vargas et al., 2011). Dans une récente étude, des génomes de *Salmonella S. Paratyphi C* ont été isolés chez des victimes d'une grande épidémie qui a décimé la population cocoliztli au Mexique en 1545 (Vagene et al., 2018).

Cette bactérie a été découverte au XIX^{ème} siècle par Karl Joseph Eberth, après l'observation de bacilles dans les ganglions lymphatiques abdominaux et la rate de patients atteints de la fièvre typhoïde. Il avait publié ses observations en 1880 et 1881 et sa découverte a ensuite été vérifiée et confirmée par des bactériologistes allemands et anglais, dont Robert Koch (Marineli et al., 2013).

En 1884, Théobald Smith a isolé de l'intestin d'un cochon mort une "bactérie" qu'il pensait être la cause du choléra porcine (Evangelopoulou, 2010). Bien que cette bactérie ait été isolée pour la première fois par T. Smith, Daniel E. Salmon, le chef de Smith, a revendiqué le mérite de la découverte et le nom du genre *Salmonella* a été choisi d'après son nom (Schultz, 2008).

1.2. Taxonomie et nomenclature

La taxonomie actuelle et la nomenclature du genre *Salmonella* a fait l'objet de débats depuis que Le Minor & Popoff (1987) ont proposé des changements dans les années 1980 (Tindall et al., 2005). La taxonomie repose sur des aspects génétiques, biochimiques et sérologiques (MacKenzie et al., 2017). Les nouvelles souches de *Salmonella* peuvent être classées en espèces et sous-espèces selon la parenté de l'ADN, montré à l'origine par hybridation ADN-ADN, et la présence ou l'absence de 11 caractères biochimiques (Crosa et al., 1973; Nataro et al., 2011)

Le genre *Salmonella* ne comporte que deux espèces, *S. enterica* et *S. bongori*. *S. enterica* est divisé en six sous-espèces: *S. enterica subsp. enterica*, *S. enterica subsp. salamae*, *S. enterica subsp. arizonae*, *S. enterica subsp. diarizonae*, *S. enterica subsp. houtenae*, *S. enterica subsp. Indica* (Figure 1).

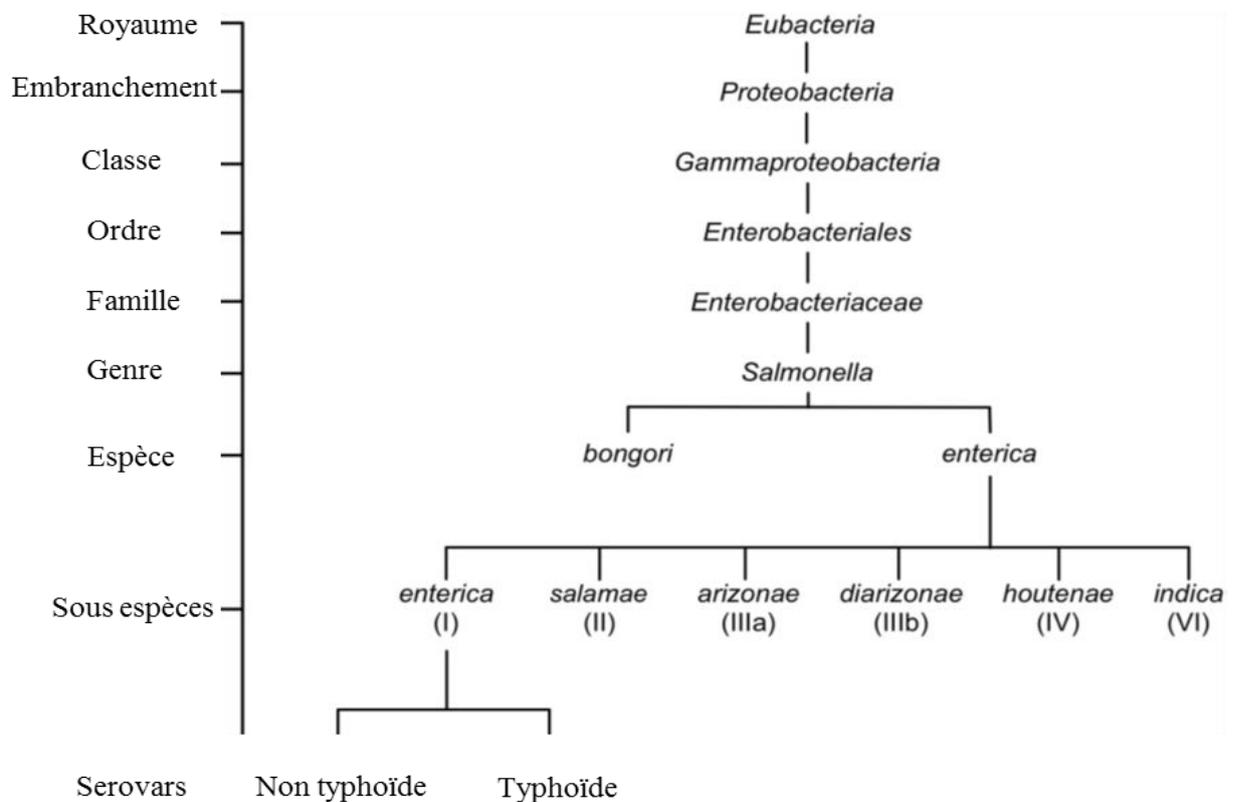


Figure 1. La taxonomie de *Salmonella* et sa classification générale. Le genre *Salmonella* est classé en espèces, sous-espèces et sérovars sur la base de Kauffman-Le Minor schème (Mac Kenzie et al. 2017)

Les sérovars appartenant à *S. enterica subsp. enterica* sont désignés par un nom généralement lié à l'endroit géographique où le sérovar a été isolé pour la première fois. Ce nom est écrit en lettres romaines (non en italique) et la première lettre est une lettre majuscule. Les sérovars appartenant à d'autres sous-espèces sont désignés par leurs formules antigéniques, suivant les sous-espèce (Popoff et al., 2003).

Salmonella enterica subsp. enterica contient plus de 2500 sérovars, différenciés par leur présentation antigénique (Tindall et al., 2005). Cependant, la plupart des infections humaines sont causées par un nombre limité de sérovars (Hendriksen et al., 2011).

Pour les sérovars appartenant à *S. enterica* et *S. bongori*, la formule antigénique est attribuée en utilisant le schéma de Kaufmann-White le Minor.

Cette classification antigénique de *Salmonella* est traditionnellement basée sur la réaction d'anticorps avec 3 types d'antigènes de surface: les antigènes somatiques O (64 variantes), flagellaires H (11 variantes) et capsulaires Vi (Grimont and Weill, 2007). Par convention, les antigènes identifiés pour une souche donnée sont rapportés dans une formule antigénique, dans laquelle est indiqué le nombre de sous-espèces suivi des antigènes O, H1 et H2 séparés par des points-virgules (Wattiau et al., 2011).

Antigène O : L'antigène O est un polysaccharide thermostable présent sur la surface externe du lipopolysaccharide. Chaque antigène O est composé de 5-6 unités de sucre. La variation des unités de sucre, les liaisons covalentes entre les sucres et la liaison entre les sous-unités de l'antigène O résultent en différents antigènes O. Plusieurs antigènes O peuvent être exprimés ensemble à la surface d'une seule cellule (Raetz and Whitfield, 2002).

Antigène H: L'antigène H est composé de sous-unités de flagelline et sont la partie filamenteuse du flagelle. Les sérovars de *Salmonella* expriment soit un type d'antigène H (sérovar monophasique) ou, pour la plupart, deux types d'antigène H (le serovar est diphasique). *Salmonella* est unique parmi les bactéries entériques à cet égard. Chez *Salmonella*, la flagelline est une protéine monomérique de 55 kDa codée par les gènes *fliC* et *fliB* qui s'assemblent pour former l'ensemble des filaments de l'appareil flagellaire nécessaire à la motilité bactérienne (Nataro et al., 2011; Ryan et al., 2017; Zeng et al., 2003). Ils expriment la phase 1 de l'antigène H et la phase 2 de l'antigène H, respectivement. Le gène *fliC* est situé dans l'un des opérons de biosynthèse flagellaire, et il est présent dans toutes les salmonelles. Le gène *fliB* est situé dans une région du génome unique aux salmonelles et est présent dans quatre des sous-espèces *S. enterica* (sous-espèces I, II, III b, et IV) (McQuiston et al., 2011). Les deux loci *fliC* et *fliB* sont régulés de manière coordonnée de sorte qu'un seul antigène à la fois est exprimé dans une seule cellule, par l'intermédiaire d'un mécanisme de variation de phase (Silverman et al., 1979).

Antigène Vi : L'antigène Vi, découvert par Felix & Pitt en 1934 est un polysaccharide capsulaire retrouvé principalement chez *S. Typhi* et *S. Paratyphi C*, ainsi que dans quelques souches de *S. Dublin* et *Citrobacter freundii*. Le polysaccharide capsulaire interfère avec les défenses spécifiques et non spécifiques de l'hôte et est considéré comme un facteur de virulence principal (Robbins and Robbins, 1984).

1.3.Morphologie et caractéristiques

Les salmonelles sont des bacilles droits mesurant $0,7-1,5 \times 2,0-5,0 \mu\text{m}$, conformes à la définition générale de la famille des *Enterobacteriaceae*. *Salmonella* est Gram négatif, anaérobie facultative et habituellement mobile par des flagelles péritriches (Figure 2). Les colonies ont généralement un diamètre de 2 à 4 mm (Le Minor and Popoff, 1987). Les caractéristiques biochimiques sont présentées dans le tableau 1.

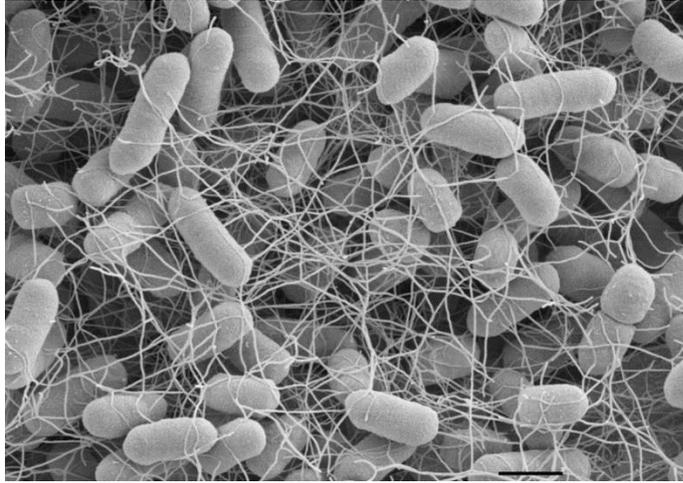


Figure 2. Colonie de *Salmonella enterica* Subspecies *enterica* Sérovar Typhimurium. Microscopie électronique en scanner. Bar = 1 μm . Source: Muhsin Özel, Gudrun Holland, Rolf Reissbrodt/Robert Koch Institut

Les salmonelles peuvent se multiplier dans diverses conditions environnementales en dehors des hôtes vivants. Elles ne nécessitent pas de chlorure de sodium pour la croissance, mais peuvent se développer en présence de 0,4 à 4% de sodium (Pui et al., 2011). Elles sont sensibles à la chaleur et tuées à une température de 70°C ou plus. Elles peuvent se multiplier entre 2 et 57°C avec une température optimale de croissance de 37°C. *Salmonella* a besoin d'un minimum d'eau disponible (a_w de 0,93), mais les cellules survivent bien dans les aliments secs. Le pH minimal pour la croissance est de 4,05 et la croissance optimale se produit à pH 7 (Adams and Moss, 2007).

Tableau 1. Caractéristiques biochimiques de *Salmonella enterica* susp. *enterica*

Caractéristiques	Réaction usuelle
Catalase	+
Oxydase	-
Acide produit par D-glucose	+
H ₂ S à partir du TSI	+
Indole	-
Citrate	+
Lysine décarboxylase	+
Ornithine décarboxylase	+
Urease	-
Rouge de méthyle	+
Voges-Proskauer	-
Dulcitol	+
Galacturonate	-
Gélatinase	-
Glucose	+
Lactose	-
Malonate	-
Salicine	-
Sorbitol	+

TSI : Triple sugar iron gélose + : Positive ; - : Négative

1.4. Génome

Les chromosomes des entérobactéries sont des mosaïques composées de régions colinéaires entrecoupées de « boucles » ou « îlots » uniques à certaines espèces. Les îlots codent parfois pour des fonctions de pathogénicité (appelés îlots de pathogénicité de *Salmonella*, SPI), des CDS (Coding DNA sequences) et des pseudo-gènes (McClelland et al., 2001).

Une comparaison des génomes de plusieurs entérobactéries séquencées met immédiatement en évidence certains traits communs importants. Toutes ont un seul chromosome de 4,3 à 5,0 Mb (McClelland et al., 2004; Parkhill et al., 2001; Perna et al., 2001)

L'ADN extra chromosomique se trouve sous forme de plasmides qui portent souvent des gènes associés à la virulence ou à la résistance aux antibiotiques.

Les gènes du « core génome » sont, en général, partagés entre les espèces entériques et ont des fonctions de ménage associés à la colonisation et la transmission intestinale. Ils peuvent jouer un rôle dans le métabolisme ou la biosynthèse des polysaccharides ou coder pour des protéines structurelles communes (Baker and Dougan, 2007)..

1.5. Distribution

Les salmonelles sont largement représentées dans l'environnement et peuvent causer un large éventail de maladies chez les humains et les animaux. De nombreux animaux peuvent être atteints ou servir d'hôtes pour *Salmonella*, comme les mammifères domestiques et sauvages, la volaille et d'autres types d'oiseaux, les reptiles, les amphibiens, les poissons et quelques invertébrés (Hoelzer et al., 2011).

La salmonelle s'introduit habituellement dans les milieux agricoles par l'intermédiaire d'excréments d'animaux. La maladie peut affecter toutes les espèces d'animaux domestiques; les jeunes animaux, les femelles gestantes ou allaitantes étant les plus sensibles.

De nombreux animaux, en particulier les porcs et la volaille, peuvent également être infectés sans développer de signes cliniques, ils sont dits porteurs sains ou porteurs asymptomatiques. Ces animaux peuvent participer à la propagation de l'infection entre les troupeaux et être une source de contamination alimentaire et d'infection humaine (OIE, 2008).

1.6. Spécificité de l'hôte

Le degré d'adaptation de l'hôte varie selon les sérovars de *Salmonella* et affecte la pathogénicité pour l'homme et les animaux (Chen et al., 2013). Les sérovars de la sous-espèce *enterica* peuvent être divisés en trois groupes en fonction de leur capacité à infecter une grande variété d'hôtes (Singh, 2013):

1^{er} groupe: Sérovars sans restriction. Ce groupe comprend des sérovars qui ont une large gamme d'hôtes appelés aussi sérovars non restreints car ils infectent presque tous les animaux. Ce groupe comprend des sérovars comme *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis*. Ils provoquent des maladies entériques légères, en persistant chez l'hôte sans symptômes cliniques graves. Ils ont également la capacité de produire des infections semblables à la typhoïde chez les souris et les humains.

2^{eme} groupe : Sérovars adaptés à l'hôte. Ce sont des sérovars qui provoquent une infection systémique très grave chez leur hôte préférentiel et sont généralement excrétés sans aucun symptôme clinique lorsqu'ils infectent accidentellement d'autres hôtes différents. Des sérovars tels que Dublin, Choleraesuis, entrent dans cette catégorie, car ils ne provoquent des infections systémiques que chez les bovins et les porcs respectivement.

3^{eme} groupe : Sérovars restreints à un seule hôte. Ils provoquent exclusivement une infection systémique, qui s'avère souvent fatale chez leur hôte, présentent un tropisme élevé pour les organes lymphatiques de leur hôte et prolifèrent dans les tissus fœtaux. Les sérovars tels que Typhi, Gallinarum, Abortusequi, appartiennent à ce groupe.

1.7. Diagnostic

1.7.1. Méthodes de détection conventionnelles pour *Salmonella*

Les méthodes conventionnelles pour détecter la présence de *Salmonella* peuvent être divisées en trois étapes : détection, identification et désignation du sérovar. Pour réaliser des enquêtes épidémiologiques et associer des souches avec des cas cliniques de salmonellose, il est fait appel à du sous-typage ou caractérisation génotypique.

Les méthodes basées sur la culture sont toujours les techniques de détection les plus utilisées et restent la référence pour la détection de *Salmonella* en raison de leur sélectivité et sensibilité (Odumeru and Leon-Velarde, 2012). Il faut généralement 3-4 jours pour obtenir un résultat d'identification.

En santé humaine, le diagnostic repose sur des coprocultures, c'est-à-dire en l'isolement direct des selles humaines sur des géloses sélectives. La gélose *Salmonella-Shigella* (S.S.) est souvent utilisée pour l'isolement sélectif des *Salmonella* et des *Shigella* dans les prélèvements cliniques (selles). Les agents inhibiteurs sont les sels biliaires, le vert brillant et le citrate de sodium. Ils empêchent la pousse de toutes bactéries Gram+ et rendent difficile la croissance des bactéries Gram- autre que *Salmonella* et *Shigella*. Le milieu contient du thiosulfate pouvant donner du H₂S. Celui-ci est révélé par le citrate ferrique. Le milieu contient du lactose pouvant être fermenté. La fermentation est révélée par le virage de l'indicateur coloré, le rouge neutre à sa teinte acide. Les colonies caractéristiques de *Salmonella* (lactose négatif) sont opaques, translucides ou transparentes et généralement avec un centre noir (H₂S positif). Les colonies caractéristiques de *Shigella* (lactose négatif) sont incolores. Les coliformes qui réussissent à pousser sur ce milieu sont rose-rouge (lactose positif).

En santé animale, il existe la Norme Française NFU 47-102 (Figure 3) qui est celle utilisée en France pour la mise en évidence des bactéries du genre *Salmonella* chez les mammifères (AFNOR, 2008).

Cette norme NFU 47-102 comporte les étapes suivantes :

Pré-enrichissement : Le pré-enrichissement se fait dans un milieu non sélectif ce qui augmente le taux de récupération de *Salmonella* en permettant la réparation de cellules endommagées (Adams and Moss, 2007). Le milieu utilisé pour le pré-enrichissement dans la NF U 47-102 est l'eau peptonnée tamponnée (EPT).

Enrichissement : Les milieux pré-enrichis après incubation sont inoculés dans des milieux sélectifs contenant deux ou plusieurs composés inhibiteurs tels que les sels biliaires, le thiosulfate, la novobiocine, etc. L'utilisation d'inhibiteur dans un milieu sélectif permet une croissance de *Salmonella* tout en supprimant la propagation de d'autres bactéries (Lee et al., 2015). La NFU 47-102, utile pour le dépistage d'un portage asymptomatique de *Salmonella*, utilise le milieu gélosé semi-solide modifié de Rappaport Vassidialis (MSRV) associé au bouillon de Muller-Kaufmann au tétrathionate et novoviocine (MKTTn). Ces milieux sont incubés respectivement à 41,5° C pendant 18-24 heures (AFNOR, 2008; Odumeru and Leon-Velarde, 2012). La gélose semi-solide modifié Rappaport-Vassiliadis (MSRV) est destinée à la détection de souches de *Salmonella* motiles et ne convient pas à la détection de souches de *Salmonella* non mobiles (ISO, 2010), mais la combinaison avec le bouillon MKTTn permet

d'augmenter la sensibilité de la méthode et de mettre en évidence des salmonelles peu mobiles (AFNOR, 2008).

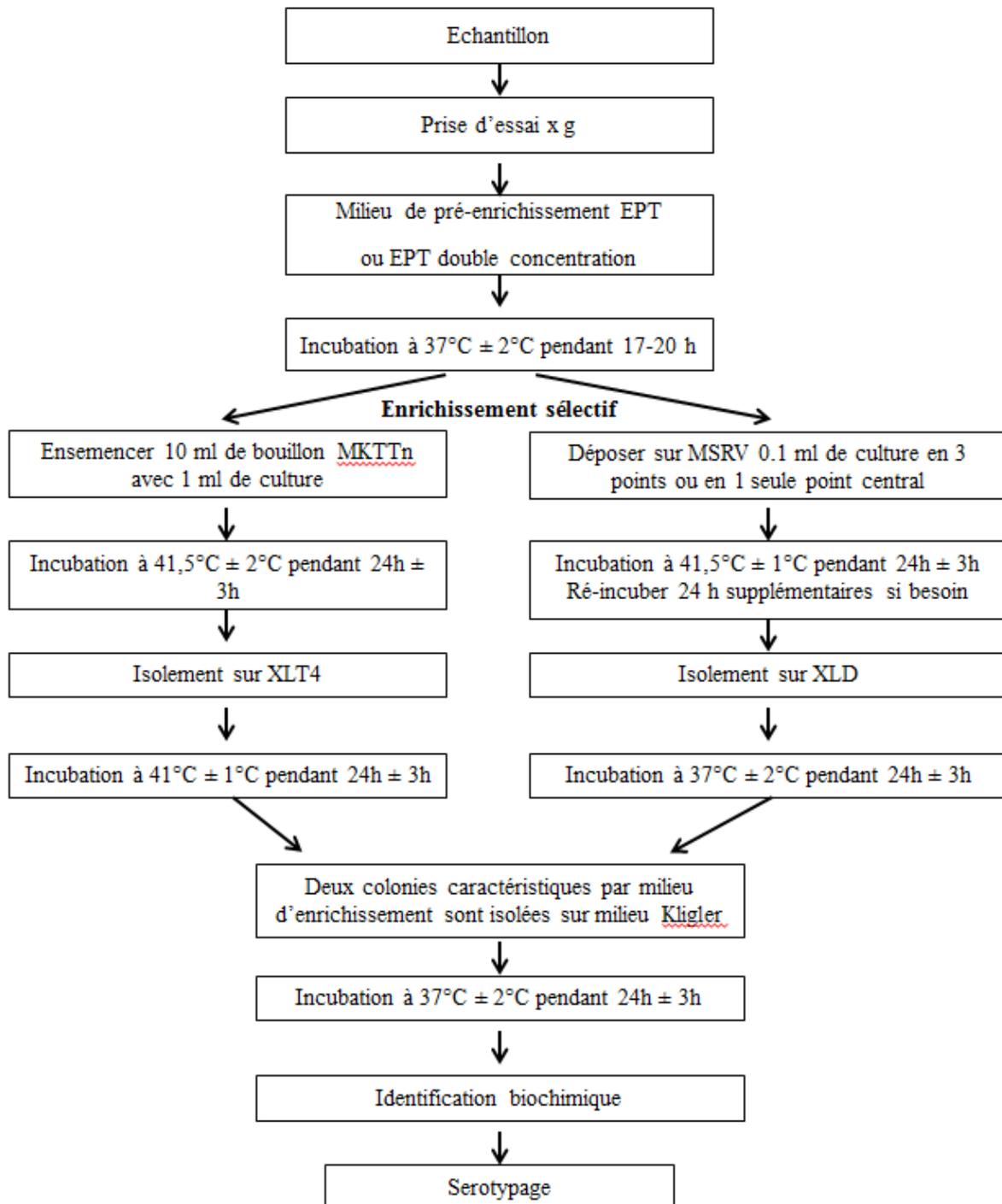


Figure 3. Mode opératoire pour la détection et l'identification des salmonelles selon la NF-U-47-102

Isolement : Les milieux d'enrichissement sélectif sont striés sur un milieu sélectif solide (gélose) pour permettre l'isolement des colonies de *Salmonella* tout en inhibant

simultanément la croissance d'autres bactéries (Lee et al., 2015). L'intérêt des milieux chromogéniques a été démontré dans un certain nombre d'études ; la sensibilité et la spécificité de ces milieux sont améliorées par rapport aux milieux sélectifs traditionnels pour la récupération de *Salmonella* et d'autres entérobactéries (Humphries and Linscott, 2015). Les milieux Xylose Lysine Désoxycholate (XLD) ou Xylose Lysine Tergitol 4 (XLT4) utilisés dans le NF U 47-102, utilisent trois caractéristiques : la formation d'acide lors de l'utilisation de sucres contenus dans le milieu, la décarboxylation de la lysine en cadaverine, et la production de hydrogène sulfuré à partir de thiosulfate de sodium en présence de citrate ferrique ammoniacal (AFNOR, 2008). Sur XLD et sur XLT4, les colonies de *Salmonella* sont rouges avec un centre noir et peuvent présenter un halo jaune après 24 heures d'incubation sur XLT4.

D'autres géloses chromogéniques sont proposées dans le commerce pour isoler de manière sélective *Salmonella* : IBISA, ASAP *Salmonella*, ChromID®*Salmonella*, CASE, COMPASS® *Salmonella*, CHROMagar *Salmonella*, IRIS®*Salmonella*, RAPID' *Salmonella*.

Identification des colonies caractéristiques : Les colonies caractéristiques sont repiquées sur des géloses sélectives et non sélectives afin de s'assurer que les contaminants éventuels, tels que *Proteus* spp sont absents.

La Norme NF-U-47-102 indique que dans le cadre du dépistage d'un portage asymptomatique, pour confirmer les colonies caractéristiques, soit il faut utiliser une gélose Kligler et un milieu de décarboxylation de la L-lysine, ou une gélose lysine-fer et un milieu urée indole. Pour identifier les colonies caractéristiques, des trousse de diagnostic commerciales qui incluent les mêmes caractères peuvent également être utilisées. Les caractères biochimiques identifiés dans le milieu de Kligler sont résumés dans le Tableau 2.

Les milieux de Kligler poussés et glucose négatif, quel que soient les résultats de la lecture des gaz, H₂S et lactose, ne demandent pas à être confirmés. Toutes les autres souches devront subir des tests biochimiques supplémentaires.

Les tests biochimiques peuvent être réalisés avec des sucres aqueux peptonés ou des systèmes commerciaux tels que le système API (Analytique Profile Index).

Tableau 2. Résultats des caractères biochimiques dans le milieu de Kliger

Caractères biochimiques	Réaction négative	Réaction positive	Résultats pour la majorité des <i>Salmonella</i>
Fermentation du glucose	Culot rouge	Culot jaune	Glucose + ou illisible*
Oxydation du lactose	Pente rouge	Pente jaune	Lactose - **
Production de H ₂ S	Pas de couleur noire	Couleur noire du culot et quelques fois de la pente*	H ₂ S +***
Production de gaz	Pas de bulle d'air	Apparition de bulles d'air qui font décoller la gélose	Gaz +

* la production d'H₂S peut masquer la lecture du Glucose

** certaines salmonelles peuvent fermenter le lactose.

***certaines salmonelles ne produisent pas d'H₂S

La confirmation du genre *Salmonella* peut être simplifiée par l'usage de la technique MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry). Cette technique repose sur l'obtention d'un spectre protéique de la souche à identifier et la comparaison de ce spectre protéique à ceux de la base de données créée par le fournisseur de l'appareil. Par exemple, la base de données créée par Bruker Daltonique (Wissebourg, France) comprend les spectres protéiques de 20 souches de *Salmonella*.

1.7.2. Dénombrement

Actuellement, presque toutes les données quantitatives qui ont été générées pour *Salmonella* ont été obtenues par méthodes de bactériologie traditionnelle (Malorny et al., 2008).

Pour le dénombrement de *Salmonella*, les laboratoires de diagnostic ont besoin d'une méthode hautement sensible et spécifique car généralement le nombre de cellules dans les matrices issues de la production primaire est faible et la flore annexe peut influencer la croissance de la bactérie cible (Hoorfar, 2011).

La méthode classique de dénombrement consiste en la préparation de la suspension mère, de façon à obtenir une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes contenus dans la prise d'essai, et si nécessaire, de dilutions décimales en vue de réduire le nombre de micro-organismes par unité de volume pour permettre d'effectuer le dénombrement des colonies. Un volume de 100µl de la suspension mère et des dilutions décimales (deux au minimum) est alors étalé sur des géloses sélectives. Après la période d'incubation spécifiée (24h en général), le comptage des colonies caractéristiques est fait pour chaque gélose

contenant moins de 150 colonies au total. Au-delà de ce chiffre, les colonies non caractéristiques risquent de ne pas être visibles. Cette méthode de dénombrement direct par comptage des colonies est intéressante car elle donne un résultat en un jour mais la lecture des géloses peut être rendue difficile par la présence de la flore annexe et du faible nombre de salmonelle dans l'échantillon à dénombrer.

C'est pourquoi, il est aujourd'hui proposé de dénombrer les salmonelles des matrices alimentaires ou environnementales par la méthode du nombre le plus probable. Cette méthode dite semi-quantitative est décrite dans la partie 2 de la norme XP CEN ISO/TS 6579-2 (2013) et repose sur une technique miniaturisée (Figure 4). Le résultat est exprimé en NPP/gr.

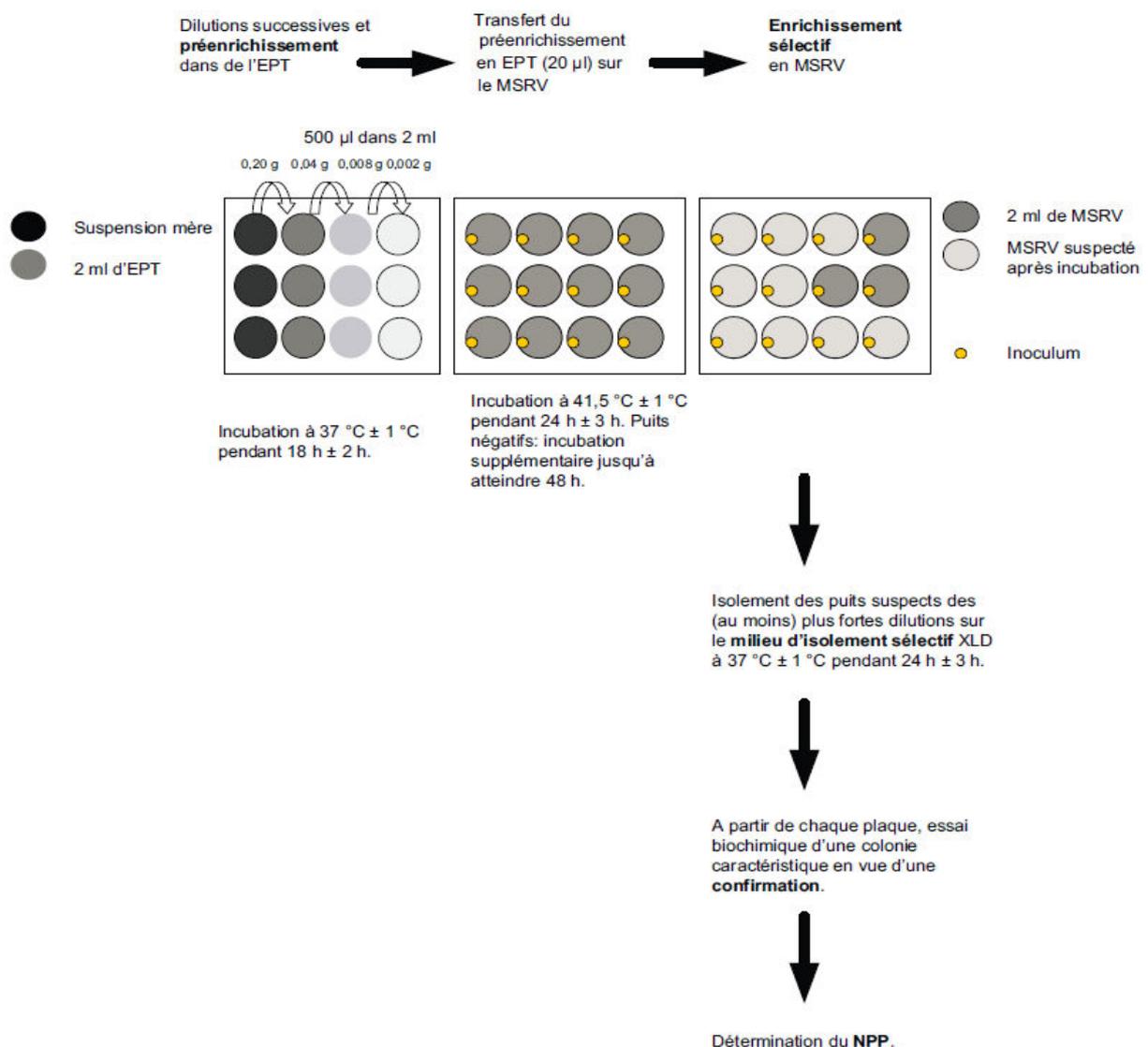


Figure 4. Présentation simplifiée du protocole sur MSR/V miniaturisé

Mais cette technique n'est pas adaptée pour les salmonelles immobiles car elle repose sur la mobilité de la bactérie dans le milieu mini-MSRV et la visualisation d'un halo de migration après multiplication et migration des salmonelles dans ce milieu.

1.7.3. Caractérisation phénotypique et génotypique des souches

La caractérisation phénotypique des salmonelles repose principalement sur la détermination du sérovar des souches. Mais pour aller plus finement dans la caractérisation des souches, il est nécessaire d'appliquer des méthodes de typage moléculaire. Celles-ci sont très utiles pour la surveillance de ce pathogène et l'investigation de toxi-infections (Ruppitsch, 2016).

Sérotypage

Le sérotypage a été initialement proposé par Fritz Kaufmann et P. Bruce White en 1934 en tant que un schéma de classement de *Salmonella*, et élargi au fil des ans pour inclure les plus de 2500 sérovars (Grimont and Weill, 2007). Cette procédure est basée sur l'agglutination de la bactérie avec des sérums spécifiques pour identifier les variations des antigènes somatiques O et flagellaires H. Un sérovar est représenté par une formule antigénique (par exemple, I,4,5,12:i:1,2) indiquant les sous-espèces et les antigènes O, H1 et H2. Les sérovars dans les sous-espèces, peuvent être nommés aussi avec des noms (par exemple, *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium).

Les groupes O, les premiers individualisés furent désignés par des lettres de l'alphabet. Puis il fut nécessaire de poursuivre par des chiffres. Il est, actuellement, plus logique de désigner chaque groupe O par le facteur O caractéristique. Les lettres sont provisoirement conservées entre parenthèses. Ex. O:4 (B) ; O:18 (K) (Grimont and Weill, 2007). Plusieurs antigènes O peuvent être exprimés ensemble à la surface d'une seule cellule, mais en revanche, bien que la plupart des salmonelles possèdent deux copies différentes du gène codant pour la protéine flagellaire, ces bactéries ont la propriété unique d'expression d'une seule protéine flagellaire à un moment (Wattiau et al., 2011). Si une phase est indétectable, une méthode appelée inversion de phase est utilisée. Elle consiste à inhiber la phase dominante par un antisérum spécifique sur un milieu spécial, par exemple le Sven Gard, qui permettra la croissance de la population bactérienne qui exprime l'autre phase de l'antigène H (McQuiston et al., 2011). Le sérotypage est largement utilisé et peut fournir une identification définitive des isolats basée sur la diversité de la formule antigénique mais son pouvoir discriminant peut se montrer

insuffisant dans la recherche de la source des épidémies occasionnés par des sérovars communs (Kerouanton et al., 2007).

PFGE : Electrophorèse sur gel à champ pulsé

Ce type d'électrophorèse a été développé en 1984 (Schwartz and Cantor, 1984) afin de séparer les grandes molécules d'ADN (> 50 kb) que l'électrophorèse classique en gel d'agarose ne permet pas de résoudre, même en diminuant au maximum la concentration d'agarose (en dessous de 0.4% les gels sont impossibles à manipuler).

Cette méthode a été adaptée à *Salmonella* dans les années 1990 (Olsen et al., 1992; Ridley et al., 1998). Cette technique utilise des endonucléases de restriction pour couper l'ADN du chromosome en 5 à 20 fragments de différentes longueurs d'environ 10 kb à 900 kb (Gaul et al., 2007). Ces fragments ne peuvent pas être séparés dans un gel d'agarose classique. Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel augmentant ainsi la probabilité que la molécule d'ADN passe à travers les mailles du gel. Cette probabilité dépend de la taille de la molécule et la vitesse de migration d'un fragment d'ADN dans le gel varie dans le sens inverse de sa taille. L'électrophorèse en champ pulsé permet ainsi de séparer des fragments d'ADN d'une taille allant de moins de 1 kb à une dizaine de mégabases. Pour ce type d'électrophorèse, il n'est pas possible d'utiliser des ADN purifiés par les techniques classiques car ces techniques les cassent en fragments d'une taille inférieure à 100 kb. Pour éviter la cassure mécanique des molécules d'ADN les cellules sont incluses dans des blocs ou plug d'agarose (Figure 5).

La PFGE est restée longtemps la méthode «gold standard» de typage de *Salmonella* et a été adoptée par de nombreux laboratoires de référence pour la surveillance et les enquêtes sur les maladies d'origine alimentaire (Golab et al., 2016; Kerouanton et al., 2007; Wattiau et al., 2011). Cette technique permet d'évaluer la relation génétique entre les isolats suspectés d'avoir une relation épidémiologique. La technique est utile pour la prise d'empreintes génétique des souches dans des situations épidémiques et se caractérise pour son fort pouvoir de discrimination (Wattiau et al., 2011).

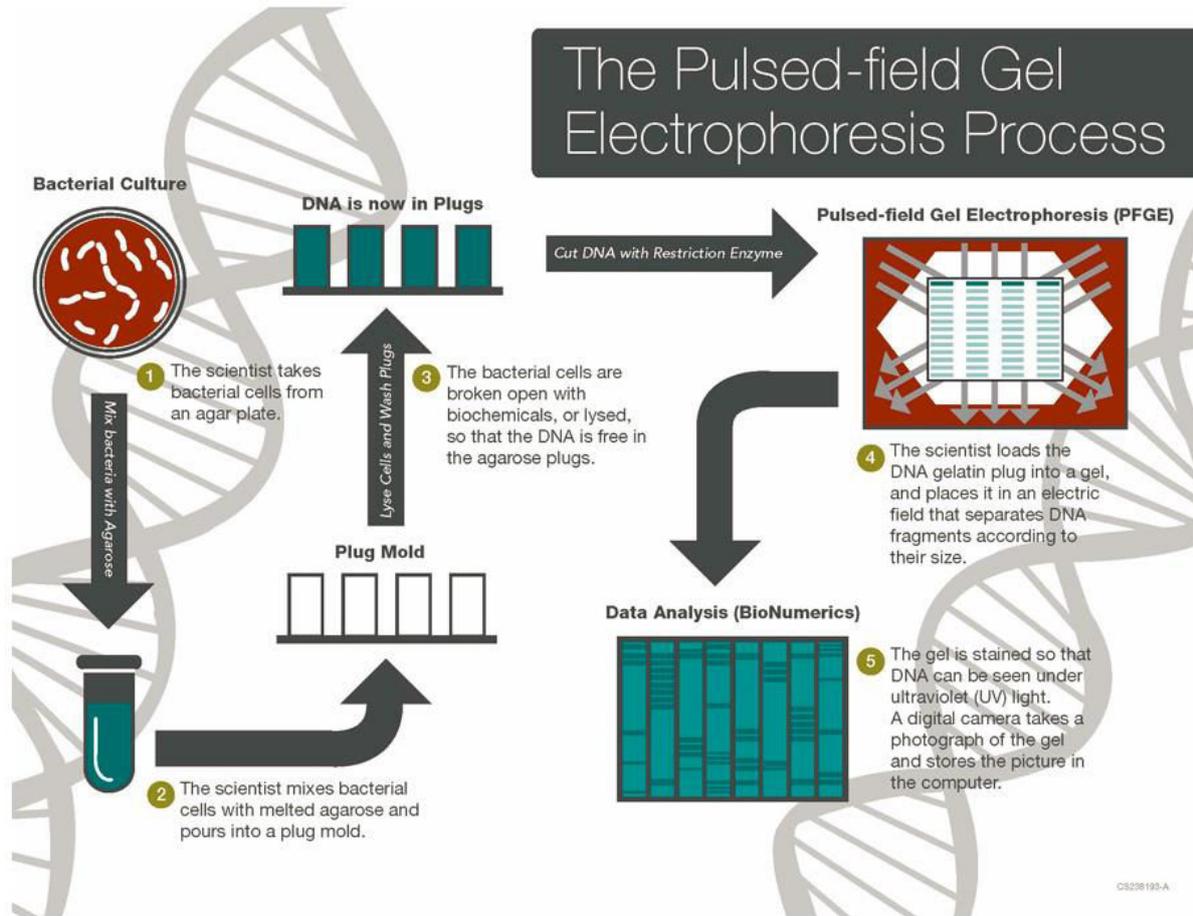


Figure 5. Schéma de la méthode PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) (CDC : <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocol-images.html>)

MLVA : Multilocus variable-number tandem-repeat (VNTR) Analysis

La MLVA est une méthode de typage à haute résolution qui a été développée pour le diagnostic de *Salmonella* par Lindstedt en 2003 (Lindstedt et al., 2003) et qui s'est répandue dans les laboratoires de santé publique pour *Salmonella* et a été étendue à d'autres pathogènes alimentaires (Dimovski et al., 2014). La méthode est rapide, robuste et facile à utiliser. Elle consiste à déterminer la longueur de séquences courtes répétées en certains locus: les répétitions en tandem polymorphes VNTR (variable-number tandem-repeat). La méthode repose sur l'amplification par PCR des VNTR à l'aide d'amorce spécifique de ces régions. Les amplicons sont ensuite séparés par électrophorèse pour vérification de l'amplification, puis par électrophorèse capillaire pour déterminer précisément la taille du fragment. Les tailles des fragments sont ensuite entrées dans une base de données pour déterminer le nombre de répétition pour chaque locus (Figure 6).

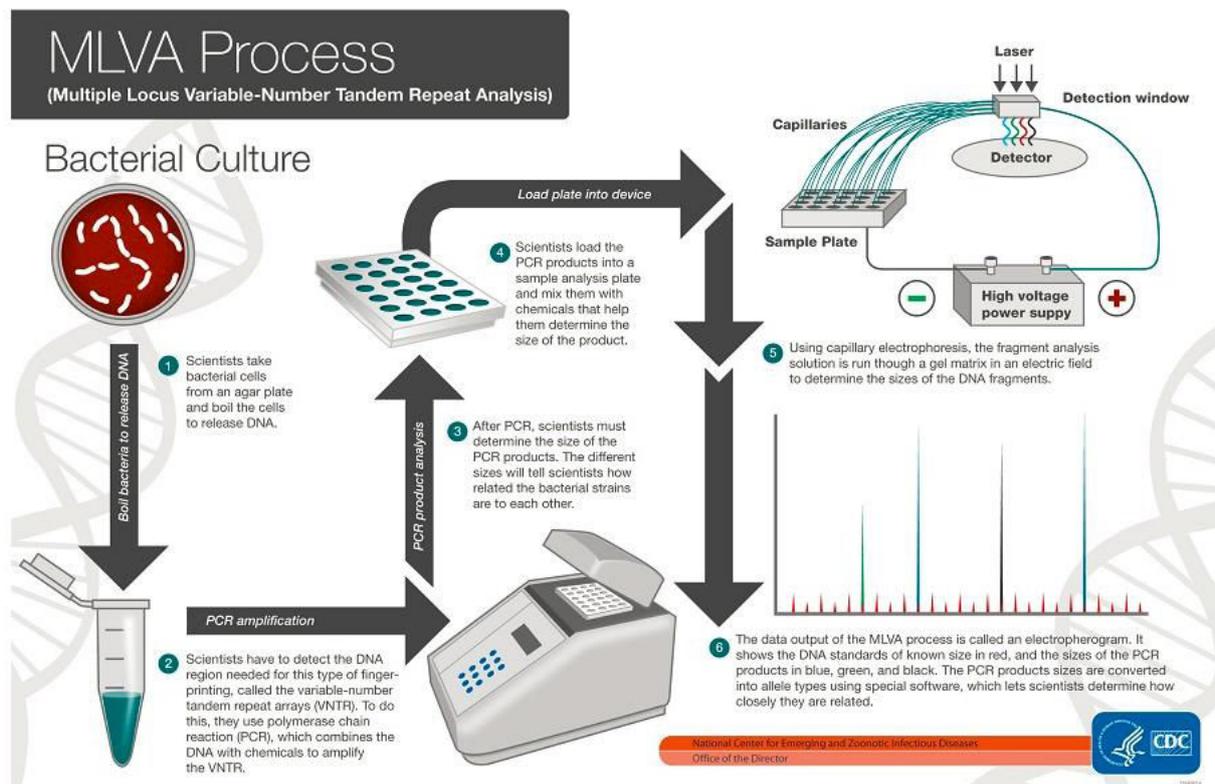


Figure 6. Schéma de la méthode MLVA (Multilocus variable-number tandem-repeat (VNTR) Analysis) (CDC : <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocol-images.html>)

Un profil MLVA est généralement exprimé comme une chaîne de nombres de longueur N, qui représente le nombre de copies de séquences répétées à chacun d'un ensemble de N loci en cours d'analyse. Par exemple, le profil 3-4-3-10-12 indique 3 copies répétées au locus 1, 4 copies répétées au locus 2, et ainsi de suite (Dimovski et al., 2014). Pour l'analyse des

souches de *S. Typhimurium*, la MLVA cible les cinq locus variables : STTR3, STTR5, STTR6, STTR9 et STTR10 (Lindstedt et al., 2003). La méthode s'est révélée très utile pour les recherches de sources épidémiques, car elle a la capacité de différencier des souches étroitement apparentées. Elle est techniquement simple et peu coûteuse à mettre en œuvre. Cependant, le champ d'application de chaque MLVA est généralement lié à un sérovar unique (Wattiau et al., 2011; Wuyts et al., 2013). Un schéma a été publié récemment pour *S. Dublin* (Vignaud et al., 2017), mais pas encore pour *S. Derby*.

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Cette méthode est utilisée en routine en France par le Centre National de Référence (CNR-ESS, 2017) sur les génomes de sérovar *Typhimurium* et de son variant monophasique. Elle est basée sur le séquençage des régions CRISPR pour *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* mise en évidence en 1987 par le japonais Ishino chez *Escherichia coli* (Ishino et al., 1987). Ces séquences d'ADN sont généralement associées aux gènes *cas*, le tout formant un système d'immunité adaptative, retrouvé également chez d'autres bactéries (Rath et al., 2015).

Chez *Salmonella*, il existe deux régions, CRISPR1 et CRISPR2 séparées par 20 kb dont une partie contient la machinerie CAS 92 (CRISPR-associated genes). Chaque région est caractérisée par la succession de séquences directes répétées d'ADN (DR ou direct repeats) d'une longueur moyenne de 29 pb et régulièrement intercalées par des séquences non codantes de 32 pb appelées spacers (27 en moyenne par souche). Le contenu en spacers d'une collection globale de 750 souches représentatives de plus de 130 sérovares dont les plus fréquemment impliqués en pathologie humaine, comme *Typhimurium* et *Enteritidis*, a été inventorié par cette méthode (Fabre et al., 2012). Plus de 3800 spacers ont été mis en évidence par séquençage Sanger des deux régions (de 500 pb à 4 kb par région). Le contenu en spacers de chaque souche (de 1 à 124 par région) est parfaitement corrélé au sérovar.

MLST : MultiLocus Sequence Typing

Cette méthode repose sur le séquençage de plusieurs locus codant pour des gènes de ménage (housekeeping genes) en vue de mettre en évidence des mutations sur ces gènes. Des numéros d'allèles sont alors affectés à des séquences uniques et la combinaison des numéros d'allèles donne un code se référant à un ST (Sequence Type). Plusieurs schéma de MLST sont décrits pour *Salmonella* (Wattiau et al., 2011).

Les données MLST sont accessibles sur des bases de données librement accessibles *via* internet (<http://pubmlst.org/>; <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>). Ces bases permettent la comparaison des souches entre laboratoires. Les inconvénients de la MLST sont le temps de travail nécessaire pour amplifier, séquencer et analyser la séquence nucléotidique des fragments d'ADN cibles, ce qui la rend peu adaptée pour les laboratoires de routine (Figure 7).

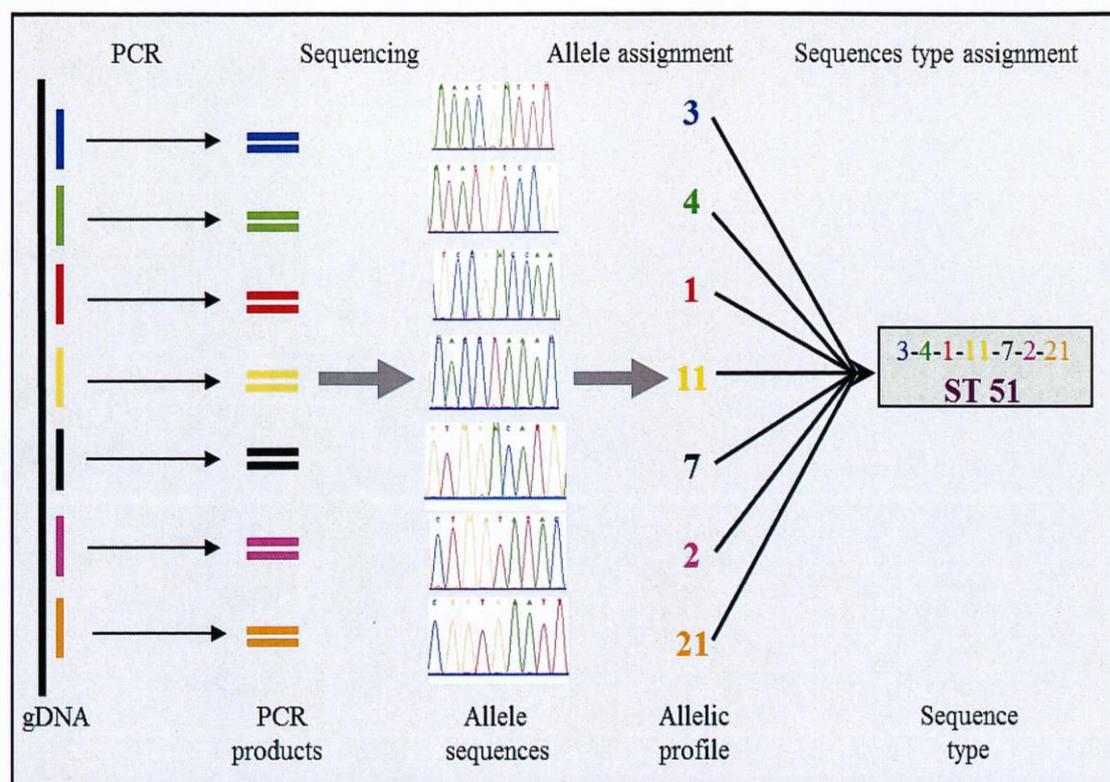


Figure 7. Schéma pour la MLST (Ruppitsch, 2016)

NGS/ WGS

Le séquençage de l'ADN a été inventé dans la deuxième moitié des années 1970. Deux méthodes ont été développées indépendamment, l'une par l'équipe de Walter Gilbert (Maxam and Gilbert, 1977), aux États-Unis, et l'autre par celle de Frederick Sanger (en 1977), au Royaume-Uni (Sanger and Coulson, 1975). Cette dernière technologie a pris de l'essor, avant d'être remplacée dans les années 2000 par des technologies de séquençage à haut débit, NGS (Next-Generation Sequencing) ou WGS (Whole Genome Sequencing).

Ces méthodes ont révolutionné le domaine de la génomique, de la génétique et de la microbiologie (Ruppitsch, 2016).

La NGS permet un débit rapide, et, de nos jours, avec l'introduction de la troisième ou quatrième génération d'instruments NGS, une analyse peu coûteuse de plusieurs centaines de gènes ou de génomes bactériens entiers en une seule journée (Almeida and Araujo, 2013).

Le séquençage du génome dans son entier fournit des données plus précises pour comparer les souches et identifier les épidémies, que les techniques standards (MLVA, PFGE). C'est une méthode rapide et abordable qui permet de comparer les souches entre elles mais également d'obtenir des informations génétiques sur les bactéries telles que la résistance aux antibiotiques ou la virulence (Figure 8) ou le sérovar, via le WG MLST (Ashton et al., 2016)

L'analyse de séquences est réalisée par bio-informatique pour récupérer, analyser et sauvegarder les données biologiques (Granberg et al., 2016). Après l'acquisition des données, l'élimination de l'information des séquences non pertinents dérivées de contaminants est nécessaire. De nombreux algorithmes ont été développés pour lire les séquences (Schbath et al., 2012) et le choix de ces algorithmes est basé sur les besoins de l'utilisateur.

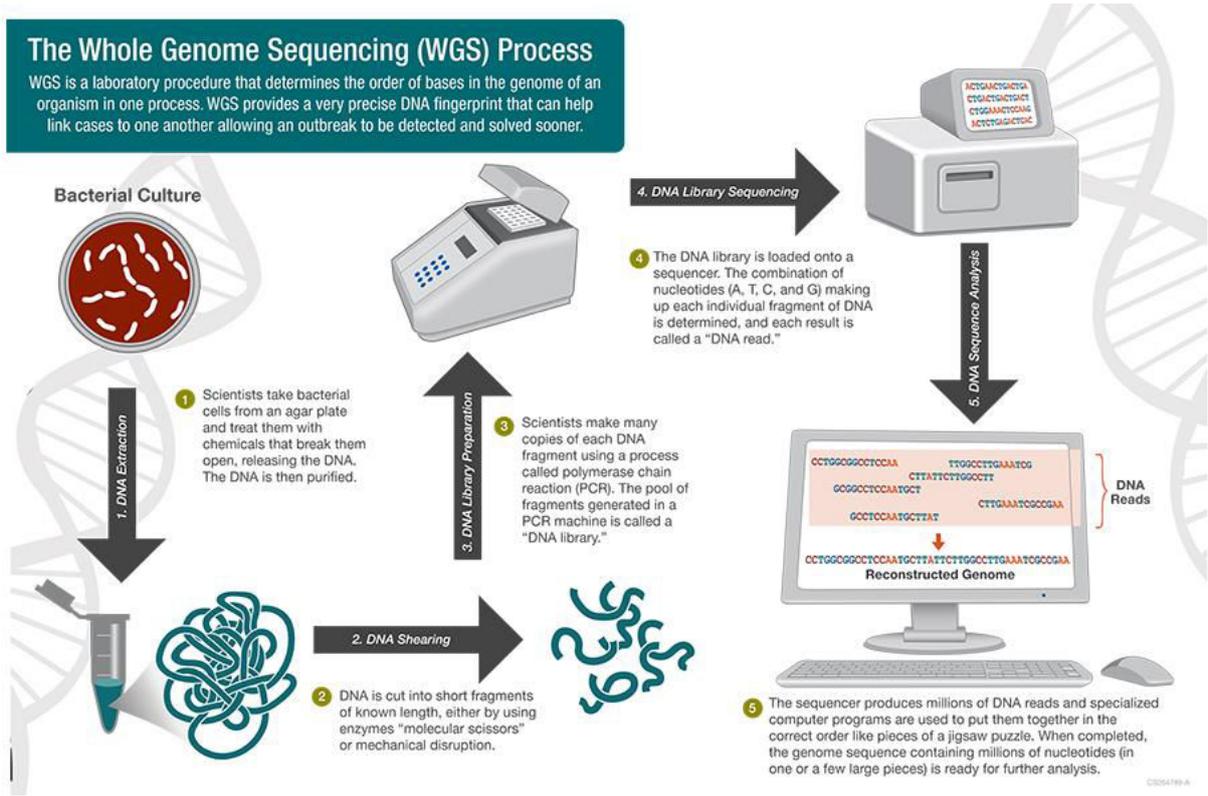


Figure 8. Schéma de la méthode WGS (Whole Genome Sequencing) (CDC : <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocol-images.html>)

2. Les salmonelloses

L'épidémiologie des infections associées à *Salmonella* varie considérablement selon le sérovar. La fièvre entérique ou fièvre Typhoïde, causée par *S. Typhi* et *S. Paratyphi*, entraîne généralement une maladie grave affectant les populations des pays en voie de développement, alors que les infections par des *Salmonella* non typhoïdes ont tendance à guérir d'elle-même et à affecter des communautés dans le monde entier (Hardy, 2004).

Sur les quelque 600 millions de cas de maladies humaines provoquées par 31 dangers d'origine alimentaire en 2010, les agents infectieux responsables des maladies diarrhéiques représentaient la grande majorité, avec 550 millions de cas (WHO, 2015). Parmi ces dangers, *Salmonella* sp. est l'une des 4 principales causes mondiales des maladies diarrhéiques (WHO, 2017).

2.1. La fièvre Typhoïde

La fièvre typhoïde (Tableau 3) reste un problème de santé publique important dans le monde, en particulier dans la population des pays pauvres. Elle cause 7,6 millions de cas dans le monde (WHO, 2015), et est endémique dans de nombreuses régions d'Afrique et le continent asiatique ainsi que des pays comme l'Amérique centrale et du Sud et le Moyen-Orient (Crump and Mintz, 2010). La plupart des cas signalés dans des pays développés sont liés aux voyages (Cooke et al., 2007; Eng et al., 2015). Les cas de la fièvre entérique sont mal caractérisés dans les pays pauvres en raison de la disponibilité limitée des ressources pour le diagnostic, des outils de surveillance et par conséquent des données épidémiologiques. Les humains sont les uniques réservoirs de *S. Typhi* et *S. Paratyphi* et la voie de transmission inclut l'ingestion d'aliments et d'eau contaminés avec des excréments de patients et de porteurs. La voie principale de contamination par *S. Paratyphi* est la nourriture vendue dans la rue (Crump and Mintz, 2010; Sanchez-Vargas et al., 2011).

Tableau 3. Caractéristiques de la fièvre typhoïde (ANSES, 2011)

Durée moyenne d'incubation	Population cible	Principaux symptômes	Durée de symptômes	Durée de la période contagieuse	Complications	Formes asymptomatiques
3 jours--1 mois	Cosmopolite toutes classes d'âges	Fièvre prolongée Anorexie Constipation le plus souvent ou diarrhées Somnolence, prostration le jour insomnie nocturne, Macules rossés au niveau du flanc	–	Pendant toute la durée » du symptôme et plusieurs semaines après 10% des patients restent excréteurs pendant 3 mois après le début des symptômes 2-5% deviennent des porteurs chroniques	Complications digestives (hémorragies, perforations) Localisations extradigestive ostéite, cholécystite Complications myocardiques : insuffisance cardiaque Létalité (1% avec antibiothérapie adaptée)	Oui + portage asymptomatique chronique

2.2. Salmonelloses non typhoïde

2. 2.1. Epidémiologie

Les chiffres dans le monde

La salmonelle non-typhoïde est l'agent pathogène bactérien le plus commun causant des infections gastro-intestinales dans le monde entier (Chen et al., 2013). En 2010, les *Salmonella enterica* non typhoïdes étaient responsables de 4 millions de DALYs (Disability-Adjusted Life years - années de vie ajustées sur l'incapacité) et de 59 000 décès dont 32 000 dans deux sous-régions africaines (WHO 2015). D'après les données de 2001 à 2005, le sérovar le plus commun responsable de l'infection par les *Salmonella* non typhoïdes est *S. Enteritidis*, suivi de *S. Typhimurium*, et, contrairement à la *Salmonella* typhoïde, les animaux sont le principal réservoir de *Salmonella* non typhiques (Eng et al., 2015; Galanis et al., 2006). D'autres sérovares sont souvent associés aux salmonelloses non typhiques comme *S. Newport*, *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium* monophasique etc.

Les chiffres dans l'Union Européenne (UE)

Salmonella sp. est la deuxième zoonose la plus rapportée dans l'Union Européenne en 2016 (Figure 9). Le nombre total de cas de salmonelloses rapportés était de 96 039, et confirmés de 94 530 (taux de notification de 20,4/100000 habitants). Parmi les cas confirmés, 9 061 cas étaient associés à des épidémies. Les cinq sérovares les plus fréquemment liés aux cas humains

dans l'UE en 2016 étaient, en ordre décroissant: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* monophasique, *S. Infantis* et *S. Derby* (EFSA and ECDC, 2017).

Les chiffres en France

En France, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. et les norovirus, sont responsables de 73% des cas de maladies apportées par les aliments et 76% de toutes les hospitalisations associées. La salmonelle est classée au troisième rang des causes de maladies d'origine alimentaire (12%), et elle se place aussi comme la deuxième cause d'hospitalisation (24%) et première cause de décès (27%) (Van Cauteren et al., 2017). Les cas rapportés et confirmés de salmonelloses en France en 2015 étaient de 10 305 (EFSA and ECDC, 2016) mais d'après d'autres estimations, ce nombre pourrait atteindre 192 450 cas (90% IC 108,445–383,362) chaque année (Van Cauteren et al., 2015).

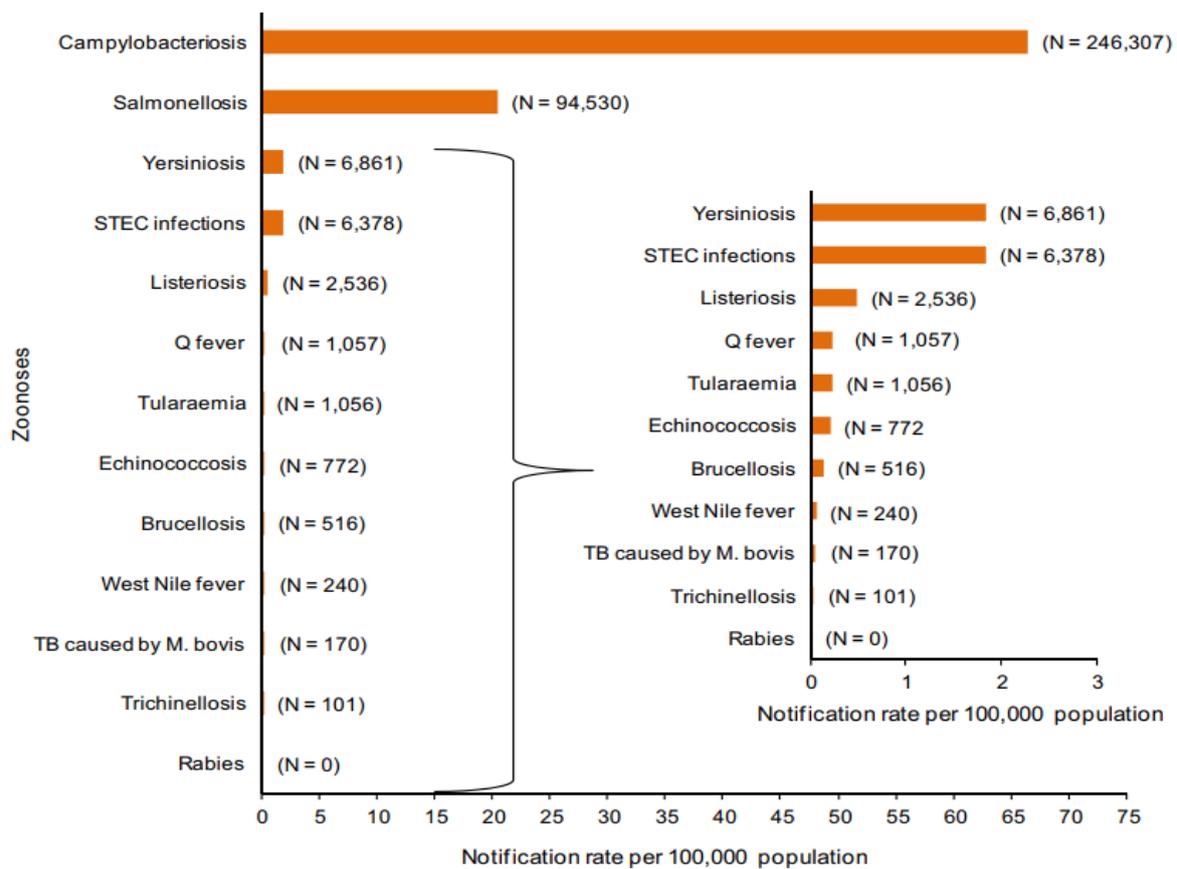


Figure 9. Nombre et taux de notification des zoonoses humaines confirmées dans l'UE 2016 (EFSA, 2017)

En France, le CNR-ESS (Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*) a enregistré 10 545 isollements humains de *Salmonella* au cours de l'année 2016, dont 9 826 en France métropolitaine (CNR-ESS, 2017) ; De 2005 à 2015, le sérovar prédominant était Typhimurium alors que le sérovar Enteritidis était en baisse constante pour ne plus occuper que la 3^{ème} place en 2011 (Tableau 4).

Tableau 4. Les 20 principaux sérovares de *Salmonella* en France au cours des années (CNR-ESS, 2017)

Rang	Distribution des sérotypes (n) par année*				
	2000	2005	2010	2015	2016
1	Enteritidis (4656)	Typhimurium (3992)	Typhimurium (3027)	Typhimurium (3288)	Enteritidis (2651)
2	Typhimurium (3800)	Enteritidis (3638)	Enteritidis (1711)	Enteritidis (2696)	Typhimurium (2071)
3	Hadar (787)	Agona (274)	<u>1</u> ,4,[5],12:i:- (1098)	<u>1</u> ,4,[5],12:i:- (2370)	<u>1</u> ,4,[5],12:i:- (1958)
4	Virchow (321)	Infantis (210)	Kentucky (208)	Infantis (224)	Infantis (251)
5	Heidelberg (226)	Typhi (187)	Newport (191)	Derby (215)	Panama (174)
6	Infantis (209)	Derby (158)	Typhi (181)	Newport (171)	Kentucky (170)
7	Brandenburg (187)	Hadar (147)	Derby (167)	Kentucky (169)	Newport (158)
8	Derby (164)	Virchow (142)	Panama (148)	Napoli (149)	Typhi (157)
9	Typhi (152)	Newport (133)	Infantis (128)	Dublin (135)	Dublin (143)
10	Newport (137)	Panama (124)	Napoli (100)	Panama (129)	Chester (113)
				Typhi (129)	Derby (113)
11	Panama (125)	<u>1</u> ,4,[5],12:i:- (101)	Dublin (81)		
12	Dublin (105)	Manhattan (95)	Hadar (76)	Chester (113)	Saintpaul (104)
13	Indiana (87)	Napoli (93)	Corvallis (70)	Hadar (79)	Paratyphi B dt+ (90)
14	Blockley (83)	Indiana (86)	Kottbus (66)	Saintpaul (78)	Napoli (82)
			Virchow (66)		
15	<u>1</u> ,4,[5],12:i:- (75)	Brandenburg (82)		IIIa. 48:z4,z23:- (73)	Poona (81)
16	Bredeney (63)	Dublin (73)	Saintpaul (64)	Agona (67)	Hadar (76)
17	Bovismorbificans (58)	Manhattan (62)	Montevideo (61)	Coeln (65)	Weltevreden (73)
18	Livingstone (56)	Worthington (55)	Rissen (60)	Virchow (63)	Agona (68)
19	Montevideo (51)	Kentucky (48)	Bovismorbificans (59)	Rissen (62)	Virchow (60)
20	Agona (50)	Dublin (45)	Brandenburg (56)	Weltevreden (60)	ParatyphiA (58)

*données incluant les souches adressées au CNR-ESS *Salmonella* et les fiches d'information

En 2016, pour la 1^{ère} fois depuis 2004, le sérovar Enteritidis reprend la 1^{ère} place des sérovares responsables des salmonelloses humaines, cela est principalement dû à une diminution du sérovar Typhimurium. Cette diminution soudaine reste inexpliquée, elle est homogène au regard des régions d'isolement, du sexe et de l'âge du patient. Le sérovar de formule

antigénique 1,4,[5],12:i:- (variant monophasique de Typhimurium) a pris une place prépondérante parmi les isolements de salmonelles en France, en constante augmentation d'année en année depuis 2008 (principalement dû à la dissémination internationale du clone multi-résistant aux antibiotiques, 4,5,12:i:-) (CNR-ESS, 2017).

2.2.2. Transmission et facteurs de risque

La transmission des *Salmonella* non typhiques à l'homme peut se produire par l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, par la consommation d'animaux infectés, ou par contact direct ou indirect avec des animaux infectés par *Salmonella* dans les maisons, les cliniques vétérinaires, les jardins zoologiques ou dans d'autres lieux publics ou privés (Figure 10) (Eng et al., 2015; Mughini-Gras et al., 2017).

La consommation de viande crue ou insuffisamment cuite reste un facteur du risque de la salmonellose attribuable aux trois productions principales de viande, c'est-à-dire les porcs (8,6%), les bovins (9,4%) et les poulets de chair (8,7%) (Mughini-Gras et al., 2014). Récemment, de plus en plus de rapports établissent un lien entre les légumes crus et les fruits contaminés par *Salmonella* et les toxi-infections alimentaire (Wiedemann et al., 2014).

Les pratiques de cuisine comme la fréquence de nettoyage des surfaces ou le fait de ne pas utiliser une planche à découper pour la viande crue sont des facteurs de risque spécifiques de l'infection par les salmonelles (Mughini-Gras et al., 2017). Le contact avec les animaux est responsable d'un certain nombre de cas de salmonelloses humaines chaque année, et le risque pour la santé publique varie selon les espèces animales, le groupe d'âge, la pratique de l'élevage et l'état de santé. Certaines sous-populations humaines sont considérées plus à risque dû à des facteurs de risque biologiques ou comportementaux.

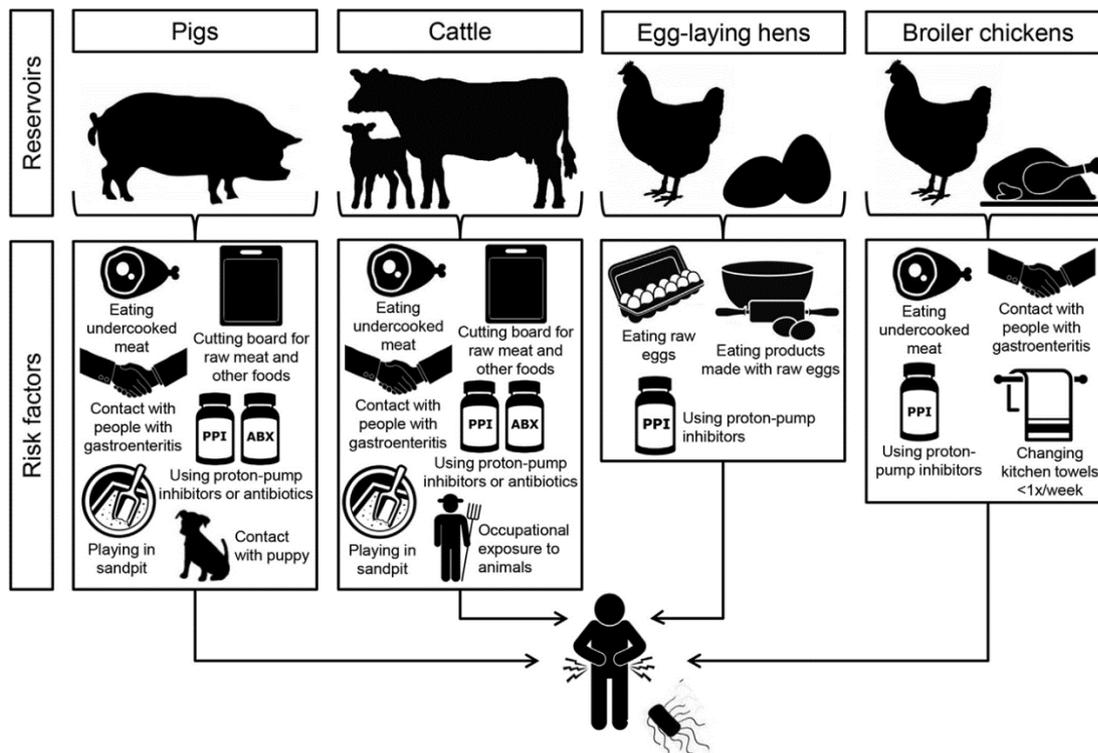


Figure 10. Exemple schématique des facteurs de risque spécifiques pour la salmonellose humaine (Mughini-Gras et al., 2017)

De nombreuses infections humaines causées par contact direct avec des animaux tels que le bétail, les porcs, les chevaux, les chats, les chiens etc. sont attribuées à des causes professionnelles, à l'environnement agricole et à la contamination au niveau familial (Hoelzer et al., 2011). L'utilisation d'antibiotiques est un facteur de risque de salmonellose associée aux porcs et aux bovins ainsi que l'utilisation de certains médicaments pour usage humain qui réduisent la barrière acide de l'estomac (inhibiteurs de la pompe à protons) augmentant ainsi le risque de contracter la salmonellose (Chen et al., 2016; Crump et al., 2015; Mughini-Gras et al., 2017).

2.2.3. Signes cliniques

La forme la plus courante d'infection par *Salmonella* est la gastro-entérite aiguë (Chen et al., 2013). Le nombre de salmonelles qui doivent être ingérées pour provoquer des troubles digestifs chez les adultes en bonne santé serait de 10^1 à 10^{11} bactéries, et les troubles gastro-intestinaux se manifestent d'autant plus vite que la dose ingérée est élevée. La dose infectieuse causant la salmonellose chez 50% des sujets exposés serait de l'ordre de quelques dizaines de bactéries pour les sérovars Typhimurium et Enteritidis, quelle que soit la population exposée (ANSES, 2011).

Les nourrissons, les jeunes enfants mal nourris et les personnes immunodéprimées, par exemple les malades du VIH (Virus d'immunodéficience Humain), sont plus sensibles aux infections (Ao et al., 2015). Les infections dans les pays pauvres sont moins bien comprises que dans les pays industrialisés. Le paludisme et la malnutrition prédisposent aux maladies invasives chez les enfants et le VIH prédispose autant les enfants que les jeunes adultes (Crump et al., 2015). Dans les pays industrialisés, les salmonelles non-typhoïdes provoquent généralement une entérocolite limitée avec diarrhée chez l'homme, et une bactériémie qui se produit chez environ 6% des patients atteints d'entérocolite diarrhéique.

La période d'incubation peut varier de 4 heures à 72 heures après l'ingestion de nourriture ou d'eau contaminée et les symptômes peuvent impliquer un début aigu de fièvre (38-39°C) et de frissons, de nausées et vomissements, coliques abdominales et diarrhée. La fièvre disparaît en 72 heures et la diarrhée sanglante s'arrête 3-7 jours après infection (Chen et al., 2013) (Tableau 5).

Tableau 5. Caractéristiques des salmonelloses non-typhiques (Anses, 2011)

Durée moyenne d'incubation	Population cible	Principaux symptômes	Durée de symptômes	Durée de la période contagieuse	Complications	Formes asymptomatiques
6-72 heures Le plus souvent de 12-36 heures	Cosmopolite tous classes d'âges	Nausées vomissements Douleurs abdominales Diarrhées Maux de tête Frissons Fièvre à 39-40°C	5-7 jours	Généralement de plusieurs jours à plusieurs semaines Parfois plusieurs mois : 1% des patients adultes et 5% des enfants de moins de 5 ans peuvent rester excréteur pendant moins de 12 mois	Bactériémie dans 3 à 10 % des cas Déshydratations Taux d'hospitalisation (22,1%) Taux de mortalité (0.8%)	Oui

2.2.4. Systèmes de surveillance

En France, le système de surveillance intégré pour *Salmonella* couvre toute la chaîne alimentaire, de l'élevage aux cas humains. De nombreux acteurs contribuent à ce système de surveillance «mosaïque». Les cas de salmonellose sont surveillés par :

- 1- Le Centre National de Reference de *Salmonella* (CNR-ESS, de l'Institut Pasteur) qui collecte de souches humaines envoyées sur une base volontaire par laboratoires médicaux privés et publics,
- 2- L'Institut National de Veille Sanitaire (InVS, Santé Publique France) pour le recueil des déclarations obligatoires des cas de maladies entériques.

Concernant les réservoirs animaux de *Salmonella*, destinés à l'alimentation, deux systèmes parallèles rassemblent des données sur les niveaux de contamination dans les différents produits au niveau national :

- 3- 1-La Direction Nationale de l'Alimentation (DGAL), rattachée au Ministère d'Agriculture Français, coordonne les plans d'échantillonnage à la ferme, l'abattoir, ou la distribution, dans le cadre des surveillances basées sur la réglementation.
- 4- 2- Le réseau Salmonella, hébergé par l'Agence française de l'alimentation, de l'environnement Santé et sécurité du travail (Anses), rassemble des souches de salmonelles non humaines envoyées sur une base volontaire par les laboratoires vétérinaires et alimentaires, publiques et privés, répartis sur l'ensemble du territoire nationale (Danan et al., 2012; David et al., 2013).

2.2.5. Réponse immunitaire contre *Salmonella*

Réponse immunitaire innée

Mucus et peptides antimicrobiens

Les premiers obstacles contre l'invasion de *Salmonella* dans l'intestin, sont la couche fine de mucus qui couvre la surface de l'épithélium de l'intestin, et la production en quantité de peptides antimicrobiens. Ces peptides antimicrobiens sont des protéines qui fonctionnent comme des antibiotiques en endommageant la membrane cellulaire de la bactérie. Les cellules de Paneth des cryptes intestinaux sont les producteurs les plus importants de peptides antimicrobiens (Ouellette, 2006).

Survie intracellulaire dans les macrophages

Une fois que *Salmonella* a passé à travers les cellules M et les entérocytes, elle est confrontée aux macrophages et aux cellules dendritiques qui phagocytent la bactérie et secrètent les cytokines pro-inflammatoires (Salazar-Gonzalez et al., 2007). Tous les monocytes expriment les PRR (Patter Recognition Receptors) qui détectent les molécules PAMPs (Pathogen

Associated Molecular Pattern). Les Toll-like Receptors (TLRs) dans la membrane des cellules (TLR1,2,4,5,6,10) et dans les vésicules intracellulaires (TLR3,7,8,9,11,13) sont les premières PRRs qui détectent la présence de *Salmonella* (Medzhitov, 2001). Les TLR détectent différents PAMPs extracellulaires et intracellulaires comme les LPS (Lipopolysaccharides), les lipoprotéines bactériennes, le peptidoglycane, la flageline l'ADN etc.

Les macrophages infectés et activés tuent ou limitent la réplication de *Salmonella* à travers la production d'enzymes lysosomales, d'enzymes intermédiaires de l'oxygène réactif, d'enzymes intermédiaires du nitrogène réactif, et d'autres peptides. Les macrophages et les lymphocytes ont développé des mécanismes de surveillance pour reconnaître la présence de PAMPs dans le cytosol, comme les NLR (Node Lyke Receptors) (Broz et al., 2012).

Inflammation de la muqueuse intestinale

Après l'invasion de *Salmonella*, une inflammation massive de la muqueuse intestinale se produit et elle est caractérisée par la sécrétion de cytokines essentielles comme les interleukines IL-18 et IL-23. Ces dernières amplifient les réponses inflammatoires par le mécanisme de signalisation paracrines qui induit aux cellules T résidentes de sécréter massivement l'interféron gamma (IFN- γ), l'IL-22 et l'IL-17 (Godinez et al., 2009). La libération de l'IL-18 est critique pour que les cellules T secrètent les interférons gamma (IFN- γ) *in vivo* (Srinivasan et al., 2007). La cytokine IL-23, quant à elle, induit la production de cytokines pro-inflammatoires IL-17 et IL-22 dans de nombreuses cellules d'origine innée et adaptative comme les neutrophiles, les cellules T α et σ , et les cellules Th 17 (Helper lymphocyte T 17) (Ouyang et al., 2008).

L'activation de Th17 par *Salmonella* induit la production de chimiokines qui sont responsables du recrutement des neutrophiles dans le site d'infection. Ces neutrophiles suivent le gradient des chimiokines, entourent et tuent *Salmonella* (Liu et al., 2009). D'autres cellules comme les macrophages et les cellules NK (Natural Killer), l'INF- γ et le Facteur de Nécrose Tumoral (TNF- α) éliminent les microorganismes des tissus.

Dans les infections par *Salmonella*, l'IFN- γ joue un rôle important dans la première étape de l'infection et de grandes quantités d'ARN messager codant pour les INF- γ sont trouvées dans le tissu lymphoïde associé à l'intestin. Pendant la première semaine d'infection les cellules chargées de produire les INF- γ sont les lymphocytes T (Nauciel and Espinasse-Maes, 1992). Cependant d'autres cellules peuvent aussi avoir un rôle essentiel de production d'INF- γ , pendant la diminution de la quantité de Lymphocytes T, comme les cellules NK, sous

l'induction de l'IL-18, et les macrophages, sous l'induction de l'IL-12 (Chan et al., 1991; Lalmanach and Lantier, 1999; Mastroeni et al., 1999).

Réponse immunitaire adaptative

L'immunité adaptative de *Salmonella* nécessite autant la réponse des lymphocytes T que des immunoglobulines. La bactérie rencontre les phagocytes soit dans le tractus gastrointestinal, soit pendant la pénétration de l'épithélium de la muqueuse (Vazquez-Torres et al., 1999). *Salmonella* est ensuite disséminée systématiquement dans les phagocytes pour coloniser les organes comme le foie et la rate. Les immunoglobulines spécifiques produites par les cellules B peuvent opsoniser les bactéries extracellulaires qui sont phagocytées par les macrophages. Les macrophages peuvent agir comme des cellules présentatrices d'antigènes (APC cells), et présentent l'antigène au MHC (Major histocompatibility complex). Après s'être attachés au MHC, ces peptides sont présentés aux récepteurs des cellules T (TCR). D'autres cellules peuvent agir comme des cellules présentatrices d'antigènes, comme les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Les cellules dendritiques, reconnaissent le LPS ou la flagelline de *Salmonella* à travers l'augmentation de l'expression des molécules MHC de type II et des molécules co-stimulatrices CD80, CD86 et CD40 (CD = Cluster de différenciation). Ce processus permet la présentation de l'antigène aux cellules T CD4, ce qui permet une liaison vitale entre les réponses immunitaires innées et adaptatives (Srinivasan et al., 2007). La reconnaissance des antigènes par le TCR permet l'activation et l'expression des cellules CD4+. Les cellules CD4+, sont absolument requises pour le contrôle de l'infection de *Salmonella*. Une fois les CD4+ activées, elles stimulent les lymphocytes B qui vont produire des anticorps et aussi des lymphocytes cytotoxiques CD8. L'expansion massive de cellules T CD4+ spécifiques à *Salmonella* et l'acquisition rapide des fonctions de Th1 (help T lymphocytes 1) stimule la libération des cytokines immunomodulatrices, comme les INF- γ , TNF- α , IL-12, IL-18 (Griffin and McSorley, 2011; Mittrucker et al., 2002).

Rôle des anticorps

Rôle des anticorps sécrétoires (SIgA)

Le rôle de SIgA spécifique à *Salmonella* paraît être minime dans l'immunité protectrice. Les anticorps sécrétoires sont produits en réponse au microbiote commensal et leur génération ne dépend pas de l'infection par *Salmonella* (Cummings et al., 2009).

Réponse des anticorps-spécifiques contre Salmonella

Le LPS, exposé à la surface des bactéries Gram négatives, produit une forte réponse des anticorps pendant l'infection due à *S. Typhimurium* (Brown and Hormaeche, 1989). La plupart des réponses médiées par les cellules B ciblent les chaînes polysaccharidiques de l'antigène O spécifiques à chaque sérovar, dans la partie extérieure de la molécule. La réponse des anticorps spécifique à *Salmonella* dépend de multiples antigènes de *Salmonella* et incluent les LPS et des protéines comme l'OmpA, les porines, la protéine Flic et une protéine de choc thermique cellulaire. D'autres structures comme les flagelles et fimbriae sont aussi ciblées par la réponse de cellules B (Cummings et al., 2009). Les anticorps spécifiques contre ces structures sont tous considérés comme protecteurs (Mastroeni, 2002).

Salmonella se trouve la plupart de temps dans le SCV des phagocytes, mais elle peut devenir extracellulaire une courte période pendant laquelle les anticorps peuvent agir directement sur elle (Cunningham et al., 2007). L'opsonisation bactérienne produit par les anticorps spécifiques entrave la colonisation bactérienne *in vivo*.

3. Virulence

3.1. Facteurs de virulence

Salmonella enterica exprime divers facteurs de virulence communs à la plupart des sérovars. Les principaux facteurs de virulence sont le système de sécrétion de type III (T3SS), le lipopolysaccharide (LPS), les polysaccharides de surface, les fimbriae, les flagelles, et les îlots de Pathogénicité. Par contre *S. Typhi*, *Paratyphi* et *Dublin* sont les seuls sérovars à exprimer l'antigène capsulaire (Vi). Les facteurs de virulence des sérovars de *Salmonella* sont codés principalement par les îlots de pathogénicité de *Salmonella* SPI (Figure 11) (de Jong et al., 2012).

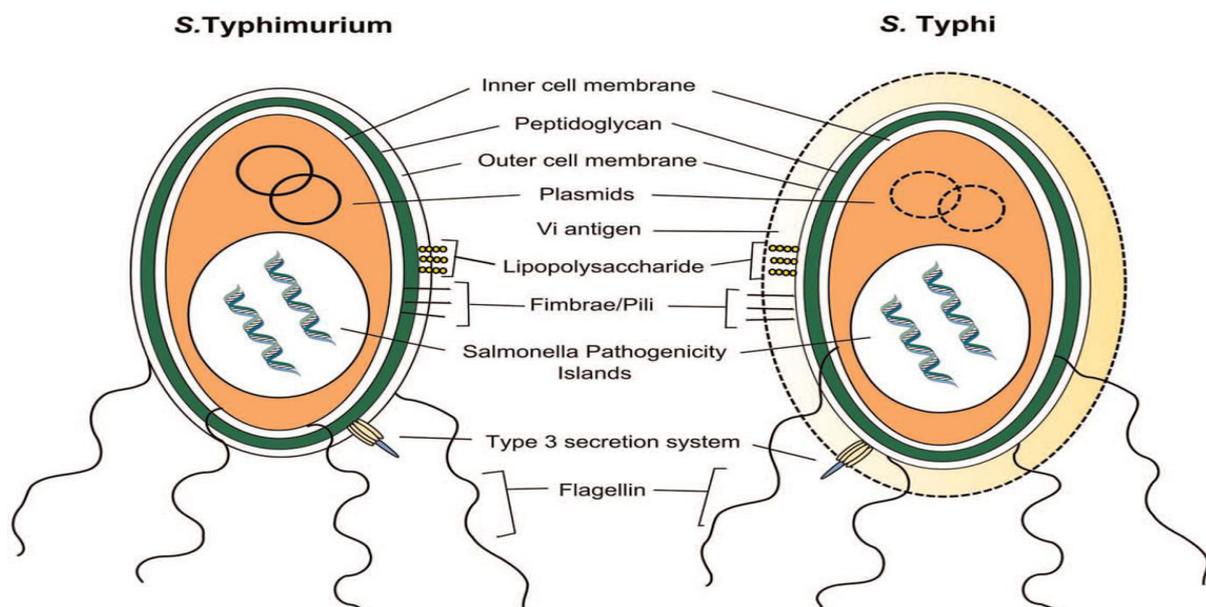


Figure 11. Facteurs de Virulence de *S. Typhimurium* et *S. Typhi* (De Jong et al, 2012)

3.1.1. Fimbriae ou pili

Ce sont des structures à poils courts, de 2-8 nm de large et 0,5-10 μm de long, principalement composés de protéines hélicoïdales nommées fimbrines (Collinson et al., 1996; van Asten and van Dijk, 2005). Divers types de fimbriae ont été décrits chez *S. Typhimurium* et interviennent dans l'adhésion et la formation des biofilms : **Fimbriae type 1** (McClelland et al., 2001), **Fimbriae en boucle** (curly fimbriae) (Baumler et al., 1997; Kukkonen et al., 1993; Romling et al., 1998), **Fimbriae Pef** (Friedrich et al., 1993), **Fimbriae Std** (Chessa et al.,

2008; Chessa et al., 2009). Les **Fimbriae Type IV** ont été décrits chez *S. Heindelberg*, *S. Typhi* et *S. Paratyphi* (Karuppiah et al., 2013).

Les 8-11 gènes qui codent les protéines impliquées dans la biosynthèse, la structure et l'assemblage des fimbriae sont généralement groupés dans un opéron de 7-9 kb. Pour *S. Typhimurium* LT2 (McClelland et al., 2001), les 12 opérons putatifs qui codent pour les fimbriae sont de type « chaperone-usher pili » : *stc*, *bcf*, *fim*, *lfp*, *saf*, *stb*, *std*, *stf*, *sth*, *sti*, *stj*. Tous ces gènes sont placés dans le chromosome sauf le gen *pef* qui est localisé sur un plasmide.

3.1.2. Flagelles

Les flagelles peuvent être aussi requis pour les processus de pathogénicité, spécialement dans la chimiotaxie et l'attachement à la cellule. La synthèse et les fonctions des flagelles nécessitent l'expression de plus de 50 gènes qui sont répartis sur au moins 17 opérons (*flh*, *flg*, *fli*, *flj*, *mot*, *che*, *tar*, *tsr*, et *aer*) qui constituent les régulons flagellaires (Chilcott and Hughes, 2000).

S. enterica exprime alternativement deux protéines filamentaires flagellaires différentes FljB et FliC, dans un processus connu sous le nom de variation de phase flagellaire (Bonifield and Hughes, 2003). La variation de phase, exploitée par la majorité des *Salmonella* flagellées, pourrait être une façon d'échapper au système de défense de l'hôte. La motilité fournie par les flagelles et le sens de rotation des flagelles dans les infections de *Salmonella* a fait l'objet de plusieurs études conduisant à des conclusions ambiguës sur leur rôle possible dans l'adhésion et l'invasion des cellules eucaryotes et dans la pathogénèse des *Salmonella* (van Asten and van Dijk, 2005).

3.1.3. Lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS), composant majeur de la membrane externe de la bactérie Gram négatif, joue un rôle important dans l'interaction entre les cellules et la contribution de l'environnement à la virulence chez les bactéries pathogènes. Le LPS est composé de trois domaines : la région lipidique A hydrophobe interne, le noyau oligosaccharidique et la chaîne externe O polysaccharide (Schnaitman and Klena, 1993). L'antigène O est constitué de chaînes répétées de polysaccharides, de galactose, rhamnose et mannose.

Selon le nombre de sous-unités répétées liées au noyau lipidique A, l'antigène O peut être classé comme région :

- ✓ courte ou S, avec 11 ou 17 monosaccharides ;
- ✓ longue ou L, de 16 à 35 sous-unités ;
- ✓ très longue ou VI, avec 35 à 100 sous-unités ou plus.

La longueur du polymère est responsable des différentes interactions avec l'hôte (Raetz and Whitfield, 2002). Les formes longues et très longues de l'antigène O sont impliquées dans des différents processus comme la résistance à l'action des neutrophiles et à la lyse des phages, à l'action bactéricide du complément sérique et la protection des peptides cationiques et jouent un rôle important lors de l'adaptation bactérienne et de la colonisation intestinale (Holzer et al., 2009; López et al., 2012; Okamura and Spitznagel, 1982). Les gènes *rfaE*, *rfaC*, *rfaH* codent la biosynthèse du noyau du LPS et se trouvent dans le cluster rFa (Schnaitman and Klena, 1993).

3.1.4. Plasmides de virulence

Un locus plasmidique de 7,8 kb contient les cinq gènes de la virulence plasmidique des salmonelles (*spv*). Ces gènes sont désignés *spv* RABCD. L'expression de gènes *spv* pourrait jouer un rôle dans la multiplication intracellulaire des *Salmonella* (Rotger and Casadesus, 1999).

3.1.5. Toxines

Endotoxines

Les endotoxines ont été décrites pour la première fois par Richard Pfeiffer et Eugenio Centani, à la fin du XIX siècle, chez des animaux d'expérimentation. Le lipide A (endotoxine), est la partie hydrophobe du lipopolysaccharide (LPS), et est composé de glucosamine phospholipidique. Elle constitue la monocouche externe des membranes externes de la plupart des bactéries Gram négatives (Raetz and Whitfield, 2002). Dans les macrophages, le lipide A s'accroche au récepteur TLR4 (Toll Like Receptor 4), ce qui déclenche la biosynthèse des cytokines et des médiateurs de l'inflammation tels que les TNF (Tumoral Necrosis Factor)- α et β et l'IL-1 (Interleukine 1). Dans le cas de sepsis sévère, une surproduction de cytokines et de facteurs de coagulation peut endommager les vaisseaux sanguins ce qui précipite le choc septique (Raetz and Whitfield, 2002).

Exotoxines

Les exotoxines produites par *Salmonella* peuvent être subdivisées en deux types :

- **Cytotoxines (verotoxines)** sensibles à la trypsine, produisent de la cytotoxicité dans les cellules Vero. Elles ont la capacité de tuer les cellules des mammifères.
- **Enterotoxin thermolabile (Stn)** qui a une masse moléculaire d'environ 29 kDa et est codée par le gène *stn*. Le gène *stn* est présent dans les sérovars de *S. enterica* (Moore and Feist, 2007; Murugkar et al., 2003), mais sa fonction dans la pathogénicité de *Salmonella* n'a pas été élucidée (van Asten and van Dijk, 2005). Elle pourrait être liée au maintien de l'intégrité et de la composition de la membrane (Nakano et al., 2012)

3.1.6. Antigène Capsulaire (Vi)

L'antigène Vi est un polysaccharide capsulaire trouvé principalement chez *S. Typhi* et *S. Paratyphi C* (Virlogeux-Payant and Popoff, 1996). L'antigène Vi capsulaire ne participe pas à la colonisation bactérienne, par contre il diminue la réponse inflammatoire locale et améliore la virulence systémique (Marshall and Gunn, 2015).

3.1.7. Les îlots de Pathogénicité

Un îlot de pathogénicité (PAI) est un groupe d'éléments génétiques mobiles qui jouent un rôle central dans la virulence des bactéries pathogènes. Les PAI abritent des gènes de virulence et sont présents seulement chez les agents pathogènes. La composition caractéristique diffère du core génome et ils sont associés avec des éléments génétiques mobiles comme des plasmides, transposons et phages. L'instabilité génétique est une caractéristique de ces éléments. Certains facteurs de virulence codés par des PAI sont les systèmes d'absorption du fer, les adhésines, les toxines formatrices de pores, les protéines provoquant l'apoptose, les super antigènes, les lipases et les protéases sécrétées, etc. (Hacker et al., 1997; Schmidt and Hensel, 2004) .

Les PAI de *Salmonella* sont nommés SPI pour *Salmonella* Pathogenicity Islands. Il en existe 5 majeurs et au moins 12 autres îlots, SPI-6 à SPI-17 , ont été décrits (Hensel, 2004).

- **SPI-1**

SPI-1 est présent chez *S. enterica* et *S. bongori*. C'est un locus chromosomique de 40 Kb situé au centisome (cs) 63 du chromosome. Il est nécessaire pour l'invasion des cellules hôtes et l'induction de l'apoptose des macrophages (Galan, 2001). SPI-1 code pour un système de sécrétion de type III (T3SS). Ce système fonctionne comme une aiguille (ou seringue)

moléculaire qui permet d'injecter des protéines effectrices dans la cellule cible infectée. Ces protéines modifient les routes de signalisation de la transduction, ce qui produit temporairement la réorganisation du cytosquelette d'actine dans la cellule hôte (Figure 12). Parmi ces protéines, SofE et SopE2 interfèrent avec la fonction des protéines de la cellule hôte de la famille de GTPases, qui régulent la formation des filaments de F-actine (Hardt et al., 1998).

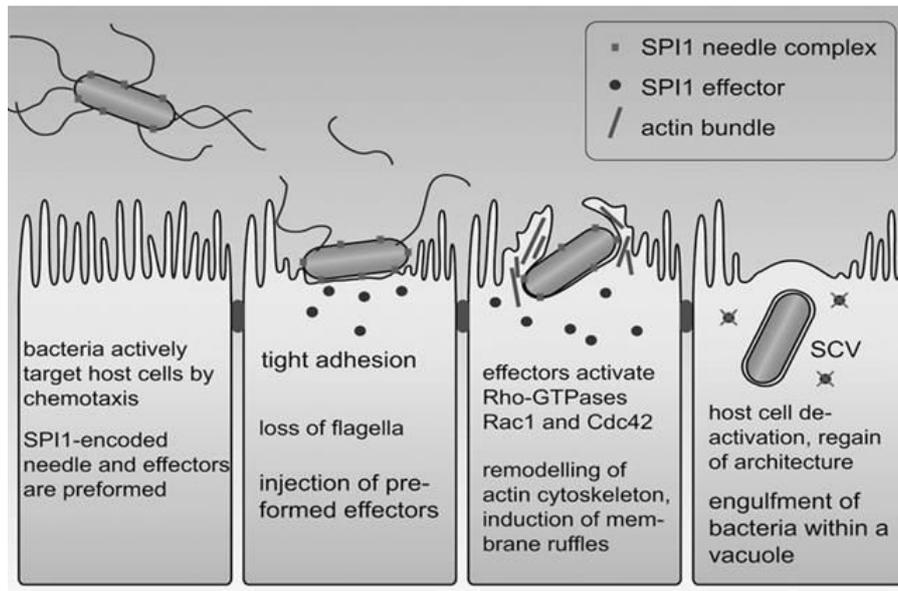


Figure 12. Invasion de *Salmonella* dans les cellules hôtes (non phagocytes) médié par SPI-1 (Gerlach & Hensel, 2007)

- **SPI-2**

SPI-2 code pour un autre type de système de sécrétion de type III, il est localisé dans le centisome 30 du chromosome. Sa taille est de 40 kb et il porte des gènes qui sont requis pour l'infection systémique et la répllication dans les macrophages (Amavisit et al., 2003; Hensel et al., 1997). Il est également impliqué dans la capacité de *S. enterica* à survivre dans les phagocytes et dans la répllication dans les SCV chez de nombreuses cellules eucaryotes.

SPI2 est également nécessaire pour empêcher l'entrée dans les SCV de la NADPH-oxydase et de l'Oxyde nitrique synthase (iNOS) (Chakravortty et al., 2002). Ce mécanisme permet à *Salmonella* d'échapper aux dommages causés par les réactifs intermédiaires de l'azote et l'oxygène, comme le peroxyde nitrite, générés par l'action de ces enzymes (Figure 13) (Schmidt and Hensel, 2004).

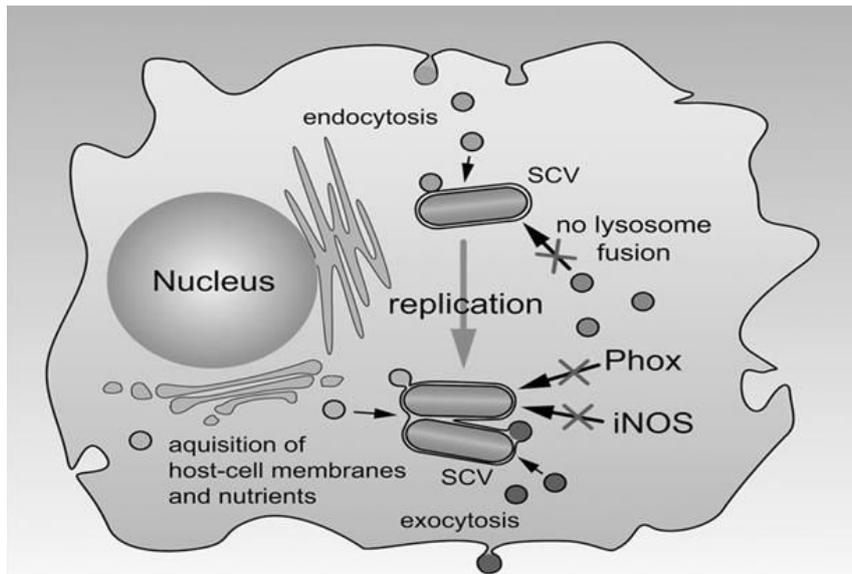


Figure 13. Survie intracellulaire de *S. Typhimurium* dans les macrophages médiée par SPI-2 (Gerlach & Hensel, 2007)

- **SPI-3**

SPI-3 porte 10 gènes importants pour la survie dans les macrophages et la croissance dans des conditions pauvres en ions Mg^{++} (Blanc-Potard et al., 1999). SPI-3 code une protéine auto transporteurs MisL qui permet à *S. Typhimurium* de s'attacher à la fibronectine et qui est apparue comme un facteur d'adhésion impliqué dans la colonisation intestinale (Dorsey et al., 2005).

- **SPI-4**

SPI-4 a été identifié pour la première fois 1998 comme un fragment génomique spécifique de *S. Typhimurium* (Wong et al., 1998). Il a toutes les caractéristiques d'un îlot de Pathogénicité et forme une insertion de 25 kb chez *S. Typhimurium*. SPI-4 porte le gène *siiE* codant pour un facteur d'adhésion non fimbriae et l'opéron *siiABCDEF* codant pour un système de sécrétion de type I (T1SS). Ce système a comme fonction la translocation de protéines effectrices mais aussi l'injection des adhésines dans la cellule hôte (López et al., 2012).

- **SPI-5**

SPI-5 a été décrit comme un locus de petite taille (7,6 kb) qui a été inséré dans la partie adjacente au tRNA *serT*. Il a une structure en mosaïque et porte des gènes qui codent pour la pathogénicité entérique de *Salmonella*. SPI-5 porte le gène qui code pour SopD, une protéine effectrice du T3SS (codé par SPI-1) (Wood et al., 1998) et le gène *pipB* qui code une protéine effectrice pour le T3SS (codé par SPI-2) (Knodler et al., 2002).

3.2 Mécanismes de virulence et cycle d'infection

La route primaire d'infection par *Salmonella* chez les humains est la voie féco-orale. Le premier obstacle à surmonter au sein de l'hôte est le pH acide de l'estomac. Pour traverser cette barrière *Salmonella* active la réponse de la tolérance à l'acide (Acid Tolerance Response ATR) qui aide à maintenir le pH intracellulaire plus élevé, à des valeurs de l'environnement extracellulaire (Foster and Hall, 1991).

Après être entrée dans l'intestin grêle, la salmonelle doit atteindre et traverser la couche de mucus intestinal avant de rencontrer et d'adhérer aux cellules épithéliales intestinales. Pour échapper aux peptides antimicrobiens dans l'intestin, *Salmonella* a développé différents mécanismes comme le système de transduction de signal PhoP-PhoQ qui détecte la présence de peptides cationiques antimicrobiens et l'activation de PhoQ qui produit une réponse de transcription qui modifie le lipide A de la bactérie par acétylation (Miller et al., 1989). Un autre mécanisme est la production d'enzymes qui empêchent la production de lipocalin-2 une protéine qui séquestre le Fer et empêche la croissance de *Salmonella* (Fischbach et al., 2006).

En particulier, *Salmonella* peut cibler la population des cellules M (microfold cells) recouvrant les plaques de Peyer (PPs), mais peut aussi envahir les entérocytes non phagocytaires (Takeuchi, 1967). Les cellules M sont associées à de plus petits agrégats lymphoïdes connus sous le nom de GALT (gut associated lymphoid tissues) (Ohno et al., 2012). La glycoprotéine 2 (GP2) s'exprime dans les cellules M agit comme un récepteur pour les pili de type I des bacilles à Gram négatif tels que *E. coli* ou *S. enterica* (Hase et al., 2009).

L'infection par *Salmonella* dans les cellules se déroule selon les étapes suivantes.

3.2.1. Adhésion

L'adhésion de *Salmonella* aux cellules hôtes est l'étape cruciale de l'infection qui permet aux bactéries de coloniser l'intestin de l'hôte. L'adhésion à l'épithélium par *Salmonella* est facilitée par les flagelles et les fimbriae présents sur la surface des cellules bactériennes (Darwin and Miller, 1999). D'autres récepteurs de l'hôte interagissent avec des facteurs d'adhésion des agents pathogènes comme le lipopolysaccharide (LPS) et la capsule (Wagner and Hensel, 2011). Une fois que *Salmonella* a pris contact avec la lumière intestinale, elle a besoin d'un contact initial avec l'épithélium pour interagir avec la cellule cible. Ce processus se produit par motilité et chimiotaxie, mais aussi grâce à l'intervention de différents déterminants de virulence comme les fimbriae et les adhésines et le système de sécrétion de type III (T3SS).

L'attachement étroit entre la bactérie et la cellule eucaryote est un prérequis indispensable pour la translocation.

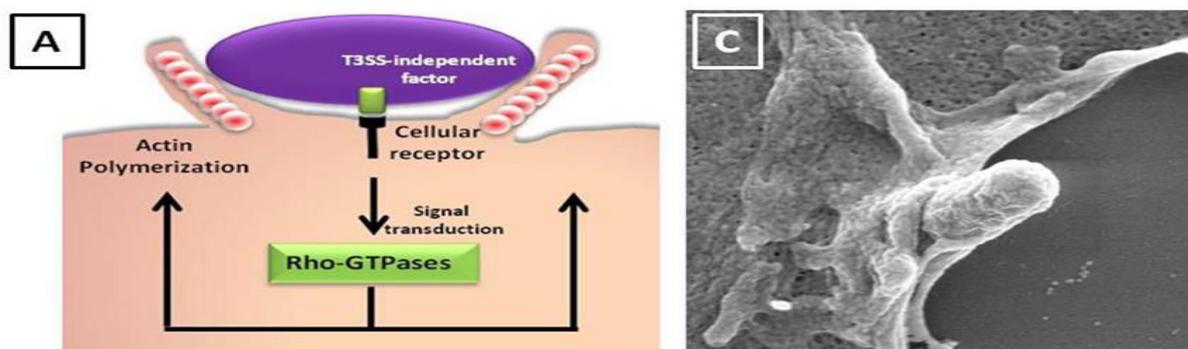
3.2.2. Invasion

La capacité de *Salmonella* à accéder aux cellules épithéliales intestinales est conférée par de nombreux gènes de virulence codés par l'îlot de Pathogénicité (SPI-1) (Finlay and Brumell, 2000). Les protéines codées par SPI-1 forment un système de sécrétion de type III (T3SS). Ce système possède une base ancrée dans la membrane ainsi qu'une aiguille creuse formée d'une seule protéine polymérisée. Cette aiguille permet le transport de plusieurs protéines bactériennes directement dans le cytosol de la cellule hôte. Le T3SS codé par SPI-1 confère la capacité d'envahir les cellules non phagocytaires et de coloniser le tractus gastro-intestinal de leurs hôtes. D'autre part, un autre T3SS codé par SPI-2 permet à *Salmonella* de survivre dans les cellules eucaryotes et de se propager aux organes internes, tels que le foie et la rate. Les deux T3SS sont présents dans tous les sérovars de *S. enterica* et correspondent aux déterminants de virulence les plus importants chez *Salmonella*. Un autre système de sécrétion, le type IV, codé par le SPI-19 est exigé pour *S. Gallinarum* pour infecter les macrophages (Blondel et al., 2013). Les protéines effectrices transloquées permettent effectivement aux bactéries de «détourner» de nombreux processus intracellulaires essentiels à travers deux mécanismes nommés « Trigger » et « Zipper » (Figure 14).

Mécanisme Trigger: Ce mécanisme induit de grands réarrangements du cytosquelette d'actine de l'hôte, ce qui engendre une érosion intense de la membrane et une internalisation des bactéries. Ce mécanisme implique la formation d'un T3SS.

Mécanisme Zipper: Ce mécanisme implique des petits réarrangements des protéines du cytosquelette. Les protéines de surface des bactéries, interagissent avec les récepteurs de la membrane cellulaire. Cette interaction produit l'activation des voies de signalisation des cellules hôtes conduisant au remodelage de l'actine.

Le mécanisme Zipper



Le mécanisme Trigger

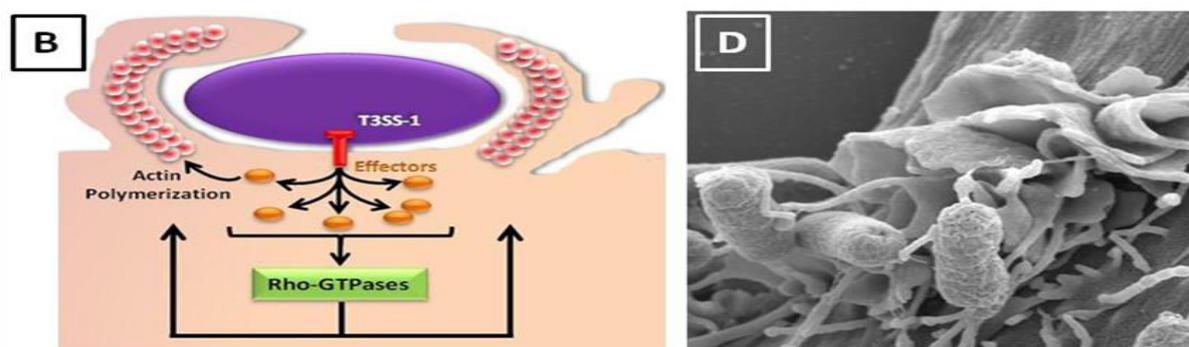


Figure 14. Mécanismes Zipper et Trigger A : Zipper. B : Trigger, *S. Enteritidis* envahis des fibroblastes via le mécanisme Zipper(C) et Trigger (D). Rosselin et al., 2012

3.2.3. Formation du SCV (*Salmonella* containing vacuoles) et réplication

La modification interne produit dans la cellule induit la formation de prolongations dans la membrane cellulaire qui englobent les bactéries ayant adhéré. Les vacuoles qui se forment s'appellent *Salmonella* containing Vacuoles (SCV). Ces vacuoles représentent le compartiment intracellulaire dans lequel *Salmonella* peut survivre (Francis et al., 1993). En condition normale, la présence de l'antigène bactérien active la fusion des lysosomes avec le phagosome, ce qui engendre la dégradation de la bactérie. Cependant, *Salmonella* utilise le système de sécrétion de type III pour injecter d'autres protéines qui changent la structure du compartiment. Dans ces conditions la fusion des lysosomes est bloquée et cela permet la survie de *Salmonella* dans le milieu intracellulaire et la réplication de la bactérie (Eng et al., 2015).

Dans les macrophages et les cellules épithéliales l'invasion est suivie d'une phase de latence de 3-4 heures après laquelle la bactérie intracellulaire commence la phase de réplication, à ce moment, la bactérie se localise dans une structure nommée SiFs (*Salmonella* induced filaments) dont la fonction reste inconnue. Les SCV migrent dans une localisation péri-

nucléaire près de l'appareil de Golgi et sortent dans la sous-muqueuse (Finlay and Brumell, 2000). *Salmonella* utilise l'augmentation de l'acidification de l'environnement dans le SCV pour réguler ses gènes et établir une niche intracellulaire (Arpaia et al., 2011).

3.2.4. Colonisation des macrophages et dissémination

Les salmonelles sont englouties par les phagocytes, en particulier les neutrophiles, les monocytes inflammatoires, qui se différencient en macrophages, et les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques absorbent directement les bactéries de la lumière intestinale en ouvrant les jonctions serrées et en envoyant des dendrites à la lumière. Les salmonelles sont ensuite phagocytées et un nouveau SCV se forme, ce qui leur permet d'assurer leur survie et leur réplication.

Salmonella peut induire l'apoptose dans les macrophages en utilisant le système SPI-1, pour échapper aux cellules immunitaires et empêcher l'inflammation (Finlay and Brumell, 2000). La migration de ces phagocytes infectés, spécialement les macrophages, facilite la dissémination systémique de la bactérie *via* la circulation sanguine vers plusieurs autres tissus tels que la rate, le foie et le système réticuloendothéliale où ce pathogène se multiplie préférentiellement (Eng et al., 2015; Fabrega and Vila, 2013). A partir du site d'infection initiale dans les plaques de Peyer, *Salmonella* peut se déplacer par les ganglions lymphatiques afférents aux ganglions lymphatiques mésentériques, et finalement être drainée à travers les tissus systémiques par les vaisseaux lymphatiques.

Pour échapper à la réponse immunitaire des cellules T, la salmonelle développe des mécanismes comme l'immunosuppression directe de cellules T (Srinivasan et al., 2007).

4. *Salmonella* en Filière Porcine

4.1. La Filière porcine en France

4.1.1. Importance

La production de porcs en France peut être visualisée comme une pyramide de sélection à trois niveaux: les élevages de sélection, les élevages de reproduction et les fermes de production (porcs charcutiers) (Figure 15). Les fermes de multiplication approvisionnent d'autres élevages en truies reproductrices ou porcelets. La sélection des porcs se déroule à travers les « organisations de sélection de porc français » régulées par le gouvernement qui coordonnent et guident l'amélioration génétique et collectent les données de généalogie, performance reproductive, croissance, type de carcasse et qualité de la viande (IFIP, 2004).

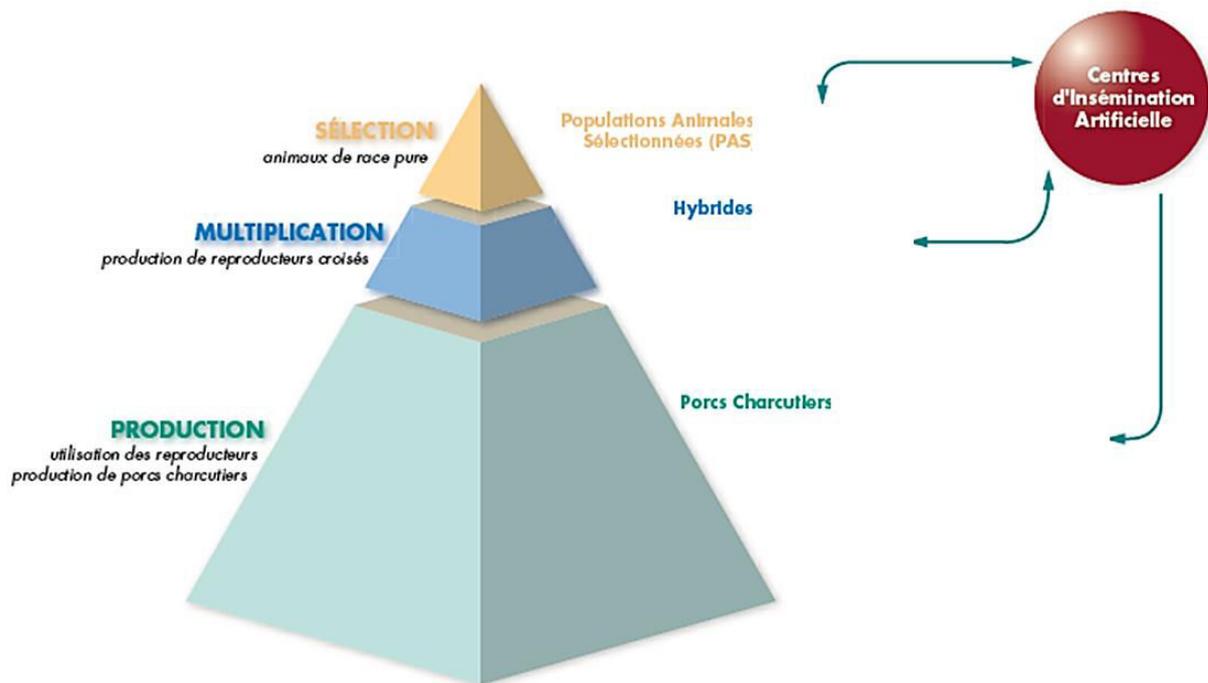


Figure 15. Structure pyramidale et classification des types d'exploitations incluant la chaîne d'approvisionnement du porc (IFIP, 2004)

La France est le 3^{ème} producteur du porc de l'Union Européenne après l'Allemagne et l'Espagne. En 2016, le nombre total de têtes porcines était de 12,793 millions (3trois3.com, 2018). La production porcine française se concentre sur le Grand Ouest, 73% des porcs étant produits en Bretagne, Pays de la Loire et Basse-Normandie. Près de 24 millions de porcs ont

été abattus en 2013, ce qui représente 2,15 millions de tonnes de poids de carcasse. Cela représente 10% de la production de l'Union Européenne. La majorité des porcs français (95%) sont abattus dans 23 abattoirs spécialisés, dont 10, tous localisés en Bretagne et Pays de la Loire, ont une capacité d'1 million de porcs par an.

Un quart de la production de porc en France est consommée sous forme de viande (70 % de commercialisation en supermarchés et hypermarchés) et 50 % sous forme de charcuterie. La consommation de porcs par habitant était de 32 kg/habitant/an en 2013 contre 37 kg/habitant/an en 2007 (FranceAgriMer 2015).

4.1.2. Elevages de porcs en France

Les types d'élevage

Il existe quatre types d'élevages (Roguet et al., 2014):

① **Exploitations porcines spécialisées sans ou avec très peu d'herbivores.** Ces exploitations représentent 39% des élevages et 61% des porcs y sont produits. Elles sont subdivisées en trois sous types : naisseur /engraisseur ou naisseur ou engraisseur.

Les naisseurs / engraisseurs. Il s'agit du type d'élevage le plus répandu en France. Il assure toutes les étapes de l'élevage, de la naissance des porcelets à l'engraissement des porcs charcutiers. Les exploitations ont en moyenne 215 truies et disposent de 59 hectares (ha).

Les naisseurs : L'éleveur élève les truies, les verrats, fait naître les porcelets et les élève jusqu'au moment de leur sevrage. Ces exploitations ont en moyenne 431 truies et 33 (ha)

Les engraisseurs : L'éleveur se fournit en porcelets sevrés auprès d'un autre éleveur « Naisseur » et élève les porcs charcutiers jusqu'à ce qu'ils soient prêts à partir pour l'abattage. Cette période d'engraissement dure environ 6 mois et permet d'amener les animaux à un poids de 115 à 120 kilogrammes de poids vif (INAPORC, 2017).

② **Les exploitations d'élevages de polyculture-élevage :** Ces exploitations représentent 19% des élevages et 11% des porcs y sont produits. Ce type d'élevage est subdivisé en deux sous types selon que des herbivores sont associés ou non aux porcs.

③ **Les exploitations d'élevages mixtes :** Ce type d'exploitation est subdivisé en deux sous types selon que le porc est associé à des vaches laitières ou d'autres herbivores.

④ **Les exploitations d'herbivores ou des grandes cultures spécialisées** comprenant un petit atelier porcin (4% des élevages et 1 % des porcs).

Les systèmes d'élevage

Il existe en France 3 systèmes d'élevage pour les porcs : en bâtiment sur caillebotis, en bâtiment sur paille, en plein air. En fonction de ses aspirations et des caractéristiques de son exploitation (ancienneté, surface, nombre de personnes, climat...), l'éleveur fait le choix de l'un ou l'autre mode d'élevage. Il peut également combiner élevage sur paille et élevage sur caillebotis, ou encore bâtiments et accès extérieur pour les animaux.

L'élevage en bâtiment sur caillebotis

Ce système représente 90% des élevages de porcs en France. Il est le plus répandu en Europe et dans le monde. Les animaux vivent dans des bâtiments dont le sol est ajouré. Appelé caillebotis, ce sol permet l'évacuation rapide des déjections animales et de l'eau de lavage du sol dans des fosses situées dans la partie basse des bâtiments. Le porc est un animal qui aime la propreté : l'élevage sur caillebotis répond à ce besoin en permettant de garder un espace de vie toujours propre pour les animaux. Le mélange de déjections et d'eau s'écoule ensuite vers des cuves de stockage : les fosses à lisier. Le lisier est stocké en attendant le moment propice à la fertilisation des cultures.

L'élevage en bâtiment sur litière

Ce type d'élevage représente 5% des élevages de porcs en France. Comme pour l'élevage sur caillebotis, les porcs sont élevés dans des bâtiments à une différence près : le sol n'est pas ajouré mais bétonné et recouvert d'une litière. Cette litière, faite la plupart du temps de paille, peut également être constituée de sciure ou de copeaux de bois. Ce type d'élevage nécessite d'avoir suffisamment de paille disponible et demande davantage de main d'œuvre car la litière doit être changée régulièrement pour conserver un espace suffisamment propre aux animaux. Ce système est en outre souvent lié à des démarches qualité spécifiques.

L'élevage en plein air

Ce type d'élevage représente 5% des élevages de porcs en France. Dans ces élevages, les animaux sont élevés à l'extérieur. Le porc étant un animal sensible aux variations de température, il doit être protégé du froid et de la chaleur. L'éleveur dispose alors des abris paillés à l'intérieur et surmontés d'une toiture en tôle. Il met également en place des clôtures de protection contre la faune sauvage. Ce système d'élevage nécessite de disposer de surface de terres suffisantes pour assurer une rotation des parcelles. L'élevage en plein air est souvent lié à des démarches qualité spécifiques.

4.2. *Salmonella* dans la Filière Porcine

4.2.1. Les enjeux de Santé Publique

Les salmonelles sont la cause bactérienne la plus fréquente des infections d'origine alimentaire en France et sont omniprésentes dans de nombreuses productions animales (David et al., 2013). A côté de la volaille, des poules pondeuses et des dindes, les porcs sont une des espèces animales responsables de la transmission de *Salmonella* aux humains. Il a été estimé par l'EFSA que 10-20 % des infections humaines à *Salmonella* dans l'Union Européenne peuvent être attribuables aux porcs et produits de porcs (EFSA and ECDC, 2010a).

Les études de source attribution estiment que les porcs sont la source principale de salmonellose en Europe du Sud (43,6 % de tous les cas). La France fait partie des 8 pays où les porcs sont les contributeurs les plus importants dans les salmonelloses humaines (Bonardi, 2017). La part des salmonelloses humaines attribuée au porc et à la viande de porc peut varier considérablement entre les différents pays. Elle dépend principalement de la prévalence de *Salmonella* chez les porcs et dans la viande de porc et aussi des habitudes et des préférences de consommation et de l'importance relative des autres sources de *Salmonella*. Les cas humains sont la conséquence de la consommation de viande mal cuite et de la contamination croisée dans la cuisine (Bollaerts et al., 2009). La viande de porc fraîche est aussi une source importante de salmonellose en Italie (Giovannini et al., 2004).

4.2.2. Les enjeux réglementaires

Pour les salmonelles, la réglementation européenne (directive zoonose CE 99/2003/et règlement CE/2160/2003 du 17 novembre 2003) prévoit la mise en place de dispositifs de surveillance de tous les sérovars de *Salmonella* aux différents maillons de la chaîne de production pour les porcs reproducteurs et les porcs charcutiers. Cette réglementation était initialement applicable en 2009, cependant il faut l'accord des experts scientifiques sur les modalités de surveillance et de maîtrise, ainsi que sur le rapport coût-bénéfice des différents plans de surveillance envisagés (Corregé and Minvielle, 2013). Les critères réglementaires pour *Salmonella* dans les denrées alimentaires sont établis dans le règlement CE/2073/2005 qui a été imposé depuis le 1er Janvier du 2006. Dans les états membres de l'Union Européen, les programmes nationaux de surveillance de *Salmonella* dans la viande et produits de porcs sont basés sur la collecte d'écouvillons de carcasse (chiffonnage) dans les abattoirs, et d'échantillons des viandes dans les usines de production. Le règlement CE/217/2014 est une

révision du règlement CE/2073/2005 et a réduit le nombre acceptable de porcs positifs à *Salmonella* de 5 pour 50 (10%) à 3 pour 50 (6%). Si ce taux est dépassé, les entreprises doivent mettre en place des interventions appropriées pour réduire le nombre des carcasses contaminées (Bonardi, 2017).

Vu les dispositions des règlements CE/852/2004 du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires et CE/1831/2003 du 22 décembre 2003 relatif à l'hygiène des aliments pour animaux, le gouvernement Français a encouragé toutes les organisations professionnelles de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale à élaborer, à diffuser et à aider à la mise en œuvre des guides de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP. Pour les élevages de porcs, ce guide (GBPH, 2009) s'intéresse à toutes les activités dont est responsable l'éleveur et qui sont liées à la production d'animaux destinés à la consommation humaine, depuis la réception des intrants (animaux, matières premières...) jusqu'au départ des extrants (animaux d'élevage ou de boucherie, effluents).

4.2.3. Les enjeux économiques

Les pertes directes en élevage provoqués par les salmonelles sont négligeables en Europe car les épisodes de salmonellose clinique sont rares et circonscrits dans le temps et l'espace et répondent bien aux traitements antibiotiques. Par contre les coûts indirects induits par les cas humains (arrêts de travail, traitements, hospitalisation, séquelles et parfois décès) bien que difficiles à évaluer précisément, sont très importants (Corregé and Minvielle, 2013).

Le Service de Recherche économique de l'USDA (United States Department of Agriculture) aux États-Unis a estimé le coût annuel des maladies d'origine alimentaire dues à *Salmonella* (non-Typhoïdique) à 3 milliard de dollars (USDA, 2013). Dans l'Union Européenne, le coût globale de la salmonellose humaine peut atteindre 3 milliards d'euros (EFSA, 2014).

4.2.4. Enjeux environnementaux

La propagation du lisier contaminé par *Salmonella* dans les champs et les cultures peut constituer une menace d'un point de vue environnemental (Fablet, 2006). De plus, le lisier qui est répandu dans les pâturages représente un risque de contamination pour d'autres animaux comme les vaches laitières (Baudart et al., 2000). Plusieurs enquêtes ont démontré que les infections à *Salmonella* dans les élevages de porcs conventionnels peuvent persister dans l'environnement du troupeau pendant plusieurs mois et même années. La contamination de

l'environnement peut constituer une source importante d'infection dans les élevages de porcs (Jensen et al., 2006).

4.3. Epidémiologie des infections par *Salmonella* dans la filière porcine

4.3.1. Prévalence de *Salmonella* dans la filière porcine

Prévalence dans l'Union Européenne.

Lors d'une enquête menée en 2008 dans l'Union Européenne sur des élevages reproducteurs comptant au moins 50 porcs reproducteurs, la prévalence était de 31,8% (95 % d'intervalle de confiance, IC) (EFSA and ECDC, 2009).

En 2015, neuf états membres ont signalé des données sur la prévalence de *Salmonella* chez les porcs. La proportion globale d'échantillons de porcs positifs à *Salmonella* était de 11,5%. Les données représentent à la fois des systèmes de porcs reproducteurs et d'engraissement et ont été obtenues à la ferme ou au niveau de l'abattoir. Les types d'échantillons positifs étaient les suivants : fèces, ganglions lymphatiques, échantillons d'organes ou de tissus, écouvillons de carcasse et échantillons environnementaux. En raison du nombre différent d'animaux testés et de différences entre les états membres dans le choix des matrices d'échantillonnage, les comparaisons entre les années et les pays doivent être faites avec prudence (EFSA and ECDC, 2016).

Prévalence en France

En 2008, une étude sur *Salmonella* chez les porcs reproducteurs a été menée dans les États membres de l'Union européenne (EFSA 2009). Cette étude a révélé que 50,3% des fermes de sélection et 38,7% des fermes de production en France étaient infectées par *Salmonella*.

En 2006–2007, une enquête épidémiologique européenne menée dans des abattoirs en France a déterminé une prévalence individuelle de 18,4% dans les ganglions de porcs, 18,6 % sur les carcasses, et une sérologie positive de 21 % dans les jus de viande (Robinault et al., 2008).

4.3.2. Sources de contamination

Bien que la transmission de *Salmonella* se produise en général par voie féco-orale ou par l'air, d'autres sources peuvent servir de vecteurs. C'est le cas par exemple des animaux sauvages et

des aliments pour animaux (McChesney et al., 1995). Les déjections de souris peuvent contenir jusqu'à 10^5 UFC de *Salmonella*.

A l'occasion d'une enquête sur la contamination par *Salmonella*, qui impliquait 23 élevages de porcs, un large éventail d'animaux sauvages a été trouvé positifs à *Salmonella* (souris, rats, chats) (Davies and Wray, 1997). Cette même étude a également mis en évidence des contaminations dans les aliments, les réserves de céréales. Elle a aussi démontré l'importance des rongeurs dans la perpétuation de l'infection des bâtiments ainsi que la présence régulière de renards infectés dans les fermes d'élevage en plein air.

Une autre étude a mis en évidence un portage important de *Salmonella* par les cafards (25%) et les petits mammifères (11,7%) collectés autour des élevages de porcs à l'île de la Réunion (Tessier et al., 2016). La comparaison par PFGE de ces souches avec celles isolées des porcs à la même période a mis en évidence des profils génétiques similaires entre les porcs et la faune sauvage et plus particulièrement chez les cafards.

4.3.3. Excrétion et portage asymptomatique

L'infection asymptomatique et l'excrétion intermittente posent un grand problème dans la détection et le contrôle de *Salmonella* chez les porcs. Les données de terrain et expérimentales indiquent que certains porcs colonisés par *Salmonella* deviennent des porteurs chroniques, tandis que d'autres peuvent éliminer les bactéries et les disséminer dans l'environnement. Cependant les causes sous-jacentes de telles différences dans la réponse à *Salmonella* au niveau génétique ne sont pas connues (Hurd et al., 2001; Uthe et al., 2009). Une fois que le porc porteur de *Salmonella* est placé dans des conditions stressantes (transport, mélange), le pathogène peut réapparaître et les porcs peuvent excréter *Salmonella* et contaminer ses autres compagnons de lot et l'environnement.

Le stress induit une multiplication de *S. Typhimurium* chez les porcs porteurs due à l'influence du cortisol (Verbrugghe et al., 2011). Par conséquent, il est non seulement important d'identifier les porcs qui sont porteurs et peuvent devenir des excréteurs, mais il est également important d'empêcher le statut de porteur et éliminer l'excrétion de *Salmonella* (Uthe et al., 2009). Les jeunes animaux qui sont confinés dans des situations de densité élevée, ont un contact intensif avec les fèces des autres porcs ou d'autres facteurs environnementaux comme les cadavres. L'excrétion et la dissémination dans ces conditions sont favorisées par les fortes doses de *Salmonella*, par le comportement exploratoire du cochon et l'inefficacité du système immunologique des porcelets (Michiels et al., 2012).

Des études chez des porcs infectés expérimentalement avec *S. Typhimurium* ont déterminé des différences phénotypiques et une variabilité importante dans l'excrétion et la réponse immunitaire des porcs (Huang et al., 2011; Knetter et al., 2015). Dans leurs travaux, ils ont décrit l'existence de faibles excréteurs (LS Low shedders) et excréteurs persistantes (PS Persistent shedders). La quantité de bactéries excrétées une fois qu'un porc devient infectieux a une grande importance. Diverses études ont précédemment établi l'existence de super excréteurs chez d'autres animaux comme chez le bovin pour *Escherichia coli* O157, et prouvé que ces animaux ont un rôle important dans la dynamique de la transmission. Certains porcs excrètent plus de bactéries que d'autres et peuvent être classés comme « super-excréteurs » ou « super-shedders ». La présence potentielle de porcs «super-excréteurs» est importante pour l'industrie car elle souligne le besoin d'interventions pour résoudre ce problème (Berriman et al., 2013).

Le niveau de contamination de l'environnement est probablement le facteur le plus importante pour la dissémination de *Salmonella* dans un lot de porcs (Osterberg et al., 2010). La possibilité de la transmission entre porcs enfermés ensemble pendant les essais expérimentaux a été démontrée. Une telle transmission résulterait de super-infections, de réinfections, ou l'excrétion passive des *Salmonella* ingérées. Tous ces aspects peuvent produire une sous-estimation de la durée de l'états de non-excrétion et la surestimation de la durée de l'état d'excrétion (Ivanek et al., 2012).

4.3.3. Sérovars impliqués

En 2016, selon les données SERPIG de l'EFSA, parmi tous les isolats notifiés provenant des porcs, le variant monophasique de *S. Typhimurium* était le sérovar le plus commun (34,1%). *S. Typhimurium* est placé en deuxième position (29,5%) et *S. Derby* en troisième position (19,2 %). Les autres sérovars fréquemment signalés chez les porcs sont Rissen, Panama, Goldcoast, Agona, Brandebourg, Londres, Anatum, Manhattan, Enteritidis et Bovismorbificans (EFSA 2015).

Variante monophasique de *S. Typhimurium*

Ce sérovar a été rarement identifié avant le milieu des années 1990 (Arguello et al., 2014). La première description d'une épidémie du variante monophasique de *S. Typhimurium* en Europe était liée au phage type U302 aussi nommée «Clone Espagnol ». Ce clone est apparue en 1997 et est caractérisé par une délétion de l'opéron allantoïne-glyoxylate et de l'opéron fljAB, et possède un modèle résistance ACSuGSTSxT (résistant à l'ampicilline, au chloramphénicol

sulfamide, gentamicine, streptomycine, tétracycline, et co-trimoxazole) (Echeita et al., 2001; Laorden et al., 2010).

De nombreux pays ont signalé une incidence accrue de ce sérovar, particulièrement associé aux troupeaux de porcs (de la Torre et al., 2003) et plus tard au bétail (Switt et al., 2009a). Dans la viande de porc dans l'UE, ce sérovar a été classé comme le troisième sérovar le plus fréquemment rapporté avec 18% de prévalence (EFSA and ECDC, 2016).

S. Typhimurium 1,4, [5], 12 : i : -, diffère de *S. Typhimurium* par l'absence de l'antigène H de seconde phase codé par le gène *fljB*. Plusieurs gènes, y compris *fljB*, *fljA* et *hin*, situés dans l'opéron *fljBA*, sont impliqués dans l'expression de l'antigène flagellaire de phase 2. Le gène *fljB* qui code l'antigène flagellaire de phase 2, le gène *FljA* qui code un régulateur négatif de *fliC*, et l'antigène flagellaire de phase 1 et le gène *hin* (qui code une invertase d'ADN) sont responsables de la variation de phase flagellaire, un mécanisme régulateur impliquant la production de *FliC* ou *FljB* (Switt et al., 2009b).

Ainsi, des mutations, des délétions, ou des insertions dans *fljB* lui-même, avec l'altération dans le mécanisme de régulation de la variation de phase, pourraient empêcher l'expression de l'antigène flagellaire de phase 2. De manière intéressante, divers profils de délétion de *fljB*, ainsi que des délétions au sein d'autres gènes de l'opéron *fljBA* et des gènes environnants (*iroB* et *STM2757*), ont été détectés (Soyer et al., 2009b). Récemment, d'autres particularités ont été décrites pour le variant monophasique de *S. Typhimurium*, comme un nouvel îlot génétique spécifique, désigné SGI-3. Cet îlot est inséré au niveau du locus *yjdC* codant pour la résistance aux métaux lourds, spécialement au sulfate de cuivre, un additif couramment utilisé dans l'alimentation animal (Petrovska et al., 2016).

Concernant la pathogénicité de ce sérovar chez le porc, une étude réalisée dans des cellules épithéliales porcines suggère que l'expression monophasique de *FliC* n'affecte pas les fonctionnalités du variant monophasique de *S. Typhimurium* pendant l'adhésion et l'invasion (Crayford et al., 2014).

Salmonella Typhimurium

Les infections à *S. Typhimurium* chez les porcs causent des pertes économiques considérables et des problèmes de santé publique car les porcs sont un réservoir d'infection pour les humains (Boyen et al., 2009). *S. Typhimurium* développe la plupart de temps seulement une entérocolite de sévérité variable (Huang et al., 2011) mais ils peuvent aussi présenter une phase systémique (Stevens and Gray, 2013).

La mise en œuvre de la lysotypie pour ce sérovar a mis en évidence 200 phage types (Bergeron et al., 2010). Chez les humaines, le phage type DT104 a causé une importante maladie émergente pendant les années 1990, et était associé à l'augmentation de résistance à plusieurs antibiotiques comme l'ampicilline, le chloramphénicol, la streptomycine, les sulfamides et la tétracycline (Bergeron et al., 2010; Gebreyes et al., 2006).

Aux États-Unis, entre 1998 et 2008, parmi les 37 épidémies associées au porc, le sérovar Typhimurium étaient le plus impliqué dans 22% des cas (Jackson et al., 2013).

***Salmonella* Derby**

S. Derby a été isolé pour la première fois chez les humains dans une toxi-infection d'origine alimentaire avec une tarte au porc à Derby, en Grande-Bretagne (Peckham and Savage, 1923). Ce sérovar est étroitement lié au porc et aux dindes mais rarement associé aux autres espèces animales. Récemment, il a été reconnu comme pathogène d'origine alimentaire et est principalement associé à l'abattage des porcs ou des produits de porc dans de nombreuses régions du monde (Kerouanton et al., 2013b; Mannion et al., 2007; Xu et al., 2017). Bien que l'on considère que *S. Derby* joue un rôle mineur dans les cas de salmonellose humaine, il est toujours considéré comme un danger pour la santé publique (Osterberg et al., 2009). Des épidémies causées par *S. Derby*, ont été sporadiquement signalées dans le monde entier, en particulier au Japon, aux États-Unis, en Australie et en Europe (Ebuchi et al., 2006; EFSA and ECDC, 2011; Sanders et al., 1963). Elles étaient associées à de la viande contaminée dont la source n'a pas été élucidée.

Des études sur la pathogénicité de *S. Derby* chez les porcs ont démontré que *S. Derby* s'attache préférentiellement plus au jéjunum qu'au colon (Hayward et al., 2014). Une particularité importante de *S. Derby* est la présence dans son génome de l'îlot de Pathogénicité 23 (SPI-23). Cet îlot joue un rôle important dans le tropisme tissulaire de *S. Derby* sur le jéjunum et porte le gène *potR* qui intervient dans l'adhésion aux cellules jéjunales (Hayward et al., 2016).

Le Tableau 6 présente les caractéristiques génomiques des trois sérovars les plus fréquemment associés au porc en France.

Tableau 6. Caractéristiques génomiques de *S. Typhimurium*, *S. Derby* et du variant monophasique de *S. Typhimurium*

	<i>S. Typhimurium</i> LT2 (McClelland et al., 2001)	<i>S. Derby</i> 07CR553 (Kerouanton et al., 2015)	<i>S. Typhimurium</i> 1,4, [5], 12, i : - (Dyall-Smith et al., 2017)
Taille (pb)	4 857 432	4 823 293	4 999 862
G+C contenu	52	53	52.2
rRNA clusters	7	7	8
tRNA clusters	85	72	84
CDS	4.489	4.509	5.300

pb : paire de bases G+C : Guanine + Cytosine CDS : Coding DNA sequences

4.3.4. Facteurs de risque à la ferme

Le nombre de sources potentielles d'infection à *Salmonella* pour une population porcine est pratiquement illimité. De nombreuses études épidémiologiques ont été conduites dans les élevages de porcs à travers le monde. Elles ont mis en évidence l'importance du type d'aliment, de l'usage des antibiotiques, de l'infection avec d'autres agents, des pratiques d'hygiène, du type de sol, des contacts entre porcs, etc.

Aliment

L'aliment constitue le substrat nutritionnel pour les porcs et influe sur leur écosystème microbien gastro-intestinal. De nombreuses études ont reporté une association entre les aliments en granules et le risque élevé d'infection à *Salmonella*, sur la base de la prévalence bactériologique et sérologique (Rostagno and Callaway, 2012). Les changements dans la structure physique des aliments permettent des changements dans l'osmolarité, le pH et production de mucine. Les aliments en granules diminuent l'acidité de l'estomac (élévation du pH). Au contraire, l'aliment liquide (spécialement celui fermenté) diminue le pH, favorise les populations microbiennes et peut créer une ambiance hostile pour *Salmonella* (Hotes et al., 2010).

L'aliment peut aussi être une source de contamination par *Salmonella*, ce qui apporte d'autres facteurs de risque associés aux aliments. En effet, il a été démontré que les animaux peuvent être infectés à la suite de l'ingestion d'aliments contaminés. Un contrôle approprié et les étapes de décontamination sont nécessaires pendant la fabrication des aliments pour réduire

les contaminations. Toutes les matières premières peuvent être considérées comme contaminées potentiellement (Davies et al., 2004). Cependant, dans la plupart de cas la contamination est susceptible de se produire avec une prévalence faible (<10% des échantillons testés dans un lot contaminé) (Davis et al., 2003). En France dans une enquête sur la contamination des aliments à la ferme, 154 matières premières et 84 aliments ont été contrôlés. Deux tourteaux (soja et colza), un coproduit sec (pain) et un aliment pour truie gestante provenant de quatre élevages différents se sont révélés positifs à *Salmonella* (Royer et al., 2014). Ces résultats confirment que la contamination des céréales est faible et que les tourteaux sont la principale source de contamination potentielle des aliments (EFSA and ECDC, 2012).

Usage des antibiotiques

Les résultats rapportés sont habituellement contradictoires lorsqu'on essaie de déterminer le rôle potentiel des antibiotiques spécifiques comme facteur de risque *Salmonella* en élevages de porc (Beloeil et al., 2007; Farzan et al., 2006; Funk et al., 2007). L'utilisation d'antibiotiques dans les élevages porcins affecte la résistance bactérienne, et influence l'émergence de pathogènes résistants d'origine alimentaire tels que *Salmonella* (Farzan et al., 2010).

Infections produites par d'autres agents microbiens

Le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) et *Lawsonia intracellularis*, ont été associés à l'excrétion de *Salmonella* chez les porcs en fin d'engraissement (Beloeil et al., 2004).

Facteurs associés au management et aux caractéristiques des élevages

D'autres facteurs ont été identifiés comme pouvant être liés à une prévalence plus élevée en *Salmonella* comme la taille de l'élevage (Beloeil et al., 2007), l'hygiène et désinfection (Lo Fo Wong et al., 2004), le type de sol (Hotes et al., 2010; Nollet et al., 2004).

4.3.5. Facteurs de risque à l'abattoir

Les facteurs de risque pour la contamination par *Salmonella* dans les abattoirs peuvent être associés aux porcs et à la ligne de production (Berends et al., 1997). Les porcs porteurs de salmonelles lorsqu'ils quittent la ferme constituent la source principale de *Salmonella* pour la contamination à l'abattoir. Il y a de nombreux facteurs de risque avant l'abattage comme la proportion des porcs infectés par *Salmonella*, le stress lié au transport et l'exposition des porcs

à *Salmonella* pendant le transport et l'attente (Rostagno and Callaway, 2012; Rostagno et al., 2003a).

Pour réduire le stress des animaux avant l'abattage les porcs sont placés dans des parcs d'attente. Cette période est variable entre les abattoirs et peut avoir une durée de 30 minutes à 2 heures (Delhalle et al., 2008). Un temps d'attente de plus de 2 heures avant l'abattage est considéré comme un facteur de risque pour la contamination des porcs par *Salmonella* (Swanenburg et al., 2001).

L'éviscération est l'une des sources les plus importantes de contamination bactérienne pendant le processus d'abattage. Il a été démontré que l'augmentation en *Salmonella* et *Escherichia coli* est associée à cette étape (Delhalle et al., 2008). Les pratiques d'éviscération sont responsables de 55 à 90% des contaminations à *Salmonella* sur les carcasses (Berends et al., 1997).

Les amygdales ont une contamination élevée en *Salmonella* et peuvent avoir aussi un rôle dans la dissémination de cette bactérie à l'abattoir (Hald et al., 2003; Van Damme et al., 2018). Au cours de la procédure d'abattage traditionnelle, qui implique l'enlèvement de la langue avec les amygdales attachées ensemble, et d'autres organes comme la trachée, les poumons, le foie et le cœur, parfois les reins, la carcasse peut être facilement contaminé par des bactéries (Fredriksson-Ahomaa et al., 2009).

De même, la présence de *Salmonella* dans les ganglions lymphatiques peut poser un risque de contamination au moment des incisions durant l'inspection vétérinaire.

Une fois que la ligne d'abattage est contaminée, *Salmonella* peut être isolée sur les machines, les mains des opérateurs, les couteaux, et les carcasses ce qui indique que les risques de contaminations croisées sont nombreux.

4.4. Infection par *Salmonella* chez les porcs

4.4.1. Etapes de la colonisation par *Salmonella* chez les porcs

La colonisation par *Salmonella* chez les porcs est caractérisée par trois phases:

Colonisation des intestins

Salmonella peut s'adapter à une grande variété d'environnements et d'hôtes avec des particularités anatomiques, histologiques, immunologiques et de composition du microbiote.

La première phase de la colonisation dans l'intestin du porc est l'adhésion à l'épithélium intestinal qui est facilitée par les flagelles et les fimbriae. Dans une étude menée pour déterminer les gènes associés à la colonisation dans les réservoirs primaires de *Salmonella* comme les porcs, les poulets et les bovins, la présence des nombreux gènes associés à la motilité flagellaire a été décrite. Notamment, *fliN*, *flgN*, *fliB* et *fliZ* seraient essentiels à l'infection des porcs, mais non requis pour l'infection du poulet ou du veau (Chaudhuri et al., 2013). *S. enterica* exprime des adhésines alléliques spécifiques qui reconnaissent les récepteurs intestinales des hôtes et les cibles cellulaires et achèvent la colonisation. D'autres souches, qui ne portent pas ces ligands ne peuvent pas être retenues par l'hôte. La multiplication et l'excrétion ces souches de *Salmonella* sur le long terme entraînent une gastro-entérite et / ou persistance dans l'hôte (Yue and Schifferli, 2014) (Figure 16).

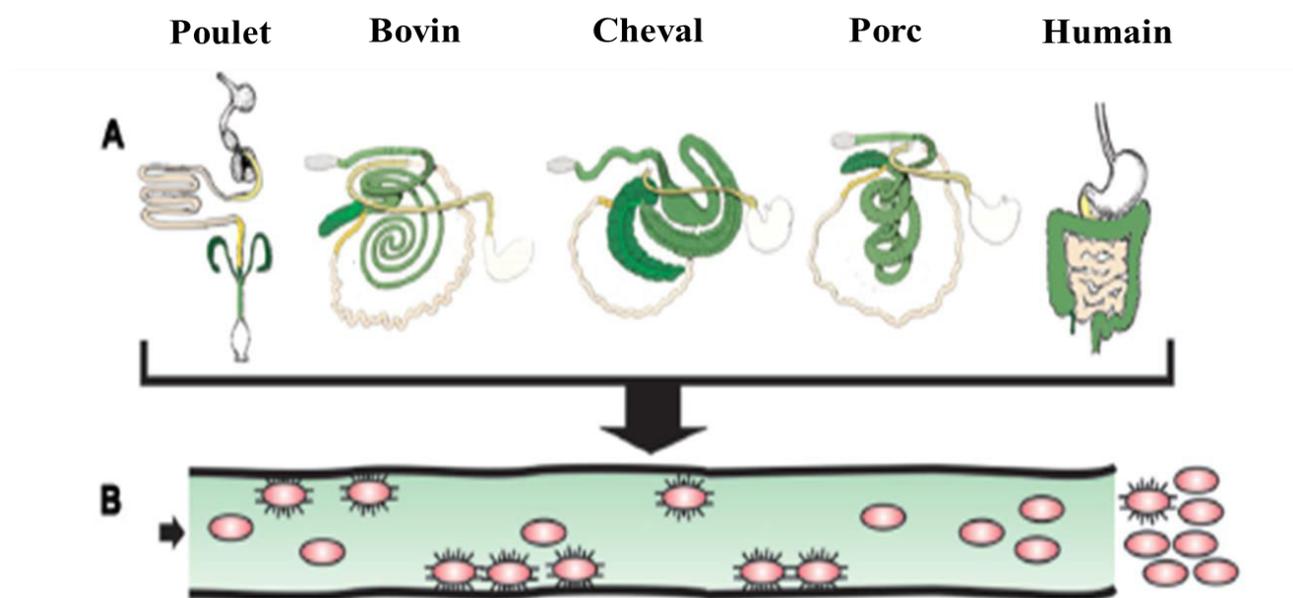


Figure 16. Modèle de la colonisation de la surface intestinal A: *Salmonella* peut se adapter aux diverses anatomies du tractus gastro-intestinal des différents animaux B: *S. enterica* exprime des adhésines alléliques spécifiques pour débiter la colonisation

Invasion des entérocytes

L'invasion de la muqueuse intestinale porcine ne peut pas se faire sans l'îlot de pathogénicité SPI-1 et le système de sécrétion de type III (T3SS). Le T3SS facilite l'absorption et l'invasion endothéliale et est associé à SPI-1, qui héberge des gènes de virulence impliqués dans l'adhésion, l'invasion et la toxicité des salmonelles (Stevens et al., 2009). Le SPI-1 de *S. Typhimurium* est nécessaire pour une colonisation efficace de l'intestin du porc, mais une

fois internalisées dans les cellules hôtes, les bactéries expriment un second T3SS codé par SPI-2 (SPI-2 T3SS), qui permet de créer les infections systémiques et la pathogénèse intracellulaire (Hensel, 2000).

Dissémination bactérienne

Certains sérovars de salmonelles peuvent envahir les amygdales des porcs 30 minutes après le contact oral avec la source de contamination et en 2-3 heures ils peuvent coloniser les ganglions lymphatiques mandibulaires, le colon, le caecum et les ganglions lymphatiques iléo-caeaux (Hurd et al., 2001). *Salmonella* peut persister dans plusieurs organes, y compris les amygdales (Fedorka-Cray et al., 1995b), et est aussi capable de survivre et de proliférer dans les phagocytes et les leucocytes, ce qui entraîne une possible translocation vers le tissu lymphoïde associé à l'intestin.

4.4.2. Génétique de la colonisation par *Salmonella* chez les porcs

Une variation génétique (single nucleotide polymorphisme, SNP) dans le gène CCT7 porcin est associée à la circulation des neutrophiles, globules blancs et monocytes ainsi qu'à l'excrétion de *Salmonella* dans les fèces des cochons infectés de manière expérimentale (Uthe et al., 2009)

Le même auteur a décrit une association entre les SNP et l'excrétion et la colonisation de *Salmonella* chez le porc. Trois gènes sont, entre autres, impliqués (Uthe et al., 2011):

- le gène *HP* (haptoglobine) qui code une protéine de phase aiguë impliquée dans le métabolisme de l'hémoglobine et l'inflammation. Elle prévient aussi la perte de Fer et l'endommagement causé par l'oxygène.
- le gène *NCF2* (neutrophil cytosolic factor) code une sous-unité du cytosol qui produit une enzyme qui exerce un effet microbicide sur *Salmonella*.
- le gène *PGD* (phosphogluconate déshydrogénase) qui code l'enzyme PGD qui catalyse la production des pentoses impliqués dans le système de destruction des neutrophiles.

4.4.4. Colonisation chez les porcs infectés expérimentalement

Dose et voies d'inoculation de Salmonella

L'infection expérimentale avec *Salmonella* sp. peut être induite par différentes méthodes comme l'inoculation orale, l'instillation intranasale et l'infection intrapéritonéale. L'utilisation de différentes voies d'inoculation de *Salmonella* produit différents degrés de virulence et influe le statut de porteur de l'animal (Fedorka-Cray et al., 1995b).

Le modèle d'infection orale peut être considéré comme le modèle le plus proche du modèle physiologique. L'infection orale des porcs induit la colonisation et la persistance de *Salmonella* dans les amygdales et l'intestin, avec l'utilisation de doses d'inoculation de *Salmonella* basses, modérées ou élevées (Boyen et al., 2009). La dose minimale de *Salmonella* nécessaire pour l'infection aiguë des tissus de porcs destinés ou non à l'alimentation serait de 10^3 par ml pour une contamination par voie intranasale, ou 10^3 par gramme de fèces si la transmission se fait via un environnement contaminé (Loynachan and Harris, 2005).

Les profils d'excrétion fécale des porcs sont dépendants de la dose d'inoculation (Boyen et al., 2009; Osterberg and Wallgren, 2008). Des porcs inoculés avec des doses élevées de *Salmonella* (10^9 UFC) démarrent l'excrétion plus tôt que ceux inoculés avec des doses plus faibles (10^6 UFC) (Ivanek et al., 2012). L'inoculation de doses de 10^7 UFC peut rendre les animaux positifs mais une dose de 10^9 garanti l'uniformité de l'inoculation. Cependant cette dose diffère grandement de l'infection naturelle (Boyen et al., 2009).

Colonisation des organes

Les amygdales sont décrites comme site primaire de colonisation chez les porcs qui deviennent porteurs asymptomatiques. Mais *Salmonella* peut aussi entrer *via* d'autres organes comme, l'intestin grêle, le poumon et le cordon ombilical. Après infection expérimentale par *S. Typhimurium* et *S. Yoruba*, les bactéries ont été également isolées dans les ganglions lymphatiques (Osterberg and Wallgren, 2008). Chez des porcs expérimentalement infectés avec *S. Typhimurium*, le poumon s'est révélé être l'organe le plus impliqué dans la dissémination systémique de *Salmonella* et les amygdales les plus associées avec la dissémination lymphatique dans l'organisme (Fedorka-Cray et al., 1995b).

4.4.5. Réponse immunitaire des porcs

Particularités du système immunitaire

Cellules B : Les cellules B apparaissent dans les porcelets dans le foie au jour 20, et dans la moelle osseuse à partir du jour 45. Les cellules B sont les premiers lymphocytes à apparaître dans le sang. Les porcelets naissent avec une diversité relative des cellules B.

Thymus : Le thymus se développe 40 jours après la conception du porc et il est colonisé par deux couches de cellules mères T à partir du jour 38.

Transmission passive des anticorps : Le placenta des truies est épithéliochorial c'est-à-dire que l'épithélium du fœtus est en contact avec l'épithélium utérin. Le colostrum des truies a une prédominance d'IgG, mais les concentrations baissent rapidement au cours de la lactation, puis les IgA prédominent.

MHC : Le complexe majeur d'histocompatibilité porcine (Swine Leucocyte Antigen SLA complex) est localisé dans le chromosome 7 et est divisé par un centromère. Le SLA complex porte la région I, II et III. Il est le plus petit parmi les mammifères et contient seulement 2 millions de bases.

Lymphocytes: Ils expriment neuf protéines uniques de surface (SWC1 à SWC9). Plus de 60% de cellules T dans le sang du porc sont double positifs (CD4+ et CD8+) (Tizard, 2013).

Réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée des porcs à *Salmonella* est essentielle pour la suppression précoce des bactéries (Foster and Berndt, 2013). Elle est caractérisée par la production locale de neutrophiles et de médiateurs pro-inflammatoires. Le lipopolysaccharide de *S. Typhimurium* est l'un des plus puissants activateurs du processus de signalisation de monocytes dérivés de macrophages et des monocytes dérivés des cellules dendritiques chez les porcs (Kyrova et al., 2014). Les macrophages et les neutrophiles migrent dans le tissu intestinal des porcs infectés avec *Salmonella* et l'augmentation du taux de polynucléaires neutrophiles dans les villosités intestinales se produit dans les 24 heures post-inoculation. Dans le même délai un nombre significatif de macrophages est observé dans la sous muqueuse, chez des porcelets inoculés avec *S. Typhimurium* (Foster and Berndt, 2013). La détection des composants bactériens par les PRRs conduit à la production de cytokines et stimule la rupture des jonctions serrées entre les cellules épithéliales intestinales. Les cellules phagocytaires

peuvent aussi servir de cibles pour l'invasion et la dissémination de *Salmonella*. Les infections produites par *S. Cholerasuis* ou *S. Typhimurium* induisent la production de TNF, IFN- γ , IL-1 IL-6 IL-8 et IL-18 dans les tissus, plasma et iléon (Uthe et al., 2007).

Réponse immunitaire adaptative

La réponse adaptative est essentielle pour la guérison de l'infection et il y a peu d'information sur l'immunité adaptative au cours de la salmonellose chez les porcs.

L'élimination des pathogènes intracellulaires par l'hôte est principalement réalisée par l'activation des réponses immunitaires médiées par Th1 (Lalmanach and Lantier, 1999). L'immunité protectrice de porcs infectés avec *S. Cholerasuis* a été associée avec l'augmentation d'IgM, IgG et IgA dans le sérum (Gray et al., 1995). Les truies vaccinées confèrent une protection aux porcelets allaités, via le transfert passif d'IgG et IgA (Hur and Lee, 2010).

Concernant les anticorps, ils reconnaissent les épitopes communs aux différents sérovars et suggère que l'immunité passive peut être conférée pour un même sérovar et entre différents sérovars en utilisant les mêmes anticorps (Letellier et al., 2001).

Le rôle des cytokines dans les réponses immunitaires a été étudié dans les infections par *S. Cholerasuis* et *S. Typhimurium*. L'INF- γ est une cytokine importante dans les réponses innées et adaptatives des porcs contre les infections dues à *Salmonella*. L'INF- γ produit par les cellules T CD8+ joue un rôle important dans l'immunité protectrice contre les infections dues à *S. Cholerasuis* virulente chez les porcs (Zhu et al., 2017).

5. Problématique de l'Etude

Dans les pays industrialisés, la sécurité sanitaire des denrées alimentaires est un enjeu majeur pour les pouvoirs publics en termes de santé publique, et pour les secteurs de la production animale et de l'agro-alimentaire où elle peut constituer un atout concurrentiel pour les échanges internationaux.

Salmonella est l'un des agents pathogènes d'origine alimentaire transmis à l'homme les plus fréquents. La consommation de porc est considérée comme une source majeure d'infection humaine à *Salmonella*. Les porcs sont reconnus comme réservoir de *Salmonella* et les animaux infectés ne développent généralement pas de signes cliniques, mais ils hébergent la bactérie dans leur tractus digestif et l'excrètent *via* leurs fèces. La lacération d'un tube digestif contaminé expose la carcasse et l'environnement de l'abattoir à la bactérie, et peut contribuer à la contamination des autres carcasses par contamination croisée, notamment au moment de l'éviscération.

Dans un objectif de réduction des risques tout au long de la filière porcine, une maîtrise de la pression de contamination par les salmonelles doit passer par une gestion du problème dès l'amont de la filière, c'est-à-dire à l'élevage. Cela peut se faire en mettant en œuvre des moyens permettant de diminuer la prévalence du portage intestinal de *Salmonella* chez les porcs.

Des études épidémiologiques menées par différents auteurs en France et dans des autres pays ont mis en évidence l'existence de plusieurs facteurs de risque qui peuvent influencer sur la contamination des porcs au niveau de l'élevage. Il est donc difficile de mettre en place une stratégie unique pour réduire la présence de *Salmonella* dans la production porcine, en particulier à la lumière de la forte dynamique de la gestion de l'exploitation, qui modifiera continuellement les facteurs de risque au fil des ans. En plus d'être exhaustive, la stratégie doit aussi être simple pour l'agriculteur, de sorte qu'elle puisse facilement être induite dans la routine quotidienne de la ferme (Gotter et al., 2012). Pour pouvoir établir les dynamiques d'infection dans les élevages classiques et les probables facteurs de risque de la contamination de *Salmonella* des études longitudinales peuvent être utilisées.

En France, trois sérovars sont majoritairement isolés chez le porc à l'élevage ainsi que sur les produits de porcs à la distribution : *S. Typhimurium*, *S. Derby* et le variant monophasique de *S. Typhimurium*. Aujourd'hui, le consommateur a la même probabilité de rencontrer l'un ou l'autre de ces trois sérovars sur la viande de porc (données Réseau *Salmonella*, Anses) mais le

risque en terme de santé humaine ne semble pas être le même selon le sérovar ingéré. En effet, si les trois sérovares sont présents dans la viande de porc avant ingestion, le sérovar Typhimurium et le variant monophasique sont largement plus impliqués dans les salmonelloses humaines. Ces sérovares semblent donc plus virulents que Derby.

Objectifs de la thèse

Dans ce contexte, nous avons souhaité décrire la dynamique d'infection par *Salmonella* des porcs en élevage classique, par le biais d'une étude sérologique (Partie II) et en élevage expérimental par une étude de colonisation des porcs (partie III-2).

En particulier, nous nous sommes attachés à recueillir des données sur la colonisation des porcs par les trois principaux sérovares retrouvés chez le porc en France, *S. Typhimurium*, *S. Derby* et le variant monophasique de *S. Typhimurium*. Pour y parvenir, nous avons observé leur capacité de colonisation, *in vivo* (élevage expérimental) (Partie III-3).

De même, nous nous sommes intéressées au pouvoir pathogène chez l'homme de ces trois sérovares d'origine porcine en testant leur virulence, *in vivo* en inoculant des larves d'insecte *Galleria mellonella* et *in vitro* en testant leur capacité d'adhésion et d'invasion sur cellules intestinales humaines Caco-2 (Partie IV).

La finalité de ce projet était d'apporter des connaissances sur ce pathogène chez le porc pour aider à la mise en place de moyens de maîtrise des salmonelles dans les élevages de porcs et pour évaluer le risque des salmonelles d'origine porcine vis-à-vis du consommateurs.

CHAPITRE II :

DYNAMIQUE DE L'INFECTION PAR
***SALMONELLA* DES PORCS EN**
ELEVAGE CONVENTIONNEL

1. Introduction

Salmonella est une bactérie zoonotique Gram-négative responsable de maladies à partir des aliments contaminés d'origine animale. Ce pathogène d'origine alimentaire était le deuxième agent bactérien responsable de la gastro-entérite dans l'Union européenne en 2015 (EFSA et ECDC 2016). L'incidence des cas de salmonellose humaine a été récemment estimée à 307 pour 100,000 habitants, soit 192 450 cas par an en France (Van Cauteren et al. 2015).

Les porcs sont un réservoir reconnu de *Salmonella* et la prévalence de *Salmonella* dans l'industrie porcine française est élevée: 38,7% des exploitations (EFSA et ECDC 2009) et 17,6% des carcasses de porc (EFSA et ECDC 2008) sont positives à *Salmonella*. Entre 10% et 20% des infections humaines à *Salmonella* dans l'UE sont attribuées au porc (EFSA et ECDC 2010), et le porc se classe au troisième rang parmi les catégories d'aliments associées aux salmonelloses humaines (Bonardi 2017).

Les infections des porcs par *Salmonella* sont généralement asymptomatiques et relativement bien connues (Matiasovic et autres 2014). Les porcs sont généralement infectés à la ferme par transmission orale-fécale, bien que l'infection par contact naso-nasal soit également possible (Nollet et al., 2005). Plusieurs facteurs influençant la prévalence de *Salmonella* dans les élevages porcins ont été rapportés: mesures de biosécurité, hygiène, co-infections virales telles que l'infection par le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV), traitement antibiotique (Beloeil et al. 2007), autres animaux de l'exploitation ou animaux sauvages (Gotter et autres 2012). Des modèles statistiques utilisant les données sérologiques peuvent aider à identifier l'âge auquel les porcs sont infectés. En outre, les données de séroprévalence intra-troupeau peuvent être utilisées pour catégoriser les troupeaux de porcs et peuvent donc avoir un impact sur les décisions des exploitants du secteur alimentaire concernant l'utilisation de viande provenant de troupeaux à risque élevé pour les produits de porc crus (Meemken et al. 2014).

Des tests sérologiques tels que l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sont utilisés pour détecter les anticorps dirigés contre *Salmonella* dans le jus de viande et le sérum des porcs (Vico et Mainar-Jaime 2011) et sont avantageux car ils sont rapides et relativement peu coûteux. Ils donnent une indication de l'exposition antérieure à *Salmonella* et ne sont pas nécessairement corrélés avec l'excrétion de *Salmonella* par les porcs au moment du test (Farzan et al. 2007). Cependant, la sérologie est considérée comme l'une des meilleures alternatives pour établir le niveau d'exposition aux salmonelles d'un troupeau (Vico 2012) et

peut aider à prédire le risque d'excrétion de *Salmonella* à l'abattage (Beloil et autres 2004, Mainar-Jaime et autres 2017). Pour suivre la dynamique de *Salmonella* sp. au cours du temps, dans les troupeaux porcins, des études longitudinales sur l'état bactériologique et sérologique des porcs doivent être effectuées (Vigo et autres, 2009). Cependant, comme ces études sont fastidieuses et coûteuses, peu d'études longitudinales décrivant la dynamique de l'infection à *Salmonella* et la réponse sérologique chez les porcs ont été menées (Beloil et al., 2003; Kranker et al., 2003; Nollet et al., 2005). De plus, les pratiques de gestion des élevages peuvent varier dans le temps et l'espace, ce qui peut modifier les facteurs de risque (Gotter et al. 2012).

Le but de cette étude était i) d'établir la séroconversion de *Salmonella* sur trois fermes de naisseur-engraisseur par l'étude de trois lots de porcs dans chaque ferme et ii) d'explorer les facteurs qui peuvent être associés à l'âge de la séroconversion à *Salmonella*.

2. “Longitudinal study on *Salmonella* age-time to seroconversion in farrow-to-finish farms”

Publication soumise dans *Vet Record Open*

María Cevallos-Almeida^{1,3}, Christelle Fablet², Catherine Houdayer¹, Virginie Dorenlor², Florent Eono², Martine Denis¹, Annaëlle Kerouanton¹

¹ ANSES, Hygiene and Quality of Poultry and Pig Products Unit, Bretagne Loire University, BP 53, 22440 Ploufragan, France.

² ANSES, Swine Epidemiology and Welfare Research Unit, Bretagne Loire University, BP 53, 22440, Ploufragan, France.

³ Central University of Ecuador, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics. Quito, Ecuador

ABSTRACT

A longitudinal study was carried out on three farms to describe the serological response to *Salmonella enterica* in pigs and to investigate the factors associated with the age-time to *Salmonella* seroconversion. Three batches of 40 piglets selected at random from 10 sows (4 piglets per sow) were monitored on each farm. Blood samples were taken from sows one week after farrowing and from piglets at weeks 1, 6, 10, 14, 18, 22 and at the slaughterhouse. *Salmonella* antibodies were detected in serum by an ELISA. The relationships between the serological status of sows and piglets were assessed. The age-time to seroconversion was calculated. Factors related to farm characteristics were recorded to assess their effect on the age-time to *Salmonella* seroconversion.

At week 1, all the sows were positive. The serological results of piglets at weeks 1 and 6 were significantly and positively correlated with sows. The first seroconversions occurred from weeks 10 to 14 but most of the pigs were seropositive at the end of the fattening period, with variations between farms and batches.

The average age-time of *Salmonella* seroconversion was 137 days ($\sigma=2.2$). The results showed a “farm impact” on the age of *Salmonella* seroconversion, and suggest that farm factors are more influential than individual factors on the seroconversion age.

Keywords: *Salmonella*, pig, seroconversion, farrow-to-finish farm, longitudinal study.

INTRODUCTION

Salmonella sp. is a zoonotic Gram-negative bacterium producing food-borne disease in humans worldwide through contaminated food of animal origin. This food-borne pathogen was the second-ranking bacterial agent responsible for gastroenteritis in the European Union in 2015 (EFSA and ECDC, 2016). The incidence of human salmonellosis cases was recently estimated at 307 per 100,000 population, or 192,450 cases per year in France (Van Cauteren et al., 2015).

Pigs are a recognised reservoir of *Salmonella*, and the prevalence of *Salmonella* in the French pig production industry is high: 38.7% of farms (EFSA and ECDC, 2009) and 17.6% of pork carcasses (EFSA and ECDC, 2008) are positive to *Salmonella*. Between 10% to 20% of human *Salmonella* infections in the EU are attributed to pork (EFSA and ECDC, 2010a), and

pork ranks third among food categories associated with human salmonellosis outbreaks (Bonardi, 2017).

Infections of pigs by *Salmonella* are usually asymptomatic and relatively well known (Matiasovic et al., 2014). Pigs generally become infected on the farm by oral-fecal transmission, although infection by nose-to-nose contact is also possible (Nollet et al., 2005). Several factors influencing *Salmonella* prevalence on pig farms have been reported, including biosecurity measures, hygiene, viral co-infections such as porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection, antibiotic treatment (Beloeil et al., 2007), movement of animals and contact with other animals (Gotter et al., 2012). Diagnostic tools based on bacteriological or serological tests can help identify the age at which pigs become infected. Moreover, within-herd seroprevalence data can be used to categorise pig herds and may therefore have an impact on food business operators' decisions on the use of meat from high-risk herds for raw pork products (Meemken et al., 2014).

Serological tests such as ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) are used to detect antibodies to *Salmonella* in the meat juice and serum of pigs (Vico and Mainar-Jaime, 2011) and are advantageous because they are both quick and relatively inexpensive. They give an indication of previous exposure to *Salmonella* and are not necessarily correlated with *Salmonella* shedding by pigs at the time of testing (Farzan et al., 2007). However, serology is considered to be one of the best alternatives for establishing the level of a herd's *Salmonella* exposure (Vico, 2012), and may help to predict the risk of *Salmonella* shedding at slaughter (Beloeil et al., 2004; Mainar-Jaime et al., 2017). To follow the dynamics of *Salmonella* spp. infection in swine herds over time, longitudinal studies on the bacteriological and serological status of pigs need to be performed (Vigo et al., 2009). However, because these studies are tedious and expensive, few longitudinal studies describing the dynamics of *Salmonella* infection and serological response in swine herds have been conducted (Beloeil et al., 2003; Kranker et al., 2003; Nollet et al., 2005). Moreover, farm management practices can vary over time and space, which may change the risk factor patterns (Gotter et al., 2012).

The purpose of this study was i) to establish the age-time to *Salmonella* seroconversion on three farrow-to-finish farms by monitoring three batches of pigs on each farm and ii) to explore the factors that may be associated with age-time to *Salmonella* seroconversion.

MATERIALS AND METHODS

Study design

The study was carried out on three farrow-to-finish farms located in Brittany, France, and named F3, F5 and F6. On each farm, three successive batches of pigs coded respectively B1, B2 and B3, were followed from one week of age to slaughter age. Each batch was composed of 40 piglets from 10 sows, all of which were randomly selected. Each piglet was ear-tagged to make sure that the same pigs were monitored from the beginning to the end of the experiment. A total of 90 sows (30 per farm) and 360 pigs (120 per farm) were therefore considered in this study.

The farm was visited every 4 to 5 weeks (eight visits per batch) and a visit was also performed at the slaughterhouse. Blood samples were taken from sows one week after farrowing and from piglets at weeks 1, 6, 10, 14, 18, 22 (coded W1 to W22) and at the slaughterhouse (WSlaugh). Blood samples were collected by jugular vein puncture into evacuated tubes (Vacuette, Dutscher SAS, Brumath, France) without any additives. Serum was obtained by centrifugation of the blood for 10 min at 3500 g and stored at -20°C until analysis.

On-farm data collection

Data related to the general characteristics of the farms, type of feeding, housing, ages when pigs were moved to the different production stages, vaccination and antibiotic treatments were collected during the longitudinal follow-up (Table 1).

Antibody response to *Salmonella*

Sera samples (n=2 463) were analysed to detect the presence of antibodies against *Salmonella* with the IDEXX Swine *Salmonella* Ab Test® (IDEXX, Montpellier, France), which has a sensitivity of 99.1 % and a specificity of 99.4% (Gotter et al., 2012) as recommended by the manufacturer. The presence or absence of antibodies to *Salmonella* in the sample was determined by calculating the S/P ratio corresponding to the absorbance value at 650 nm of the sample (S) over the mean absorbance value of the positive control (P). The results were expressed as a percentage of optical density (OD%) and samples with OD% values equal to or higher than 15% were considered positive.

Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus

The presence of PRRSV-IgG antibodies was assessed using the PRRS X3 Ab ELISA (IDEXX Laboratory, Eragny sur Oise, France) according to the manufacturer's instructions. Results were expressed as sample to positive control (S/P) optical density ratios. A sample was considered positive when the S/P ratio was equal to or higher than 0.4.

Statistical analysis

Correlation between Salmonella serological results

Spearman's correlation tests were performed to assess the correlation between the serological status of sows one week after parturition and their piglets over time. The correlation between the serological results of the piglets over time was also tested (R software version 3.2.4).

Analysis related to age-time to Salmonella seroconversion in infected herds

Definition of the outcome

The age-time to *Salmonella* seroconversion was assessed at individual pig level. The OD% was used to estimate the assumed time interval during which seroconversion was deemed to occur. Age-time to seroconversion was estimated taking into account the presence of maternally-derived antibodies at 6 weeks old. If no seropositive pigs were present in the 6-week-old batch, the midpoint between the individual pig's age on observation of the first OD% higher than 15 was retained as the time to event. If seropositive pigs were present in the 6-week-old batch and the OD% then decreased to under 15%, the midpoint age between the seronegative status and a positive status was selected as the time to seroconversion. When the OD% remained higher than 15%, the midpoint between the first measurement that showed an increase and the preceding one was considered to be the age-time to seroconversion.

Survival analysis

Survival analysis was used to identify the explanatory variables (collected by the questionnaire and related to PRRSV infection) which were associated with age-time to *Salmonella* seroconversion (Table 1). The first step involved testing the difference in survival distributions between levels of each explanatory variable using the log-rank test (PROC LIFETEST, SAS 9.1, SAS Inst., Cary, USA, $p < 0.25$). Given that the assumption of linearity in the continuous variables did not hold, all the independent variables were grouped into categories for further analysis. A Cox model (TPHREG procedure, SAS 9.1, SAS Inst., Cary, USA) was then used to relate each variable where $p < 0.25$ (log-rank test) to the age-time to seroconversion. The proportional hazards assumption for the Cox proportional hazards model

was checked by examining the log-negative-log plot of the Kaplan-Meier survival function estimates and the Schoenfeld residuals versus log of time and time respectively (Dohoo et al., 2003). All the selected explanatory variables were checked for multicollinearity (χ^2 -test, $p < 0.05$), and those most strongly associated with the outcome variable and having biological relevance were retained. The last step involved the multivariable Cox proportional hazards model, which included all the factors that had passed the first screening step (TPHREG procedure, SAS 9.1, SAS Inst., Cary, USA). Since pigs from the same litter could not be considered as independent, a sow cluster effect was used. A backward elimination procedure was used by progressively removing variables that were not significant ($p > 0.05$) by the likelihood ratio χ^2 test. Variables considered to be potential confounders were retained in the final model if they changed the estimates of the hazard ratios by $>30\%$. All two-way interactions for variables in the final model were checked for significance.

Table 1. List of items for the explanatory variables used in univariate and multivariate analyses.

Item	Item signification
Sows	Salmonella serological status of dams one week after parturition Parity
Salmonella status of piglets	Detection of maternal antibodies/Salmonella in piglets at W1
PPRSV* Infection	PPRSV seroconversion (yes/no) PPRSV seroconversion before 12 weeks of life (yes/no) PPRSV seroconversion before 16 weeks of life (yes/no)
Characteristics of piglets	Gender (male, female)
Housing and feeding types	Feeding (dry/wet) Floor type (slatted or not) Weaning age (in days) Age of entry into fattening system (in days) Movements during the nursery step (room changes, pen changes) Movements during the fattening period (room changes, pen changes)
Antibiotic treatment	Antibiotic treatment in nursery Oral antibiotic treatment post weaning

*PPRSV: porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

RESULTS

IgG antibodies against *Salmonella* in sows and piglets

Overall 96.5% of the sows were seropositive to *Salmonella* one week after farrowing. The average OD% varied between batches from 30.4% to 54.1% (Figure 1).

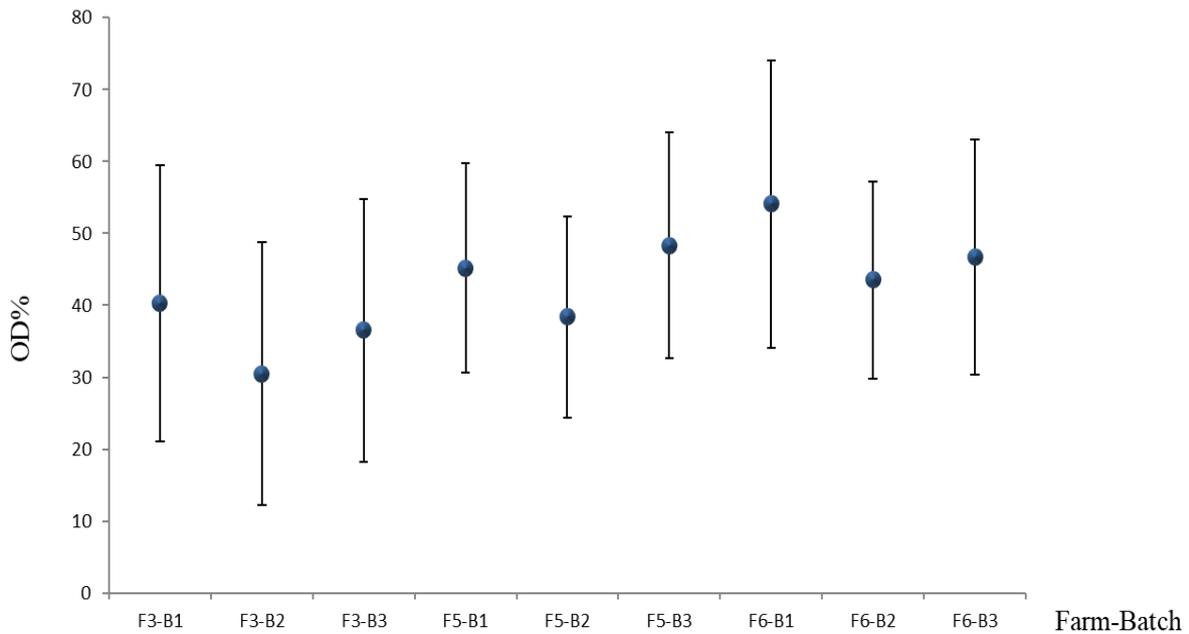


Figure 1. Average of serological results of sows at Week 1. Threshold of ELISA test % $OD \leq 15$

At W1, maternally-derived antibodies were detected in every piglet (Figure 2). The OD% of the sows one week after parturition was significantly correlated with the OD% of the piglets at one and six weeks of age, with a Spearman correlation coefficient of 0.84 and 0.78 respectively ($p < 0.05$).

The analysis of pigs was carried out on 40 pigs per batch except in F6-B1 and F6-B3, in which two pigs and one pig died respectively before W1. The OD% values for pigs decreased at W6 then increased again at W10 or W14, depending on the herd and batch. It then remained high until slaughter (Figure 2).

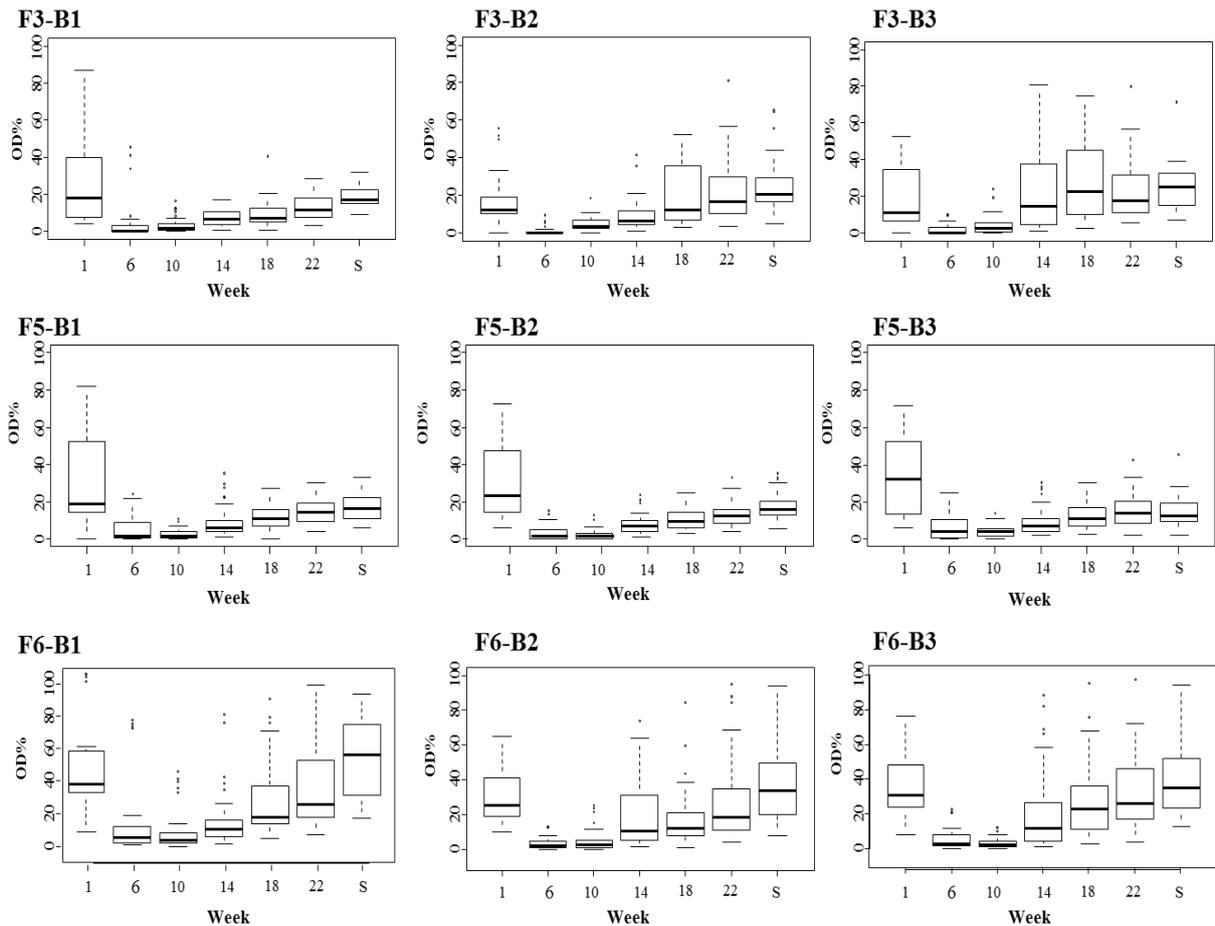


Figure 2. Infections dynamics based in serological results for three farms (3 batches per farm). S=Slaughterhouse

The frequency of seropositive pigs increased in these weeks (Figure 3). On farm F6, the pigs from the three batches became positive from W14, while on farm F3 seroconversion occurred at a different time with a batch effect, either at W14 (F3-B3) or W18 (F3-B2) or only at the slaughterhouse (F3-B1). On Farm F5, batch F5-B3 remained negative from W6 (mean < to 15%) up to slaughter. Batches F5-B1 and F5-B2 contained a high proportion of pigs that were seropositive only at the slaughterhouse. The OD% value on the same farm (F5) stayed low in all three batches, and reached a mean of only 17.1%, 17.4% and 14.5% respectively between W22 and WSlough. The highest frequency of seroconverted pigs from all the farms (75.1%) was found at the slaughterhouse (Figure 3).

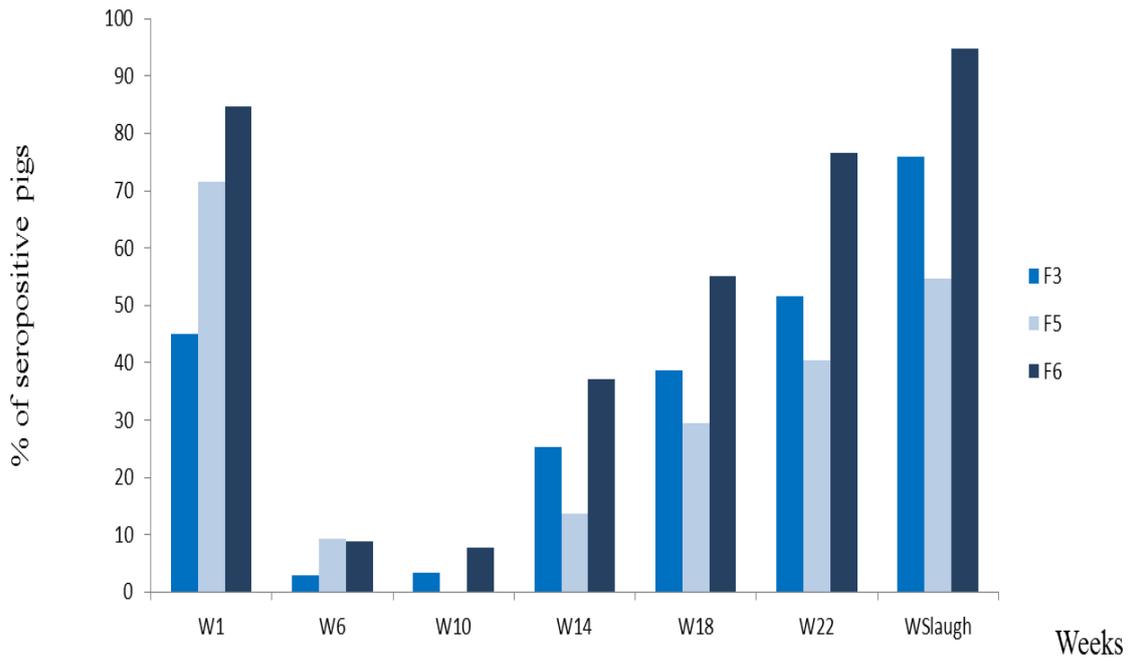


Figure 3. Frequency (%) of seropositive pigs per week. F3= Farm 3, F5= Farm5 and F6= Farm 6. %

The correlation between the pigs' serological results over time is presented in Table 2. Significant positive correlations were found between W1-W6, W14-W18, W18-W22 and W22-WSlough.

Table 2. Correlation coefficient of the serological results for the dams and their piglets and for the piglets only over time.

In bold: Spearman coefficient with a p-value < to 0.05.

	OD Sows	W1	W6	W10	W14	W18	W22	Wslaugh
OD Sows	1							
W1	0.84	1						
W6	0.78	0.86	1					
W10	0.25	0.30	0.37	1				
W14	0.40	0.08	0.10	0.35	1			
W18	0.52	0.07	0.10	0.26	0.62	1		
W22	0.58	0.03	0.09	0.11	0.48	0.60	1	
WSlaugh	0.06	0.11	0.12	0.15	0.33	0.48	0.69	1

W1: one week after farrowing; W6: pigs at 6 weeks of age; W10: pigs at 10 weeks of age; W14: pigs at 14 weeks of age; W22: pigs at 22 weeks of age; Wslaugh: slaughtered pigs.

Factors associated with the age-time to seroconversion

The mean age-time to seroconversion was 137 days ($\sigma = 2.2$ days) (Figure 4).

Pigs from farm F6 seroconverted earlier (117.9 ± 3.0 days) than pigs from the other farms (F3= 142.4 ± 3.9 days, F5= 146.6 ± 3.4 days) (Figure 5).

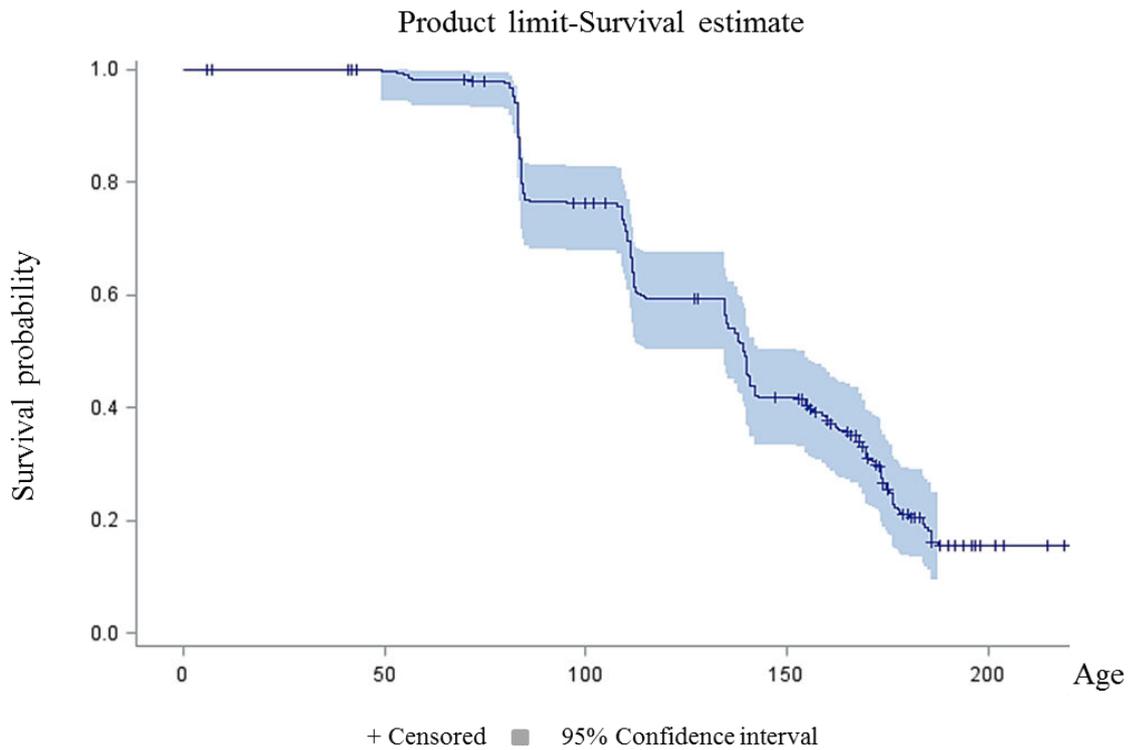


Figure 4. Survival curve for *Salmonella* seroconversion age-357 pigs since week 1 until slaughterhouse. *Salmonella* seroconversion age calculated: 137 jours ($\sigma=2$ jours)

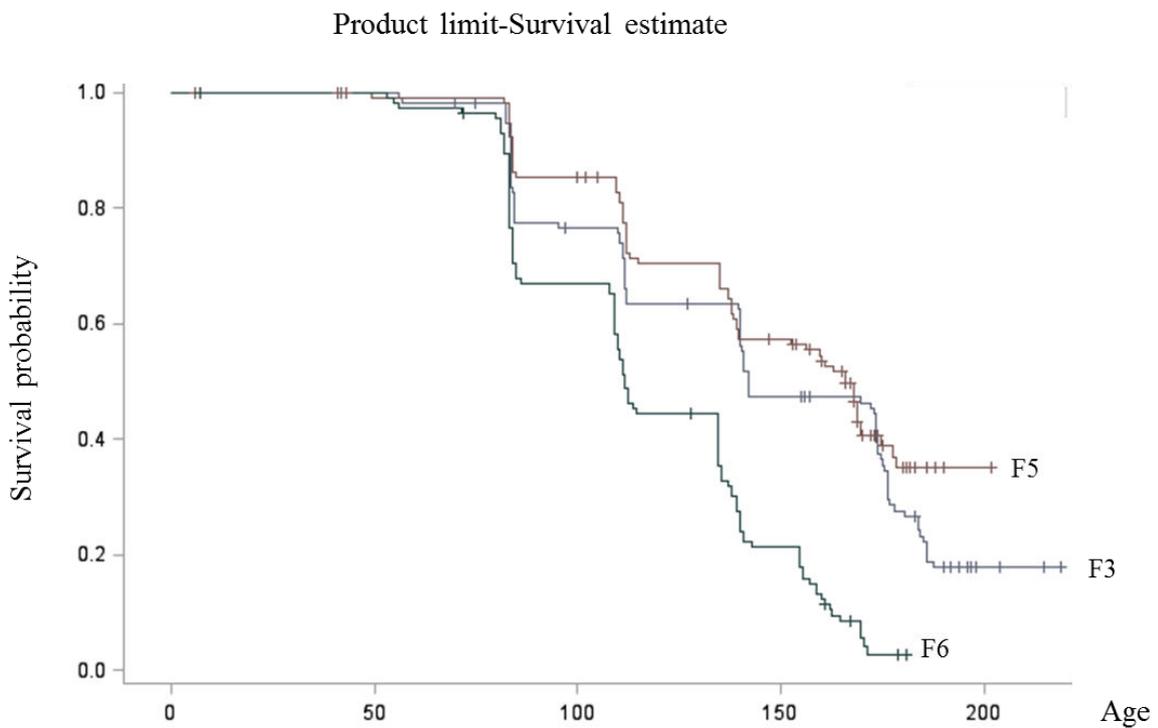


Figure 5. « Farm effect » study. Farm 6 (F6) seroconverted earlier than the others farms F3 (Farm 3) and F5 (Farm 5)

In the univariate analysis, six variables were significantly associated with the age-time to seroconversion (Table 3).

Table 3. The six variables significantly associated with the age-time to seroconversion after univariate analysis.

Item	Item signification	p-value
Housing and feeding mode	Feeding type	<.0001
	Floor type on fattening farms	<.0001
Rearing method	Room change during fattening	0.1
	Room change during the second month of fattening	0.06
	Pen change during fattening	0.15
Antibiotic treatments	Antibiotic treatment during fattening	<.0001

The final statistical analysis showed that only one factor related to a herd effect remained significantly associated with the age-time to *Salmonella* seroconversion (Table 4).

Table 4: Final Cox regression model with the variable related to the farm effect associated with age-time to Salmonella seroconversion (357 pigs, hazard ratio (HR) with 95% Confidence Interval (CI)).

Variable	HR	IC95%	p-value
Farm			
3	0.40	[0.34; 0.68]	<0.0001
5	0.33	[0.25; 0.46]	
6	1	-	

DISCUSSION

This study was performed in Brittany, which is the largest pig production area in France, 56% of French pigs being reared in this region (13.3 million heads) (GRAPHAGRI, 2016). All the farms involved in this study were farrow-to-finish farms. In France, 85% of the sows and 60% of the growing and finishing pigs are reared in this type of farm (HCCA 2015). In the current study, all the sows had antibodies against *Salmonella* and pigs from all the herds seroconverted, indicating exposure to the bacteria. This is a common situation in pig herds. Even though these farms are typical of French production, they were selected on a voluntary basis, so the results are not necessarily inferable to other farm contexts. However, the piglets were selected at random so they could be considered as representative of the batches.

Serology was used in our study to assess the age-time to seroconversion and thus to deduce previous exposure to *Salmonella*. Controversies between manufacturers and scientists related to the sensitivity and specificity of these tests have been published (Farzan et al., 2007). However, the commercial IDEXX ELISA kit we used is both highly sensitive and specific (Gotter et al., 2012).

Detection of antibodies against *Salmonella* was not the best indicator of infection at the pig level because neither the infection of lymph nodes nor the shedding of *Salmonella* organism in faeces is necessarily related to the presence of antibodies in pigs (Mainar-Jaime et al., 2008). Despite that, ELISA is useful to detect prior exposure to the bacteria in the herd farms and some national programs against pig salmonellosis are based on serology (Vico, 2012). Serology at the farm level is considered as a good solution to categorize livestock, for that reason we did not analyse the results with an individual approach.

On all the farms, we found a high OD% for sows and one-week-old piglets. The presence of antibodies against *Salmonella* was detected in piglets up to ten weeks of age. We observed a stronger correlation between the serological response of piglets and sows at one week and six weeks. The persistence of maternal antibodies up to eight weeks of age has already been described in the literature (Beloil et al., 2003; Merialdi et al., 2008). The composition and duration of maternal immunity acquired through the colostrum and milk intake have a large influence upon the dynamics of *Salmonella* transmission on a pig farm (Wales et al., 2009). In our study, the results of univariate analyses did not reveal any protective effect of maternal antibodies on the seroconversion age. However, other studies have attributed the relatively

high frequency of infection but the low frequency of disease in suckling pigs to the protective effects of maternal antibodies (Lovell and Barrow, 1999).

We noticed that the OD% levels increased mainly during the fattening period, and remained high until slaughter. Wales also described the degree of serological response in fattening pigs tending to increase after around ten weeks of age (Wales et al., 2009). This is probably due to an active immune response to the natural infection produced at the beginning of the fattening stage (Vigo et al., 2009).

A positive correlation was found between pig's serological status at the end of the finishing phase from the 18th week up to slaughter. This is probably because the antibodies of pigs first infected during the fattening period gradually increase over time because the bacteria continue to circulate within the herd and contaminate the animals again. This hypothesis could be verified by conducting bacteriological analyses in parallel with serological analyses.

The mean age-time to *Salmonella* seroconversion was estimated at 137 days. This period corresponds to the second half of the fattening phase. The onset of an immune response has been described between 7 and 30 days post natural infection (Vigo et al., 2009). Thus, we could consider that pigs could be exposed to *Salmonella* during the first half of the fattening period. Another study has described an active immune response against natural infection at the beginning of the fattening period (Beloeil et al., 2003). Factors influencing *Salmonella* infection in the fattening period have been described in the literature (Hotes et al., 2010). They are related to hygiene and biosecurity measures such as the cleaning of feed tubes, wearing protective clothing when entering the farms and controlling the proliferation of rodents. Farm practices in the farrowing section — such as allowing pigs from adjacent pens to have snout contact, and purchasing pigs from more than one supplier — were associated with an increased odds of seropositivity for *Salmonella* (Lo Fo Wong et al., 2004).

In our study, a farm effect was found to significantly influence the age-time to seroconversion. This farm effect includes a set of practices and biosecurity measures such as weaning age, room changes, pen changes, age of entry into the fattening system, cleaning and disinfection, movement and mixing of animals, etc. Other studies have shown a farm effect from farm contamination with microorganisms like *Campylobacter* but not *Salmonella* (Fosse et al., 2011).

Unlike previously published studies (Beloeil et al., 2007), we did not find any other factors associated with the age-time to seroconversion. This may be due to our limited sample size

(three farms and 120 pigs per farm). There may therefore have been a lack of statistical power to differentiate the farm factors influencing seroconversion. Unlike other works (Beloil et al., 2007), we did not observe a link between *Salmonella* seroconversion and PRRSV serological status.

In conclusion, maternal antibodies were detected in piglets up to ten weeks of life. Seroconversion on the different farms occurs during the fattening period. However, the seroconversion age was earlier on some farms, a fact that may be related to their own characteristics. The current study's limited sample size means that further studies are required to confirm these observations on a larger scale. Furthermore, to clarify the dynamics of *Salmonella* infection, it is also essential to include bacteriological analysis of faecal samples.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge SENESCYT Ecuador (Programa de Becas para Docentes Universitarios) for funding this work.

REFERENCES

- Beloil PA, Chauvin C, Proux K, Fablet C, Madec F, Alioum A (2007) Risk factors for *Salmonella* seroconversion of fattening pigs in farrow-to-finish herds *Veterinary Research* 38:835-848 doi:10.1051/vetres:2007034
- Beloil PA, Chauvin C, Proux K, Rose N, Queguiner S, Eveno E, Houdayer C, Rose V, Fravallo P, Madec F (2003) Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd *Preventive Veterinary Medicine* 60:207-226
- Beloil PA, Fravallo P, Fablet C, Jolly JP, Eveno E, Hascoet Y, Chauvin C, Salvat G, Madec F (2004) Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds *Preventive Veterinary Medicine* 63:103-120 doi:10.1016/j.prevetmed.2004.01.010
S0167587704000492 [pii]
- Bonardi S (2017) *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union *Epidemiology & Infection* 145:1513-1526 doi:10.1017/S095026881700036X
- Dohoo IR, Martin W, Sthryn H (2003) *Veterinary Epidemiologic Research*. Prince Edward Island, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island Charlottetown,
- EFSA, ECDC (2008) Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, Part A *The EFSA Journal* 135:111

- EFSA, ECDC (2009) Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 20081 Part A: *Salmonella* prevalence estimates The EFSA Journal:288 doi:doi:10.2903.1377
- EFSA, ECDC (2010) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008 The EFSA Journal 10(3):442 doi:10.2903
- EFSA, ECDC (2016) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015 EFSA Journal 14(12):231 doi:doi:10.2903/j.efsa.2016.4634
- Farzan A, Friendship RM, Dewey CE (2007) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests and culture for determining *Salmonella* status of a pig herd Epidemiol Infect 135:238-244 doi:10.1017/S0950268806006868
- Fosse J, Laroche M, Oudot N, Seegers H, Magras C (2011) On-farm multi-contamination of pigs by food-borne bacterial zoonotic hazards: an exploratory study Veterinary microbiology 147:209-213 doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.013
- Gotter V, Klein G, Koesters S, Kreienbrock L, Blaha T, Campe A (2012) Main risk factors for *Salmonella*-infections in pigs in north-western Germany Preventive Veterinary Medicine 106:301-307 doi:10.1016/j.prevetmed.2012.03.016
- GRAPHAGRI (2016) Productions animales en France. Ministère de l'agriculture et de l'alimentation. <http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Gaf16p148-166.pdf>.
- HCCA (2015) La filière porcine française. Haute conseil de la Coopération Agricole -France. [https://www.hcca.coop/Documents%20partages/Etude%20de%20la%20fili%C3%A8re%20porcine%20\(2015\).pdf](https://www.hcca.coop/Documents%20partages/Etude%20de%20la%20fili%C3%A8re%20porcine%20(2015).pdf).
- Hotes S, Kemper N, Traulsen I, Rave G, Krieter J (2010) Risk factors for *Salmonella* infection in fattening pigs - an evaluation of blood and meat juice samples Zoonoses Public Health 57 Suppl 1:30-38 doi:10.1111/j.1863-2378.2010.01361.x
- Kranker S, Alban L, Boes J, Dahl J (2003) Longitudinal study of *Salmonella enterica* aerotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds Journal of clinical microbiology 41:2282-2288
- Lo Fo Wong DM, Dahl J, Stege H, van der Wolf PJ, Leontides L, von Altrock A, Thorberg BM (2004) Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds Preventive Veterinary Medicine 62:253-266 doi:10.1016/j.prevetmed.2004.01.001
- Lovell MA, Barrow PA (1999) Intestinal colonisation of gnotobiotic pigs by *Salmonella* organisms: interaction between isogenic and unrelated strains Journal of Medical Microbiology 48:907-916 doi:10.1099/00222615-48-10-907
- Mainar-Jaime RC, Atashparvar N, Chirino-Trejo M (2008) Estimation of the diagnostic accuracy of the invA-gene-based PCR technique and a bacteriological culture for the detection of *Salmonella* spp. in caecal content from slaughtered pigs using Bayesian analysis Zoonoses Public Health 55:112-118 doi:10.1111/j.1863-2378.2007.01096.x
- Mainar-Jaime RC, Casanova-Higes A, Andres-Barranco S, Vico JP (2017) Looking for new approaches for the use of serology in the context of control programmes against pig salmonellosis Zoonoses Public Health:1-7 doi:10.1111/zph.12432
- Matiasovic J, Stepanova H, Kudlackova H, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I, Chlebova K, Leva L, Osvaldova A, Gebauer J, Faldyna M (2014) Immune response of pigs to *Salmonella enterica* serovar Derby and Typhimurium infections Veterinary Microbiology 170:284-290 doi:10.1016/j.vetmic.2014.02.003

- Meemken D, Tangemann AH, Meermeier D, Gundlach S, Mischok D, Greiner M, Klein G, Blaha T (2014) Establishment of serological herd profiles for zoonoses and production diseases in pigs by "meat juice multi-serology" Preventive Veterinary Medicine 113:589-598 doi:10.1016/j.prevetmed.2013.12.006
- Merialdi G, Barigazzi G, Bonilauri P, Tittarelli C, Bonci M, D'Incau M, Dottori M (2008) Longitudinal study of *Salmonella* infection in Italian farrow-to-finish swine herds Zoonoses Public Health 55:222-226 doi:10.1111/j.1863-2378.2008.01111.x
- Nollet N, Houf K, Dewulf J, Duchateau L, De Zutter L, De Kruif A, Maes D (2005) Distribution of *Salmonella* strains in farrow-to-finish pig herds: a longitudinal study Journal of food protection 68:2012-2021
- Van Cauteren D, De Valk H, Sommen C, King LA, Jourdan-Da Silva N, Weill FX, Le Hello S, Megraud F, Vaillant V, Desenclos JC (2015) Community Incidence of Campylobacteriosis and Nontyphoidal Salmonellosis, France, 2008-2013 Foodborne Pathogens and Disease 12:664-669 doi:10.1089/fpd.2015.1964
- Vico JP, Mainar-Jaime RC (2011) The use of meat juice or blood serum for the diagnosis of *Salmonella* infection in pigs and its possible implications on *Salmonella* control programs Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 23:528-531 doi:10.1177/1040638711403432
- Vico JPM, R.C (2012) Serological survey of *Salmonella* spp. in infection in finishing pigs from northeastern Spain and associated risk factors Spanish Journal of Agricultural Research 10:372-382 doi:http://dx.doi.org/ 10.5424/sjar/2012 102-446-11
- Vigo GB, Cappuccio JA, Pineyro PE, Salve A, Machuca MA, Quiroga MA, Moredo F, Giacoboni G, Cancer JL, Caffer IG, Binsztein N, Pichel M, Perfumo CJ (2009) *Salmonella enterica* subclinical infection: bacteriological, serological, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial resistance profiles--longitudinal study in a three-site farrow-to-finish farm Foodborne Pathogens and Disease 6:965-972 doi:10.1089/fpd.2008.0239
- Wales AD, McLaren IM, Bedford S, Carrique-Mas JJ, Cook AJ, Davies RH (2009) Longitudinal survey of the occurrence of *Salmonella* in pigs and the environment of nucleus breeder and multiplier pig herds in England Vet Rec 165:648-657 doi:165/22/648 [pii]

3. Conclusion

En conclusion, les anticorps maternels ont été détectés chez les porcelets jusqu'à dix semaines de vie. La séroconversion sur les différentes fermes se produit pendant la période d'engraissement. Cependant, l'âge de séroconversion était plus précoce dans certaines fermes, ce qui peut être lié à leurs propres caractéristiques. La taille limitée de l'échantillon de l'étude actuelle signifie que d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces observations à plus grande échelle. De plus, pour clarifier la dynamique de l'infection à *Salmonella*, il est également essentiel d'inclure l'analyse bactériologique des échantillons fécaux.

CHAPITRE III :

**DYNAMIQUE DE L'INFECTION ET
DE LA COLONISATION PAR
SALMONELLA DES PORCS EN
CONDITION EXPERIMENTALE**

1. Introduction

Salmonella (ou *S. enterica subspecies enterica*) est responsable de la salmonellose humaine et / ou animale. C'est l'un des agents pathogènes d'origine alimentaire les plus répandus dans le monde. En Europe, il s'agit de la deuxième cause de zoonose après *Campylobacter* sp., avec un taux de notification de 21,2 cas pour 100 000 habitants (EFSA and ECDC, 2017)). En France, *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. et les norovirus étaient responsables de 73% de toutes les maladies d'origine alimentaire et de 76% de toutes les hospitalisations associées entre 2008 à 2013 (Van Cauteren et al., 2017).

En plus de la volaille, des poules pondeuses et des dindes, les porcs sont une source majeure de transmission de *Salmonella* aux humains. Cependant, leur rôle dans la salmonellose d'origine alimentaire chez les humains varie parmi les pays de l'UE (Bonardi, 2017). La colonisation des intestins des porcs par les salmonelles et le transport et l'excrétion asymptomatiques peuvent entraîner la contamination des carcasses de porcs à l'abattoir (Hald et al., 2003).

Les porcs peuvent être infectés par plusieurs sérotypes de *Salmonella* et l'apparition de ces sérovars est également partiellement déterminée géographiquement (Boyen et al., 2008; Xu et al., 2017). *S. Typhimurium*, *S. Derby* et le variant monophasique de *S. Typhimurium* sont aujourd'hui les sérovars les plus isolés dans les porcs et les produits porcins de l'Union européenne (Bonardi, 2017; EFSA and ECDC, 2016).

Bien que ces trois sérovars soient présents dans les produits de porc avant l'ingestion, le sérotype *Typhimurium* et le variant monophasique sont plus largement impliqués dans la salmonellose humaine. De même, l'infection produite par *S. Derby* semble moins sévère que celle de *S. Typhimurium* (Ivanek et al., 2012; Matiasovic et al., 2014; Osterberg et al., 2009).

S. Typhimurium est reconnu comme le sérotype prédominant isolé chez l'homme en Europe et *S. Derby* figurait parmi les 10 sérotypes les plus fréquemment isolés provenant de sources humaines dans différents pays (Boyen et al., 2008; EFSA and ECDC, 2016). Le variant monophasique de *Salmonella Typhimurium* est un sérovar émergent dans les infections humaines à travers le monde (Switt et al., 2009b; Weaver et al., 2017).

En effet, ce sérovar, se révèle être un problème zoonotique majeur, provoquant des épidémies de gastro-entérite humaine dans de nombreux pays. Il est actuellement classé troisième après *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* dans les infections humaines dans les pays de l'Union

européenne (EFSA and ECDC, 2016; Fernandes et al., 2016). En France, en 2016, 18,56% de toutes les souches de *Salmonella* sp. isolées dans les cas humains (n = 10 545) étaient des souches du variant monophasique de *S. Typhimurium* (CNR-ESS, 2017) et des épidémies majeures dues à ce sérovar ont été signalées en 2010, 2011 et 2013 (Bassi et al., 2015; Gossner et al., 2012; Raguenaud et al., 2012). Les porcs sont une source reconnue de *S. Typhimurium* monophasique (Hauser et al., 2010; Ruggeri et al., 2015; Switt et al., 2009b). Des essais expérimentaux pour évaluer la dynamique de l'infection chez les porcs ont déjà été rapportés pour le sérovar *S. Typhimurium*, mais dans ces études, les animaux ont été suivis 28 jours après l'inoculation (Boyen et al., 2009) ou 32 jours après l'inoculation (Ivanek et al., 2012). Jusqu'à présent, une seule étude a décrit l'excrétion et la réponse aux anticorps des porcs inoculés par le sérotype monophasique de *S. Typhimurium* (Lynch et al., 2017) mais également sur un suivi de courte durée.

C'est pourquoi, dans cette partie de la thèse, nous avons consacré une première expérimentation au variant monophasique de *S. Typhimurium*. Cette expérimentation a été menée de façon à suivre la colonisation, la réponse sérologique et l'infection a été suivie par la mesure des quantités d'IFN- γ dans le sérum. Durant cette expérimentation, nous avons également vérifié la stabilité génétique de la souche inoculée après passage dans le tractus gastro-intestinal. En effet, dans des conditions expérimentales, les bactéries peuvent s'adapter génétiquement aux changements dans l'environnement, et leur virulence peut augmenter ou diminuer. Des variations génétiques ont déjà été décrites pour *Campylobacter coli* après passage *in vivo* chez le porc (Leblanc-Maridor et al., 2011). Des variations antigéniques et génétiques de *Salmonella* ont également été rapportées après un passage *in vivo* chez la souris (Koskiniemi et al., 2013). Dans cette dernière étude, les auteurs ont décrit l'adaptation génétique de *Salmonella* à des environnements changeants et à des mutations patho-adaptatives.

Par ailleurs, des différences dans l'excrétion et la réponse immunitaire chez les porcs ont été rapportées entre les sérovars de *Salmonella*, (Ivanek et al., 2012; Osterberg et al., 2010) mais ces études ne comprenaient pas de *S. Typhimurium* monophasique. Nous avons donc consacré une seconde expérimentation pour comparer les trois sérovars majeurs de *Salmonella* en filière porcine, sur la base de la capacité à coloniser le porc, et à provoquer la production d'anticorps anti-*Salmonella*.

2. Dynamique de la colonisation de porcs infectés expérimentalement par le variant monophasique de *Salmonella* Typhimurium

Publication en cours de révision pour Foodborne Pathogens and disease

Colonization dynamics and serology of pigs experimentally infected with a monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium

María Cevallos-Almeida^{1,4}, Catherine Houdayer¹, Valérie Rose¹, Yann Bailly², Frédéric Paboeuf², Christelle Fablet³, Martine Denis¹ and Annaëlle Kerouanton^{1*}

¹ ANSES, Hygiene and Quality of Poultry and Pig Products Unit, Bretagne Loire University, BP 53, 22440 Ploufragan, France.

² ANSES, SPF Pig Production and Experimental Unit, Bretagne Loire University, BP 53, 22440 Ploufragan, France.

³ ANSES, Swine Epidemiology and Welfare Research Unit, Bretagne Loire University, BP 53, 22440 Ploufragan, France.

⁴ Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics. Central University of Ecuador. Quito, Ecuador

*Corresponding author : annaelle.kerouanton@anses.fr

ABSTRACT

The monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium is highly prevalent in human salmonellosis cases and on pork. However, little is known about colonization dynamics in pigs. We orally inoculated 24 seven-week-old piglets with 10^9 CFU/pig of a porcine strain of monophasic *S. Typhimurium* in an experimental trial. The inoculated piglets were divided into three groups of eight pigs and were monitored for 21, 49 or 84 days post-infection until necropsied. From three days post-infection to necropsy, individual feces were sampled twice weekly and blood once weekly. At necropsy, the tonsils, mesenteric lymph nodes, and the contents of the duodenum, jejunum, ileum and cecum were collected from each pig. We determined the number of *Salmonella* CFU/g in all the samples, and measured also the interferon-gamma (IFN- γ) in pg/ml and the *Salmonella* antibodies in %OD in all the blood samples. At different times during the trial, we tested by MLVA the genomic stability of the strain after passing through the intestinal tract.

Salmonella was continuously excreted by pigs, ranging from 1.4 to 5.8 \log_{10} CFU/g depending on the day. At necropsy, *Salmonella* was present in all samples, but the tonsils were particularly contaminated. The level of interferon-gamma was highest three days post-infection (mean of 58.4 pg/ml) and rapidly decreased from day 7 post-infection. *Salmonella* antibodies were detected in five pigs seven days post-infection. At 49 days post-infection, all the pigs were seropositive. We observed new MLVA types for 3.3% of the isolates tested over the trial.

Our study allowed us to confirm the serovar's ability to persist in pigs after infection and up to 84 days post-infection. It induced a rapid IFN- γ production, and *Salmonella* IgG appeared earlier than in naturally infected pigs. The strain's genome can evolve after passing through the digestive tract of pigs.

Key words: monophasic *S. Typhimurium*, pig, excretion, serology, interferon

INTRODUCTION

Non-typhoid *Salmonella* is the etiological agent of salmonellosis, a zoonotic disease transmitted to humans primarily through contaminated food. *Salmonella* spp. are the most common cause of bacterial gastroenteritis in the European Union (EFSA and ECDC, 2016), and have been incriminated in many collective outbreaks of foodborne illness in developed countries.

The monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium (S1,4[5],12:i:-) (or monophasic *S. Typhimurium*), was first described in Europe at the end of the 20th century (Echeita et al., 2001). In recent years, it has been a major zoonotic problem, causing human gastroenteritis outbreaks in many countries. This serovar is currently ranked as the third most reported serovar after *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* in human infections in European Union countries (EFSA and ECDC, 2016; Fernandes et al., 2016). In France, 18.56% of human *Salmonella* spp. strains isolated in 2016 (n=10 545) were monophasic *S. Typhimurium* strains (CNR-ESS, 2017) and major outbreaks due to this serovar were reported in 2010, 2011 and 2013 (Bassi et al., 2015; Gossner et al., 2012; Raguenaud et al., 2012). These outbreaks were due to the consumption of ham, sausages or beef contaminated by this serovar, which was reported to be the third most commonly detected serovar in pork across the EU, with a prevalence of 18% (EFSA and ECDC, 2016). Pigs are a recognized source of monophasic *S. Typhimurium* (Hauser et al., 2010; Ruggeri et al., 2015; Switt et al., 2009b). The colonization by *Salmonella* of pigs' intestines and subsequent carriage and excretion can lead to contamination of the carcasses at the slaughterhouse (Hald et al., 2003).

Longitudinal studies on pig farms with naturally infected pigs have been conducted to determine the dynamics of *Salmonella* spp. infection over time (Vigo et al., 2009). However, due to the multiple factors that may be involved in *Salmonella* pig infection, results vary greatly between herds and studies (Lynch et al., 2017). Experimental trials to assess the dynamics of infection in pigs have already been reported for serovar *S. Typhimurium*, but in these studies, animals were monitored for 28 days post-inoculation (Boyen et al., 2009) or 32 days post-inoculation (Ivanek et al., 2012). No study up to now has described the colonization of pigs by the monophasic *S. Typhimurium* serovar over an extended period of time. Indeed, data on the immune response is available for *S. Typhimurium* or other serovars (Ivanek et al., 2012) but not for the monophasic variant.

Interferon Gamma (INF- γ) is an important marker of the early period of infection (Lalmanach and Lantier, 1999; Stevens and Gray, 2013; Uthe et al., 2009). In addition, *Salmonella* exposition can be monitored by detecting *Salmonella* antibodies (Funk et al., 2005; Vigo et al., 2009).

Under experimental conditions, bacteria can genetically adapt to changes in the environment, and their virulence may increase or decrease. Genetic variations have previously been described for *Campylobacter coli* after *in vivo* passage in pigs (Leblanc-Maridor et al., 2011). Antigenic and genetic variations of *Salmonella* have also been reported after *in vivo* passage in mice (Koskiniemi et al., 2013). In the latter study, the authors described *Salmonella*'s genetic adaptation to changing environments and patho-adaptive mutations.

The present study was designed to study the dynamics of colonization of pigs after inoculation with a monophasic *S. Typhimurium* 1,4[5],12:i:- strain using an experimental pig model. We also dosed INF- γ and looked at the seroconversion to *Salmonella*. The genetic stability of the inoculated strain after passing through the gastrointestinal tract has been also checked.

MATERIALS AND METHODS

Strain

We used a strain of monophasic *S. Typhimurium* 1,4[5],12:i:- from the ANSES-Ploufragan laboratory collection (strain number S14CH63). This strain was isolated from pig feces on a French farm in 2014. Serovar has been determined by classical serotyping and we also implemented a multiplex PCR as recommended by EFSA (EFSA and ECDC, 2010a). The multiplex-PCR protocol was adapted from Bugarel (Bugarel et al., 2012b). We also characterized the strain by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (Ribot et al., 2006) and MLVA (Profile A: 3-14-10-N-211) (Larsson et al., 2009). Antimicrobial susceptibility was also tested on 16 drugs.

To easily enumerate the strain in samples during the trial, it was made resistant to Rifampicin after several passages on Plate count agar (PCA) (Biomerieux, France) supplemented with Rifampicin (100 mg/lt., Sigma, France). PFGE and MLVA profiles, as well as the antimicrobial susceptibility were similar for S14CH63-Rif strain was similar than for S14CH63 strain.

Experimental design

The protocol of our *in vivo* trial was approved by the Ethics Committee in Animal Research No 16 of the French Ministry of National Education, Higher Education and Research (License APAFIS 2697-2015110409457994). The trial was conducted on 32 secondary specific pathogen free (SPF) piglets born at the ANSES Ploufragan protected animal facilities. At 4 weeks of age, the piglets were weaned and isolated in biosecurity level 3 experiment rooms. The 24 piglets to be inoculated were placed in three separate rooms (Groups G1, G2 and G3) with two pens (P1-P2, P3-P4, and P5-P6 respectively) in each room (four piglets per pen). The three groups were monitored respectively for 21, 49 and 84 days post-infection, until necropsy. Eight pigs intended to be used as a control were kept in another room. Biosecurity measures were carried out by the animal facility staff. Pigs were monitored daily, with rectal temperature measured and clinical manifestations recorded. Food consumption and body weight were reported weekly.

At day 0, the 24 pigs were orally inoculated with 10 ml of a solution containing 10^8 colony forming units per ml (CFU/ml) of S14CH63 *Salmonella* strain in TS (tryptone salt broth, Biomerieux, France) using a cannula attached to luer-lock syringe. The control pigs received 10 ml of TS.

Samples and necropsy

One week before inoculation, we checked that pigs were negative to *Salmonella* in feces using the NF U47-102 method (AFNOR, 2008). Briefly, samples were diluted to 1:10 in buffered peptone water (BPW, Biomerieux, France) for a non-selective pre-enrichment. A selective enrichment was then performed on muller-kauffmann tetrathionate-novobiocin (MKTTn) broth and modified semi-solid rappaport-vassiliadis (MSRV) agar (Biokar Diagnostics, France). After incubation, two selective media have been inoculated: xylose lysine deoxycholate (XLD, Biokar, France) and Rapid'*Salmonella* (Bio-Rad, France). Sample was considered as positive if typical colonies were observed.

From 3 days post-infection (p.i.) to necropsy, individual feces were sampled twice weekly and blood once weekly. Fecal samples were taken directly from the animal's rectum and immediately taken to the laboratory for detection and enumeration. Blood samples were taken from the jugular vein from day 3 p.i. for pigs in G1 and G2, and from day 7 for pigs in G3. Upon receipt of the blood, it was centrifuged at 3500 rpm for 5 minutes to recover the serum for the dosage of IFN- γ and anti-*Salmonella* antibodies. The sera were stored at -20°C until analysis.

The three groups of pigs were necropsied at different times after inoculation: 21 days p.i. for the eight pigs in G1, 49 days p.i. for the eight pigs in G2 and 84 days p.i. for the eight pigs in G3. The eight control pigs were also slaughtered at different times after the day of inoculation as follows: two pigs on 21 days p.i., two on 49 days p.i. and four on 84 days p.i.. Pigs were euthanized after intravenous inoculation of tiletamine and zolazepam (Zoletil 100, Virbac, France). At each pig's necropsy, the organs and tissues from the abdominal and thoracic cavities were observed, and the mesenteric lymph nodes (MLN), tonsils and intestinal contents from the duodenum, jejunum, ileum and cecum were collected.

Enumeration and detection of *Salmonella*

Samples were diluted to 1:10 in BPW. Serial dilution was then performed in TS until reaching a dilution of 10^{-4} . One milliliter of the 10^{-1} dilution was seeded on three plates of XLD agar (supplemented with rifampicin (XLD-Rif) and 100 μ l of the following dilutions were plated on one plate of XLD-Rif. After incubation at 37°C for 24 hours, typical black colonies of *Salmonella* were enumerated and results were expressed in CFU/g of sample.

To detect *Salmonella*, the 1:10 diluted samples were incubated at 37°C for 18 hours for enrichment. If enumerations were negative for *Salmonella* sp. (under the limit of enumeration

(10 CFU/g), *Salmonella* detection continued from pre-enrichment as described above, in order to confirm the presence or absence of *Salmonella* in the sample. This method was also applied for all the samples collected from control pigs throughout the experiment in order to check the absence of *Salmonella*.

After enumeration or detection, typical black colonies on XLD-RIF were kept in 1 ml of Peptone Glycerol Broth and kept at -70°C for MLVA typing.

Interferon-gamma response against *Salmonella* infection in pigs

To evaluate innate immunity by measuring IFN- γ production, we dosed the IFN- γ in serum using the Porcine IFN γ ELISA Kit® (Thermo Scientific-Pierce Biotechnology, USA) according to the manufacturer's instructions. The amount of porcine INF- γ in each sample was determined by interpolation from the absorbance value (Y-axis) to the porcine IFN- γ concentration (X-axis) in a standard curve. Results were expressed in pg/ml.

Serological response to *Salmonella* infection

For antibody screening (IgG), we used the IDEXX Swine *Salmonella* Ab Test® (IDEXX, France). In accordance with the manufacturer's recommendations, samples with OD% values equal to or greater than 15% were considered positive.

Genetic stability of strains after *in vivo* passage

To evaluate the genetic stability of the monophasic *S. Typhimurium* strain after *in vivo* passage during the trial, we selected 368 isolates from pigs monitored for 84 days p.i. (G3). We considered on day 17, 108 isolates from the fecal samples of eight pigs; on day 49, 120 isolates from the fecal samples of eight pigs; and on day 84, 140 isolates from the organs and fecal samples of eight pigs. The latter 140 isolates were distributed as follows: 20 isolates for each organ (tonsils and lymphatic nodes), 20 for each part of the intestine (duodenum, ileum, jejunum, and cecum) and 20 for feces. The 368 isolates were typed by Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) as described below.

MLVA typing

The 5-loci MLVA allele profiles were determined according to the previously published harmonized method (Larsson et al., 2009). DNA was extracted with an InstaGene matrix according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, France). STTR9, STTR5, STTR6, STTR10, and STTR3 were amplified within a multiplex PCR assay using the Quiagen multiplex PCR Kit (Quiagen, France). Amplified fragments were separated by capillary electrophoresis with the 3100-Avent Genetic Analyzer (Applied Biosystems, France). The GENEFLOR™ 625 Fluorescent DNA Ladder ROX (Chimerx, U.S.A.) was used as a labeled size standard marker. Sequencing data were imported and the size of the PCR products and number of repetitions in each locus were determined with BioNumerics v7.5 software (Applied Maths, Belgium).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using R software (R version 3.2.4).

The excretion level was compared between groups for each sampling time post-inoculation with a Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Post-hoc pairwise comparisons were then performed using the Holm test to adjust the p-values of these comparisons given the number of tests conducted ($p < 0.05$). The correlation between the amount of *Salmonella* in feces between successive sampling times was assessed with a Spearman correlation test ($p < 0.05$). The amount of *Salmonella* shed by each pig on the whole trial period was estimated by calculating the area under the curve of excretion (AUC). A Kruskal-Wallis test was used to compare the AUC between groups ($p < 0.05$). We compared the colonization levels of each organ at the three dates of necropsy using the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$).

RESULTS

Clinical monitoring

No clinical signs were observed in control pigs. Inoculated pigs had a high rectal temperature (greater than 40°C), lethargy and diarrhea the day after inoculation. After that, no clinical signs were noted throughout the trial in G1 and G2. In G3, animals had a short episode of diarrhea 42 days p.i., possibly due to the presence of a rotavirus a few days before. The pigs' growth and feed consumption were normal throughout the trial. At 21 days, no difference was observed in the average body weight gain of pigs in G1, G2, G3 and Control group (889, 949, 721 and 787 g/day respectively) ($p=0.112$).

Salmonella excretion kinetics in feces

The control pigs remained negative for *Salmonella* in feces throughout the trial. All the inoculated pigs were excreting *Salmonella* on day 3 p.i., and excreted continuously until day 84 p.i., with variations in the amount of *Salmonella* excreted according to the day (Figure 1).

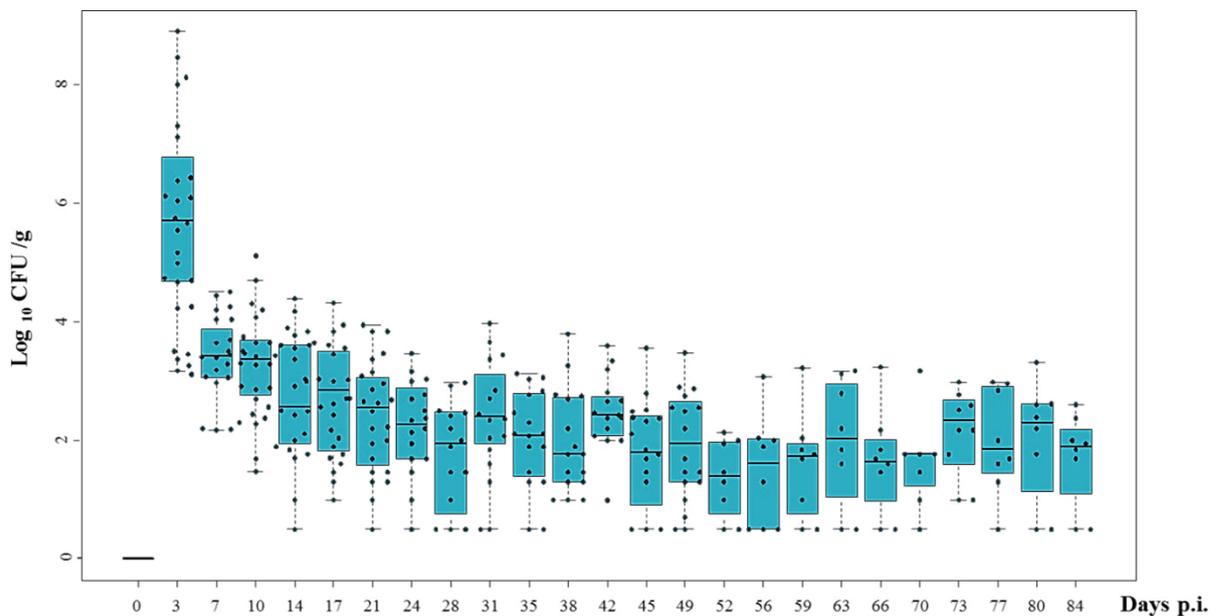


Figure 1. Monophasic *Salmonella* Typhimurium excretion kinetics for all pigs over 84 days (in log₁₀ CFU/g). Each point represents the numeration data for each pig on each sampling day post inoculation.

The highest level of excretion in feces was on day 3 p.i. when compared to the other days (mean of $5.8 \pm 1.6 \log_{10}$ CFU/g, $p < 0.05$) and the lowest on day 52 p.i. (mean of $1.4 \pm 0.7 \log_{10}$ CFU/g) (Table 1). The amount of *Salmonella* in feces decreased significantly ($p < 0.01$), dropping by $2.4 \log_{10}$ CFU/g on day 7. The excretion curves of each individual pig in each pen, from day 0 to day 21, were very similar, with an excretion peak on day 3 p.i. (Figure 2).

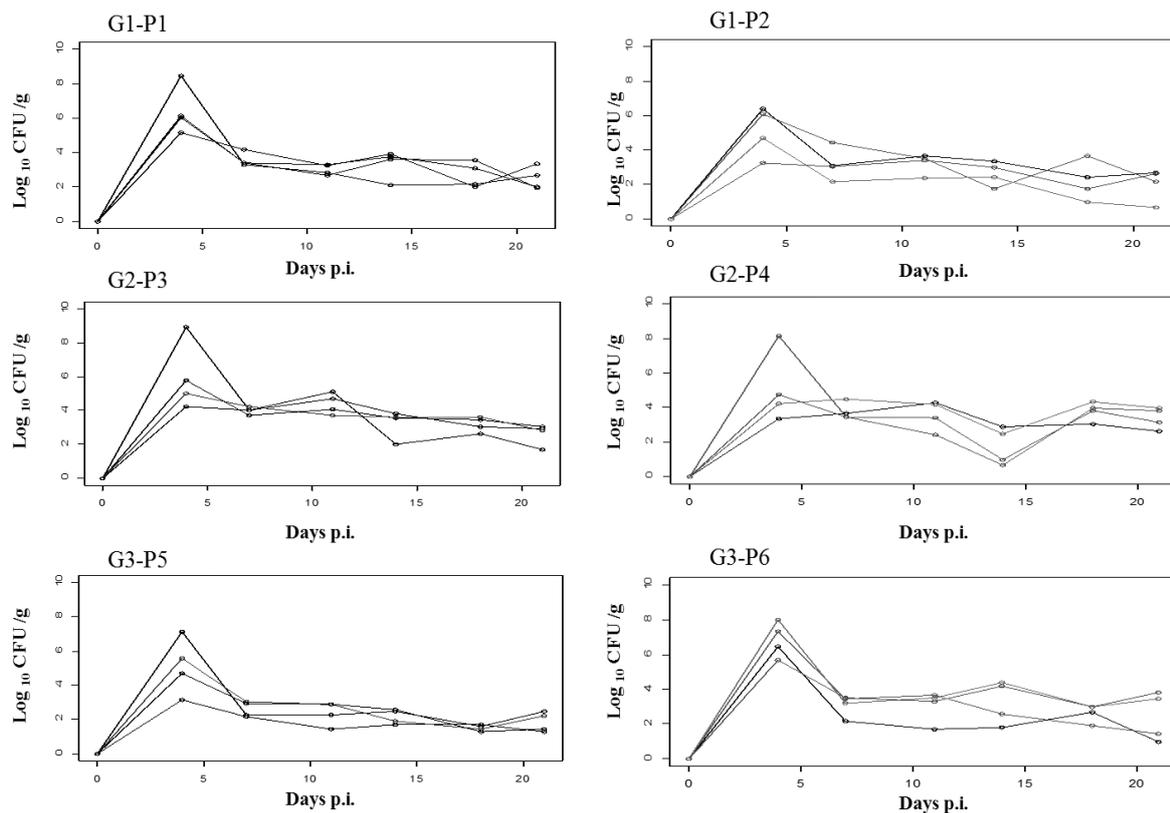


Figure 2. Individual curves for excretion of monophasic *Salmonella Typhimurium* in feces per pen over 21 days ($n=24$ pigs). G1: Group 1 (monitored for 21 days). G2: Group 2 (monitored for 49 days). G3: Group 3 (monitored for 84 days). P1 to P6: Pen 1 to Pen 6.

Likewise no significant difference was found between individual excretion levels of pigs in G1 and G2 ($p > 0.05$). In contrast, there was a significant difference in individual excretion levels of pigs in G3 ($p < 0.01$).

There was a strong positive ($\rho \geq 0.70$) significant correlation ($p < 0.05$) of the amount of *Salmonella* in feces between days 7-10, 35-38, 46-49, 49-52, 52-56, 56-60, and 66-70.

Table 1. Average (mean) and standard deviation (SD) values for fecal excretion (in log₁₀ CFU/g), antibody response (serology %OD) and Interferon-γ (pg/ml) on each sampling day throughout the trial.

	Days Post-Infection																								
	-7	3	7	10	14	17	21	24	28	31	35	38	42	45	49	52	56	59	63	66	70	73	77	80	84
Fecal excretion																									
Mean	0.0	5.8	3.4	3.3	2.7	2.7	2.4	2.2	1.7	2.4	2.0	2.0	2.5	1.8	2.0	1.4	1.5	1.6	2.0	1.6	1.7	2.2	2.0	2.0	1.7
SD	0.0	1.6	0.7	0.9	1.0	0.9	0.9	0.8	0.9	0.9	0.8	0.9	0.6	0.9	0.9	0.7	0.9	0.9	1.1	0.9	0.8	0.8	0.9	1.0	0.8
n	24	24	24	24	24	24	24	16	16	16	16	16	16	16	16	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Serology %OD																									
Mean	0.0	0.0	7.2	-	9.5	-	13.5	-	21.3	-	29.1	-	41.8	-	45.6	-	54.0	-	60.9	-	63.6	-	69.3	-	73.0
SD	0.0	0.0	8.3	-	8.9	-	9.5	-	15.9	-	16.6	-	17.8	-	18.0	-	18.6	-	17.6	-	17.5	-	13.9	-	10.9
n	24	16*	24	-	24	-	24	-	16	-	16	-	16	-	16	-	8	-	8	-	8	-	8	-	8
INF-γ pg/ml																									
Mean	1.3	58.4	7.5	-	0.0	-	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SD	3.4	40.3	4.0	-	0.0	-	7.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n**	16	16	16	-	16	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

n = number of pigs monitored for each sampling day (D0 to D84). CFU= Colony-Forming Unit

- : no sample

*Only 16 pigs in Groups 1 and 2 were sampled on D3 for serology

**INF-γ production was analyzed only on the 16 pigs in Groups 1 and 2.

Colonization levels in organs and intestinal contents

The average colonization levels of *Salmonella* per organ for the three groups range from $0.6 \pm 0.9 \log_{10}$ CFU/g (Duodenum) to $5.0 \pm 1.4 \log_{10}$ CFU/g (tonsils) (Table 2). Except for tonsils, samples taken on day 21 p.i. (G1) were more contaminated than those obtained on days 49 p.i. and 84 p.i. The colonization levels in tonsils ($p < 0.01$), mesenteric lymphatic nodes ($p < 0.01$), jejunum ($p < 0.01$), ileum ($p < 0.01$), and cecum ($p < 0.01$) significantly differed between the three necropsy days. All the ileum, cecum and tonsil samples were contaminated, whatever the group. Tonsils were the most contaminated organs, particularly on day 49 p.i. (G2) ($6.0 \pm 0.3 \log_{10}$ CFU/g). In contrast, samples of the duodenum and mesenteric lymph nodes showed low colonization levels on the three times of necropsy (mean levels of $0.6 \pm 0.9 \log_{10}$ CFU/g and $0.8 \pm 0.9 \log_{10}$ CFU/g respectively). These levels were significantly lower than those of the ileum and tonsils whatever the necropsy date ($p < 0.05$).

Table 2. Contamination levels in organs and intestinal contents in \log_{10} CFU/g for each group, at three autopsy time post inoculation (Group 1 = Day 21, Group 2 = Day 49 and Group 3 = Day 84).

Group		Tonsils	MLN	Duodenum	Jejunum	Ileum	Cecum	Feces
1	Positive/Total samples	8/8	8/8	4/8	8/8	8/8	8/8	8/8
	Mean	5.5	1.7	1.0	4.2	3.8	3.1	2.5
	SD	0.9	0.9	1.3	0.7	0.7	0.7	0.9
2	Positive/Total samples	8/8	5/8	4/8	8/8	8/8	8/8	8/8
	Mean	6.0	0.7	0.6	2.7	2.8	2.4	2.0
	SD	0.3	0.7	0.8	1.3	1.1	0.3	0.9
3	Positive/Total samples	8/8	1/8	2/8	8/8	6/8	8/8	8/8
	Mean	3.5	0.1	0.2	1.2	1.7	1.6	1.7
	SD	1.2	0.2	0.4	1.0	1.1	0.7	0.8
Total	Mean	5.0	0.8	0.6	2.7	2.8	2.4	2.2
	SD	1.4	0.9	0.9	1.6	1.3	0.8	0.9

SD= Standard deviation, MLN= Mesenteric Lymphatic Nodes, n=number of pigs

IFN- γ levels in serum

Only G1 and G2 were included for this analysis (n= 16 pigs). A week before inoculation, 13 pigs had IFN- γ levels under the LDD threshold and three had levels between the threshold (≤ 0.074) and 15 pg/ml. On day 3 p.i., all the pigs' levels were above the threshold, with a very high level of IFN- γ (mean value of 58.4 ± 40.3 pg/ml) (Table 1). The highest level of IFN- γ obtained on this day was 149.1 pg/ml. On day 7 p.i., IFN- γ levels decreased (mean value of 7.5 ± 4.0 pg/ml) (Figure 3). We found a positive correlation ($r=0.79$) between IFN- γ levels and the excretion results on day 3 p.i. ($p<0.01$).

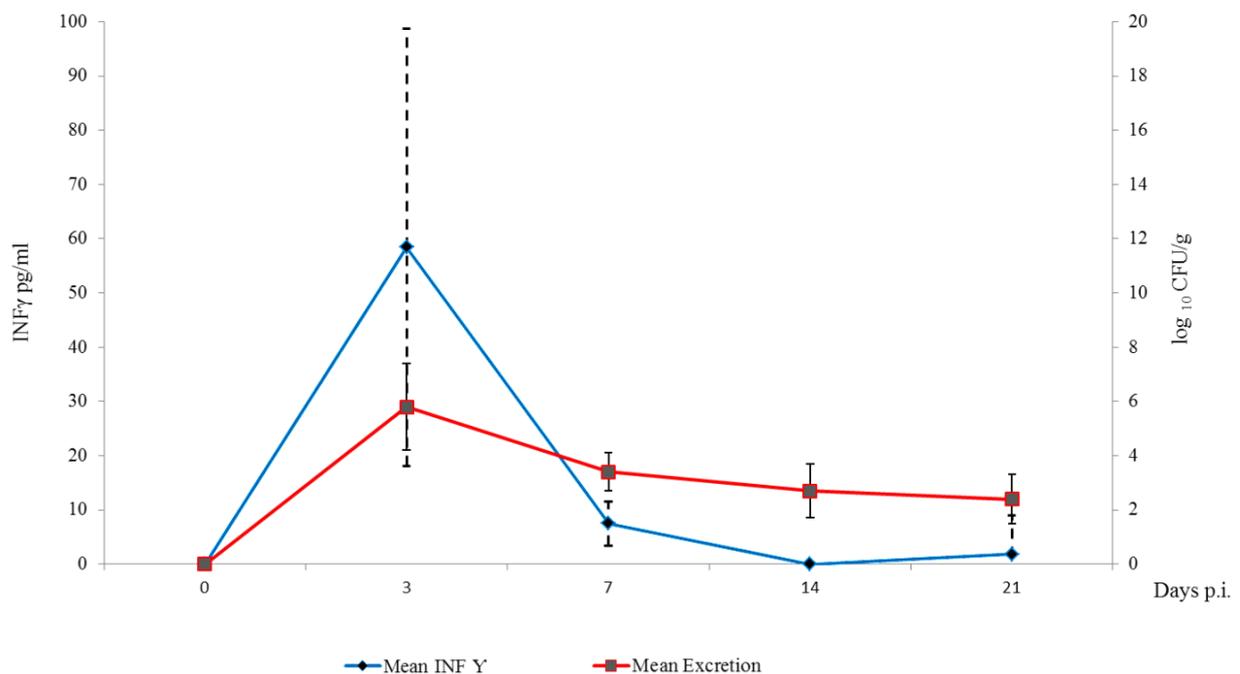


Figure 3. Average and standard deviation of IFN- γ production and monophasic *Salmonella Typhimurium* excretion levels over 21 days (pigs in Groups 1 and 2).

Kinetics of individual seroconversion

The seroconversion is a period of time during which specific antibodies develop and become detectable in serum. This event can occur at different times for different pigs and could indicate the onset of infection (Tizard, 2013). Antibody responses began by day 7 p.i.. The mean OD% varied from 0.0 ± 0.0 on day 3 p.i. to 73.0 ± 10.9 on day 84 p.i. (Table 1). All the pigs from G2 and G3 had seroconverted by day 49 p.i. In G1, only one pig had seroconverted by day 7 p.i. and had a high OD% until necropsy on day 21 p.i. In G2, two pigs had seroconverted by day 7 p.i.

Then, by day 42 p.i., 87.5% of pigs (7/8) in Group 2 had seroconverted and the whole group had seroconverted by day 49 p.i., the day of necropsy. In G3, only two pigs had seroconverted by day 7 p.i. All the pigs in G3 had seroconverted by day 42 p.i., and antibody levels stayed high until necropsy (day 84 p.i.).

Genetic stability of strains after *in vivo* passage (MLVA typing)

During *in vivo* passage, three MLVA profiles (A, B and C) were identified among the 368 isolates. Three hundred and fifty-one isolates belonged to MLVA Profile A (3-14-10-N-211), profile of the inoculated strain, 11 belonged to MLVA Profile B (3-14-11-N-211) and one to MLVA Profile C (3-14-9-N-211). Five isolates could not be typed and were classified as “NT” (non typable; see Table 3).

Table 3. Distribution of isolates in the different MLVA profiles according to sampling day

NT = Non typable

Days	Total isolates	MLVA Profile			
		Number of isolates (%)			
		A 3-14-10-N-211	B 3-14-11-N-211	C 3-14-9-N-211	NT
17	108	107 (99.0%)	1 (1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
42	120	114 (95.8%)	2 (1.7%)	1 (0.8%)	3 (2.5%)
84	140	130 (92.9%)	8 (5.7%)	0 (0.0%)	2 (1.4%)
TOTAL	368	351 (95.4%)	11 (3.0%)	1 (0.3%)	5 (1.4%)

The difference between profiles A, B and C lies in locus STTR6. Indeed, this 6-bp locus was repeated 10, 9 or 11 times respectively for profiles A, B and C. The difference was checked by sequencing the STTR6 locus.

Profile A was observed for 99.0% of strains on day 17 p.i., then 95.8% of strains on day 42 p.i., and finally 92.9% of strains on day 84 p.i., while the presence of profile B increased during the trial: 1.0% on day 17 p.i., 1.7% on day 42 p.i., and 5.7% on day 84 p.i.

MLVA profile B was found in one isolate of fecal sample of pig 5672, four isolates from fecal samples (n=2) and jejunum (n=2) of pig 5671, four isolates from the fecal samples of pig 5658, and two isolates from the cecum and ileum of this same pig (pig 5658).

The isolate with profile C was isolated from feces (pig 5660). Other isolates from those same pigs (5672, 5671, 5658, 5660) showed the profile A of the parental strain, in same samples or other types of samples.

DISCUSSION

The main aim of this work was to describe the dynamics of colonization and of pigs after inoculation with a monophasic variant of a *Salmonella* Typhimurium strain in experimental conditions. In our model, we inoculated pigs with 10^9 CFU of monophasic *S. Typhimurium*. This high dose guarantees the uniformity of colonization (Boyen et al., 2009).

After 24 hours of inoculation, the rectal temperature of pigs briefly increased. A high rectal temperature on day one post infection had already been described in pigs experimentally infected with *S. Typhimurium* (Knetter et al., 2015; Uthe et al., 2007).

We observed continuous excretion of *Salmonella* during the 84 days of the trial, which peaked at three days after inoculation, and shedding patterns varied by individual pig. Most of the time, studies have reported intermittent excretion for *S. Typhimurium* in experimental trials (Boyen et al., 2009; Ivanek et al., 2012), and in naturally contaminated pigs infected with either *S. Typhimurium* (Beloeil et al., 2003; Tessier, 2015) or monophasic *S. Typhimurium* (Fernandes et al., 2016). Continuous shedding may be explained by the high challenge dose, as already reported in a trial on pigs inoculated with *S. Typhimurium* (Osterberg and Wallgren, 2008). It could also result from the strain used in our trial, a monophasic *S. Typhimurium* 4,[5],12;i:-. A recent study has shown that pigs exposed to a contaminated environment with a considerably low dose of monophasic *S. Typhimurium* can excrete up to 10^4 CFU/g (Lynch et al., 2017).

In our study, pigs were divided into three groups depending on slaughter age. No statistical difference between levels of *Salmonella* excretion was observed between pigs in G1 and G2, but pigs in G3 had different patterns of excretion. Indeed, one pig's excretion level was much higher than that of the other pigs. The carrier status of pigs with *S. Typhimurium* has been widely described by many authors, and the existence of low shedders, persistent shedders (Knetter et al., 2015) and super shedders (Berriman et al., 2013) has been reported. It is difficult to diagnose high and low shedders because under farm and slaughterhouse

conditions, a rapid diagnostic test to determine the quantity of *Salmonella* excreted in feces is not available today. High shedders represent a major problem in the pig industry because they increase contamination levels on farms, generate recontamination between pigs, and continuously shed high levels of *Salmonella* (Berriman et al., 2013; Lanzas et al., 2011; Weaver et al., 2017).

The objective of this study was also to establish the degree of contamination in the organs and intestinal contents of inoculated pigs over time. Indeed, the laceration of a contaminated digestive tract exposes the carcass and the abattoir environment to the bacteria, and can contribute to the contamination of other carcasses by cross-contamination (Berends et al., 1997; Rostagno et al., 2003b). It is thus really important to implement tools to reduce the prevalence of the intestinal carriage of *Salmonella* in pigs.

At necropsy, 100% of the tonsils, ileum and cecum were contaminated in all groups, tonsils being the most contaminated organs in this study ($5.0 \pm 1.4 \log_{10}$ CFU/g). This level in tonsils was higher than that obtained for pigs challenged with 10^7 CFU of *S. Typhimurium* per gram (Boyen et al., 2009). The tonsils are one of the primary sites of invasion by bacteria, which subsequently spread to the super pharyngeal lymph nodes. They are also a primary site of colonization for *Salmonella* in pigs that have become subclinical carriers (Fedorka-Cray et al., 1995a). Indeed, the tonsils, lymphatic nodes and gastrointestinal tract are the most important colonization sites for *S. Typhimurium* and other serovars (Van Parys et al., 2011). The lymphatic nodes have also been reported to be the most common site for diagnosis and a site of predominant colonization of *S. Typhimurium* in pigs (Osterberg et al., 2010; Van Parys et al., 2013). However, in our study, we found a low colonization level in lymph nodes, possibly explained by our strain which could have a different behavior in the colonization of pigs' internal organs.

We found a higher rate of colonization in the jejunum, ileum and cecum than in the duodenum. Our results are consistent with studies which established that *S. Typhimurium* preferentially colonizes the ileum, cecum and colon, presumably due to low pH and fewer biliary salts than in the duodenum and jejunum (Uribe et al., 2016). The latter authors also reported that the jejunum, ileum and colon respond differently to infection by *Salmonella* spp. We also evaluated the response of the pig to infection by measuring interferon, as well as measuring the production of antibodies against *Salmonella*. The role of INF- γ during the infection has been demonstrated. This glycoprotein of 17 kDA is secreted by macrophages, NK and LTH1 cells (Stevens and Gray, 2013; Uthe et al., 2009). We observed that pigs

produced high levels of INF- γ three days after inoculation with monophasic *S. Typhimurium*. We also found a positive correlation between INF- γ levels and *Salmonella* fecal excretion levels three days after inoculation. This result has been already described in an experimental challenge on pigs with *S. Typhimurium* (Uthe et al., 2009).

Our study showed that seroconversion occurred at different moments during the trial. Five pigs were already positive seven days after infection and all the pigs in two groups had seroconverted by 49 days after infection. However, a recent study showed that 17 out of 20 pigs had seroconverted 28 days after exposure to an environment contaminated with monophasic *S. Typhimurium* (Lynch et al., 2017). Some authors have reported a seroconversion of 100% 14 days after inoculation (Osterberg and Wallgren, 2008) or 77.8% 40 days after inoculation (Van Parys et al., 2013) for pigs inoculated with *S. Typhimurium*. A recent longitudinal survey carried out on 360 pigs from three farms allowed us to observe that pigs seroconverted on average at 137 ± 2.2 days of age, and that by slaughter age, 75.07% of the pigs had seroconverted (Cevallos-Almeida et al., 2018a).

All our observations on colonization, IFN- γ production and serology tended to indicate that the monophasic variant of *S. Typhimurium* causes similar reactions in pigs after experimental inoculation than those observed by other authors after inoculation with *S. Typhimurium*. This is probably related to the fact that these two serovars have demonstrate to have strong similarities in terms of pathogenicity island (SPI) and virulence (Vieira-Pinto et al., 2012)

After *in vivo* passage in pigs, we identified two new MLVA profiles compared to the original MLVA profile. Maximal range of VNTR variation observed is an insertion or a deletion of one repeat unit in STTR6 locus. These new profiles were obtained for 3.3% of the typed isolates. These results are consistent with other studies which described little genetic variation or mutation of human isolates of *S. Typhimurium* after *in vitro* and *in vivo* passage assays in mice (Dimovski et al., 2014). Some studies have described variations in *Salmonella* MLVA loci such as STTR5, STTR9 and STTR10 due to multiple or single events of deletion (Dimovski et al., 2014; Vignaud et al., 2016). Our results indicate that mutation can occur in a short frame time. However, Dimovski et al. (2014) recommends that isolates whose profiles differ at one of the rapidly changing STTR5, STTR6, and STTR10 loci should be collapsed into the same cluster. Thus, surveillance of outbreaks using this methodology has to use this clustering approach.

CONCLUSION

The monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium used in this study induced a continuous and persistent excretion in pigs experimentally infected and monitored for 21, 49 or 84 days. The tonsils being the most infected organs. INF- γ response was high in the early stages of infection. A complete humoral response was achieved by 49 days post inoculation. *In vivo* passage of monophasic *S.* Typhimurium through the gastrointestinal tract of pigs resulted in little genetic variation of isolates in a single rapidly changing locus. These findings are important for clarifying colonization in pigs by the monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge funding by SENESCYT-ECUADOR (Secretaría de Educación Superior Ciencia y Tecnología Del Ecuador; Programa de Becas para Docentes Universitarios <http://www.educacionsuperior.gob.ec>), and would also like to thank Stéphanie Bougeard for her help in statistical analysis.

REFERENCES

- AFNOR (2008) NF U47-102, Animal health analysis methods — Isolation and identification of any *Salmonella* serotype or of specified *Salmonella* serotypes among mammals. France
- Bassi C et al. (2015) Épidémie de salmonellose à *Salmonella*, sérotype Typhimurium et sérotype 4,12:i:-, Paris, novembre 2012 à février 2013 Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire Institut de Veille Sanitaire 11-12
- Beloil PA et al. (2003) Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd Preventive Veterinary Medicine 60:207-226
- Berends BR, Van Knapen F, Snijders JM, Mossel DA (1997) Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses Int J Food Microbiol 36:199-206
- Berriman AD, Clancy D, Clough HE, Christley RM (2013) Semi-stochastic models for *Salmonella* infection within finishing pig units in the UK Mathematical biosciences 245:148-156 doi:10.1016/j.mbs.2013.06.004
- Boyen F, Pasmans F, Van Immerseel F, Donne E, Morgan E, Ducatelle R, Haesebrouck F (2009) Porcine *in vitro* and *in vivo* models to assess the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for pigs Laboratory animals 43:46-52 doi:10.1258/la.2007.007084
- Bugarel M, Vignaud ML, Moury F, Fach P, Brisabois A (2012) Molecular identification in monophasic and nonmotile variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium MicrobiologyOpen 1:481-489 doi:10.1002/mbo3.39
- Cevallos-Almeida M, Houdayer C, Dorenlor V, Eono F, Fablet C, Denis M, Kerouanton A (2018) Dynamic of *Salmonella* seroconversion of pigs from birth to slaughterhouse Submit to Veterinary Record Open
- CNR-ESS (2017) Rapport d'activité annuel Année d'exercice 2016. Institut Pasteur, Paris,
- Dimovski K et al. (2014) Analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium variable-number tandem-repeat data for public health investigation based on measured mutation rates and whole-genome sequence comparisons J Bacteriol 196:3036-3044 doi:10.1128/JB.01820-14
- Echeita MA, Herrera S, Usera MA (2001) Atypical, fljB-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium J Clin Microbiol 39:2981-2983 doi:10.1128/JCM.39.8.2981-2983.2001
- EFSA, ECDC (2010) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008 The EFSA Journal 10(3):442 doi:10.2903
- EFSA, ECDC (2016) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015 EFSA Journal 14(12):231 doi:doi:10.2903/j.efsa.2016.4634
- Fedoraka-Cray P, Kelley LC, Stabel TJ, Gray JT, Laufer JA (1995) Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine Infect Immun 63:2658-2664
- Fernandes L, Centeno M, Couto N, Nunes T, Almeida V, Alban L, Pomba C (2016) Longitudinal characterization of monophasic *Salmonella* Typhimurium throughout the pig's life cycle Vet Microbiol 192:231-237 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.07.018
- Funk JA, Harris IT, Davies PR (2005) Comparison of fecal culture and Danish Mix-ELISA for determination of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* prevalence in growing swine Vet Microbiol 107:115-126 doi:10.1016/j.vetmic.2005.01.006
- Gossner CM et al. (2012) Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011 Euro Surveill 17:1-4

- Hald T, Wingstrand A, Swanenburg M, von Altrock A, Thorberg BM (2003) The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses *Epidemiol Infect* 131:1187-1203
- Hauser E et al. (2010) Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans *Appl Environ Microbiol* 76:4601-4610 doi:10.1128/AEM.02991-09
- Ivanek R, Osterberg J, Gautam R, Sternberg Lewerin S (2012) *Salmonella* fecal shedding and immune responses are dose- and serotype- dependent in pigs *PLoS One* 7:e34660 doi:10.1371/journal.pone.0034660
- Knetter SM et al. (2015) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-infected pigs with different shedding levels exhibit distinct clinical, peripheral cytokine and transcriptomic immune response phenotypes *Innate Immun* 21:227-241 doi:10.1177/1753425914525812
- Koskiniemi S et al. (2013) Pathoadaptive mutations in *Salmonella enterica* isolated after serial passage in mice *PLoS One* 8:e70147 doi:10.1371/journal.pone.0070147
- Lalmanach AC, Lantier F (1999) Host cytokine response and resistance to *Salmonella* infection *Microbes Infect* 1:719-726
- Lanzas C, Lu Z, Grohn YT (2011) Mathematical modeling of the transmission and control of foodborne pathogens and antimicrobial resistance at preharvest *Foodborne Pathog Dis* 8:1-10 doi:10.1089/fpd.2010.0643
- Larsson JT, Torpdahl M, Petersen RF, Sorensen G, Lindstedt BA, Nielsen EM (2009) Development of a new nomenclature for *Salmonella* Typhimurium multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) *Euro Surveill* 14:1-5
- Leblanc-Maridor M, Denis M, Chidaine B, Rossero A, Seegers H, Beaudeau F, Belloc C (2011) Genetic instability of *Campylobacter coli* in the digestive tract of experimentally infected pigs *Vet Microbiol* 154:171-179 doi:10.1016/j.vetmic.2011.07.002
- Lynch H, Arguello H, Walia K, Lawlor PG, Duffy G, Gardiner GE, Leonard FC (2017) Evaluation of an Alternative Experimental Infection Method, Which Closely Mimics the Natural Route of Transmission of Monophasic *Salmonella* Typhimurium in Pigs *Foodborne Pathog Dis* 14:23-28 doi:10.1089/fpd.2016.2193
- Osterberg J, Lewerin SS, Wallgren P (2010) Direct and indirect transmission of four *Salmonella enterica* serotypes in pigs *Acta Vet Scand* 52:1-7 doi:1751-0147-52-30 [pii] 10.1186/1751-0147-52-30
- Osterberg J, Wallgren P (2008) Effects of a challenge dose of *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Yoruba on the patterns of excretion and antibody responses of pigs *Vet Rec* 162:580-586
- Raguenaud ME, Le Hello S, Salah S, Weill FX, Brisabois A, Delmas G, Germonneau P (2012) Epidemiological and microbiological investigation of a large outbreak of monophasic *Salmonella* Typhimurium 4,5,12:i:- in schools associated with imported beef in Poitiers, France, October 2010 *Euro Surveill* 17:1-7
- Ribot EM, Fair MA, Gautam R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet *Foodborne Pathog Dis* 3:59-67 doi:10.1089/fpd.2006.3.59
- Rostagno MH, Hurd HS, McKean JD, Ziemer CJ, Gailey JK, Leite RC (2003) Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica* *Appl Environ Microbiol* 69:4489-4494
- Ruggeri J et al. (2015) Inactivated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant (S. Typhimurium 1,4,[5],12:i-) in sows is effective to control infection in piglets under field condition *Vet Microbiol* 180:82-89 doi:10.1016/j.vetmic.2015.07.029
- Stevens MP, Gray JT (2013) *Salmonella* Infections in Pigs vol 1, Ed.2 edn. CAB International, UK

- Switt AI, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M (2009) Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i Foodborne Pathog Dis 6:407-415 doi:10.1089/fpd.2008.0213
- Tessier C (2015) Risques associés à *Salmonella* spp. dans la filiere porcine: l'exemple de l'Ile de la Reunion., Université de la Reunion
- Tizard I (2013) Veterinary Immunology vol 1. Ninth edn. Elsevier,
- Uribe JH et al. (2016) Transcriptional analysis of porcine intestinal mucosa infected with *Salmonella* Typhimurium revealed a massive inflammatory response and disruption of bile acid absorption in ileum Vet Res 47:1-10 doi:10.1186/s13567-015-0286-9
- Uthe JJ, Royae A, Lunney JK, Stabel TJ, Zhao SH, Tuggle CK, Bearson SM (2007) Porcine differential gene expression in response to *Salmonella enterica* serovars Choleraesuis and Typhimurium Molecular immunology 44:2900-2914 doi:10.1016/j.molimm.2007.01.016
- Uthe JJ, Wang Y, Qu L, Nettleton D, Tuggle CK, Bearson SM (2009) Correlating blood immune parameters and a CCT7 genetic variant with the shedding of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in swine Vet Microbiol 135:384-388 doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.074
- Van Parys A, Boyen F, Leyman B, Verbrugghe E, Haesebrouck F, Pasmans F (2011) Tissue-specific *Salmonella* Typhimurium gene expression during persistence in pigs PLoS One 6:e24120 doi:10.1371/journal.pone.0024120
- Van Parys A, Boyen F, Leyman B, Verbrugghe E, Maes D, Haesebrouck F, Pasmans F (2013) Induction of seroconversion and persistence of *Salmonella* Typhimurium in pigs are strain dependent Comp Immunol Microbiol Infect Dis 36:465-471 doi:10.1016/j.cimid.2013.03.007
- Vieira-Pinto M et al. (2012) Virulence Characterization of *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:-, the New Pandemic Strain. In: Anous B, Gurtler JB (eds) *Salmonella* - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies. doi:DOI: 10.5772/30242
- Vignaud ML, Amirouche M, Cadels-Six S, Jeuge S, Ellouze M, Le Hello S, Lallier R (2016) MLVA Profiles stability of *Salmonella* isolated from dry saussages durings production and shelf life In: International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis I3S, Saint Malo France, 6-7-8 june 2016 2016. pp 1-230
- Vigo GB et al. (2009) *Salmonella enterica* subclinical infection: bacteriological, serological, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial resistance profiles--longitudinal study in a three-site farrow-to-finish farm Foodborne Pathogens and Disease 6:965-972 doi:10.1089/fpd.2008.0239
- Weaver T et al. (2017) Longitudinal study of *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- shedding in five Australian pig herds Prev Vet Med 136:19-28 doi:10.1016/j.prevetmed.2016.11.010

3. Contamination expérimentale de porcs par les 3 sérovars majeurs de *Salmonella* retrouvés dans la filière porcine en France : colonisation et sérologie

Publication à soumettre dans *Foodborne Pathogens and Disease*

Experimental infection of pigs by *Salmonella* Derby, Typhimurium and it's monophasic variant : comparison of colonization and serology

María Cevallos-Almeida^{1,3}, Laure Martin¹, Catherine Houdayer¹, Valerie Rose¹, Jean-Marie Guionnet², Frédéric Paboeuf², Martine Denis¹ and Annaëlle Kerouanton¹

¹ ANSES, Hygiene and Quality of Poultry and Pig Products unit, Bretagne Loire University, BP 53, 22440 Ploufragan, [France](#).

² ANSES, SPF Pig Production and Experimental Unit, Bretagne Loire University, BP 53, 22440 Ploufragan, France.

³ Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics. Central University of Ecuador. Quito, Ecuador

ABSTRACT

Salmonella serovars Derby, Typhimurium and monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium are the most isolated serovars in pigs in France. To compare the excretion patterns, seroconversion to *Salmonella* and contamination in organs of pigs inoculated with strains of these three serovars, we conducted an experimental trial with 36 SPF piglets. Four pigs were used as negative control. The 32 other pigs were divided equally in 4 groups. Each group was inoculated with a different strain: *S. Derby*, *S. Typhimurium*, monophasic variant *S. Typhimurium* and another monophasic *S. Typhimurium* used as Positive control. Fecal and blood samples were collected twice a week until autopsy, at 21 days p.i. for the half of each group and 49 days p.i. for the remaining.. At autopsy (day 21 and 49 p.i.), the tonsils, mesenteric lymph nodes and different part of intestinal contents were collected from each pig. *Salmonella* were quantified in CFU/g by bacteriological method and dosage of anti-*Salmonella* antibodies were performed using ELISA Kit. Pigs inoculated with monophasic *S. Typhimurium* excreted *Salmonella* continuously in their feces during the trial. For the other serovars, at least one pig was negative in one or several days p.i. The quantity of *Salmonella* excreted was statistically different between the group inoculated with *S. Typhimurium* and monophasic *S. Typhimurium* ($p < 0.05$), but no differences were founded between the others serovars. Tonsils, cecum and jejunum were the most contaminated organs in all groups. Seroconversion for 100% of pigs was achieved at different days p.i., 28 for *S. Typhimurium*, 31 for monophasic *S. Typhimurium* and 38 for *S. Derby*. No large differences were found regarding excretion and colonization among the studied serovars.

Key words: *Salmonella*, Typhimurium, Derby, monophasic, colonization, antibody

INTRODUCTION

Salmonella (or *S. enterica* subspecies *enterica*) is responsible for human and / or animal salmonellosis. It's one of the most widely distributed foodborne pathogen worldwide. In Europe, it is the second cause of zoonosis after *Campylobacter sp.*, with a notification rate of 21.2 cases per 100.000 population (EFSA and ECDC, 2016). In France, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, and norovirus were responsible for 73% of all foodborne illnesses and 76% of all associated hospitalizations (Van Cauteren et al., 2017). *S. Typhimurium* is recognized as the predominant serovars isolated from human in Europe and *S. Derby* was among the 10 most frequently isolated serovars from human sources in different countries (Boyen et al., 2008; EFSA and ECDC, 2016). The monophasic variant of *Salmonella Typhimurium* is an emerging serovar in human infections around the world (Switt et al., 2009b; Weaver et al., 2017). Attribution source studies established the important role of pork in food-borne outbreaks of human salmonellosis because in several investigations many isolates detected in pigs have been responsible for human cases (Bonardi, 2017). Pigs can be infected by several *Salmonella* sérovars and the occurrence of these sérovars is also partly geographically determinate (Boyen et al., 2008; Xu et al., 2017). *S. Typhimurium* and *S. Derby* and the monophasic variant of *S. Typhimurium* are nowadays the most isolated serovars in swine and pork products in the European Union (Bonardi, 2017; EFSA and ECDC, 2016). In France *S Derby* and *Typhimurium* are also the most isolated serovars in pig production (Denis et al., 2013) and in the last ten years the French *Salmonella* Network was observed an increase in diagnosis of monophasic serovars in animal food and environmental sources (Bugarel et al., 2012b)

Differences in excretion and immune response in pigs have been reported between *Salmonella* serovars (Ivanek et al., 2012; Osterberg et al., 2010) but these studies not included monophasic *S. Typhimurium*.

While these three serovars are present in pork products prior to ingestion, serovar *Typhimurium* and the monophasic variant are more widely implicated in human salmonellosis. Also infection produced by *S Derby* seems to be less severe than *S. Typhimurium* (Ivanek et al., 2012; Matiasovic et al., 2014; Osterberg et al., 2009). To better characterize these three serovars, we implemented an experimental trial to evaluate their colonization and immune response of pigs.

MATERIALS AND METHODS

Strains

Four strains of *Salmonella*, belonging to personal laboratory collection were used for piglet's inoculation (Table 1). The monophasic *S. Typhimurium* strain S14CH63, already tested in a previous experiment (Cevallos-Almeida et al., 2018b) has been used as Positive control. All strains have been isolated in pig's fecal samples at a farm level or lymphatic nodes at slaughterhouse. To easily enumerate the strain in samples during the trial, they were made resistant to Rifampicin after several passages on XLD agar (Biokar, France) supplemented with Rifampicin (100 mg/l, Sigma, France). Rif-strains have been checked to be similar than parental strains by serotyping, PFGE typing (Ribot et al., 2006) and susceptibility testing.

Table 1. *Salmonella* strains used for the experimental design

Serovar	Experimental Group	Strain N°	Year of isolation	Source
<i>S. Derby</i>	SDb	07CR553	2007	Mesenteric lymph nodes of fattening pig
<i>S. Typhimurium</i>	ST	07CR095	2007	
monophasic variant of <i>S. Typhimurium</i>	mST	S12AK050	2012	Feces of fattening pig
	mST+	S14CH63	2014	

Experimental design

In vivo trial protocol was approved by Ethic Committee in Animal Research No 16 of the French Ministry of National Education, Higher Education and Research (License APAFIS No.7689-2016112311346069). The trial was conducted on 36 Secondary Specific Pathogen Free (SPF) piglets, born at the ANSES Ploufragan protected animal facilities.

At 4 weeks of age, the piglets were placed in separate hermetic experimental animal rooms of biosecurity level 3. The 32 piglets intended to be inoculated were placed in four separate rooms, with two pens per room (8 pigs per room, 4 per pen). Each room constitutes a group. In Group 1 (or SDb), 2 (or ST), 3 (mST) piglets were inoculated respectively by *S. Derby*, *S. Typhimurium* and the monophasic *S. Typhimurium*. In the Group 4 (Control group or mSTC+), piglets were inoculated with a monophasic *S. Typhimurium* control strain.

Biosecurity measures were all carried out by the animal facility staff. Pigs were monitored daily, rectal temperature being measured and clinical manifestations recorded. Food consumption and body weight were reported weekly.

Experimental Inoculation

Seven days before inoculation, the 36 piglets were verified to be free of *Salmonella*. Fecal samples of each pig have been analyzed following the NF U47-102 method (AFNOR, 2008). At day 0, the 32 pigs were inoculated orally using a cannula connected to a screw syringe. We gave 10 ml of a solution containing a bacterial solution of 10^8 CFU for each serovar per ml in Salt Tryptone Broth (SLT) (Biomerieux, France). The 8 control pigs received orally 10 ml of SLT Broth.

Sampling and autopsy

Fecal samples (at least 30 g) were taken directly from the animal rectum at day 1, 2 and 3 days after inoculation in the first week, and twice a week until day 49 after inoculation

For measurement of post infections immune responses, blood samples were at the same dates of fecal samples. Upon receipt of the blood, it was centrifuged at 3500 rpm for 5 minutes to recover the serum for the dosage of anti-*Salmonella* antibodies. The sera were stored at -20°C until analysis.

The 4 groups were autopsied at different ages: 21 days for 16 pigs (4 in each group) and 49 days for the remaining pigs. The 4 control pigs were kept in 2 separate rooms and slaughtered also at different ages: 2 pigs at 21 days and 2 pigs at 49 days. Pigs were euthanized after intravenously inoculation of an overdose of tiletamine and zolazepam (Zoletil 100, Virbac, France). Autopsy was performed by observation of organs and tissues in abdominal and thoracic cavities. The tonsils, mesenteric lymph nodes (MLN) and intestinal contents of duodenum, jejunum, ileum and cecum were collected.

Enumeration and detection of *Salmonella*

All the analyses were performed as already described (Cevallos and others, 2018). Briefly, fecal and autopsy samples were 1:10 diluted in Buffered Peptone Water (BPW, Biomerieux, France). Serial dilution was then performed in TS until dilution 10^{-4} . One milliliter of the dilution 10^{-1} was seeded in 3 plates of XLD supplemented with rifampicin (XLD-Rif), and 100 μl of the following dilutions were plated on one plate of XLD-Rif. After incubation at

37°C for 24 hours, typical black colonies of *Salmonella* were counted for enumeration of *Salmonella* in CFU/g of sample. If enumerations were negative for *Salmonella* sp because under the limit of enumeration (10 CFU/g), *Salmonella* detection were continued from enrichment using the NF U47-102 method (AFNOR, 2008) in order to confirm the presence or absence of *Salmonella* in the sample. This method was also applied for all the samples collected from control pigs along the assay in order to check the absence of *Salmonella*.

Antibody response against *Salmonella*

For antibody screening, we used the IDEXX Swine *Salmonella* Ab Test® (IDEXX, France). In accordance with the manufacturer's recommendations, samples with OD% values equal to or greater than 15% were considered positive.

Data Management and statistical analysis

Statistical analysis was performed using R software (R version 3.2.4). The excretion level was compared between for each sampling time post-inoculation with a Tukey test ($p < 0.05$). The amount of *Salmonella* shed by each pig on the whole trial period was estimated by calculating the area under the curve of excretion (AUC). A Kruskal-Wallis test was used to compare the AUC between groups ($p < 0.05$). For the data obtained from the autopsy, we compared the contamination levels of each group at the 2 dates of autopsy with a Kruskal-Wallis Test ($p < 0.05$).

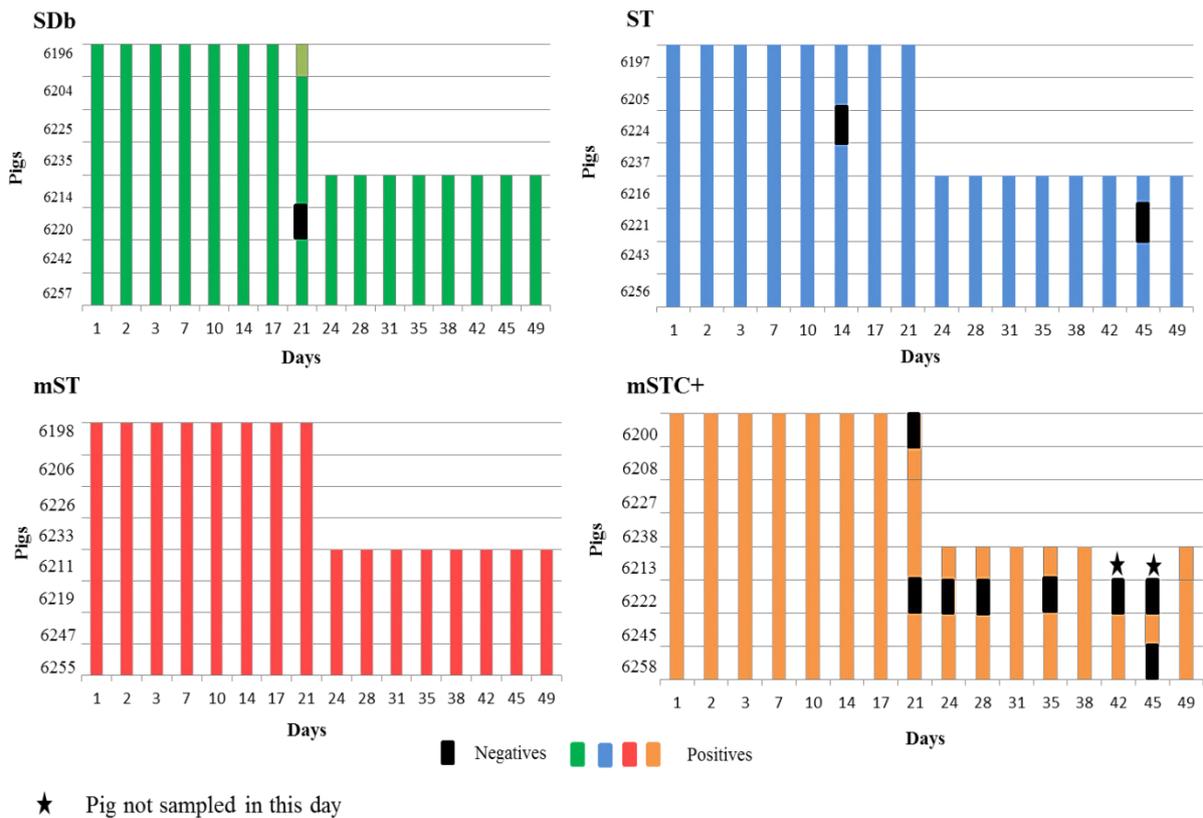
RESULTS

Clinical monitoring

No clinical signs were founded in control pigs. Clinical signs in pigs differ according the strain inoculated. A transitory diarrhea was founded in all groups at least one time: for Group SDb on day 14 p.i., for Group ST on day 7 p.i. and 10 p.i., for Group mST on day 21 p.i. and for group mSTC+ on day 14 p.i. For Group mST, not fever was remarked in all trial. Concerning weight of pigs, we didn't find statistical difference ($p > 0.05$) between inoculated pigs and control group and neither for feed consumption. On days 42 and 45 p.i., a pig has not been sampled in group mST+ due to rectal prolapse. Feces of this pig were sampled at the time of autopsy.

Comparison between *Salmonella* serovars: Excretion in fecal samples

The control pigs remained negative for *Salmonella* in feces throughout the trial. In the Group mST, all pigs were positives in all days and fecal excretion was continuous. In the other groups, at least one pig was negative on specific days after inoculation. For Group SDb, one pig was negative on day 21. In Group ST, two pigs were negative, one on day 14 p.i. and one on day 45 p.i. In Group mSTC+ we found three pigs negative, one only on day 21 p.i. (n°6200), another only on day 45 p.i (n°6258) and one pig (n°6222) showed intermittent shedding since day 21 p.i. until day 49 p.i. (Figure 1).



★ Pig not sampled in this day
Figure 1. Distribution of negative pigs to Salmonella in fecal excretion for each serovar. SDb: S. Derby 07CR553, ST: S. Typhimurium, mST: monophasic S. Typhimurium S12AK50, mSTC+: monophasic S. Typhimurium control positive S14CH63

Mean excretion and standard deviation data for all groups are presented in Table 1.

Table 1. Average (Mean) and standard deviation (S.D.) of fecal excretion (in log₁₀ CFU/g) and serology results (in OD%) for each sampling day and for all serovars. Sample with OD% ≥ 15% are considered as positive (in bold).

		DAYS P.I.	-7	1	2	3	7	10	14	17	21	24	28	31	35	38	42	45	49
<i>S. Derby</i> 07CR553	Fecal Excretion	Mean	0.0	3.5	2.6	2.2	2.4	2.3	3.7	3.2	1.4	2.0	1.7	1.2	1.1	1.1	1.8	1.6	1.7
		S.D.	0.0	1.1	1.0	0.6	0.6	0.4	0.6	0.5	1.0	0.5	0.7	0.4	0.6	0.6	0.3	0.4	0.6
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	4	4	4	4	4	4	4
	Serology	Mean	0.1	0.0	-	0.3	13.9	23.0	20.5	13.3	18.9	40.1	45.5	41.7	41.6	53.9	58.1	63.5	70.3
		S.D.	0.2	0.0	-	0.5	22.7	22.8	22.9	15.8	23.1	37.9	32.8	33.9	29.3	36.0	36.7	35.7	35.3
		n	8	8	-	8	8	8	8	8	8	8	4	4	4	4	4	4	4
<i>S. Typhimurium</i> 07CR095	Fecal Excretion	Mean	0.0	3.7	3.0	2.7	1.2	2.4	1.5	1.7	1.8	1.8	1.8	1.6	1.2	1.1	1.7	1.5	1.3
		S.D.	0.0	1.2	1.4	0.4	1.0	0.7	1.1	0.8	1.0	0.9	0.8	0.9	0.5	0.5	1.0	1.1	0.7
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	4	4	4	4	4	4	4
	Serology	Mean	0.0	0.0	-	0.1	4.7	9.0	9.1	8.5	15.6	21.0	33.7	28.9	38.9	46.5	46.9	54.2	63.7
		S.D.	0.0	0.0	-	0.2	5.9	10.2	12.8	5.7	7.6	11.6	21.9	11.3	16.6	12.6	13.2	15.9	23.0
		n	8	8	-	8	8	8	8	8	8	8	4	4	4	4	4	4	4
Monophasic <i>S. Typhimurium</i> S12AK50	Fecal Excretion	Mean	0.0	4.2	3.7	3.2	2.8	3.3	2.3	2.0	3.4	2.0	1.8	2.3	2.2	1.8	2.3	2.1	2.2
		S.D.	0.0	1.7	0.8	0.4	0.8	0.9	0.6	0.7	0.9	0.9	0.4	0.6	0.3	0.4	0.3	0.8	0.3
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	4	4	4	4	4	4	4
	Serology	Mean	0.0	0.0	-	0.0	7.3	10.1	6.0	12.3	20.5	12.5	16.7	29.0	51.8	73.0	76.8	84.0	82.4
		S.D.	0.0	0.0	-	0.0	14.2	18.8	9.1	14.2	34.7	7.0	11.4	16.6	20.2	24.5	21.2	17.5	20.2
		n	8	8	-	8	8	8	8	8	8	8	4	4	4	4	4	4	4
<i>S. Typhimurium</i> Control S14CH63	Fecal Excretion	Mean	0.0	4.2	3.9	4.0	2.5	2.5	2.6	3.0	1.0	1.0	1.5	1.9	1.7	1.3	0.5	0.8	0.8
		S.D.	0.0	2.1	1.4	3.2	4.2	5.5	4.2	4.8	10.8	4.6	6.9	12.1	21.7	30.8	35.4	39.0	38.1
		n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	4	4	4	4	4	4	4
	Serology	Mean	0.0	0.0	-	0.3	12.8	20.0	22.0	29.3	30.6	40.3	48.5	53.5	65.4	72.6	79.5	83.9	94.2
		S.D.	0.0	0.0	-	0.7	18.6	23.5	31.5	34.3	34.6	24.7	31.9	37.0	35.9	37.6	46.7	45.0	44.3
		n	8	8	-	8	8	8	8	8	8	8	4	4	4	4	4	4	4

n : number of followed pigs for each day of sampling (D-7 to D49); CFU : Colony Forming Units; - : no sample

We found statistical difference with multiple comparisons of Holms ($p < 0.05$) between the average of excretion levels obtained in the groups on day 3, 14, 17 and 21 p.i. (Figure 2).

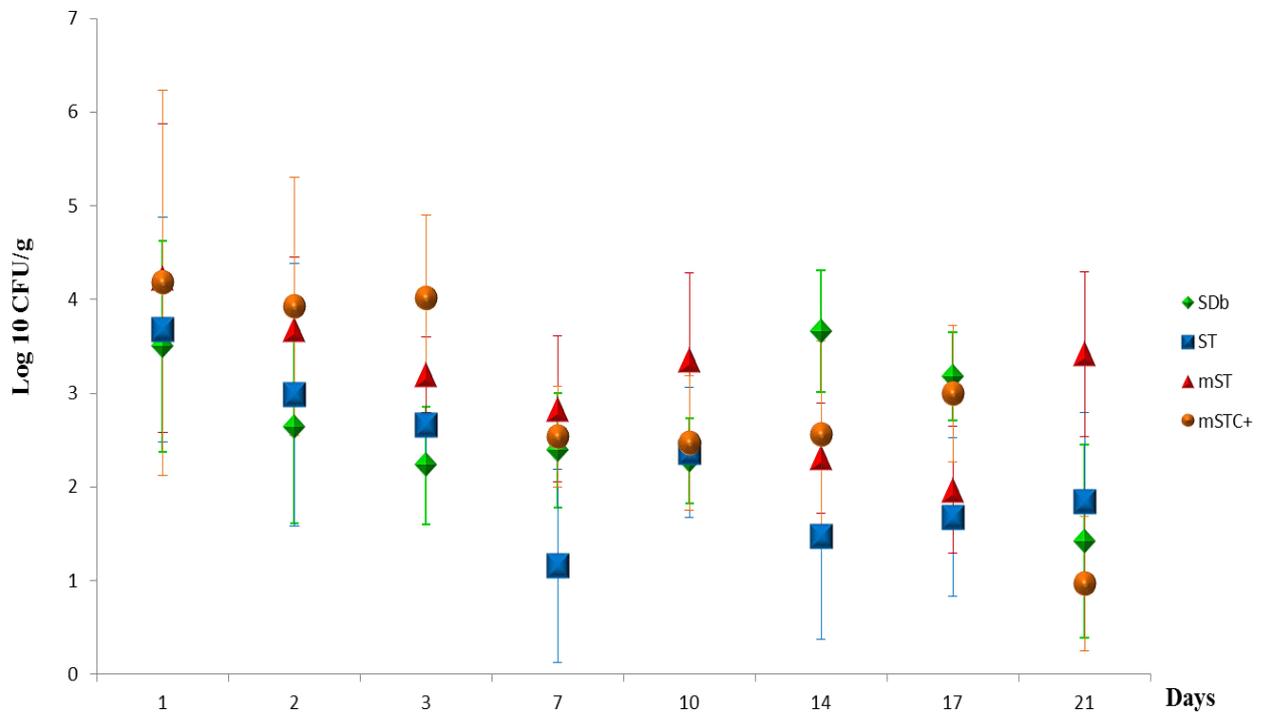


Figure 2. Average of fecal excretion of 32 pigs followed during 21 days (8 pigs per serovar). SDb: *S. Derby 07CR553*, ST: *S. Typhimurium*, mST: monophasic *S. Typhimurium S12AK50*, mSTC+: monophasic *S. Typhimurium control positive S14CH63*

At Day 3, Group SDb differs from mSTC+ Group, at day 14, Group SDb differs from Group ST, at day 17 Group SDb differs from Group mST and mSTC+ and at day 21 group mST differs from Groups SDb, ST and mSTC+.

Inoculated pigs of Groups ST, mST, and mSTC+ followed during 21 days (32 pigs) showed the excretion pic on day 1 p.i. with variation in levels through the trial. Group SDb showed also a high excretion at day 1 but the excretion pic was at day 14 post inoculation, associated to a diarrhea passage at this day (Figure 3).

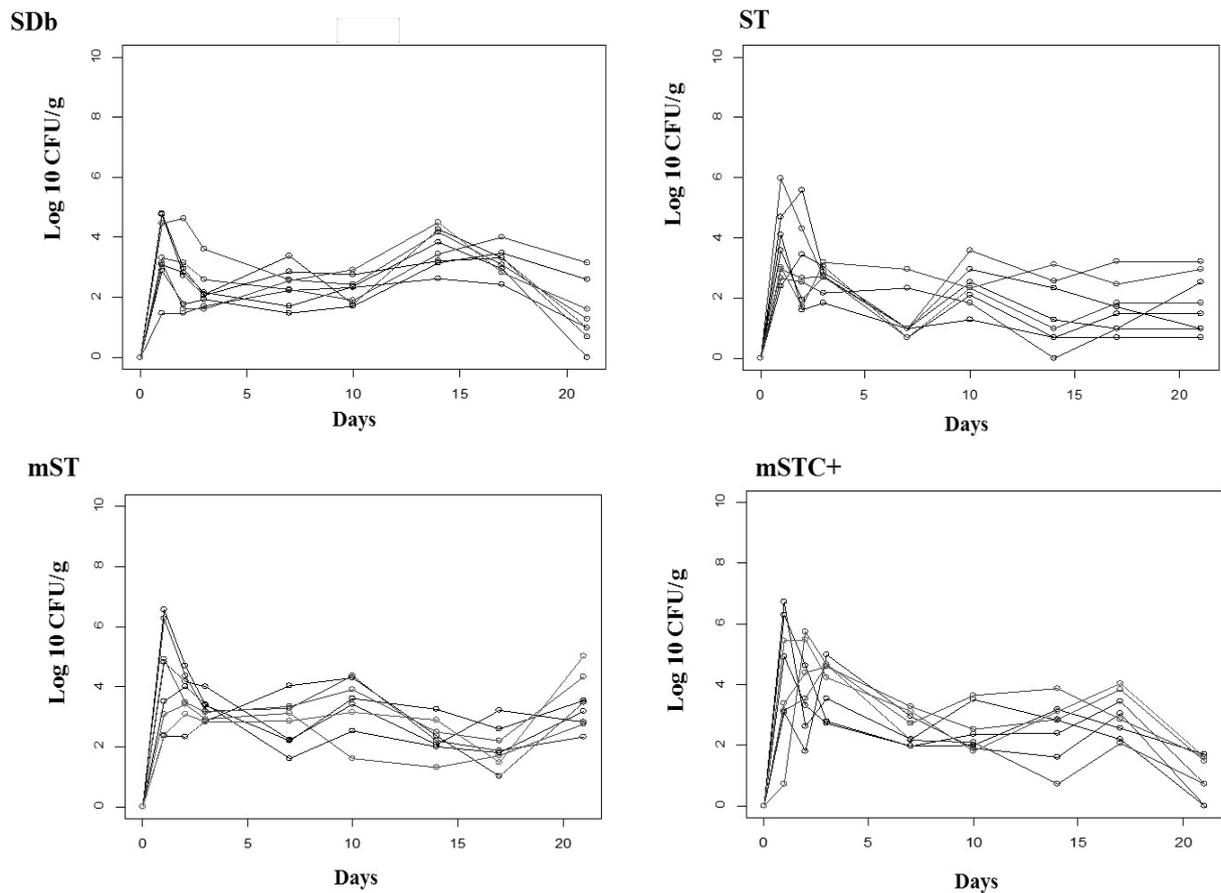


Figure 3. Kinetics of *Salmonella* excretion for each pigs of each group (8 pigs per group), during 21 days. SDb: *S. Derby* 07CR553, ST: *S. Typhimurium*, mST: monophasic *S. Typhimurium* S12AK50, mSTC+: monophasic *S. Typhimurium* control positive S14CH63

Comparison of AUC measure from excretion's curves of the 32 pigs followed during 21 days p.i. using Kruskal-Wallis test showed significant difference ($p < 0.05$) between the group ST and group mST (Figure 4).

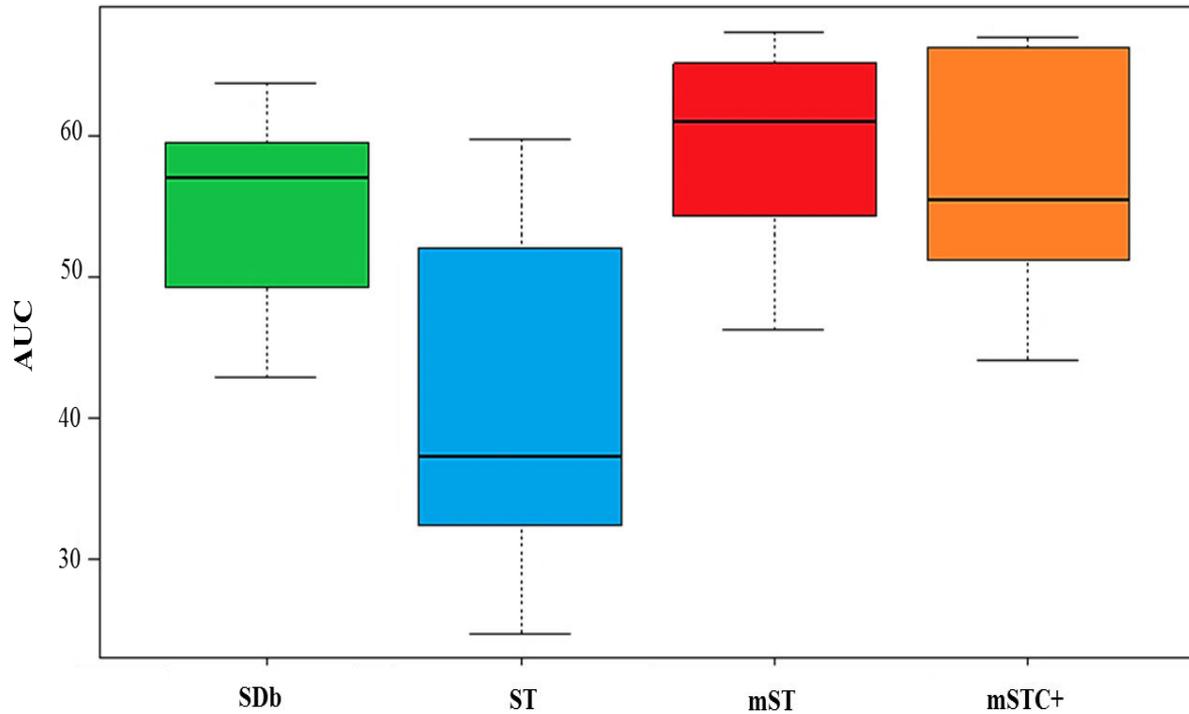


Figure 4. Comparison of AUC obtained for each group (21 days). SDb: *S. Derby* 07CR553, ST: *S. Typhimurium*, mST: monophasic *S. Typhimurium* S12AK50, mSTC+: monophasic *S. Typhimurium* control positive S14CH63

***Salmonella* colonization in organs and intestinal contents**

At each autopsy date, 100% of the cecum content and tonsils samples were contaminated, whatever the group. Ranging from 25% to 75% of mesenteric lymph nodes contaminated, according to serovar and autopsy date. For all serovars, contamination levels in intestinal contents increased through the intestinal passage until ileum and begin to decrease in cecum and fecal samples. For all serovars, the lowest levels of contamination were found in the duodenum and mesenteric lymph nodes, while the tonsils were significantly the most contaminated, at day 21 as at day 49 ($p < 0.01$) (Table 3). On the basis of the analysis made at autopsy, we don't found statistical difference between serovars whatever the type of sample, neither at day 21 nor at day 49 ($p > 0.05$).

Table 3. Contamination levels in organs and intestinal contents in log₁₀ CFU/g (mean±SD) for each inoculated group, at autopsy day 21 p.i., day 49 p.i. and in total.

Serovar / Strain	Autopsy date	Tonsils	MLN	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum
SD / 07CR553	Day 21	4.8±0.2	0.2±0.3	0.5±0.3	1.9±1.4	2.8±0.7	2.5±0.7
	Day 49	5.4±0.6	0.2±0.3	0.6±0.4	0.6±0.4	1.1±1.3	1.7±0.7
	TOTAL	5.1±0.6	0.2±0.3	0.6±0.4	1.2±1.2	1.9±1.3	2.1±0.8
ST / 07CR095	Day 21	4.7±0.7	0.6±1.2	1.3±0.8	3.0±0.7	2.3±0.4	2.8±1.3
	Day 49	4.4±1.1	1.0±1.2	0.2±0.3	1.5±0.2	2.7±0.8	2.1±0.6
	TOTAL	4.5±0.9	0.8±1.1	0.7±0.8	2.2±0.9	2.5±0.6	2.4±1.0
mST / S12AK50	Day 21	4.7±0.5	0.0±0.0	0.5±0.3	0.8±0.7	2.3±1.2	2.4±0.1
	Day 49	5.7±0.3	0.2±0.3	0.4±0.7	1.5±1.7	2.6±1.8	1.4±0.9
	TOTAL	5.2±0.7	0.1±0.3	0.5±0.5	1.1±1.3	2.4±1.4	1.9±0.8
mSTC+ / S14CH63	Day 21	4.8±0.2	0.7±0.5	0.7±0.6	1.5±1.1	1.4±1.5	1.9±0.8
	Day 49	5.4±0.3	0.4±0.5	0.3±0.4	1.1±1.2	0.8±0.3	1.6±0.8
	TOTAL	5.1±0.4	0.6±0.5	0.5±0.5	1.3±1.1	1.2±1.0	1.8±0.8

MLN: Mesenteric Lymphatic Nodes, SDb: *S. Derby*, ST: *S. Typhimurium*, mST: monophasic *S. Typhimurium*, mST+: monophasic *S. Typhimurium* control strain. SD: Standard deviation

Antibody responses

Means of OD% per day are showed in table 1. Pigs became seropositive from day 7 p.i. for pigs in group SDb, mST and mST+ while for pigs in group ST, it was from day 10 p.i.. Seroconversion of 100% of pigs is reach at different times according to serovar: all pigs in Group mSTC+ were seroconverted by day 24 p.i., pigs in Group-ST by day 28 p.i., pigs in Group mST by day 31 p.i., and pigs in Group SDb by day 38 p.i.

Comparing frequencies of *Salmonella's* seroconverted pigs and frequencies of *Salmonella's* shedding pigs, we found that the pigs positives to *Salmonella* in fecal excretion, were not positives for ELISA *Salmonella* test in the four groups (Figure 5). At day 1 and 3 p.i., the excretion frequencies were high in each group, however in spite of being positive status they did not seroconvert. From day 7 the frequencies of pigs that seroconverted started to increase in all groups. On day 49, 100% of pigs shedding *Salmonella* and seroconverted in ELISA test.

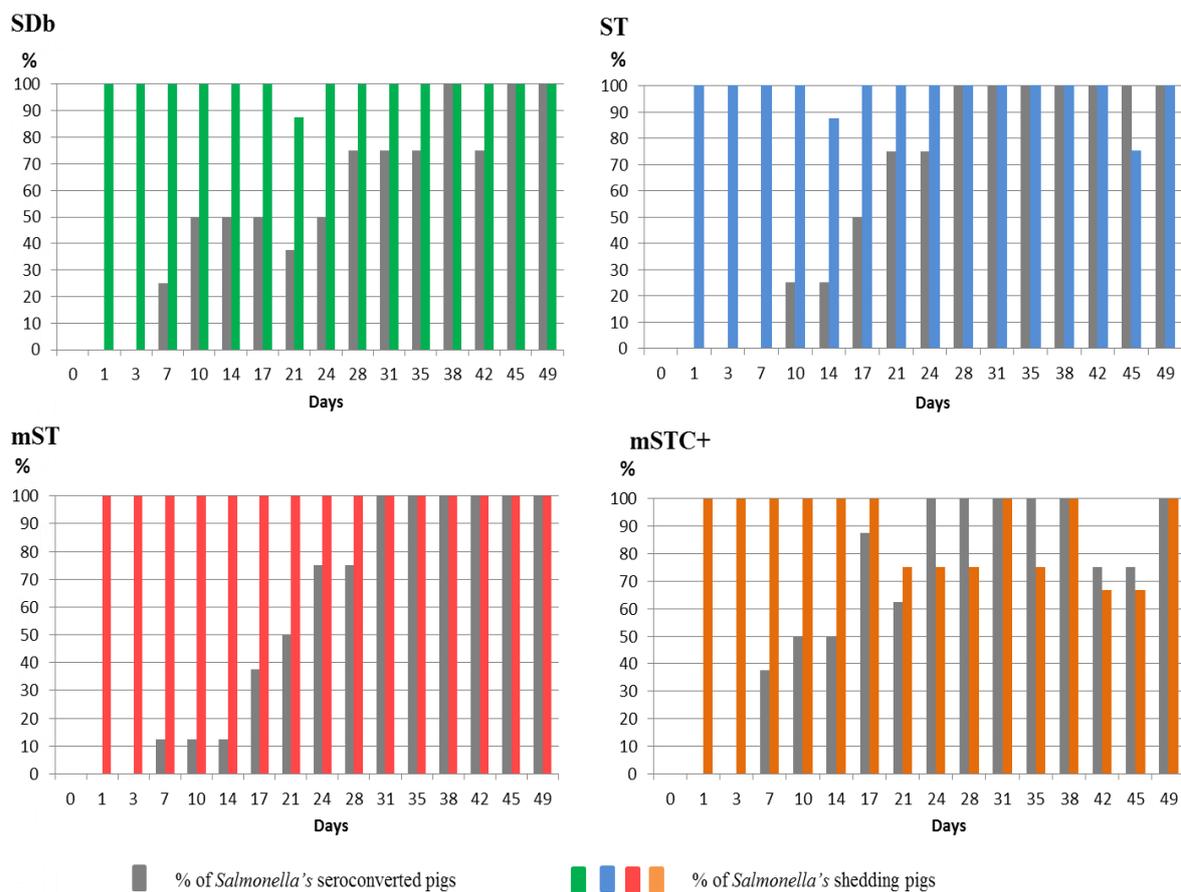


Figure 5. Comparison between frequencies (%) of *Salmonella's* seroconverted pigs and *Salmonella* shedding pigs per day through 49 days of trial

DISCUSSION

In our study we compared the patterns of excretion, immunological response and colonization in several organs in four groups of animals inoculated with strains of *S. Derby*, *S. Typhimurium* and monophasic *S. Typhimurium*. We found differences in some clinical signs, like diarrhea and fever in pigs. While all groups had transient diarrhea at least one time, fever was not remarked in mST group. In mST+ group several pigs had fever at day 1, 2 and 7 p.i.. The same strain monophasic *S. Typhimurium* S14CH63 used in 2016 (Cevallos et al., 2018) caused fever only at day one p.i.. In other studies that compare infection with *S. Typhimurium* with *S. Yoruba*, and *S. Derby* with *S. Cubana*, any clinical sign or diarrhea were observed (Osterberg et al., 2009; Osterberg and Wallgren, 2008). However, for *S. Typhimurium* several clinical signs as fever, diarrhea and anorexia were reported in animals inoculated at dose of 10^9 CFU (Boyen et al., 2009).

Excretion dynamics for all groups showed that the high level of excretion was reached at day one post inoculation, except for the group inoculated with *S. Derby*. In this group pic of excretion was reached at day 14, probably due to contamination with Rotavirus. Indeed, concurrent infection of Rotavirus with other enteric pathogens such as Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) or *Salmonella* is reported as common and causes an additive effect resulting in more severe clinical disease (Constable et al., 2016). In the following days after inoculation *Salmonella* excretion was variable depending of serovar inoculated. Variation in virulence of various *Salmonella* serovars may play an important role in the ability of and speed at which *Salmonella* serovars can disseminate throughout the pigs (Loynachan et al., 2004). Only the pigs in mST group have been shown to shed continuously *Salmonella* all along the experimental trial. A recent longitudinal study in pigs naturally infected with *Salmonella* Typhimurium, indicates that these serovar may cause high shedding rates amongst colonized pigs, particularly in younger animals (Weaver et al., 2017). In SDb and ST groups at least one pig was negative for *Salmonella* in different days of sampling. These results are consistent with to other study in pigs experimentally infected with *S. Typhimurium* and *S. Derby*, where pigs tends to shed *Salmonella* in shorter blocks of time (both of part of the continuous and intermittent shedding) and reenter in a state of intermittent non shedding (Ivanek et al., 2012).

We found statistical differences between total excretion levels between pigs inoculated with serovars *S. Typhimurium* and monophasic variant of *S. Typhimurium* (mST), but not for pigs inoculated with *S. Derby*. Our work is the first comparison of the colonization between

S. Typhimurium and monophasic *S. Typhimurium*. The monophasic variant S12AK50 strain caused a higher excretion than the *S. Typhimurium* 07CR095 strain. Even if the monophasic variant is genetically related to *S. Typhimurium* (Bugarel et al., 2012a; Soyer et al., 2009a; Vieira-Pinto et al., 2012), further research seems to be necessary to establish differences between these two serovars in colonization of pigs.

For all serovars the highest contamination in organs and intestinal contents was found in tonsils, cecum and jejunum. The less contaminated sites were the lymph nodes and the duodenum. Matiasovic et al. (2014), showed that after *S. Typhimurium* inoculation, only tonsils and lymphatic nodes remained culture positive until 28 days and only tonsils and cecum for inoculation by *S. Derby*.

Pigs seroconverted at different times according to the serovar inoculated. We found 100 % of seroconversion in pigs in group mST by day 31 p.i.. Our results are similar to those found by Lynch et al., who found 85% of pigs seroconverted at day 28 p.i. (Lynch et al., 2017). For pigs in groups ST and SDb, 100% seroconversion was achieved by day 28 and 38 p.i. Another study showed a different result with a seroconversion of 100% of pigs within two weeks after infection (Osterberg and Wallgren, 2008). For *S. Derby*, our results are different to those found by Osterberg et al., (2009) with 100% seroconversion at 21 days. Pigs in mST+ seroconverted earlier than those of other groups: 100% of seroconversion was achieved by day 24 p.i. During our precedent study with the same monophasic strains, 100% of seroconversion occurred only by 49 days p.i. (Cevallos-Almeida et al., 2018b).

CONCLUSION

This study showed similar profiles of *Salmonella* excretion and colonization profiles whatever the serovar used for experimental inoculation. However the amount of excretion was different between groups inoculated with *S. Typhimurium* 07CR095 and monophasic *S. Typhimurium* S12AK50. Seroconversion was achieved at different days according to the serovar inoculated. Further researches are necessary to establish virulence genetic patterns of serovars to understand the differences in colonization and pathogenicity among serovars colonizing in pigs.

Acknowledge

We acknowledge funding by SENESCYT-ECUADOR (Secretaría de Educación Superior Ciencia y Tecnología Del Ecuador; Programa de Becas para Docentes Universitarios <http://www.educacionsuperior.gob.ec>), and would also like to thank Christelle Fablet from Anses Ploufragan unit of Swine Epidemiology and Welfare Research for her help in the statistical analysis

REFERENCES

- AFNOR (2008) NF U47-102, Animal health analysis methods — Isolation and identification of any *Salmonella* serotype or of specified *Salmonella* serotypes among mammals. France
- Bonardi S (2017) *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union *Epidemiology & Infection* 145:1513-1526 doi:10.1017/S095026881700036X
- Boyen F, Haesebrouck F, Maes D, Van Immerseel F, Ducatelle R, Pasmans F (2008) Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control *Vet Microbiol* 130:1-19 doi:10.1016/j.vetmic.2007.12.017
- Boyen F, Pasmans F, Van Immerseel F, Donne E, Morgan E, Ducatelle R, Haesebrouck F (2009) Porcine *in vitro* and *in vivo* models to assess the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for pigs *Laboratory animals* 43:46-52 doi:10.1258/la.2007.007084
- Bugarel M, Granier SA, Bonin E, Vignaud ML, Roussel S, Fach P, Brisabois A (2012) Genetic diversity in monophasic (1,4,[5],12:i:- and 1,4,[5],12:-:1,2) and in non-motile (1,4,[5],12:-:-) variants of *Salmonella enterica* S. Typhimurium *Food Research International* 45 1016–1024 doi:10.1016/j.foodres.2011.06.057
- Cevallos-Almeida M, Houdayer C, Rose V, Bailly Y, Paboeuf F, Fablet C, Denis M, Kerouanton A (2018) Colonization dynamics and serology of pigs experimentally infected with a monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium *In revision for Foodborne Pathog Dis*
- Constable P, Hinchcliff K, Done S, Gruenberg W (2016) *Veterinary Medicine - E-BOOK: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. In: Sciences EH (ed)
- Denis M, Houard E, Fablet A, Rouxel S, Salvat G (2013) Distribution of serotypes and genotypes of *Salmonella enterica* species in French pig production *Vet Rec* 173:370 doi:10.1136/vr.101901
- EFSA, ECDC (2016) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015 *EFSA Journal* 14(12):231 doi:doi:10.2903/j.efsa.2016.4634
- Ivanek R, Osterberg J, Gautam R, Sternberg Lewerin S (2012) *Salmonella* fecal shedding and immune responses are dose- and serotype- dependent in pigs *PLoS One* 7:e34660 doi:10.1371/journal.pone.0034660
- Loynachan AT, Nugent JM, Erdman MM, Harris DL (2004) Acute infection of swine by various *Salmonella* serovars *J Food Prot* 67:1484-1488
- Lynch H, Arguello H, Walia K, Lawlor PG, Duffy G, Gardiner GE, Leonard FC (2017) Evaluation of an Alternative Experimental Infection Method, Which Closely Mimics the Natural Route of Transmission of Monophasic *Salmonella* Typhimurium in Pigs *Foodborne Pathog Dis* 14:23-28 doi:10.1089/fpd.2016.2193

- Matiasovic J, Stepanova H, Kudlackova H, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I, Chlebova K, Leva L, Osvaldova A, Gebauer J, Faldyna M (2014) Immune response of pigs to *Salmonella enterica* serovar Derby and Typhimurium infections Veterinary Microbiology 170:284-290 doi:10.1016/j.vetmic.2014.02.003
- Osterberg J, Lewerin SS, Wallgren P (2009) Patterns of excretion and antibody responses of pigs inoculated with *Salmonella* Derby and *Salmonella* Cubana Vet Rec 165:404-408 doi:165/14/404 [pii]
- Osterberg J, Lewerin SS, Wallgren P (2010) Direct and indirect transmission of four *Salmonella enterica* serotypes in pigs Acta Vet Scand 52:1-7 doi:1751-0147-52-30 [pii] 10.1186/1751-0147-52-30
- Osterberg J, Wallgren P (2008) Effects of a challenge dose of *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Yoruba on the patterns of excretion and antibody responses of pigs Vet Rec 162:580-586
- Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of Escherichia coli O157:H7, *Salmonella*, and Shigella for PulseNet Foodborne Pathog Dis 3:59-67 doi:10.1089/fpd.2006.3.59
- Soyer Y, Moreno Switt A, Davis MA, Maurer J, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ, Dumas NB, Root T, Warnick LD, Grohn YT, Wiedmann M (2009) *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones J Clin Microbiol 47:3546-3556 doi:10.1128/JCM.00546-09
- Switt A, Soyer Y, Warnick L, Wiedmann M (2009) Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i Foodborne Pathog Dis 6:407-415 doi:10.1089/fpd.2008.0213
- Van Cauteren D, Le Strat Y, Sommen C, Bruyand M, Tourdjman M, Da Silva NJ, Couturier E, Fournet N, de Valk H, Desenclos JC (2017) Estimated Annual Numbers of Foodborne Pathogen-Associated Illnesses, Hospitalizations, and Deaths, France, 2008-2013 Emerg Infect Dis 23:1486-1492 doi:10.3201/eid2309.170081
- Vieira-Pinto M, Tremudo P, Dominguez L, Fernandez Garayzabal JF, Vela AI, Bernardo F, Lobo C, Oliveira M (2012) Virulence Characterization of *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:-, the New Pandemic Strain. In: Anous B, Gurtler JB (eds) *Salmonella* - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies. doi:DOI: 10.5772/30242
- Weaver T, Valcanis M, Mercoulia K, Sait M, Tuke J, Kiermeier A, Hogg G, Pointon A, Hamilton D, Billman-Jacobe H (2017) Longitudinal study of *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- shedding in five Australian pig herds Prev Vet Med 136:19-28 doi:10.1016/j.prevetmed.2016.11.010
- Xu C, Ren X, Feng Z, Fu Y, Hong Y, Shen Z, Zhang L, Liao M, Xu X, Zhang J (2017) Phenotypic Characteristics and Genetic Diversity of *Salmonella enterica* Serotype Derby Isolated from Human Patients and Foods of Animal Origin Foodborne Pathog Dis 14:593-599 doi:10.1089/fpd.2017.2278

4. Conclusion

La première expérimentation avec le variant monophasique de *S. Typhimurium* a montré que ce sérovar induit une excrétion continue et persistante chez les porcs infectés expérimentalement et surveillés pendant 21, 49 ou 84 jours. Concernant les organes, les amygdales ont présenté les niveaux plus élevés de contamination, tandis que les ganglions lymphatiques les niveaux les plus bas. Dans ce travail, la réponse immunitaire a été suivie par le dosage des INF- γ et la mesure de la production d'anticorps contre *Salmonella*. Les résultats ont montré que la réponse INF- γ était élevée dans les premiers stades de l'infection et la séroconversion a été obtenue pour tous les porcs 49 jours après l'inoculation. Le passage du variant monophasique de *S. Typhimurium* à travers le tractus gastro-intestinal des porcs a entraîné une faible variation génétique des isolats typer par MLVA, au niveau d'un seul locus, STTR6, connu pour changer rapidement. Ces résultats sont importants pour clarifier la colonisation chez les porcs par le variant monophasique de *S. Typhimurium*.

Lors de la seconde expérimentation qui consistait à comparer *S. Derby*, *S. Typhimurium* et le variant monophasique de *S. Typhimurium*, les résultats ont montré des profils similaires d'excrétion et de colonisation quel que soit le sérovar utilisé pour l'inoculation expérimentale. Cependant, la quantité d'excrétion était différente entre les groupes inoculés avec *S. Typhimurium* 07CR095 et *S. Typhimurium* S12AK50 monophasique, qui a provoqué de plus forts niveaux d'excrétion. La séroconversion a été mise en évidence à différents jours selon le sérovar inoculé sans que cela ait entraîné des différences significatives de la réponse sérologique.

CHAPITRE IV :

**EVALUATION DU POUVOIR
PATHOGENE DE SOUCHES DE
SALMONELLA ISOLEES DE PORC
AU TRAVERS D'UN MODELE
INSECTE**

1. Introduction

Salmonella sp. est une bactérie Gram négative, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, et reconnue dans les pays européens comme l'un des pathogènes les plus importants impliqués dans les maladies d'origine alimentaire (EFSA and ECDC, 2017). Entre 10 et 20% des infections humaines à *Salmonella* dans l'UE sont attribuées au porc (EFSA and ECDC, 2010b). Parmi les 2 500 sérovars de *Salmonella enterica*, *S. Derby*, *S. Typhimurium* et *S. Typhimurium* monophasique font partie des cinq sérovars les plus fréquemment rapportés dans les cas humains de *Salmonella* (EFSA and ECDC, 2010a). En France, le centre national de référence (Institut Pasteur, Paris) (CNR-ESS, 2017) a rapporté en 2016, 2071 et 1958 cas humains associés respectivement à *S. Typhimurium* et à *S. Typhimurium* monophasique (*S.* 1,4, [5], 12: i: -). *Salmonella* Derby était à la dixième place avec 113 cas; ce séovar est associé à 100 à 220 cas chaque année depuis les six dernières années.

Ces trois sérovars ont été signalés et associés aux porcs et à la viande de porc, et dans une moindre mesure, à la volaille et au bétail. En France, *Salmonella* séovar Typhimurium et Derby ont longtemps été les sérovars principaux isolés de porcs à la ferme et à l'abattoir (Denis et al., 2013), avec 40% des isolats de *S. Derby* et 40% des isolats de *S. Typhimurium* sur tous les isolats récoltés. Au cours de ces dernières années, une forte augmentation du variant monophasique de *S. Typhimurium* 1,4, [5], 12: i: - est survenue dans la production porcine. Une étude menée en 2012 en France a montré que 34% des souches isolées à partir du colon des porcs étaient des *S. Typhimurium* et deux tiers de ces souches étaient monophasiques (Kerouanton et al., 2013a). En 2015, en France, les trois sérovars principaux sur la viande de porc étaient le variant monophasique de *S. Typhimurium* (1, 4, [5], 12: i :-) (43,7%), *S. Typhimurium* (17,9%) et *S. Derby* (17,9%). Ces sérovars, représentaient 79,5% des souches isolées dans ce type de viande (Leclerc et al., 2016).

Malgré leur relation génétique étroite, les différences épidémiologiques et la virulence de différents sérovars de *Salmonella* sont courantes (Vo et al., 2007) et dépendent du potentiel de virulence du microorganisme et de la susceptibilité de l'hôte (Figueiredo et al., 2015). Des différences entre sérovars en ce qui concerne la sévérité de la maladie chez les humains ont été décrites et, le plus souvent, les maladies sont liées au séovar Typhimurium (Andino and Hanning, 2015). Ce séovar a également tendance à causer plus d'infections intestinales chez les humains que d'autres sérovars (Gal-Mor et al., 2014). Cependant, la comparaison de la virulence chez l'homme entre les sérovars associés aux porcs n'a pas déjà été décrite.

Plusieurs modèles sont disponibles pour tester la virulence des souches de *Salmonella* ou étudier le rôle des gènes dans la pathogénicité de ce pathogène. Les modèles les plus connus sont le modèle *in vitro* utilisant des cellules comme Caco-2 ou HeLa (McWhorter et al., 2015; Wang et al., 2016). De même, le modèle murin est actuellement utilisé et permet des tests *in vivo* chez les rongeurs (souris, rat ou cobaye) (McWhorter et al., 2015; Ren et al., 2017). Cependant, il existe des obstacles éthiques, budgétaires et logistiques associés à l'utilisation des rongeurs.

Le modèle insecte de *Galleria mellonella* (grand papillon de nuit ou le tegne de la ruche) est un modèle d'hôte fiable pour étudier la pathogénèse de nombreux pathogènes humains (Junqueira, 2012; Mukherjee et al., 2010; Ramarao et al., 2012; Tsai et al., 2016). Des études sur la virulence de *S. Typhimurium* dans le modèle de *Galleria mellonella* ont déjà été décrites (Bender et al., 2013; Card et al., 2016; Kurstak, 1967; Viegas et al., 2013). Bien qu'il ne remplace pas les modèles de mammifères, *G. mellonella* fournit une alternative rapide et rentable pour collecter les données initiales de la virulence bactérienne (Tsai et al., 2016). De plus, contrairement à de nombreux autres modèles d'invertébrés, y compris *Caenorhabditis elegans*, les analyses peuvent être effectuées à 37 ° C, une température optimale pour la grande majorité des pathogènes humains (Bender et al., 2013). Différentes raisons justifient l'utilisation de ces insectes pour déterminer la virulence des bactéries chez l'homme, y compris un système immunitaire inné complexe, la présence d'hémolymphe analogue au sang chez les mammifères et une réponse humorale orchestrée par des molécules effectrices solubles incluant des protéines du complément, de la mélanine et des peptides antimicrobiens (Ramarao et al., 2012; Tsai et al., 2016).

Les trois sérovars, *S. Derby*, *S. Typhimurium* et *S. Typhimurium* monophasique, peuvent être ingérés par l'homme à travers la viande de porc, et il semble que *S. Derby* soit moins impliqué dans la salmonellose humaine, le nombre de cas humains étant plus faible que ceux liés aux deux autres sérovars. Cela pourrait suggérer que *S. Derby* est moins virulente que les autres sérovars. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la performance de virulence de souches de *S. Derby*, *S. Typhimurium* et *S. Typhimurium* monophasique isolées chez les porcs. Pour cela, nous avons choisi d'évaluer leur niveau de pathogénicité dans un modèle *in vivo* utilisant des larves de *Galleria mellonella* et dans un modèle *in vitro* utilisant des cellules intestinales Caco-2.

2. Virulence characterization of *Salmonella* Derby, *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variant S. 1,4[5],12:i:- isolated from pigs through *in vivo* *Galleria mellonella* model and *in vitro* Caco-2 assay.

Publication à soumettre dans Plos One

María Cevallos-Almeida^{1,3}, Alain Rincé², Isabelle Rincé², Martine Denis¹, and Annaëlle Kerouanton¹

1 Anses, Hygiene and Quality of Poultry and Pig Products unit, Bretagne Loire University, Ploufragan, France.

2 UCBN, U2RM Stress/Virulence EA4655, Normandie-Université, Caen, France

3 Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics. Central University of Ecuador. Quito, Ecuador

*Corresponding author: annaelle.kerouanton@anses.fr

Key-words : *Salmonella*, pig, virulence, *Galleria mellonella*

ABSTRACT

To determine the virulence patterns in humans of the three most prevalent *Salmonella* serovars in pig in France (Derby, Typhimurium and its monophasic variant 1,4[5], 12:i:-), we tested 5 strains per serovar in an *in vivo* insect model and in an *in vitro* assay on cell. For the *in vivo* insect model, each strain was inoculated in 20 larvae of *Galleria mellonella* in a concentration of 10^4 UFC per larvae. After 48 hours at 37°C, we counted the surviving larvae to calculate the survival percentage. For the *in vitro* assay, Caco-2 cells were inoculated with 10^7 UFC of *Salmonella*, and after the assay, we determined a percentage of adhesion and a percentage of invasion for each strain.

Survival % average was respectively 10.67%, 52.33% and 42.00% for *S. Derby*, *S. Typhimurium* and monophasic *S. Typhimurium*. Significant difference was found between *S. Derby* and the two other serovars, *S. Typhimurium* and monophasic *S. Typhimurium*. The strains of *S. Derby* were all identified as highly virulent while difference in patterns of virulence intra-serovars was founded for *S. Typhimurium* and monophasic *S. Typhimurium*.

The invasion of our strains was low, under 2.42%. The % of adhesion varied from 3.93% to 54.60% and was respectively in average 9.50%, 12.38% and 30.92% for *S. Derby*, *S. Typhimurium* and monophasic *S. Typhimurium*. Significant difference was found between monophasic *S. Typhimurium* and *S. Derby*. Moreover, the highest difference between strains was observed for the monophasic *S. Typhimurium* serovar with a % of adhesion varying from 8.63% to 54.6%.

Our study showed different pattern of virulence between- and intra-serovar. We showed for the first time data on virulence on *Salmonella* Derby, and surprisingly, our strains isolated from pig were highly virulent on larvae while its adhesion on Caco-2 cells was the lowest. This serovar is described as having a lower virulence potential. The two models showed that some monophasic *S. Typhimurium* were highly virulent suggesting that this serovar could be very pathogen for humans.

INTRODUCTION

Salmonella sp. is a Gram negative bacterium, belonging to *Enterobacteriaceae* family, and recognized in European countries as one of the most important pathogens implicated in food-borne human disease (EFSA and ECDC, 2017). Many animal sources of contamination for humans have been reported by several authors, but pigs are one of the major animal species that are responsible for the transmission of *Salmonella* to humans (Bonardi, 2017). Between 10 to 20% of human *Salmonella* infections in the EU are attributed to pork (EFSA and ECDC, 2010b). Among the approximately 2500 serovars of *Salmonella enterica*, the serovars *S. Derby*, *S. Typhimurium* and monophasic *S. Typhimurium* are in the five most reported serovars in *Salmonella* human cases (EFSA and ECDC, 2010a). In France, the national reference center (Pasteur Institute, Paris) (CNR-ESS, 2017) reported 2071 and 1958 human cases associated respectively to *S. Typhimurium* and monophasic *S. Typhimurium* (S. 1,4, [5], 12: i :-) in the year 2016. *Salmonella* Derby was in the tenth place with 113 cases; this serovar fluctuates from 100 to 220 cases since the last six years.

These three serovars were reported and associated with (contact with) pigs and (consumption of) pig meat and to a lesser extent from poultry and cattle. In France, *Salmonella* serovar *Typhimurium* and *Derby* have long been serovars mainly isolated from pigs at the farm and slaughterhouse (Denis et al., 2013), with 40% of *S. Derby* isolates and 40% of *S. Typhimurium* isolates on all harvested isolates) while in the recent years in the pig production, a high increase in the monophasic variant of *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:- occurred. In the frame of a French study in 2012, 34% of the strains isolated from the pig's colon content were *S. Typhimurium* and two-third of these strains were monophasic (Kerouanton et al., 2013a). The three main serovars on pork meat in 2015 in France were monophasic variants of *S. Typhimurium* (1, 4, [5], 12: i :-) with 43.7%, *S. Typhimurium* with 17.9% and *S. Derby* with 17.9%. These serovars represented 79.5% of the strains isolated from this category of meat (Leclerc et al., 2016).

Despite their close genetic relationship, differences in epidemiology and virulence of different *Salmonella* serovars are common (Vo et al., 2007) and depend upon the virulence potential of the microorganism and the susceptibility of the host (Figueiredo et al., 2015). Differences among serovars with respect to disease severity in humans have been described and most illness was related to serovar *Typhimurium* (Andino and Hanning, 2015). This serovar also, tend to have more potential to cause extra intestinal infections in humans than others (Gal-

Mor et al., 2014). However, comparison of virulence in humans between serovars associated to pigs was not already described.

Several models are available for testing the virulence of *Salmonella* strains or studying the role of genes in the pathogenicity of this pathogen. The best known models is the *in vitro* model using cells like Caco-2 or HeLa cells (McWhorter et al., 2015; Wang et al., 2016). Similarly, the murine model is currently used and allows *in vivo* tests in rodents (mouse, rat, or guinea pig) (McWhorter et al., 2015; Ren et al., 2017). However, there are ethical, budgetary and logistical hurdles associated with utilization of rodents. Also, *Galleria mellonella* insect model (greater wax moth or Honeycomb moth) is as a reliable model host to study pathogenesis of many human pathogens (Junqueira, 2012; Mukherjee et al., 2010; Ramarao et al., 2012; Tsai et al., 2016). Studies in virulence of *S. Typhimurium* in *Galleria mellonella* model has been already described (Bender et al., 2013; Card et al., 2016; Kurstak, 1967; Viegas et al., 2013). Although it will not replace mammalian models, *G. mellonella* provides a rapid and cost effective alternative to collect initial data of bacterial virulence (Tsai et al., 2016). Moreover, in contrast to many other invertebrate models, including *Caenorhabditis elegans*, analyses can be performed at 37°C, a temperature optimal for the vast majority of human pathogens (Bender et al., 2013). Different reasons justify the use of these insects to determine virulence of bacteria in humans, including a complex innate immune system, presence of hemolymph analogous to blood in mammals, and humoral response orchestrated by soluble effector molecules that includes complement like proteins, melanin and antimicrobial peptides (Ramarao et al., 2012; Tsai et al., 2016).

Because the three serovars, *S. Derby*, *S. Typhimurium* and monophasic *S. Typhimurium*, may be likely to be ingested by humans through pork, it appears that Derby is less involved in human salmonellosis because of the small number of humans cases in France compared to the other two serovars. This might suggest that Derby is less virulent. To verify this hypothesis, we investigated the virulence performance of strains of *S. Derby*, *S. Typhimurium* and monophasic *S. Typhimurium* isolated from pigs. For this, we chose to evaluate their level of pathogenicity in an *in vivo* model using *Galleria mellonella* larvae and in an *in vitro* model using intestinal caco-2 cells.

MATERIAL AND METHODS

Strains

For virulence assay, we decided to test 5 strains per serovar, *S. Derby* (SD), *S. Typhimurium* (ST) and monophasic variant of *S. Typhimurium* (vmST) (total of 15 strains). These strains of pig origin were selected from our own collection, on the basis of their serovar first and, then on their *Xba*I-PFGE patterns in order to have different strains within the same serovar.

Also, these strains had previously been serotyped according to the Kaufmann-White classification (Popoff, 2001). Serotyping were performed in our laboratory, the French National Reference Laboratory for *Salmonella*. We also previously confirmed by PCR the variant monophasic *S. Typhimurium* strains according to the method described by (Lailier et al., 2013). The strains had previously been typed by RFLP-PFGE, according to the PulseNet protocol (Ribot et al., 2006). The *Xba*I PFGE patterns of the 15 selected strains are presented in figure 1.

One of these strains, *S. Derby* 07CR553, was previously sequenced (Kerouanton et al., 2015)

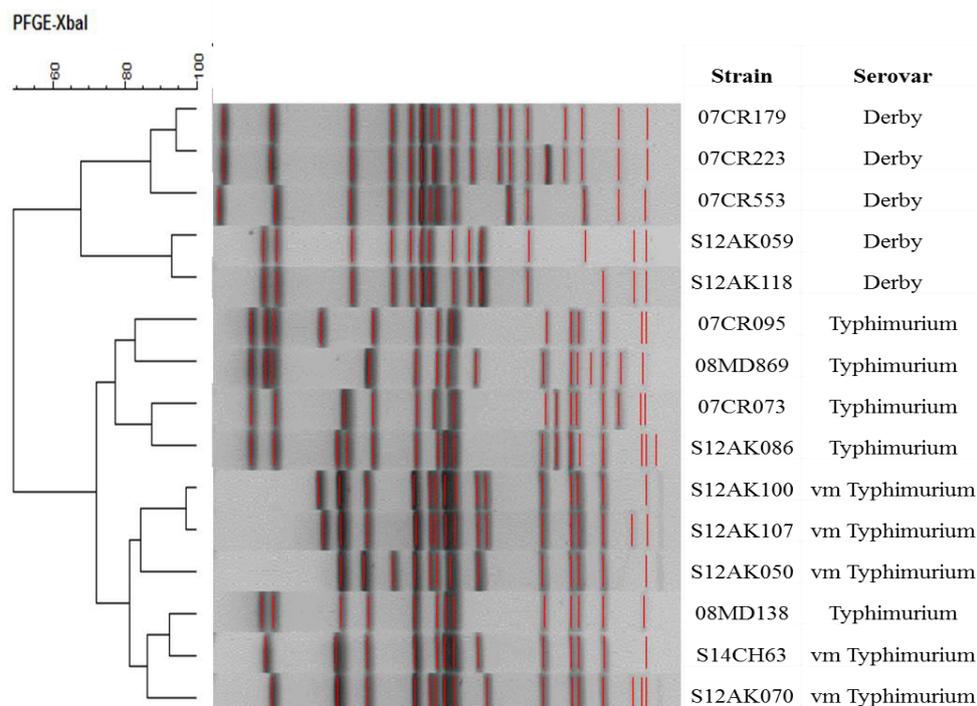


Figure 1. *Xba*I-PFGE patterns of the 15 strains.

Strains were strains isolated from carcasses, lymph nodes or feces of pig sampled at slaughterhouse (Table 1) (Denis et al., 2013); (Kerouanton et al., 2013a); (Kerouanton et al., 2013b). The strains were stored à -80°C in Peptone Glycerol Broth.

Table 1. *Salmonella* strains used in virulence test in *Galleria mellonella* model

<i>Salmonella</i> serovar	Strain	Year of isolation	Source
<i>S. Derby</i>	07CR553	2007	Mesenteric lymph nodes of fattening pig
	S12AK059	2012	Carcasse of fattening pig
	S12AK118	2012	Carcasse of fattening pig
	07CR179	2007	Mesenteric lymph nodes of fattening pig
	07CR223	2007	Mesenteric lymph nodes of fattening pig
<i>S. Typhimurium</i>	S12AK086	2012	Feces of fattening pig
	07CR073	2007	Mesenteric lymph nodes of fattening pig
	07CR095	2007	Mesenteric lymph nodes of fattening pig
	08MD138	2008	Feces of male breeding pig
	08MD869	2008	Feces of fattening pig
monophasic variant of <i>S. Typhimurium</i>	S14CH63	2014	Feces of fattening pig
	S12AK050	2012	Feces of fattening pig
	S12AK070	2012	Carcasse of fattening pig
	S12AK100	2012	Feces of fattening pig
	S12AK107	2012	Feces of fattening pig

For the assay on *Galleria mellonella*, we used as positive control a strain of *S. Typhimurium*, ATCC 14028 purchased from the collection of Pasteur Institute, Paris. This strain was previously tested on mouse (McWhorter et al., 2015)

Assay in *Galleria mellonella* model

The *in vivo* assay was performed at the Microbiological Risk Laboratory of Caen-Normandy University. Each strain of *Salmonella* was streaked on Luria Bertani agar (LB) and incubated at 37°C for 24 hours. One colony was then transferred to 20 ml of Luria Bertani broth, and incubated at 37°C for 24 hours.

The day of larvae infection, 5 ml of this culture was transferred in a Falcon Tube of 10 ml and centrifuged at 4000 rpm for 5 minutes. Precipitated bacteria were washed one minute by centrifugation with 1 ml of physiological water (PW). This step was repeated two times. The final concentration was adjusted to an optical density of 0.5 in a volume of 1.5 ml. Serial dilution (1:10) was then performed in 100 μ l of physiological water until the dilution 10^{-6} . Numeration of the culture was realized by plating the dilutions 10^{-5} and 10^{-6} on LB agar and by counting the colonies after incubation at 37°C for 24 hours of the plates.

We inoculated 20 larvae of *Galleria mellonella* with a size of 20 mm per strain and per dilution. Each larva was inoculated with 10^4 CFU of *Salmonella*. For that, 0.1 milliliter of the dilution 10^{-2} was injected with a 10 ml syringe into the hindmost left proleg of each larva using a syringe pump inoculator (KD Scientific, USA). Larvae were then placed in plastic petri dishes and incubated at 37°C until 48 hours. The assay was repeated three times; so, 60 larvae were used per strain.

Surviving larvae were counted 48 hours after inoculation. Percentage of survival of a strain was calculated with the follow formulae:

$$\text{Survival percentage in \%} = \frac{\text{Larvae counted at dilution } 10^{-2} \text{ in the three repetitions}}{\text{Total larvae (= 60)}} \times 100$$

***In vitro* assay on Caco-2 cells**

Intestinal cells, Caco-2, were seeded in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM medium) (Invitrogen-Gibco, France) at 10^5 cells per well in a 24 well-plate. Then, 10^7 bacteria of each strain were added in two wells, one to numerate adhesive and invasive bacteria and the other, to numerate invasive bacteria. Cells were incubated for 3h at 37°C with 5% CO₂ to allow bacterial adhesion and invasion.

In the first well, cells were washed three times with PBS solution (Invitrogen-Gibco, France) and then the monolayer was lysed with 0.1% triton X-100 (Sygma, France) for 15 minutes at 37°C, and total bacteria, intracellular and adherent bacteria, were enumerated by serial dilutions in Tryptone salt (TS) (Biomerieux, France) by plating on PCA agar plates (Biomerieux, France).

In the second well, the monolayer was washed three times in PBS solution, and 1ml of DMEM containing gentamicin (Sygma, France) at 480 mg/L was added to kill extracellular

bacteria. After 2-hour incubation, the monolayer was washed twice in PBS solution and lysed with 0.1% Triton X-100 as described above. After serial dilution in TS, released intracellular bacteria were enumerated by the colony count method on PCA agar plates.

The number of adherent bacteria was deduced by subtracting the number of intracellular bacteria to the number of intracellular and adherent bacteria. Then, the percentage of invasive bacteria (%_Inv or Per_Inv) and the percentage of adherent bacteria (%_Adh or per_Adh) were calculated from the inoculum deposited on the Caco-2 cells.

Statistical analysis

All comparisons of the means were performed in R software (R version 3.2.4). The strains were also classified in three classes of pathogenicity (low, intermediate and high) by hierarchical clustering with the method “hclust ward D2” under R software.

RESULTS

Virulence of *Salmonella* in *Galleria mellonella* model

All the strains induced mortality in larvae but the level of mortality was variable according to the strain. One the most important change in larvae after inoculation was melanization.

The survival percentage is on average 35%. The highest mortality was founded for two SD strains (S12AK59 and 07CR179) with a survival % of 6.67 and the lowest mortality for a vmST strain (S14CH63) with a survival % of 90 (figure 2).

Survival % average was respectively 10.67%, 52.33% and 42.00% for *S. Derby*, *S. Typhimurium* and monophasic *S. Typhimurium*. These two last values were closed to the survival % of the control *S. Typhimurium* strain ATCC 14028 used in the *in vitro* assay (46.67%). However, inside the serovar, the survival % can vary between the strains. The difference between the strains is low for SD, from 6.67% to 16.7%, and higher for the two others serovars; from 21.67% to 78.33% for ST, and from 10.00% to 90.00% for vmST.

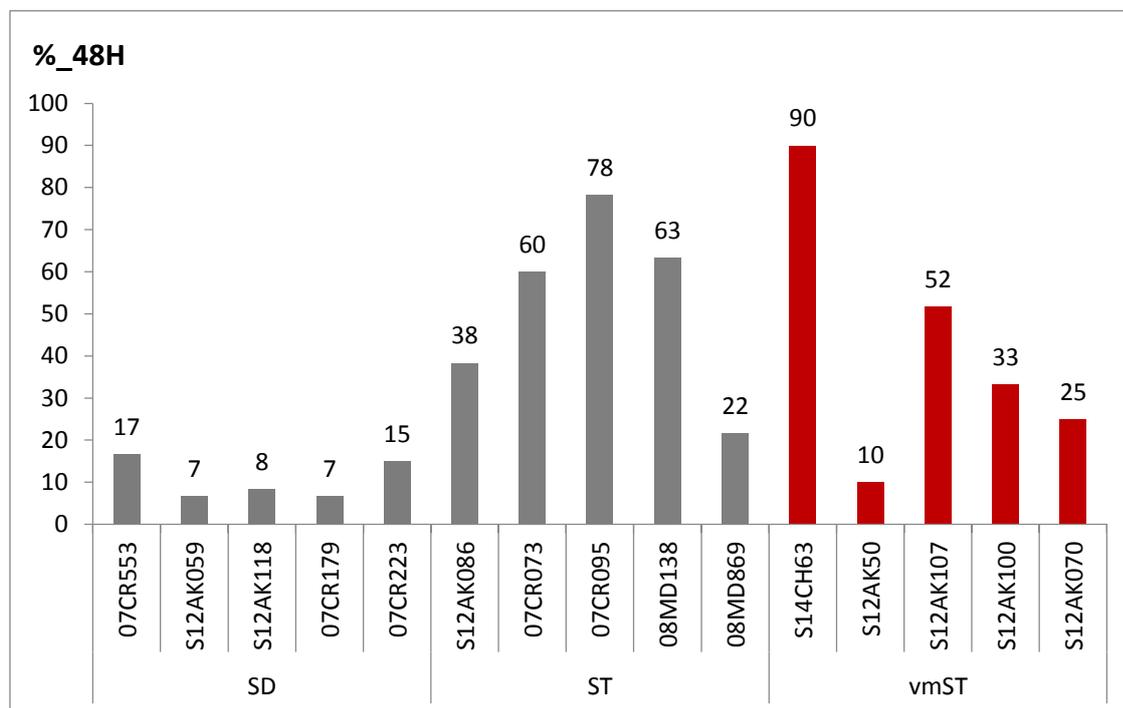


Figure 2. Survival percentage of larvae inoculated with the 15 *Salmonella* strains.
SD : *S. Derby*; ST : *S. Typhimurium*; vmST : variant monophasic *S. Typhimurium*

Significant differences were found between serovars (Kruskal-Wallis test, p-value < 0.05) (figure 3). The difference was between *S. Derby* and the two other serovars, *S. Typhimurium* (Wilcoxon Mann Whitney test, p-value = 0.011) and monophasic *S. Typhimurium* (Wilcoxon Mann Whitney test, p-value = 0.036).

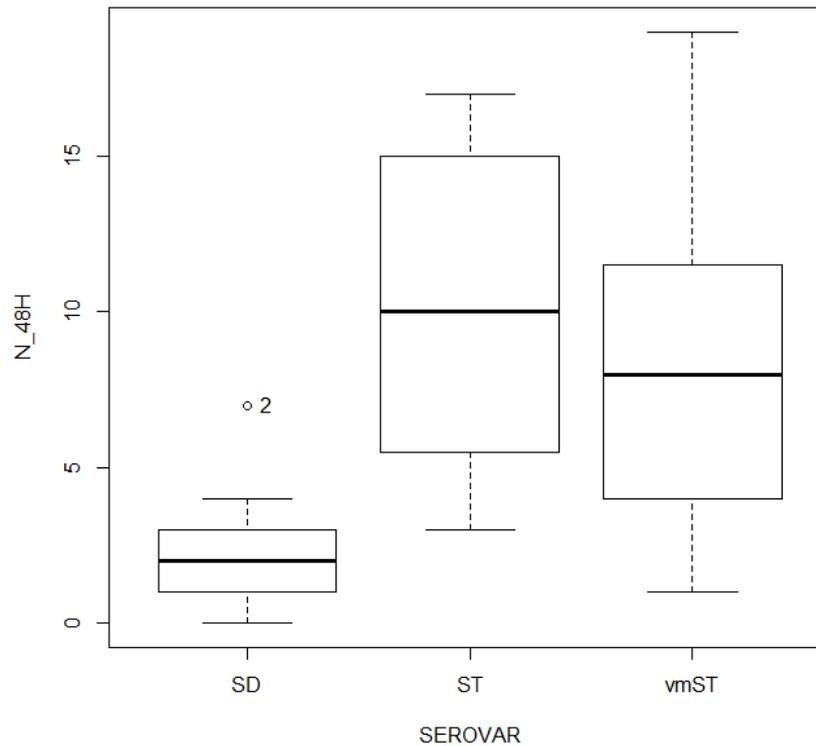


Figure 3. Comparison of Salmonella serovars according to the number of surviving larvae. SD : S. Derby; ST : S. Typhimurium; vmST : variant monophasic S. Typhimurium; N_48h : number of surviving larvae 48 hours after inoculation with Salmonella.

The strains could be distributed in three clusters according to their survival percentage (figure 4). The first cluster encompasses strains with High Virulence (< 30% of survival), the second as strains with Intermediate Virulence (30-60% of survival) and the third one as strains with Low Virulence (> 60% of survival).

All the SD strains are classified in the HV cluster. The ST strains spread in the three clusters with one strain in HV cluster and in IV cluster up, and 3 strains in the LV cluster. The vmST

strains were also found in the three clusters with two strains in HV cluster and in IV cluster, and one strain in the LV cluster. The control strain ATCC 14028 was classed as Intermediate Virulent strain.

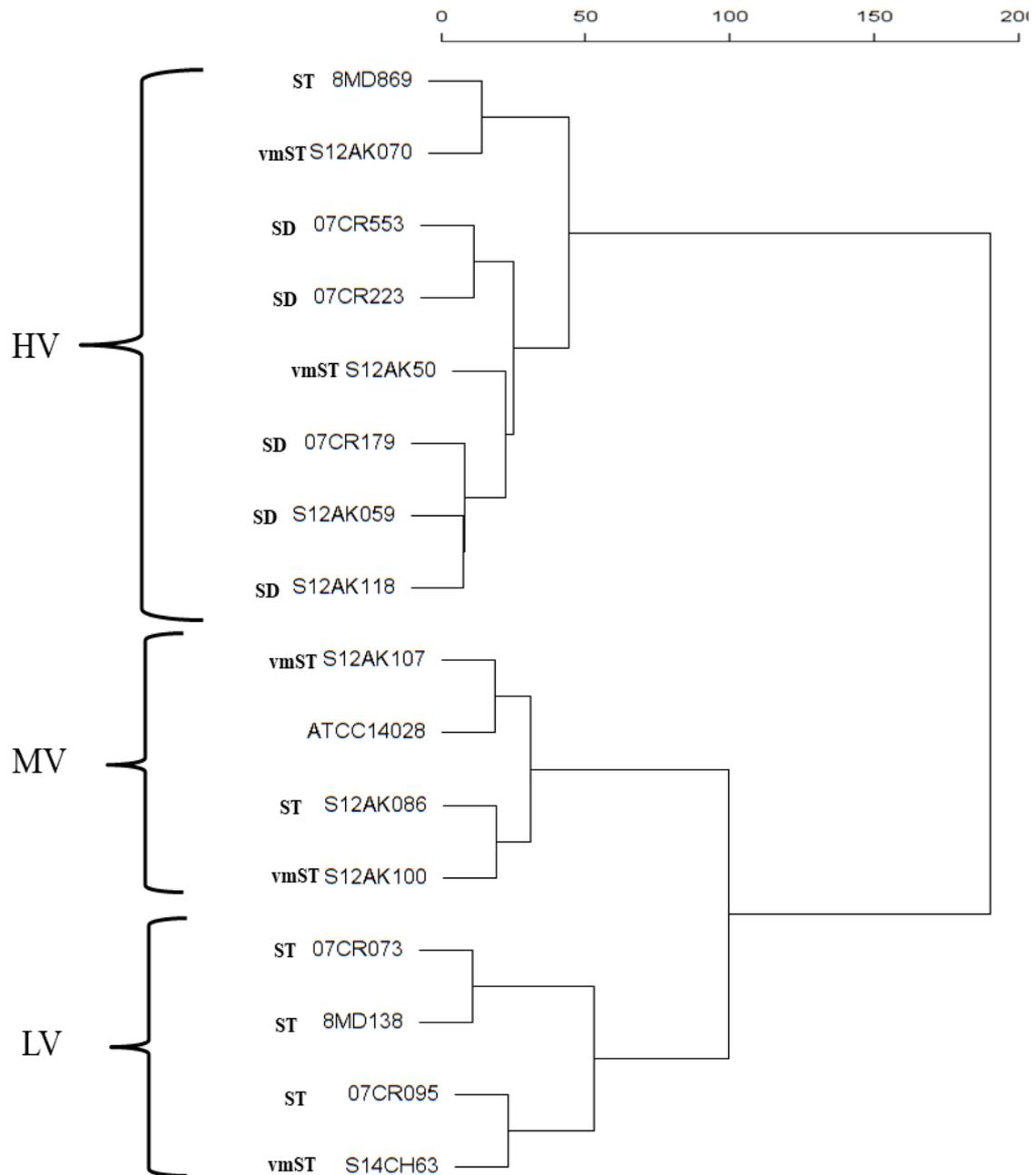


Figure 4. Hierarchical classification of the strains according their survival percentage. HV : High Virulence (< to 30% of larvae survival); IV : Intermediate Virulence (30-60% of larvae survival); LV: Low Virulence (> to 60% of larvae survival); SD : *S. Derby*; ST : *S. Typhimurium*; vmST : variant monophasic *S. Typhimurium*.

Virulence of *Salmonella* on Caco-2 cells

Percentage of adhesion

The percentage of adhesion was in average 17.60%. The highest adhesion was founded for two vmST strains (S12AK50, S12AK70) with 52.84% and 54.60% of adhesion, respectively (figure 5). The lowest %_adh was for a SD strain (07CR553) with 3.93% of adhesion.

The average for the percentage of adhesion was respectively 9.50%, 12.38% and 30.92% for *S. Derby*, *S. Typhimurium* and monophasic *S. Typhimurium*. Inside the serovar, the %_adh vary between the strains. The difference between the strains is less important for SD, from 3.93% to 15.12%, and for ST, from 4.66% to 23.89%. The highest difference between strains was observed for the vmST serovar; the %_adh vary from 8.63% to 54.6%.

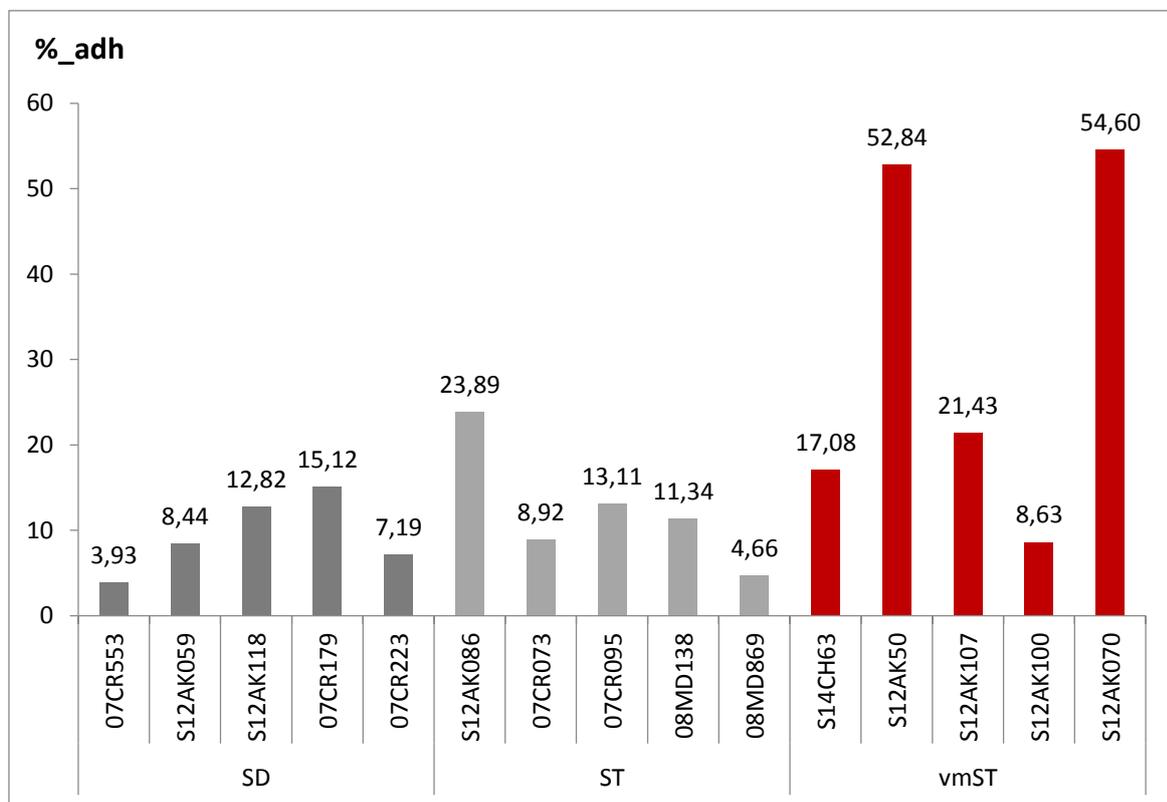


Figure 5. percentage of adhesion to Caco-2 cells for the 15 *Salmonella* strains.

SD : *S. Derby*; ST : *S. Typhimurium*; vmST : variant monophasic *S. Typhimurium*

Significant differences were found between serovars (Kruskal-Wallis test, p-value < 0.05) (figure 6). The difference was between monophasic *S. Typhimurium* and *S. Derby* (Wilcoxon Mann Whitney test, p-value = 0.02). *S. Typhimurium* was not significantly different from *S. Derby* (Wilcoxon Mann Whitney test, p-value = 0.43) and from monophasic *S. Typhimurium* (Wilcoxon Mann Whitney test, p-value = 0.06).

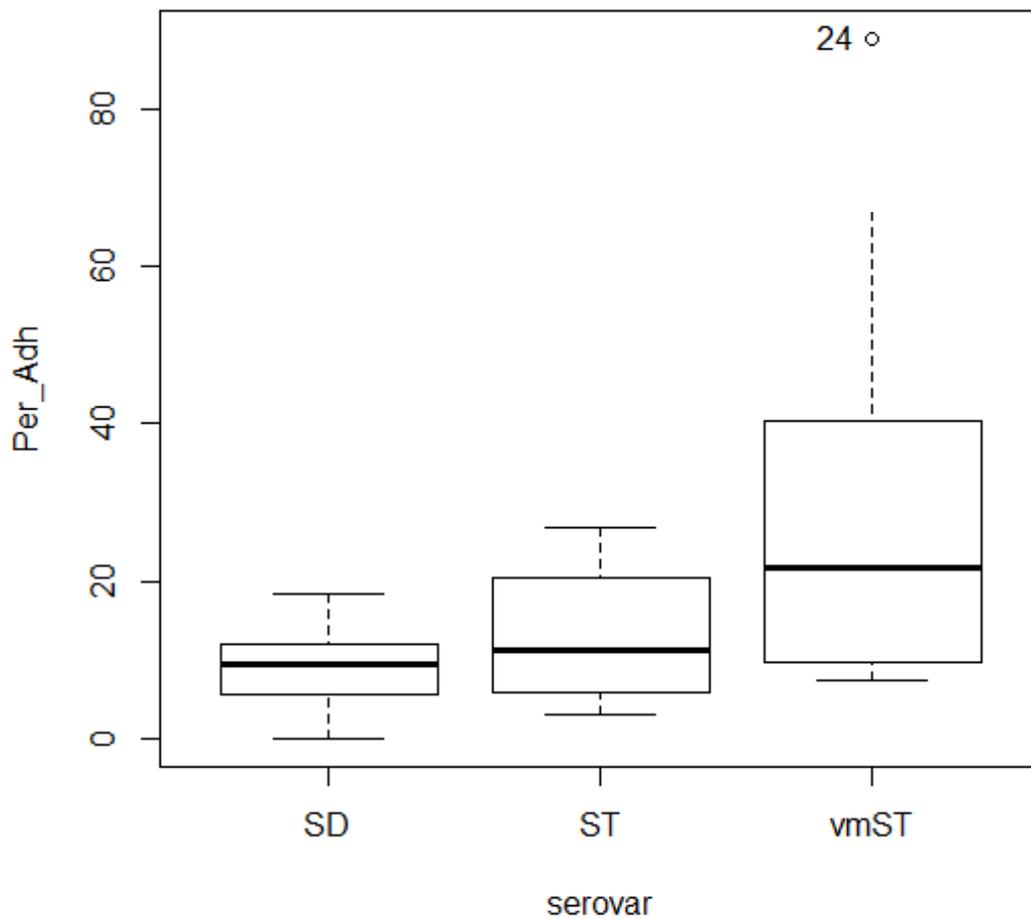


Figure 6. Comparison of Salmonella serovars according to their percentage of adhesion to Caco-2 cells.

SD : *S. Derby*; ST : *S. Typhimurium*; vmST : variant monophasic *S. Typhimurium*.

Percentage of invasion

The percentage of invasion was in average 0.88%. The invasion was low and varied from 0.12% (wmST strain S12AK107) to 2.42% (vmST strain 07CR070) (figure 7).

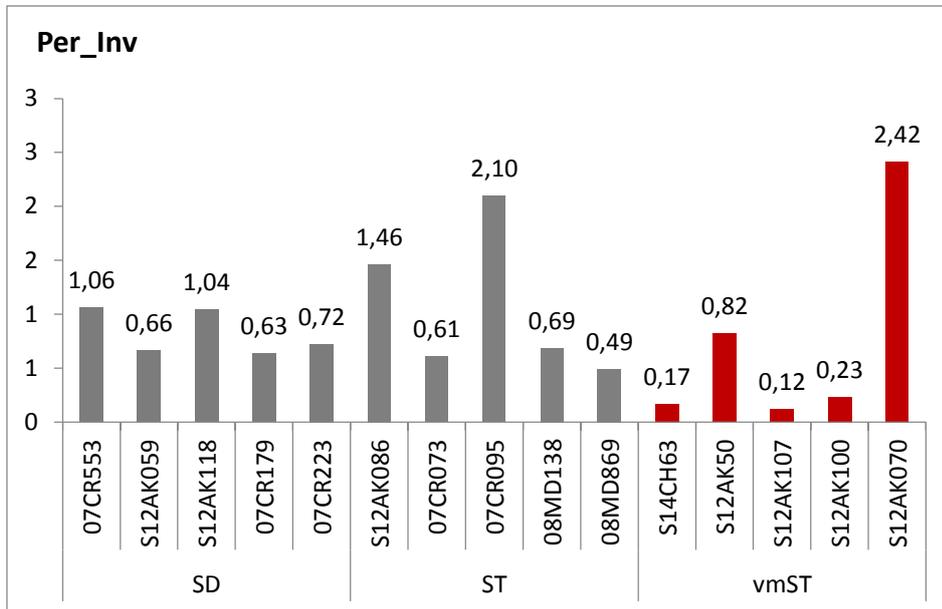


Figure 7. Percentage of invasion on Caco-2 cells for the 15 Salmonella strains.

SD : *S. Derby*; ST : *S. Typhimurium*; vmST : variant monophasic *S. Typhimurium*

There was no significant difference between serovars for the %_inv (Kruskal-Wallis test, p-value = 0.167) (figure 8). The average was 0.82%, 1.07%, 0.75% for respectively SD, ST and vmST.

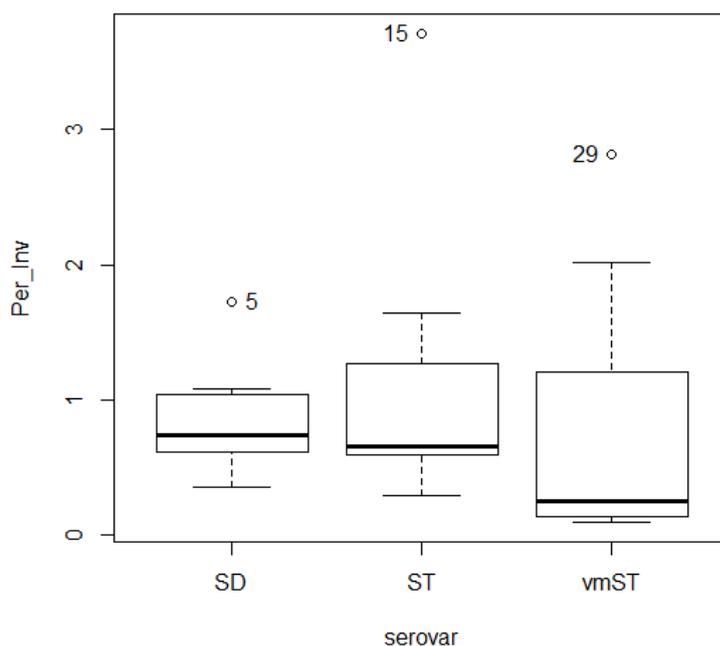


Figure 8. Comparison of Salmonella sérovars according to their percentage of invasion on Caco-2 cells. SD: *S. Derby*; ST: *S. Typhimurium*; vmST: variant monophasic *S. Typhimurium*.

Classification of the strains

The strains could be distributed in three clusters according their percentage of adhesion to caco-2 cells (figure 9). We do not consider the percentage of invasion because this value does not impact on the classification of the strain by hierarchical classification under R. The first cluster was considered as strains with High Adhesion (> to 30%), the second as strains with Intermediate Adhesion (10-30%) and the third one as strains with Low Adhesion (< to 10%).

The vmST strains spread in three clusters, HA (2 strains), IA (2 strains) and LA (one strain). No SD and ST strains were classified in the HA cluster. The IA cluster encompasses 2 SD and 3 ST strains; and the LA cluster, 3 SD and 2 ST strains.

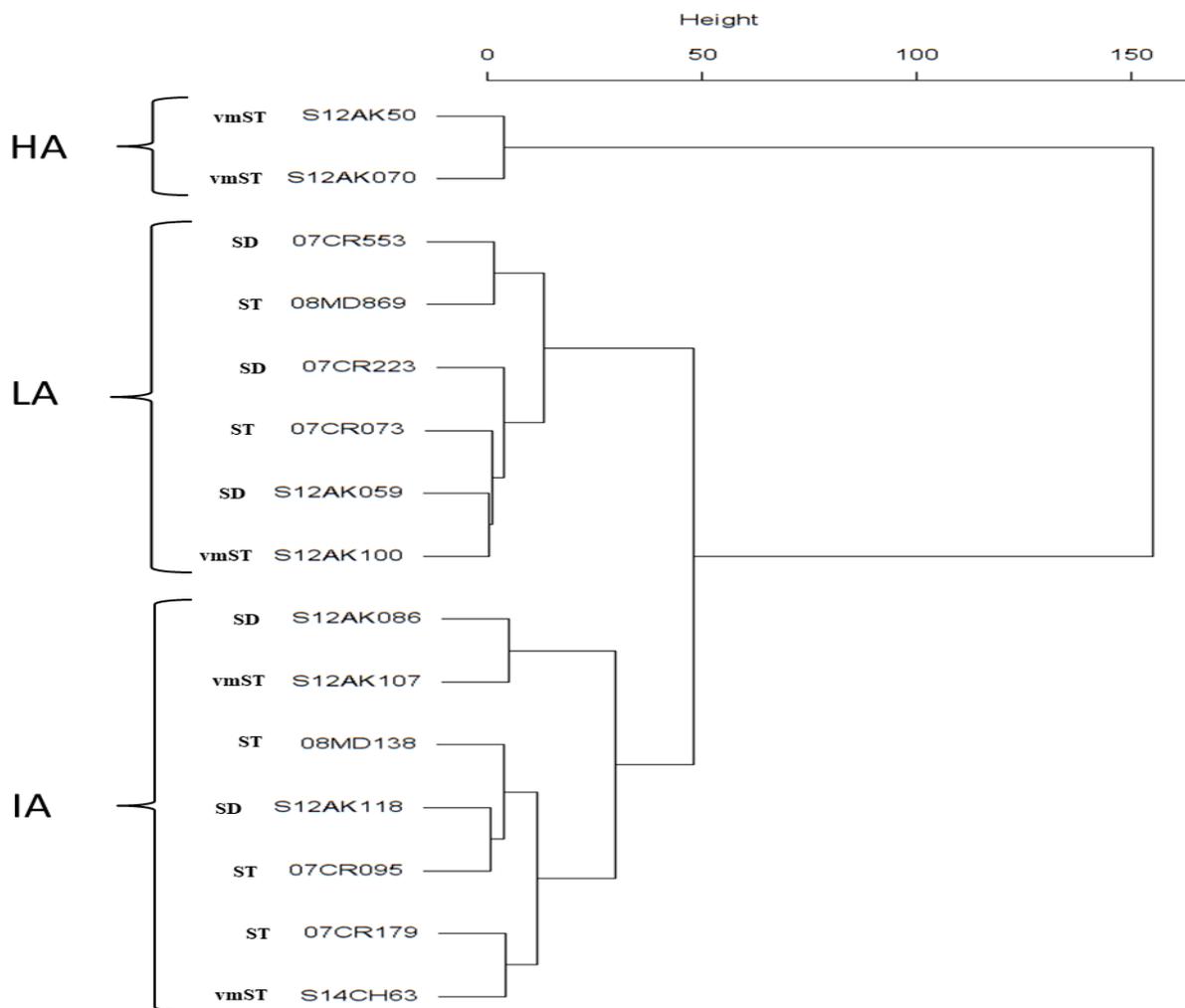


Figure 9. Hierarchical classification of the strains according their percentage of adhesion to Caco-2 cells. HA: High Adhesion (> to 30%); IA: Intermediate Adhesion (10-30%); LA: Low Adhesion (<to 10%). SD: *S. Derby*; ST: *S. Typhimurium*; vmST: variant monophasic *S. Typhimurium*.

We classified the 15 *Salmonella* strains according their adhesion on Caco-2 cells and their survival in *Galleria mellonella* (Table 2). We could conclude as previously shown that there is a low concordance between these two methods for the *S. Derby* serovar; these strains induced a high mortality of the larvae but had intermediate but low % of adhesion on Caco-2 cells. Otherwise, the two vmST strains that caused high larval mortality also had a very strong adhesion to Caco-2 cells.

Table 2. Distribution of the 15 *Salmonella* strains according their survival in *Galleria mellonella* model and their adhesion on Caco-2 cells.

	HV (% survival)	IV (% survival)	LV (% survival)	Number of strains
HA (%_adhesion)	S12AK50 S12AK070			2
IA (%_adhesion)	07CR179 S12AK118	S12AK107 S12AK086	08MD138 07CR095 S14CH63	7
LA (%_adhesion)	8MD869 07CR553 07CR223 S12AK059	S12AK100	07CR073	6
Number of strains	8	3	4	15

In grey: *S. Derby* strains; in black: *S. Typhimurium* strains; in red: monophasic variant *S. Typhimurium* strains; HA: High Adhesion; IA: Intermediate Adhesion, LA: Low Adhesion

DISCUSSION

In order to establish a level of virulence of *S. Derby*, *S. Typhimurium* and variant monophasic *S. Typhimurium* strains isolated from pigs, we tested the strains in an *in vivo* model by using larvae of *Galleria mellonella* and in an *in vitro* assay on Caco-2 cells. This work allows us to classify the different strains through the survival percentage of larvae after inoculation by *Salmonella* and through the percentage of adhesion of the bacteria on Caco-2 cells. We wanted to evaluate their level of pathogenicity for humans.

The possibility of addressing many aspects of mammalian innate immunity in invertebrates has expanded their use as model to study human infections (Viegas et al., 2013). Some studies in virulence of *S. Typhimurium* in *Galleria mellonella* model has been already described (Bender et al., 2013; Card et al., 2016; Kurstak, 1967; Viegas et al., 2013). In our study, we observed for almost all the strains that inoculation of the larvae by *Salmonella* induces melanization of the dying larvae. Melanization response has been described as the synthesis and deposition of melanin to encapsulate pathogens at the wound site, followed by hemolymph coagulation, and is analogous to abscess formation in mammalian infections (Tsai et al., 2016). Pathogenesis of *Salmonella* in the larvae begins for a bacterial slowly multiplication in gut or visceral cavity and the infection progress with cellular damage characterized by vacuolization, disintegration of hemocytes and nucleotide alterations (Kurstak, 1967). Histopathological studies in *Galleria mellonella* larvae inoculated with *S. Typhimurium* showed moderate and several pathological changes characterized by complete destruction of the intestinal epithelium with necrotic cells and cellular debris (Card et al., 2016).

Our work highlighted that the serovar *S. Derby* showed the highest mortality of *Galleria mellonella* larvae in comparison with the others serovars. We obtained a mortality of 89.33% of larvae for *S. Derby*. Moreover, all the *S. Derby* presented the same pattern of virulence; they were all classed in the High Virulent group. However, this result was not concordant with the results observed by the *in vitro* assay; these strains had low or intermediate adhesion on Caco-2 cells. No other studies tested this serovar on *Galleria mellonella* larvae model and on Caco-2 cells; so it is difficult to compare our results with those of others studies. *Salmonella Derby* has been described as having a lower virulence potential and lacked a combination of genes important for virulence including *irsA* and *msgA* genes. Lack of many genes important to virulence suggests that the serovar *Derby* is less virulent to humans (Litrup et al., 2010). This could explain that *S. Derby* strains have a low potential of virulence on

Caco-2 cells, but do not explain their behavior on *Galleria mellonella* larvae. We are unable to identify why *S. Derby* behaves like this on larvae.

One of the first works of inoculation of *Salmonella* Typhimurium strains in larvae of *Galleria mellonella* using the same level of inoculum as our (10^4 CFU per larva) gave a mortality of larvae from 20 to 34% (Kurstak, 1967). The mortality of the larvae was higher in our study, and reached in average 47.67% for *S. Typhimurium* and 58.00% for monophasic *S. Typhimurium*. On Caco-2 cells, the percentage of adhesion was also higher for the monophasic *S. Typhimurium* (30.92%), and significantly different to *S. Derby* (9.50%). This tends to confirm that *S. Typhimurium* and its variant monophasic are more pathogenic in humans than *S. Derby*. This is consistent with what is found in human cases in Europe (EFSA and ECDC, 2017) and France (CNR-ESS, 2017).

Difference of virulence between serovars could be explained also because *S. Typhimurium* were especially susceptible to apolp-III a protein that have an important role in insect immune response; because it target components of bacterial cells like lipopolysaccharides, acids lypoteicoiques and others compounds (Zdybicka-Barabas and Cytrynska, 2011).

In another study (McWhorter et al., 2015) the authors didn't see any relationship between the presence or absence of virulence genes by PCR and either *in vitro* invasive capacity (Caco-2 cells) or *in vivo* pathogenicity (mice) when tested a collection of *Salmonella* strains, with different serovars, isolated from egg and poultry farms. Other studies on *S. Typhimurium* using *Galleria mellonella* models showed that the LPS structure of the bacteria could influence *Salmonella* virulence in *Galleria mellonella*, as the lack of the PhoQ gene (Bender et al., 2013), or of the virulence plasmid (Card et al., 2016)

Our study highlighted that the strains within the *S. Typhimurium* serovar and within the monophasic *S. Typhimurium* serovar exhibit different virulence patterns; the mortality varied from 10% to 90%, and the adhesion from 4.66% to 54.6%. Differences intra-serovars in mice models were already described (Suez et al., 2013). In 2015, McWhorter and colleagues classified the ATCC 14028 as high virulent *S. Typhimurium* strain in his study; this strain had a strong invasiveness capacity on Caco-2 cell and induces a high mortality of the mouse inoculated with it.. With our assay using *Galleria mellonella*, the ATCC 14028 strain was identified as intermediate virulent (survival percentage of 46.67%) and we could observed that three strains, one *S. Typhimurium*, and two monophasic *S. Typhimurium* could be considered highly virulent compared to the control strain. These two monophasic *S.*

Typhimurium strains had also a high adhesion on Caco-2 cells. This confirms that the virulence within a same serovar may be variable and that the classification of the strains relative to each other also depends on the collection of the strains tested.

CONCLUSION

This study contributes to evaluate virulence of three major serovars found in the pig production in France. Our investigation showed different patterns of virulence between strains belonging to *S. Derby*, *S. Typhimurium* or monophasic *S. Typhimurium* and, also differences between serovars. Results on Caco-2 cells and literature tend to confirm that *S. Derby* had a low pathogenicity compared to the monophasic *S. Typhimurium*, but this was not confirmed on larvae. We could observe that the concordance between the *in vivo* model and the *in vitro* model was not so obvious, at least for *S. Derby*. More extensive research is necessary to corroborate these differences. It would be interesting to sequence our strains to describe more precisely their pathogenic potential.

ACKNOWLEDGEMENT

We acknowledge SENESCYT-ECUADOR (Secretaría de Educación Superior Ciencia y Tecnología Del Ecuador; Programa de Becas para Docentes Universitarios <http://www.educacionsuperior.gob.ec>) for funding this work.

REFERENCES

- Andino A, Hanning I (2015) *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars ScientificWorldJournal 2015:520179 doi:10.1155/2015/520179
- Bender JK, Wille T, Blank K, Lange A, Gerlach RG (2013) LPS structure and PhoQ activity are important for *Salmonella* Typhimurium virulence in the *Galleria mellonella* infection model [corrected] PLoS One 8:e73287 doi:10.1371/journal.pone.0073287
- Bonardi S (2017) *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union Epidemiology & Infection 145:1513-1526 doi:10.1017/S095026881700036X
- Card R, Vaughan K, Bagnall M, Spiropoulos J, Cooley W, Strickland T, Davies R, Anjum MF (2016) Virulence Characterisation of *Salmonella enterica* Isolates of Differing Antimicrobial Resistance Recovered from UK Livestock and Imported Meat Samples Front Microbiol 7:640 doi:10.3389/fmicb.2016.00640
- CNR-ESS (2017) Rapport d'activité annuel Année d'exercice 2016. Institut Pasteur, Paris,
- Denis M, Houard E, Fablet A, Rouxel S, Salvat G (2013) Distribution of serotypes and genotypes of *Salmonella enterica* species in French pig production Vet Rec 173:370 doi:10.1136/vr.101901
- EFSA, ECDC (2010a) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008 The EFSA Journal 10(3):442 doi:10.2903
- EFSA, ECDC (2010b) Quantitative Microbiological Risk Assessment on *Salmonella* in Slaughter and Breeder pigs: Final Report EFSA Journal
- EFSA, ECDC (2017) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2016. EFSA Journal 15(12):228 pp doi:https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077
- Figueiredo R, Card R, Nunes C, AbuOun M, Bagnall MC, Nunez J, Mendonca N, Anjum MF, da Silva GJ (2015) Virulence Characterization of *Salmonella enterica* by a New Microarray: Detection and Evaluation of the Cytolethal Distending Toxin Gene Activity in the Unusual Host *S. Typhimurium* PLoS One 10:e0135010 doi:10.1371/journal.pone.0135010
- Gal-Mor O, Boyle EC, Grassl GA (2014) Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ Front Microbiol 5:391 doi:10.3389/fmicb.2014.00391
- Junqueira JC (2012) *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives Virulence 3:474-476 doi:10.4161/viru.22493
- Kerouanton A, Hirchaud E, Rose V, Esnault E, Naquin D, Denis M (2015) First Complete Genome Sequence of a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Derby Strain Associated with Pork in France Genome announcements 3 doi:10.1128/genomeA.00853-15
- Kerouanton A, Rose V, Even M, Houard E, Denis M Prevalence and genetic diversity of *Salmonella* in organic and conventional pig productions in France. In: International Symposium of *Salmonella* I3S, Saint-Malo, 2013a. pp 279-280
- Kerouanton A, Rose V, Weill FX, Granier SA, Denis M (2013b) Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella enterica* serotype derby isolated from pigs, pork, and humans in France Foodborne Pathog Dis 10:977-984 doi:10.1089/fpd.2013.1537
- Kurstak E, Vega, E. (1967) Infection bactérienne à *Salmonella* Typhimurium chez un invertébré, *Galleria mellonella* L. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/m68-039>.
- Lailier M, Grout J, Marault M, Oudart C, Moury F, Brisabois A (2013) Methode de confirmation moléculaire des souches de *Salmonella* variants monophasiques et immobiles du sérovar Typhimurium Euroreference, cahier de la Référence No 11

- Leclerc V, Moury F, Noel V, Berta-Vanrullen I, Cadels-Six S, Lailier M (2016) Le réseau *Salmonella*, un dispositif de surveillance des salmonelles sur la chaîne alimentaire: bilan 2015. Bulletin épidémiologique, santé animales et alimentation vol 77. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation
- Littrup E, Torpdahl M, Malorny B, Huehn S, Christensen H, Nielsen EM (2010) Association between phylogeny, virulence potential and serovars of *Salmonella enterica* Infect Genet Evol 10:1132-1139 doi:10.1016/j.meegid.2010.07.015
- McWhorter AR, Davos D, Chousalkar KK (2015) Pathogenicity of *Salmonella* strains isolated from egg shells and the layer farm environment in australia Appl Environ Microbiol 81:405-414 doi:10.1128/AEM.02931-14
- Mukherjee K, Altincicek B, Hain T, Domann E, Vilcinskis A, Chakraborty T (2010) Galleria mellonella as a model system for studying Listeria pathogenesis Appl Environ Microbiol 76:310-317 doi:10.1128/AEM.01301-09
- Popoff MY (2001) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. World Health Organisation Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella* Institut Pasteur France,
- Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D (2012) The insect Galleria mellonella as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis J Vis Exp:e4392 doi:10.3791/4392
- Ren J, Sang Y, Qin R, Cui Z, Yao YF (2017) 6S RNA is involved in acid resistance and invasion of epithelial cells in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Future Microbiol 12:1045-1057 doi:10.2217/fmb-2017-0055
- Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of Escherichia coli O157:H7, *Salmonella*, and Shigella for PulseNet Foodborne Pathog Dis 3:59-67 doi:10.1089/fpd.2006.3.59
- Suez J, Porwollik S, Dagan A, Marzel A, Schorr YI, Desai PT, Agmon V, McClelland M, Rahav G, Gal-Mor O (2013) Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans PLoS One 8:e58449 doi:10.1371/journal.pone.0058449
- Tsai CJ, Loh JM, Proft T (2016) Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing Virulence 7:214-229 doi:10.1080/21505594.2015.1135289
- Viegas SC, Mil-Homens D, Fialho AM, Arraiano CM (2013) The virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in the insect model Galleria mellonella is impaired by mutations in RNase E and RNase III Appl Environ Microbiol 79:6124-6133 doi:10.1128/AEM.02044-13
- Vo AT, van Duijkeren E, Fluit AC, Hendriks HG, Tooten PC, Gaastra W (2007) Comparison of the *in vitro* pathogenicity of two *Salmonella* Typhimurium phage types Comp Immunol Microbiol Infect Dis 30:11-18 doi:10.1016/j.cimid.2006.09.003
- Wang KC, Huang CH, Ding SM, Chen CK, Fang HW, Huang MT, Fang SB (2016) Role of yqiC in the Pathogenicity of *Salmonella* and Innate Immune Responses of Human Intestinal Epithelium Front Microbiol 7:1614 doi:10.3389/fmicb.2016.01614
- Zdybicka-Barabas A, Cytrynska M (2011) Involvement of apolipoprotein III in antibacterial defense of Galleria mellonella larvae Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 158:90-98 doi:10.1016/j.cbpb.2010.10.001

3. Conclusion

Cette étude contribue à évaluer la virulence de trois sérovars majeurs trouvés dans la production porcine en France. Notre étude a montré différents profils de virulence entre les souches appartenant à *S. Derby*, *S. Typhimurium* ou au variant monophasique de *S. Typhimurium* et, également, des différences entre sérovars. Les résultats sur les cellules Caco-2 et la littérature tendent à confirmer que *S. Derby* a une faible pathogénicité par rapport à *S. Typhimurium* monophasique, mais cela n'a pas été confirmé par l'étude chez les larves de *Galleria mellonella*. Nous avons pu observer que la concordance entre le modèle *in vivo* et le modèle *in vitro* n'était pas si évidente, au moins pour *S. Derby*. Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour corroborer ces différences. Il serait intéressant de séquencer nos souches pour décrire plus précisément leur potentiel pathogène.

CHAP V :
DISCUSSION GENERALE

Depuis la première description de *Salmonella* en 1985 par Daniel D. Salmon, 17 millions de références concernant *Salmonella* ont été publiées dans la littérature scientifique. Malgré tous les efforts déployés pour diminuer les enjeux de santé publique liés aux infections de *Salmonella*, la prévalence des cas humains, dans les pays industrialisés et en voie de développement, continue à être élevée. Les données de l'EFSA pour l'année 2016 ont estimé à 94 530 le nombre de cas humains de salmonellose dans toute l'Europe (EFSA and ECDC, 2017). La complexité du cycle épidémiologique, l'implication de plusieurs espèces animales et la virulence de certains sérovars font que le contrôle de la maladie est difficile et que malgré tous les efforts pour combattre la maladie, les toxi-infections alimentaires se produisent chez les humains.

Salmonella a également été décrite comme un enjeu majeur dans la filière porcine dans plusieurs pays en Europe et notamment en France. Dans l'union Européenne, le nombre de cas humains attribués au porc et à la viande de porc serait de 10 à 20 % (EFSA and ECDC, 2010b) et la viande de porc serait la première source de viande responsable des salmonellose (Bonardi, 2017).

Les porcs sont porteurs sains de *Salmonella*, ils arrivent donc à l'abattoir sans qu'on ait pu identifier leur statut d'excréteur. Au cours de l'abattage, de nombreux facteurs de risque existent et peuvent aboutir à une contamination des carcasses. La diminution de la prévalence du portage intestinal des porcs dans les élevages pourrait donc diminuer le risque de contamination dans les abattoirs.

La filière porcine a donc besoin d'outils pour mieux comprendre le comportement infectieux de *Salmonella* au sein des élevages. Il est nécessaire de pouvoir mettre en place des critères qui peuvent permettre de considérer un élevage comme à risque pour la santé humaine.

Parmi les sérovars impliqués dans les contaminations humaines, trois sérovars sont également très prévalents dans la filière porcine, tant chez le porc que sur les produits à base de porc. Il s'agit des sérovars Typhimurium, Derby et le variant monophasique de *S. Typhimurium*.

Les objectifs de mes travaux de recherche étaient d'établir les dynamiques d'infection au sein des élevages conventionnels et expérimentaux ainsi que de déterminer les différences entre ces trois sérovars de *Salmonella* concernant le pouvoir colonisateur pour le porc et le pouvoir pathogène chez les humains.

Le premier objectif de ce travail consistait à évaluer la dynamique d'infection au sein des élevages, par le biais d'une étude sérologique. Cette étude a été réalisée en Bretagne, la plus grosse région de production porcine en France (56% de la production, 13,3 millions de têtes (GRAPHAGRI, 2016). Toutes les fermes étudiées dans cette étude étaient des fermes de type naisseur-engraisseur. En France, ce type de production rassemble 85% de truies et 60% de porcs à l'engraissement (HCCA, 2015). Même si ces exploitations sont représentatives de la production française, elles ont été sélectionnées sur la base du volontariat. Les résultats ne sont donc pas nécessairement extrapolables à d'autres fermes. Cependant, les porcelets ont été sélectionnés au hasard afin qu'ils puissent être considérés comme représentatifs des lots.

La sérologie a été utilisée dans notre étude pour évaluer l'âge de la séroconversion et ainsi déduire l'exposition antérieure à *Salmonella*. Des controverses entre les fabricants et les scientifiques concernant la sensibilité et la spécificité de ces tests ont été publiées (Farzan et al., 2007). Le kit commercial IDEXX ELISA utilisé dans cette étude a donc été choisi pour ses bonnes performances de sensibilité et spécificité (Gotter et al., 2012).

La détection d'anticorps contre *Salmonella* n'est pas le meilleur indicateur d'infection au niveau du porc, car ni l'infection des ganglions lymphatiques, ni l'excrétion de *Salmonella* dans les fèces ne sont nécessairement liées à la présence d'anticorps chez les porcs (Mainar-Jaime et al., 2008). Malgré cela, l'ELISA est utile pour détecter une exposition antérieure des troupeaux aux bactéries et certains programmes nationaux de surveillance sont basés sur la sérologie (Vico, 2012). La sérologie au niveau de l'élevage est considérée comme une bonne solution pour catégoriser le bétail, c'est pourquoi dans cette étude nous n'avons pas analysé les résultats sur la base d'une approche individuelle.

Dans toutes les fermes, nous avons trouvé un pourcentage de DO élevé pour les truies comme les porcelets d'une semaine. Cette présence d'anticorps contre *Salmonella* a été détectée chez les porcelets jusqu'à l'âge de dix semaines. Nous avons observé une forte corrélation dans la réponse sérologique des porcelets et des truies à une semaine et six semaines. La persistance d'anticorps maternels jusqu'à l'âge de huit semaines a déjà été décrite dans la littérature (Beloëil et al., 2003; Merialdi et al., 2008). La composition et la durée de l'immunité maternelle acquise grâce au colostrum et à la consommation de lait ont une grande influence sur la dynamique de la transmission de *Salmonella* à la ferme (Wales et al., 2009). Dans notre étude, les résultats de l'analyse univariée n'ont révélé aucun effet protecteur des anticorps maternels sur l'âge de séroconversion. Cependant, il a été estimé que la fréquence relativement élevée de l'infection, alors que la fréquence de la maladie était faible chez les

porcelets allaités, pourrait être lié aux effets protecteurs des anticorps maternels (Lovell and Barrow, 1999).

Les niveaux de DO ont augmenté principalement pendant la période d'engraissement et sont demeurés élevés jusqu'à l'abattage. Wales et ses collaborateurs ont également décrit que le degré de réponse sérologique chez les porcs d'engraissement tend à augmenter après environ dix semaines (Wales et al., 2009). Ceci est probablement dû à une réponse immunitaire active contre l'infection naturelle qui se serait produite au début de l'engraissement (Vigo et al., 2009).

Une corrélation positive a été trouvée entre l'état sérologique des porcelets en fin de phase d'engraissement, entre la 18ème semaine d'engraissement et l'abattage. Ceci est probablement dû au fait que les anticorps des porcs, d'abord infectés au cours de la période d'engraissement, continuent d'augmenter progressivement avec le temps car les bactéries continuent à circuler dans le troupeau et à contaminer de nouveau les animaux. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en menant des analyses bactériologiques en parallèle des analyses sérologiques.

L'âge moyen de séroconversion à *Salmonella* a été estimé en 137 jours. Cette période correspond à la seconde moitié de la phase d'engraissement. L'apparition d'une réponse immunitaire a été décrite entre 7 et 30 jours après l'infection naturelle (Vigo et al., 2009). Ainsi, nous estimons que les porcs pourraient avoir été exposés à *Salmonella* durant la première moitié de la période d'engraissement. Une autre étude a décrit une réponse immunitaire active contre l'infection naturelle au début de la période d'engraissement (Beloeil et al., 2003). Les facteurs influençant l'infection à *Salmonella* durant la période d'engraissement ont été décrits dans la littérature (Hotes et al., 2010). Ils sont liés à des mesures d'hygiène et de biosécurité telles que le nettoyage des tuyaux d'alimentation, le port de vêtements de protection en entrant dans les fermes et le contrôle de la prolifération des rongeurs. Les pratiques agricoles en maternité - comme permettre aux porcs d'enclos adjacents d'avoir un contact et/ou de mélanger des porcs de plusieurs fournisseurs - sont associées à une probabilité accrue de séropositivité pour *Salmonella* (Lo Fo Wong et al., 2004).

Dans notre étude, un « effet ferme » influence de manière significative l'âge de la séroconversion. Cet « effet ferme » comprend un ensemble de pratiques et de mesures de biosécurité telles que l'âge du sevrage, les changements de salles, d'enclos, l'âge d'entrée en engraissement, le nettoyage et la désinfection, le déplacement et le mélange des animaux.

D'autres études ont montré un « effet ferme » dans la contamination par des micro-organismes comme *Campylobacter* mais pas pour *Salmonella* (Fosse et al., 2011).

Contrairement aux études publiées antérieurement (Beloëil et al., 2007), nous n'avons trouvé aucun autre facteur associé à l'âge de la séroconversion. Cela peut être dû à la taille limitée de notre échantillon (trois fermes et 120 porcs par ferme). Il peut donc y avoir eu un manque de puissance statistique pour différencier les facteurs agissant sur la séroconversion. En 2007, Beloëil et ses collaborateurs avaient observé un lien entre la séroconversion de *Salmonella* et l'état sérologique des porcs pour le virus PRRSV. Nous n'avons pas mis en évidence un tel lien dans notre étude.

Le second objectif de ce travail était de décrire la dynamique de la colonisation des porcs après inoculation avec une souche du variant monophasique de *Salmonella* Typhimurium dans des conditions expérimentales. Dans notre modèle, nous avons inoculé des porcs avec 10^9 UFC de *S. Typhimurium* monophasique/porc. Cette dose élevée garantit l'uniformité de la colonisation (Boyen et al., 2009).

Après 24 heures d'inoculation, la température rectale des porcs a brièvement augmenté. Une température rectale élevée le premier jour après l'infection avait déjà été décrite chez des porcs infectés expérimentalement par *S. Typhimurium* (Knetter et al., 2015; Uthe et al., 2007).

Nous avons observé une excrétion continue de *Salmonella* au cours des 84 jours de l'essai, avec un pic d'excrétion trois jours après l'inoculation, et des profils d'excrétion variables selon les porcs. La plupart du temps, des études ont rapporté une excrétion intermittente de *S. Typhimurium* dans des essais expérimentaux (Boyen et al., 2009; Ivanek et al., 2012) comme chez les porcs naturellement contaminés par *S. Typhimurium* (Beloëil et al., 2003; Tessier, 2015) ou par le variant monophasique de *S. Typhimurium* (Fernandes et al., 2016). L'excrétion continue peut s'expliquer par la forte dose d'inoculation, comme cela a déjà été rapporté dans un essai sur des porcs inoculés avec *S. Typhimurium* (Osterberg and Wallgren, 2008). Elle pourrait également être liée à la souche utilisée dans notre essai, un variant monophasique de *S. Typhimurium*. Une étude récente a montré que les porcs exposés à un environnement contaminé avec une dose très faible du variant monophasique de *S. Typhimurium* peuvent excréter jusqu'à 10^4 UFC / g (Lynch et al., 2017).

Dans notre étude, les porcs ont été divisés en trois groupes en fonction de l'âge d'abattage. Aucune différence statistique entre les niveaux d'excrétion de *Salmonella* n'a été observée entre les porcs de G1 et G2, mais les porcs de G3 présentaient des profils d'excrétion

différents. En effet, le niveau d'excrétion d'un porc était beaucoup plus élevé que celui des autres porcs. Le portage des porcs par *S. Typhimurium* a été largement décrit par de nombreux auteurs, et l'existence de faibles excréteurs, d'excréteurs persistants (Knetter et al., 2015) et de super excréteurs (Berriman et al., 2013) a été rapportée. Il est difficile de diagnostiquer des forts et faibles excréteurs car, dans les conditions d'élevage et d'abattoir, un test de diagnostic rapide pour déterminer la quantité de *Salmonella* excrétée dans les fèces n'est pas disponible aujourd'hui. Les forts excréteurs représentent un problème majeur dans l'industrie porcine car ils augmentent les niveaux de contamination dans les exploitations, génèrent une re-contamination entre les porcs et excrètent continuellement des taux élevés de *Salmonella* (Berriman et al., 2013; Lanzas et al., 2011; Weaver et al., 2017).

L'objectif de cette étude était également d'établir le degré de contamination des organes et du contenu intestinal des porcs inoculés au fil du temps. En effet, la lacération d'un tube digestif contaminé expose la carcasse et l'environnement de l'abattoir à la bactérie et peut contribuer à la contamination d'autres carcasses par contamination croisée (Berends et al., 1997; Rostagno et al., 2003b). Il est donc très important de mettre en place des outils pour réduire la prévalence du portage intestinal de *Salmonella* chez les porcs.

À l'autopsie, 100% des amygdales, de l'iléon et du caecum étaient contaminés dans tous les groupes, les amygdales étant les organes les plus contaminés dans cette étude ($5,0 \pm 1,4 \log_{10}$ UFC / g). Ce niveau dans les amygdales est plus élevé que celui obtenu pour les porcs inoculés par un inoculum de *S. Typhimurium* de 10^7 UFC/g (Boyen et al., 2009). Les amygdales sont l'un des principaux sites d'invasion par les bactéries, qui se propagent ensuite aux ganglions lymphatiques. Elles sont également le principal site de colonisation de *Salmonella* chez les porcs devenus porteurs sains (Fedorka-Cray et al., 1995a). En effet, les amygdales, les ganglions lymphatiques et le tractus gastro-intestinal sont les principaux sites de colonisation de *S. Typhimurium* et d'autres sérovars (Van Parys et al., 2011). Les ganglions lymphatiques ont également été signalés comme le site de diagnostic le plus commun et un site de colonisation prédominante de *S. Typhimurium* chez les porcs (Osterberg et al., 2010; Van Parys et al., 2013). Cependant, dans notre étude, nous avons trouvé un faible niveau de colonisation dans les ganglions lymphatiques, peut-être expliqué par notre souche qui pourrait avoir un comportement différent dans la colonisation des organes internes des porcs.

Nous avons trouvé un taux plus élevé de colonisation dans le jéjunum, l'iléon et le caecum que dans le duodénum. Nos résultats sont en accord avec les études qui ont établi que *S. Typhimurium* colonise préférentiellement l'iléon, le caecum et le côlon, vraisemblablement

en raison d'un pH bas et du plus faible taux de sels biliaires que dans le duodénum et le jéjunum (Uribe et al., 2016). Ces derniers auteurs ont également signalé que le jéjunum, l'iléon et le côlon réagissaient différemment à l'infection par *Salmonella* spp.

Nous avons également évalué la réponse du porc à l'infection en mesurant les IFN- γ et la production d'anticorps contre *Salmonella*. Le rôle des IFN- γ au cours de l'infection a été démontré. Cette glycoprotéine de 17 kDA est sécrétée par les macrophages, les cellules NK et LTH1 (Stevens and Gray, 2013; Uthe et al., 2009). Nous avons observé que les porcs produisaient des niveaux élevés d'IFN- γ trois jours après l'inoculation. Nous avons également trouvé une corrélation positive entre les niveaux d'IFN- γ et les niveaux d'excrétion fécale de *Salmonella* trois jours après l'inoculation. Ce résultat est concordant avec les observations de Uthe et ses collaborateurs lors d'un essai expérimental sur des porcs avec *S. Typhimurium* (Uthe et al., 2009).

Notre étude a montré que la séroconversion s'est produite à différents moments au cours de l'essai selon les groupes et les porcs. Cinq porcs étaient déjà positifs sept jours après l'infection et tous les porcs des groupes G2 et G3 avaient séroconverti 49 jours après l'infection. Cependant, une étude récente a montré que 17 porcs sur 20 avaient présenté une séroconversion dès 28 jours après l'exposition à un environnement contaminé par le variant monophasique de *S. Typhimurium* (Lynch et al., 2017). Pour les porcs inoculés avec *S. Typhimurium*, des auteurs ont rapporté une séroconversion de 100% 14 jours après l'inoculation (Osterberg and Wallgren, 2008) ou 77,8% 40 jours après l'inoculation (Van Parys et al., 2013). En élevage conventionnel, une étude longitudinale récente réalisée sur 360 porcs provenant de trois élevages a permis d'observer que les porcs avaient une séroconversion moyenne à $137 \pm 2,2$ jours et que 75,07% des porcs étaient séroconvertis par l'âge d'abattage (Cevallos-Almeida et al., 2018a).

Toutes nos observations sur la colonisation, la production d'IFN- γ et la sérologie ont tendance à indiquer que le variant monophasique de *S. Typhimurium* provoque des réactions similaires chez les porcs après inoculation expérimentale que celles observées par d'autres auteurs après inoculation avec *S. Typhimurium*. Ceci est probablement lié au fait que ces deux sérovars ont démontré de fortes similarités en termes d'îlot de pathogénicité (SPI) et de virulence (Vieira-Pinto et al., 2012).

Après passage *in vivo* chez les porcs, nous avons identifié deux nouveaux profils MLVA par rapport au profil MLVA original. La variation maximale observée est une insertion ou une suppression d'une unité répétée dans un seul locus, STTR6. Ces nouveaux profils ont été obtenus pour 3,3% des isolats typés. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui décrivaient peu de variation génétique ou de mutation d'isolats humains de *S. Typhimurium* après des essais de passage *in vitro* et *in vivo* chez des souris (Dimovski et al. 2014). Certaines études ont décrit des variations dans les locus MLVA de *Salmonella* tels que STTR5, STTR9 et STTR10 en raison d'événements de délétion multiples ou uniques (Dimovski et al., 2014; Vignaud et al., 2016). Nos résultats indiquent que la mutation peut se produire dans un court laps de temps. Cependant, Dimovski et al. (2014) recommande que les isolats dont les profils diffèrent à l'un des locus STTR5, STTR6 et STTR10 qui évoluent rapidement soient regroupés dans un même cluster. La surveillance des épidémies utilisant cette méthodologie doit utiliser cette approche de clusterisations des profils pour ne pas risquer d'écarter des souches qui seraient liées à un même événement épidémiologique.

Le troisième objectif de ce travail consistait à comparer les profils d'excrétion, de réponse sérologique et de colonisation dans plusieurs organes de quatre groupes d'animaux inoculés avec des souches de sérovars différents : *S. Derby*, *S. Typhimurium* et le variant monophasique de *S. Typhimurium*. Nous avons trouvé des différences entre les groupes pour certains signes cliniques, comme la diarrhée et la fièvre. Alors que tous les groupes ont eu une diarrhée transitoire au moins une fois, la fièvre n'a pas été remarquée dans le groupe mST. Dans le groupe mST +, plusieurs porcs ont eu de la fièvre aux jours 1, 2 et 7 p.i. (post-inoculation). La même souche de variant monophasique (S14CH63), utilisée en 2016 (Cevallos-Almeida et al., 2018b) n'avait causé de la fièvre qu'au premier jour. Dans des études de comparaison de sérovars (*S. Typhimurium* vs *S. Yoruba* ; et *S. Derby* vs *S. Cubana*), aucun signe clinique ou diarrhée n'avait été observé (Osterberg et al., 2009; Osterberg and Wallgren, 2008). Cependant, chez des animaux inoculés comme dans notre étude à une dose de 10^9 UFC de *S. Typhimurium*, plusieurs signes cliniques de fièvre, de diarrhée et d'anorexie ont été signalés (Boyen et al., 2009).

Un niveau élevé d'excrétion a été atteint au premier jour après inoculation dans tous les groupes. Le pic d'excrétion est cependant à J 14 post-inoculation pour le groupe inoculé avec *S. Derby*. Ce même jour, un porc de ce groupe montrait une élévation de température corporelle et de la diarrhée était observée dans le parc. Nous avons supposé que les porcs étaient porteurs de rotavirus, mais cela n'a pas été vérifié par des analyses. Il a été démontré

que l'infection concomitante du rotavirus avec d'autres pathogènes entériques tels que *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC) ou *Salmonella* est fréquente et entraîne un effet cumulatif entraînant plusieurs maladies cliniques (Constable et al., 2016). Ceci pourrait donc expliquer l'augmentation de l'excrétion à J14 pour ce groupe.

Dans les jours qui ont suivi l'inoculation, l'excrétion de *Salmonella* était variable selon le sérovar inoculé. Une étude a montré que les degrés divers de virulence des sérovares de *Salmonella* peuvent jouer un rôle important dans la capacité et la vitesse à laquelle ils peuvent se disséminer chez les porcs (Loynachan et al., 2004).

Dans notre étude, seulement les porcs inoculés par le variant monophasique (groupe mST) ont excrété continuellement *Salmonella* tout au long de l'essai. Une étude longitudinale récente chez des porcs naturellement infectés par le variant monophasique de *S. Typhimurium* indique que ce sérovar peut provoquer des taux élevés d'excrétion chez les porcs colonisés, particulièrement chez les animaux plus jeunes (Weaver et al., 2017). Dans les groupes inoculés par *S. Derby* et *S. Typhimurium*, au moins un porc était négatif pour *Salmonella* au cours des différents jours d'échantillonnage. Ces résultats sont concordants avec d'autres études chez des porcs infectés expérimentalement avec *S. Typhimurium* et *S. Derby*, où les porcs ont tendance à alterner les périodes d'excrétion et de non excrétion, et donc à entrer dans un état d'excrétion intermittente (Ivanek et al., 2012). En ce qui concerne la souche de variant monophasique utilisée comme témoin dans cette étude, nous avons noté d'avantage d'intermittence dans l'excrétion que lors d'une précédente étude (Cevallos-Almeida et al., 2018b).

Nous avons trouvé des différences statistiques entre les niveaux d'excrétion totale des porcs inoculés avec *S. Typhimurium* et ceux inoculés par le variant monophasique de *S. Typhimurium* (mST), qui ont excrété d'avantage. Il n'y avait pas de différence entre ces deux groupes et celui des porcs inoculés par *S. Derby*. Ce travail représente la première comparaison de la colonisation en essai expérimental entre *S. Typhimurium* et *S. Typhimurium* monophasique. Même si le variant monophasique est génétiquement apparenté à *S. Typhimurium* (Bugarel et al., 2012a; Soyer et al., 2009a; Vieira-Pinto et al., 2012), d'autres recherches sont nécessaires pour établir les différences entre ces deux sérovares en terme de colonisation des porcs.

Au moment de l'autopsie, pour tous les sérovares, les taux les plus élevés en *Salmonella* ont été observés dans les amygdales, le caecum et le jéjunum. Les sites les moins contaminés

étaient les ganglions lymphatiques et le duodénum. Une étude a montré qu'après l'inoculation par *S. Typhimurium*, seuls les amygdales et les ganglions lymphatiques restaient positifs jusqu'à 28 jours (Matiasovic et al., 2014). La même étude montre qu'après inoculation par *S. Derby*, seules les amygdales restent positifs jusqu'à 28 jours.

Concernant le suivi sérologique, les porcs ont séroconverti à différents moments selon le sérovar inoculé. Nous avons trouvé 100% de séroconversion chez les porcs du groupe vmST à jour 31 p.i. Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par Lynch et ses collaborateurs (2017), où 85% des porcs étaient séroconvertis au jour 28 p.i.. Pour les porcs des groupes ST et SDb, 100% de séroconversion était obtenu à J28 et J38 p.i. respectivement. Une autre étude a montré un résultat différent avec une séroconversion de 100% des porcs dans les deux semaines suivant l'infection (Osterberg et Wallgren 2008). Pour *S. Derby*, nos résultats sont différents à ceux trouvés par Osterberg et ses collaborateurs en 2009, avec 100% de séroconversion à 21 jours. Les porcs du groupe mST + ont séroconverti plus tôt que ceux des autres groupes: 100% de la séroconversion a été observé à J24 p.i.. Au cours de l'étude précédemment menée avec cette souche, 100% de la séroconversion n'avait été atteint qu'à J49 p.i. (Cevallos-Almeida et al., 2018b).

Enfin, dans la dernière partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la pathogénicité pour l'homme des sérovars associés à la filière porcine. Afin d'établir un niveau de virulence de *S. Derby*, *S. Typhimurium* et du variant monophasique de *S. Typhimurium* isolées de porcs, nous avons testé 15 souches (5 par sérovar) dans un modèle *in vivo* utilisant des larves de *Galleria mellonella* et dans un test *in vitro* sur cellules Caco-2. Ce travail nous a permis de classer les différentes souches à travers le pourcentage de survie des larves après inoculation par *Salmonella* et à travers le pourcentage d'adhésion des bactéries sur les cellules Caco-2. Le but était d'évaluer leur niveau de pathogénicité envers les humains.

Il est possible de traiter de nombreux aspects de l'immunité innée des mammifères chez les invertébrés. C'est pourquoi ils sont utilisés comme modèle pour étudier les infections humaines (Viegas et al., 2013). Certaines études portant sur la virulence de *S. Typhimurium* et utilisant le modèle de *Galleria mellonella* ont déjà été décrites (Bender et al., 2013; Card et al., 2016; Kurstak, 1967; Viegas et al., 2013).

Dans notre étude, nous avons observé, pour presque toutes les souches, que l'inoculation des larves par *Salmonella* induit la mélanisation des larves mourantes. La réaction de mélanisation a été décrite comme la synthèse et le dépôt de mélanine pour encapsuler des agents

pathogènes au site de la plaie, suivie de la coagulation de l'hémolymphe. Cette réaction est analogue à la formation d'abcès chez les mammifères (Kurstak, 1967).

La pathogénèse de *Salmonella* chez les larves commence par une multiplication bactérienne lente dans l'intestin ou la cavité viscérale, puis l'infection progresse avec des dommages cellulaires caractérisés par une vacuolisation, une désintégration des hémocytes et des altérations nucléotidiques (Kurstak, 1967).

Des études d'histopathologie chez des larves de *Galleria mellonella* inoculées avec *S. Typhimurium* ont montré des changements pathologiques modérés et variés, caractérisés par une destruction complète de l'épithélium intestinal avec des cellules nécrotiques et des débris cellulaires (Card et al., 2016).

Nos travaux ont mis en évidence que le sérovar Derby provoquait la mortalité la plus élevée chez les larves de *Galleria mellonella* par rapport aux autres sérovars testés. La mortalité de larves était de 89,33% avec les souches de *S. Derby*. Toutes les souches de *S. Derby* présentaient le même schéma de virulence : elles ont toutes été classées dans le groupe des « Fortes Virulentes ». Cependant, ce résultat n'est pas concordant avec les résultats observés avec le test *in vitro*; en effet, ces souches ont une adhérence faible ou intermédiaire sur les cellules Caco-2. Aucune autre étude n'a testé ce sérovar sur le modèle des larves de *Galleria mellonella* ni sur les cellules Caco-2; il est donc difficile de comparer nos résultats avec ceux d'autres études. *Salmonella Derby* a été décrit comme ayant un potentiel de virulence plus faible car il leur manquerait des gènes importants pour la virulence, y compris les gènes *irsA* et *msgA*. L'absence de nombreux gènes importants pour la virulence suggère que le sérovar Derby est moins virulent pour l'homme (Littrup et al., 2010). Cela pourrait expliquer que les souches de *S. Derby* ont un faible potentiel de virulence sur les cellules Caco-2, mais n'expliquent pas leur comportement sur les larves de *Galleria mellonella*. Nous sommes incapables d'identifier pourquoi *S. Derby* se comporte ainsi sur les larves.

L'un des premiers travaux d'inoculation des larves de *Galleria mellonella* avec des souches de *S. Typhimurium* utilisant le même niveau d'inoculum (10^4 UFC par larve) a donné une mortalité de larves de 20 à 34% (Kurstak, 1967). La mortalité des larves était plus élevée dans notre étude et atteignait en moyenne 47,67% pour *S. Typhimurium* et 58,00% pour *S. Typhimurium* monophasique.

Sur les cellules Caco-2, le pourcentage d'adhésion était également plus élevé avec les souches du variant monophasique de *S. Typhimurium* (30,92%) et significativement différent de celui

obtenu pour les souches de *S. Derby* (9,50%). Cela tend à confirmer que *S. Typhimurium* et son variant monophasique sont plus pathogènes chez l'homme que *S. Derby*. Ceci est cohérent avec leur fréquence dans les cas humains en Europe (EFSA and ECDC, 2017) et en France (CNR-ESS, 2017)

Pour les tests sur *Galleria mellonella*, la différence de virulence entre les sérovars pourrait s'expliquer également par le fait que *S. Typhimurium* est particulièrement sensible à l'apolp-III, un composant protéique de la lipophorine qui joue un rôle important dans la réponse immunitaire des insectes, car il lie des composants de cellules bactériennes comme les lipopolysaccharides, les acides lypticoïques et d'autres composés (Zdybicka-Barabas and Cytrynska, 2011).

Dans une autre étude (McWhorter et al., 2015), les auteurs ont étudié une collection de souches de *Salmonella* de différents sérovars, isolées d'œufs et d'exploitations avicoles. Ils n'ont observé aucune relation entre la présence ou l'absence de gènes de virulence par PCR et la capacité invasive *in vitro* (cellules Caco-2) ou la pathogénicité *in vivo* (souris).

D'autres études sur *S. Typhimurium* utilisant des modèles de *Galleria mellonella* ont montré que la structure LPS des bactéries pouvait influencer la virulence de *Salmonella* chez *Galleria mellonella*, comme l'absence du gène *PhoQ* (Bender et al., 2013), ou du plasmide de virulence (Card et al., 2016).

Notre étude a mis en évidence que les souches des sérovars *Typhimurium* et son variant monophasique présentent des profils de virulence très variables selon les souches sur *Galleria mellonella*; la mortalité variait de 10% à 90% et l'adhésion de 4,66% à 54,6%. Des différences intra-sérovars dans les modèles de souris ont déjà été décrites (Suez et al., 2013)

En 2015, McWhorter et ses collaborateurs ont classé la souche ATCC 14028 comme souche de *S. Typhimurium* hautement virulente; cette souche a une forte capacité d'invasion sur la cellule *Caco-2* et induit une forte mortalité chez les souris inoculées. Avec notre essai sur *Galleria mellonella*, la souche ATCC 14028 a été identifiée comme virulente intermédiaire (pourcentage de survie de 46,67%) et nous avons pu observer que trois souches, une *S. Typhimurium* et deux *S. Typhimurium* monophasique pouvaient être considérées comme très virulentes par rapport à cette souche de référence. Les deux souches du variant monophasique montrent également une forte adhésion sur les cellules *Caco-2*. Ceci confirme que la virulence au sein d'un même sérovar peut être variable et que la classification des souches les unes par rapport aux autres est très dépendante des souches choisies pour le test.

CHAP VI :
CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse nous a permis de mieux comprendre la dynamique d'infection et de colonisation des porcs par *Salmonella* au travers de trois études : une étude longitudinale dans trois élevages conventionnels avec le suivi de trois lots de porcs par élevage, de la naissance à la date d'abattage et, deux études expérimentales en animalerie après inoculation orale de porcelets de 7 semaines. De plus, au cours de cette thèse, nous avons aussi évalué la pathogénicité de souches représentatives des trois sérovars majeurs de la filière porcine, par des essais *in vivo* sur le modèle insecte *Galleria mellonella* et *in vitro*, sur cellules intestinales humaines Caco-2.

L'étude longitudinale en élevage conventionnel nous a permis de calculer un âge moyen de séroconversion pour *Salmonella* de 137 jours d'âge, soit 19,5 semaines d'âge. Sur la base de ce calcul, nous avons estimé que la contamination par *Salmonella* s'était produite en début d'engraissement.

Le premier essai expérimental nous a permis d'apporter pour la première fois des données sur la dynamique d'infection des porcs par le variant monophasique de *S. Typhimurium*. Ce sérovar est devenu important en termes de prévalence chez le porc et également en infections humaines. Nous avons observé pour ce sérovar une excrétion continue et persistante chez tous les porcs suivis pendant 21, 49 ou 84 jours après inoculation ; alors qu'une excrétion intermittente est généralement décrite pour salmonelle chez le porc. A l'autopsie, il a été possible d'apprécier la colonisation des porcs par ce sérovar ; les salmonelles ont été retrouvées à des niveaux variables dans les différentes parties de l'intestin, à des niveaux faibles dans les nœuds lymphatiques et à des niveaux très élevés dans les amygdales. En réponse à l'infection, les porcs ont produit des anticorps anti-*Salmonella*. Nous avons mis en évidence que les premiers porcs avaient séroconverti à 7 jours et l'ensemble des porcs à 49 jours post-inoculation. Les interféron-gamma, signe de la réponse inflammatoire, ont quant à eux été produits dès les premiers jours après l'infection. Nous nous sommes intéressées lors de cet essai à la stabilité génétique de la souche après passage dans le tractus digestif du porc. Nous avons observé des profils MLVA différents de celui de la souche inoculée indiquant que le génome de la souche a faiblement évolué. Ceci sous-entend que des profils MLVA proches en fin d'élevage conventionnel peuvent être issus d'une même souche mère.

En perspective, il serait intéressant de confirmer en conditions naturelles l'excrétion continue de *Salmonella* des porcs infectés par le variant monophasique de *S. Typhimurium*. Pour cela, il faudrait cibler des élevages de porcs contaminé par ce sérovar et suivre le niveau d'excrétion dans les fèces des porcs de la naissance jusqu'à l'âge d'abattage. Ces données

seraient intéressantes à avoir pour mieux définir la gestion du risque *Salmonella* en filière porcine.

Cet essai nous a laissé entrevoir que certains porcs pouvaient être considérés faiblement excréteurs et d'autres fortement excréteurs. En perspective, ceci serait à confirmer dans le cadre d'un futur essai en testant un plus grand nombre de porcs. Des différences d'excrétion dans des études récentes ont mis en évidence l'importance de l'hétérogénéité de l'hôte dans l'infection. En particulier, il a été démontré qu'une minorité des individus infectés dits super-excréteurs sont responsables de la majorité des infections et qu'il serait intéressant de pouvoir les identifier précocement pour les retirer des élevages et ainsi diminuer la dissémination de la bactérie dans l'élevage. Ces études ciblent des marqueurs immunologiques et microbiotiques pour identifier précocement ces super-excréteurs.

En perspective, il faudrait appliquer un seuil de distance génétique pour la MLVA en vue de savoir à partir de quel seuil il est pertinent de considérer des souches comme ayant la même souche mère. Un seuil a été défini après passage de *S. Typhimurium* chez la souris pendant 15 jours après injection intraveineuse. Ce modèle étant différent de notre essai, inoculation orale et porc, il convient de définir un seuil pour nos conditions. Ceci est important pour mieux évaluer la diversité génétique de *Salmonella* au sein de l'élevage.

Parce que le schéma MLVA n'existe que pour certains sérovars, il serait intéressant en perspective de séquencer le génome entier des isolats récupérés dans le cadre de cet essai après le transit intestinal. Ceci permettrait d'évaluer sur un plus grand nombre de séquences génomiques l'instabilité de la souche après passage dans le tractus digestif du porc. Cela permettrait aussi d'identifier les parties du génome les plus sensibles aux modifications après passage dans le tractus digestif. Cette technique, le WGS, est de plus intéressante car applicable à toutes les souches de *Salmonella*, quel que soit le séovar. Et son application sur le terrain, à tous les maillons de la filière porcine (élevage, abattoir, atelier de découpe, distribution) permettrait de mieux décrire la contamination de la chaîne par ce pathogène.

Le deuxième essai nous a permis de comparer le pouvoir colonisateur chez le porc des trois sérovars majeurs de la filière porcine en France. Nous avons pu voir que la dynamique d'excrétion et de colonisation était similaire quel que soit le séovar. Cependant, la quantité excrétée était significativement plus élevée chez les porcs inoculés par le variant monophasique par rapport à *S. Typhimurium*.

En perspective, la capacité de colonisation du porc par ces différents sérovars pourrait être complétée par l'étude d'un plus grand nombre de souches d'origine porcine par le biais d'un modèle cellulaire en testant leur adhésion et invasion sur cellule intestinale de porc (IPEC-J2).

Nous sommes intéressées au pouvoir pathogène chez l'homme de souches d'origine porcine appartenant aux 3 sérovars. Pour cela, nous avons évalué leur virulence *in vivo* sur un modèle insecte *Galleria mellonella*, et *in vitro* sur cellules Caco-2. Les souches se sont toutes révélées être potentiellement virulentes. Cependant, les deux modèles utilisés n'ont pas répondu dans le même sens surtout pour le sérovar Derby. Sur le modèle insecte *Galleria mellonella*, contrairement à notre attente, *S. Derby* s'est révélé être le sérovar le plus virulent alors que sur Caco-2, le variant monophasique avait un pourcentage d'adhésion aux cellules le plus élevé et Derby le plus bas. La littérature tend à confirmer que *S. Derby* a une faible pathogénicité par rapport à *S. Typhimurium* et son variant monophasique. Nous nous interrogeons sur le comportement de *S. Derby* dans la larve de *Galleria mellonella*. Nous avons vu avec les deux modèles différents niveaux de virulence entre souches d'un même sérovar. Ce qui sous-entend qu'il peut y avoir différentes modalités d'infection de l'homme pour un même sérovar.

En perspectives, le séquençage complet du génome des 15 souches testées appartenant aux trois sérovars devrait permettre d'examiner de plus près le contenu génétique de ces souches en termes de gènes de virulence. Ces données génomiques pourront alors être mises en parallèle avec les données obtenues *via* les essais menés *in vivo* et *in vitro*. La suite serait de séquencer un nombre conséquent de souches collectées de la filière porcine pour en déduire leur potentiel pathogène. De même, à plus long terme, ces génomes pourraient être comparés aux génomes des souches humaines pour voir s'il est possible d'évaluer le niveau d'implication de la filière porcine dans les salmonelloses humaines.

Ces travaux de recherche ont contribué à apporter de nouvelles connaissances sur le pouvoir colonisateur chez les porcs et du pouvoir pathogène chez les humains des trois sérovars majeur de *Salmonelles* retrouvés en filière porcine en France.

Tous les efforts de mesures de lutte doivent être mis en place pour diminuer le risque *Salmonella* dans les élevages. Une des stratégies est de limiter la colonisation du tube digestif des porcs par *Salmonella* ou de réduire le niveau d'excrétion de la bactérie. Ceci peut se faire en agissant sur l'alimentation. En perspectives, il peut être testé des additifs alimentaires ou des aliments de certaines textures pour modifier la composition de la flore ou du microbiote digestif des porcs en vue d'inhiber la colonisation du tube digestif du porc par *Salmonella*.

En termes de gestion du risque, il faut s'interroger si les efforts de maîtrise doivent porter sur tous les élevages positifs en salmonelles quel que soit le sérovar, ou focaliser en première intention sur les élevages contaminés par *S. Typhimurium* et plus particulièrement par le variant monophasique de *S. Typhimurium*. En effet, nos résultats suggèrent que le risque de contamination au départ de la chaîne alimentaire serait plus élevé avec ce sérovar : excrétion continue et quantité excrétée élevée. Il serait intéressant de confirmer ces derniers résultats en réalisant une enquête terrain pour avoir des données récentes de l'importance des trois sérovares dans les élevages de porcs en France et des données sur le niveau d'excrétion des porcs par cette bactérie en fin d'élevage. En effet, il y a très peu de données quantitatives en terme d'UFC/g de fèces sur ce pathogène. De même, il y a peu de données quantitatives sur les matrices alimentaires, or ces données sont importantes pour évaluer le risque *Salmonella* en filière porcine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 3trois3.com (2018) Effectif Anuel des Porcs France. 3trois3.com Communauté Professionnelle Porcine. https://www.3trois3.com/statistiques_porcines/graficos/#5.
- Adams M, Moss M (2007) Food Microbiology. 3. edn. RSC Publishing London
- AFNOR (2008) NF U47-102, Animal health analysis methods — Isolation and identification of any *Salmonella* serotype or of specified *Salmonella* serotypes among mammals. France
- Almeida LA, Araujo R (2013) Highlights on molecular identification of closely related species Infect Genet Evol 13:67-75 doi:10.1016/j.meegid.2012.08.011
- Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF, Markham PF (2003) Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands J Bacteriol 185:3624-3635
- Andino A, Hanning I (2015) *Salmonella* enterica: survival, colonization, and virulence differences among serovars ScientificWorldJournal 2015:520179 doi:10.1155/2015/520179
- ANSES (2011) Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments / *Salmonella* spp. .pp. 1-4
- Ao TT, Feasey NA, Gordon MA, Keddy KH, Angulo FJ, Crump JA (2015) Global burden of invasive nontyphoidal *Salmonella* disease, 2010(1) Emerg Infect Dis 21 doi:10.3201/eid2106.140999
- Arguello H, Sorensen G, Carvajal A, Baggesen DL, Rubio P, Pedersen K (2014) Characterization of the emerging *Salmonella* 4,[5],12:i:- in Danish animal production Foodborne Pathog Dis 11:366-372 doi:10.1089/fpd.2013.1672
- Arpaia N, Godec J, Lau L, Sivick KE, McLaughlin LM, Jones MB, Dracheva T, Peterson SN, Monack DM, Barton GM (2011) TLR signaling is required for *Salmonella* Typhimurium virulence Cell 144:675-688 doi:10.1016/j.cell.2011.01.031
- Ashton PM, Nair S, Peters TM, Bale JA, Powell DG, Painset A, Tewolde R, Schaefer U, Jenkins C, Dallman TJ, de Pinna EM, Grant KA, SWGSIG (2016) Identification of *Salmonella* for public health surveillance using whole genome sequencing PeerJ 4:e1752 doi:10.7717/peerj.1752
- Baker S, Dougan G (2007) The genome of *Salmonella* enterica serovar Typhi Clin Infect Dis 45 Suppl 1:S29-33 doi:10.1086/518143
- Bassi C, Merle C, Fenières A, Le Hello S, Mélik N, Donguy M, Lailier M, Jourdan-Da Silva N (2015) Épidémie de salmonellose à *Salmonella*, sérotype Typhimurium et sérotype 4,12:i:-, Paris, novembre 2012 à février 2013 Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire Institut de Veille Sanitaire 11-12
- Baudart J, Lemarchand K, Brisabois A, Lebaron P (2000) Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions Appl Environ Microbiol 66:1544-1552
- Baumler AJ, Tsois RM, Heffron F (1997) Fimbrial adhesins of *Salmonella* Typhimurium. Role in bacterial interactions with epithelial cells Adv Exp Med Biol 412:149-158
- Beloeil PA, Chauvin C, Proux K, Fablet C, Madec F, Alioum A (2007) Risk factors for *Salmonella* seroconversion of fattening pigs in farrow-to-finish herds Veterinary Research 38:835-848 doi:10.1051/vetres:2007034
- Beloeil PA, Chauvin C, Proux K, Rose N, Queguiner S, Eveno E, Houdayer C, Rose V, Fravallo P, Madec F (2003) Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd Preventive Veterinary Medicine 60:207-226
- Beloeil PA, Fravallo P, Fablet C, Jolly JP, Eveno E, Hascoet Y, Chauvin C, Salvat G, Madec F (2004) Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds Preventive Veterinary Medicine 63:103-120 doi:10.1016/j.prevetmed.2004.01.010
- S0167587704000492 [pii]
- Bender JK, Wille T, Blank K, Lange A, Gerlach RG (2013) LPS structure and PhoQ activity are important for *Salmonella* Typhimurium virulence in the *Galleria mellonella* infection model [corrected] PLoS One 8:e73287 doi:10.1371/journal.pone.0073287
- Berends BR, Van Knapen F, Snijders JM, Mossel DA (1997) Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses Int J Food Microbiol 36:199-206

- Bergeron N, Corriveau J, Letellier A, Daigle F, Quessy S (2010) Characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates associated with septicemia in swine Can J Vet Res 74:11-17
- Berriman AD, Clancy D, Clough HE, Christley RM (2013) Semi-stochastic models for *Salmonella* infection within finishing pig units in the UK Mathematical biosciences 245:148-156 doi:10.1016/j.mbs.2013.06.004
- Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA (1999) The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica* J Bacteriol 181:998-1004
- Blondel CJ, Jimenez JC, Leiva LE, Alvarez SA, Pinto BI, Contreras F, Pezoa D, Santiviago CA, Contreras I (2013) The type VI secretion system encoded in *Salmonella* pathogenicity island 19 is required for *Salmonella enterica* serotype Gallinarum survival within infected macrophages Infect Immun 81:1207-1220 doi:10.1128/IAI.01165-12
- Bollaerts KE, Messens W, Delhalle L, Aerts M, Van der Stede Y, Dewulf J, Quoilin S, Maes D, Mintiens K, Grijspeerdt K (2009) Development of a quantitative microbial risk assessment for human salmonellosis through household consumption of fresh minced pork meat in Belgium Risk Anal 29:820-840 doi:10.1111/j.1539-6924.2009.01223.x
- Bonardi S (2017) *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union Epidemiology & Infection 145:1513-1526 doi:10.1017/S095026881700036X
- Bonifield HR, Hughes KT (2003) Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism J Bacteriol 185:3567-3574
- Boyen F, Haesebrouck F, Maes D, Van Immerseel F, Ducatelle R, Pasmans F (2008) Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control Vet Microbiol 130:1-19 doi:10.1016/j.vetmic.2007.12.017
- Boyen F, Pasmans F, Van Immerseel F, Donne E, Morgan E, Ducatelle R, Haesebrouck F (2009) Porcine in vitro and in vivo models to assess the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for pigs Laboratory animals 43:46-52 doi:10.1258/la.2007.007084
- Brown A, Hormaeche CE (1989) The antibody response to salmonellae in mice and humans studied by immunoblots and ELISA Microbial pathogenesis 6:445-454
- Broz P, Ohlson MB, Monack DM (2012) Innate immune response to *Salmonella* Typhimurium, a model enteric pathogen Gut Microbes 3:62-70 doi:10.4161/gmic.19141
- Bugarel M, Granier SA, Bonin E, Vignaud ML, Roussel S, Fach P, Brisabois A (2012a) Genetic diversity in monophasic (1,4,[5],12:i:- and 1,4,[5],12:-:1,2) and in non-motile (1,4,[5],12:-:-) variants of *Salmonella enterica* S. Typhimurium Food Research International 45 1016–1024 doi:10.1016/j.foodres.2011.06.057
- Bugarel M, Vignaud ML, Moury F, Fach P, Brisabois A (2012b) Molecular identification in monophasic and nonmotile variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium MicrobiologyOpen 1:481-489 doi:10.1002/mbo3.39
- Card R, Vaughan K, Bagnall M, Spiropoulos J, Cooley W, Strickland T, Davies R, Anjum MF (2016) Virulence Characterisation of *Salmonella enterica* Isolates of Differing Antimicrobial Resistance Recovered from UK Livestock and Imported Meat Samples Front Microbiol 7:640 doi:10.3389/fmicb.2016.00640
- Cevallos-Almeida M, Houdayer C, Dorenlor V, Eono F, Fablet C, Denis M, Kerouanton A (2018a) Dynamic of *Salmonella* seroconversion of pigs from birth to slaughterhouse Submit to Veterinary Record Open
- Cevallos-Almeida M, Houdayer C, Rose V, Bailly Y, Paboeuf F, Fablet C, Denis M, Kerouanton A (2018b) Colonization dynamics and serology of pigs experimentally infected with a monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium In revision for Foodborne Pathog Dis
- Chakravorty D, Hansen-Wester I, Hensel M (2002) *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates J Exp Med 195:1155-1166
- Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G (1991) Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers J Exp Med 173:869-879
- Chaudhuri RR, Morgan E, Peters SE, Pleasance SJ, Hudson DL, Davies HM, Wang J, van Diemen PM, Buckley AM, Bowen AJ, Pullinger GD, Turner DJ, Langridge GC, Turner AK, Parkhill

- J, Charles IG, Maskell DJ, Stevens MP (2013) Comprehensive assignment of roles for *Salmonella* Typhimurium genes in intestinal colonization of food-producing animals *PLoS Genet* 9:e1003456 doi:10.1371/journal.pgen.1003456
- Chen HM, Wang Y, Su LH, Chiu CH (2013) Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy *Pediatr Neonatol* 54:147-152 doi:10.1016/j.pedneo.2013.01.010
- Chen Y, Glass K, Liu B, Hope K, Kirk M (2016) *Salmonella* Infection in Middle-Aged and Older Adults: Incidence and Risk Factors from the 45 and Up Study *Foodborne Pathog Dis* 13:689-694 doi:10.1089/fpd.2016.2170
- Chessa D, Dorsey CW, Winter M, Baumler AJ (2008) Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics *J Biol Chem* 283:8118-8124 doi:10.1074/jbc.M710095200
- Chessa D, Winter MG, Jakomin M, Baumler AJ (2009) *Salmonella* enterica serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal alpha(1,2)fucose residues in the cecal mucosa *Mol Microbiol* 71:864-875 doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06566.x
- Chilcott GS, Hughes KT (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium and *Escherichia coli* *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 64:694-708
- CNR-ESS (2017) Rapport d'activité annuel Année d'exercice 2016. Institut Pasteur, Paris,
- Collinson SK, Liu SL, Clouthier SC, Banser PA, Doran JL, Sanderson KE, Kay WW (1996) The location of four fimbrin-encoding genes, agfA, fimA, sefA and sefD, on the *Salmonella* enteritidis and/or *S. typhimurium* XbaI-BlnI genomic restriction maps *Gene* 169:75-80
- Constable P, Hinchcliff K, Done S, Gruenberg W (2016) *Veterinary Medicine - E-BOOK: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. In: Sciences EH (ed)
- Cooke FJ, Day M, Wain J, Ward LR, Threlfall EJ (2007) Cases of typhoid fever imported into England, Scotland and Wales (2000-2003) *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101:398-404 doi:10.1016/j.trstmh.2006.07.005
- Corregé I, Minvielle B Enjeux et stratégies de maîtrise de *Salmonella* dans la filière porcine : une analyse prospective. In, Paris, France, 2013.
- Crayford G, Coombes JL, Humphrey TJ, Wigley P (2014) Monophasic expression of FliC by *Salmonella* 4,[5],12:i:- DT193 does not alter its pathogenicity during infection of porcine intestinal epithelial cells *Microbiology* 160:2507-2516 doi:10.1099/mic.0.081349-0
- Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S (1973) Molecular relationships among the *Salmonelleae* *J Bacteriol* 115:307-315
- Crump JA, Mintz ED (2010) Global trends in typhoid and paratyphoid Fever *Clin Infect Dis* 50:241-246 doi:10.1086/649541
- Crump JA, Sjolund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM (2015) Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections *Clin Microbiol Rev* 28:901-937 doi:10.1128/CMR.00002-15
- Cummings LA, Deatherage BL, Cookson BT (2009) Adaptive Immune Responses during *Salmonella* Infection *EcoSal Plus* 3 doi:10.1128/ecosalplus.8.8.11
- Cunningham AF, Gaspal F, Serre K, Mohr E, Henderson IR, Scott-Tucker A, Kenny SM, Khan M, Toellner KM, Lane PJ, MacLennan IC (2007) *Salmonella* induces a switched antibody response without germinal centers that impedes the extracellular spread of infection *J Immunol* 178:6200-6207
- Danan C, Agbessi A, Cabassut G, Moury F, Guyot M, Talleu L, Salah S, Chemaly M (2012) Surveillance des salmonelles isolées de la chaîne alimentaire en France. <http://bulletinepidemiologique.mag.anses.fr/sites/default/files/BEP-mg-BE50-art10.pdf>.
- Darwin KH, Miller VL (1999) Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa *Clin Microbiol Rev* 12:405-428
- David JM, Sanders P, Bemrah N, Granier SA, Denis M, Weill FX, Guillemot D, Watier L (2013) Attribution of the French human Salmonellosis cases to the main food-sources according to the type of surveillance data *Prev Vet Med* 110:12-27 doi:10.1016/j.prevetmed.2013.02.002

- Davies PR, Scott Hurd H, Funk JA, Fedorka-Cray PJ, Jones FT (2004) The role of contaminated feed in the epidemiology and control of *Salmonella enterica* in pork production *Foodborne Pathog Dis* 1:202-215 doi:10.1089/fpd.2004.1.202
- Davies RH, Wray C Distribution of *Salmonella* on 23 pig farms in the UK. In: 2nd International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Copenhagen, Denmark, 20–22 August 1997 1997. pp pp. 137–141.
- Davis MA, Hancock DD, Rice DH, Call DR, DiGiacomo R, Samadpour M, Besser TE (2003) Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure to *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* *Vet Microbiol* 95:199-210
- de Jong HK, Parry CM, van der Poll T, Wiersinga WJ (2012) Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis *PLoS Pathog* 8:e1002933 doi:10.1371/journal.ppat.1002933
- de la Torre E, Zapata D, Tello M, Mejia W, Frias N, Garcia Pena FJ, Mateu EM, Torre E (2003) Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype typhimurium DT U302 *J Clin Microbiol* 41:2395-2400
- Delhalle L, De Sadeleer L, Bollaerts K, Farnir F, Saegerman C, Korsak N, Dewulf J, De Zutter L, Daube G (2008) Risk factors for *Salmonella* and hygiene indicators in the 10 largest Belgian pig slaughterhouses *J Food Prot* 71:1320-1329
- Denis M, Houard E, Fablet A, Rouxel S, Salvat G (2013) Distribution of serotypes and genotypes of *Salmonella enterica* species in French pig production *Vet Rec* 173:370 doi:10.1136/vr.101901
- Dimovski K, Cao H, Wijburg OL, Strugnell RA, Mantena RK, Whipp M, Hogg G, Holt KE (2014) Analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium variable-number tandem-repeat data for public health investigation based on measured mutation rates and whole-genome sequence comparisons *J Bacteriol* 196:3036-3044 doi:10.1128/JB.01820-14
- Dohoo IR, Martin W, Sthryn H (2003) *Veterinary Epidemiologic Research*. Prince Edward Island, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island Charlottetown,
- Dorsey CW, Laarakker MC, Humphries AD, Weening EH, Baumler AJ (2005) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin *Mol Microbiol* 57:196-211 doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04666.x
- Dyall-Smith ML, Liu Y, Billman-Jacobe H (2017) Genome Sequence of an Australian Monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium Isolate (TW-Stm6) Carrying a Large Plasmid with Multiple Antimicrobial Resistance Genes *Genome announcements* 5 doi:10.1128/genomeA.00793-17
- Ebuchi S, Baba A, Uryu K, Hiwaki H (2006) Two outbreaks caused by *Salmonella* Derby and *S. Anatum* at grilled-meat restaurants in Fukuoka city *Jpn J Infect Dis* 59:405-406
- Echeita MA, Herrera S, Usera MA (2001) Atypical, fljB-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium *J Clin Microbiol* 39:2981-2983 doi:10.1128/JCM.39.8.2981-2983.2001
- EFSA (2014) Les zoonoses expliquées par l'EFSA: *Salmonella*
- EFSA, ECDC (2008) Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, Part A *The EFSA Journal* 135:111
- EFSA, ECDC (2009) Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 20081 Part A: *Salmonella* prevalence estimates *The EFSA Journal*:288 doi:doi:10.2903.1377
- EFSA, ECDC (2010a) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008 *The EFSA Journal* 10(3):442 doi:10.2903
- EFSA, ECDC (2010b) Quantitative Microbiological Risk Assessment on *Salmonella* in Slaughter and Breeder pigs: Final Report *EFSA Journal*
- EFSA, ECDC (2011) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009 *EFSA Journal* 9:378 doi:doi:10.2903/j.efsa.2011.2090.
- EFSA, ECDC (2012) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *The EFSA Journal* 10:442

- EFSA, ECDC (2016) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015 EFSA Journal 14(12):231 doi:doi:10.2903/j.efsa.2016.4634
- EFSA, ECDC (2017) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2016. EFSA Journal 15(12):228 pp doi:<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>
- Eng SK, Pusparajah P, Ab Mutalib NS, Ser HL, Chan KG, Lee LH (2015) *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance Frontiers in Life Science 8:284-293 doi:10.1080/21553769.2015.1051243
- Evangelopoulou G (2010) A concise history of *Salmonella* spp. nomenclature Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society 61:323-329
- Fablet C (2006) *Salmonella* enterica level in French pig farms effluents: Experimental and field dataB Livestock Science 102:216–225 doi:doi:10.1016/j.livsci.2006.03.020
- Fabre L, Zhang J, Guigon G, Le Hello S, Guibert V, Accou-Demartin M, de Romans S, Lim C, Roux C, Passet V, Diancourt L, Guibourdenche M, Issenhuth-Jeanjean S, Achtman M, Brisse S, Sola C, Weill FX (2012) CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections PLoS One 7:e36995 doi:10.1371/journal.pone.0036995
- PONE-D-12-05416 [pii]
- Fabrega A, Vila J (2013) *Salmonella* enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation Clin Microbiol Rev 26:308-341 doi:10.1128/CMR.00066-12
- Farzan A, Friendship RM, Dewey CE (2007) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests and culture for determining *Salmonella* status of a pig herd Epidemiol Infect 135:238-244 doi:10.1017/S0950268806006868
- Farzan A, Friendship RM, Dewey CE, Poppe C, Funk J (2010) Evaluation of the risk factors for shedding *Salmonella* with or without antimicrobial resistance in swine using multinomial regression method Zoonoses Public Health 57 Suppl 1:85-93 doi:10.1111/j.1863-2378.2010.01357.x
- Farzan A, Friendship RM, Dewey CE, Warriner K, Poppe C, Klotins K (2006) Prevalence of *Salmonella* spp. on Canadian pig farms using liquid or dry-feeding Prev Vet Med 73:241-254 doi:10.1016/j.prevetmed.2005.09.003
- Fedoraka-Cray P, Kelley LC, Stabel TJ, Gray JT, Laufer JA (1995a) Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine Infect Immun 63:2658-2664
- Fedoraka-Cray PJ, Kelley LC, Stabel TJ, Gray JT, Laufer JA (1995b) Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine Infect Immun 63:2658-2664
- Fernandes L, Centeno M, Couto N, Nunes T, Almeida V, Alban L, Pomba C (2016) Longitudinal characterization of monophasic *Salmonella* Typhimurium throughout the pig's life cycle Vet Microbiol 192:231-237 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.07.018>
- Figueiredo R, Card R, Nunes C, AbuOun M, Bagnall MC, Nunez J, Mendonca N, Anjum MF, da Silva GJ (2015) Virulence Characterization of *Salmonella* enterica by a New Microarray: Detection and Evaluation of the Cytolethal Distending Toxin Gene Activity in the Unusual Host *S. Typhimurium* PLoS One 10:e0135010 doi:10.1371/journal.pone.0135010
- Finlay BB, Brumell JH (2000) *Salmonella* interactions with host cells: in vitro to in vivo Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 355:623-631 doi:10.1098/rstb.2000.0603
- Fischbach MA, Lin H, Zhou L, Yu Y, Abergel RJ, Liu DR, Raymond KN, Wanner BL, Strong RK, Walsh CT, Aderem A, Smith KD (2006) The pathogen-associated iroA gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2 Proc Natl Acad Sci U S A 103:16502-16507 doi:10.1073/pnas.0604636103
- Fosse J, Laroche M, Oudot N, Seegers H, Magras C (2011) On-farm multi-contamination of pigs by food-borne bacterial zoonotic hazards: an exploratory study Veterinary microbiology 147:209-213 doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.013
- Foster JW, Hall HK (1991) Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium J Bacteriol 173:5129-5135

- Foster N, Berndt A (2013) Immunity to *Salmonella* in Farm Animals and Murine Models of Disease. In: Barrow P, Methner U (eds) *Salmonella* in Domestic Animals, vol 1. CAB International, UK, pp 136-161
- Francis CL, Ryan TA, Jones BD, Smith SJ, Falkow S (1993) Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria Nature 364:639-642 doi:10.1038/364639a0
- Fredriksson-Ahomaa M, Gerhardt M, Stolle A (2009) High bacterial contamination of pig tonsils at slaughter Meat Sci 83:334-336 doi:10.1016/j.meatsci.2009.06.004
- Friedrich MJ, Kinsey NE, Vila J, Kadner RJ (1993) Nucleotide sequence of a 13.9 kb segment of the 90 kb virulence plasmid of *Salmonella* Typhimurium: the presence of fimbrial biosynthetic genes Mol Microbiol 8:543-558
- Funk J, Wittum TE, LeJeune JT, Rajala-Schultz PJ, Bowman A, Mack A (2007) Evaluation of stocking density and subtherapeutic chlortetracycline on *Salmonella* enterica subsp. enterica shedding in growing swine Vet Microbiol 124:202-208 doi:10.1016/j.vetmic.2007.04.018
- Funk JA, Harris IT, Davies PR (2005) Comparison of fecal culture and Danish Mix-ELISA for determination of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* prevalence in growing swine Vet Microbiol 107:115-126 doi:10.1016/j.vetmic.2005.01.006
- Gal-Mor O, Boyle EC, Grassl GA (2014) Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* enterica serovars differ Front Microbiol 5:391 doi:10.3389/fmicb.2014.00391
- Galan JE (2001) *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work Annu Rev Cell Dev Biol 17:53-86 doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.53
- Galanis E, Lo Fo Wong DM, Patrick ME, Binsztein N, Cieslik A, Chalermchikit T, Aidara-Kane A, Ellis A, Angulo FJ, Wegener HC, World Health Organization Global S-S (2006) Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002 Emerg Infect Dis 12:381-388 doi:10.3201/eid1205.050854
- Gaul SB, Wedel S, Erdman MM, Harris DL, Harris IT, Ferris KE, Hoffman L (2007) Use of pulsed-field gel electrophoresis of conserved XbaI fragments for identification of swine *Salmonella* serotypes J Clin Microbiol 45:472-476 doi:JCM.00962-06 [pii] 10.1128/JCM.00962-06
- GBPH (2009) Guide de bonnes pratiques d'hygiene en élevage de porcs. Les éditions des journaux officiels
- Gebreyes WA, Altier C, Thakur S (2006) Molecular epidemiology and diversity of *Salmonella* serovar Typhimurium in pigs using phenotypic and genotypic approaches Epidemiol Infect 134:187-198 doi:S0950268805004723 [pii] 10.1017/S0950268805004723
- Giovannini A, Prencipe V, Conte A, Marino L, Petrini A, Pomilio F, Rizzi V, Migliorati G (2004) Quantitative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region Food Control 15 139-144 doi:doi:10.1016/S0956-7135(03)00025-2
- Godinez I, Raffatellu M, Chu H, Paixao TA, Haneda T, Santos RL, Bevins CL, Tsolis RM, Baumler AJ (2009) Interleukin-23 orchestrates mucosal responses to *Salmonella* enterica serotype Typhimurium in the intestine Infect Immun 77:387-398 doi:10.1128/IAI.00933-08
- Golab N, Khaki P, Noorbackhsh F (2016) Subtyping of *Salmonella enterica* isolated from humans and food animals using Pulsed-Field-Gel-Electrophoresis Archives of Razi Institute 71:97-102 doi:DOI: 10.22034/ari.2000.106447
- Gossner CM, Van Cauteren D, Le Hello S, Weill FX, Terrien E, Tessier S, Janin C, Brisabois A, Dusch V, Vaillant V, Jourdan-da Silva N (2012) Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011 Euro Surveill 17:1-4
- Gotter V, Klein G, Koesters S, Kreienbrock L, Blaha T, Campe A (2012) Main risk factors for *Salmonella*-infections in pigs in north-western Germany Preventive Veterinary Medicine 106:301-307 doi:10.1016/j.prevetmed.2012.03.016
- Granberg F, Balint A, Belak S (2016) Novel technologies applied to the nucleotide sequencing and comparative sequence analysis of the genomes of infectious agents in veterinary medicine Revue scientifique et technique 35:25-42 doi:10.20506/rst.35.1.2415
- GRAPHAGRI (2016) Productions animales en France. Ministère de l'agriculture et de l'alimentation. <http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Gaf16p148-166.pdf>.

- Gray JT, Fedorka-Cray PJ, Stabel TJ, Ackermann MR (1995) Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella choleraesuis* in swine Vet Microbiol 47:43-59
- Griffin AJ, McSorley SJ (2011) Development of protective immunity to *Salmonella*, a mucosal pathogen with a systemic agenda Mucosal Immunol 4:371-382 doi:10.1038/mi.2011.2
- Grimont PAD, Weill FX (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9ème edn. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Paris, France
- Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I, Tschape H (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution Mol Microbiol 23:1089-1097
- Hald T, Wingstrand A, Swanenburg M, von Altrock A, Thorberg BM (2003) The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses Epidemiol Infect 131:1187-1203
- Hardt WD, Chen LM, Schuebel KE, Bustelo XR, Galan JE (1998) *S. Typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells Cell 93:815-826
- Hardy A (2004) *Salmonella*: a continuing problem Postgrad Med J 80:541-545 doi:10.1136/pgmj.2003.016584
- Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, Kadokura K, Tobe T, Fujimura Y, Kawano S, Yabashi A, Waguri S, Nakato G, Kimura S, Murakami T, Iimura M, Hamura K, Fukuoka S, Lowe AW, Itoh K, Kiyono H, Ohno H (2009) Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response Nature 462:226-230 doi:10.1038/nature08529
- Hauser E, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Blank K, Prager R, Rabsch W, Appel B, Fruth A, Malorny B (2010) Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans Appl Environ Microbiol 76:4601-4610 doi:10.1128/AEM.02991-09
- Hayward MR, AbuOun M, La Ragione RM, Tchorzewska MA, Cooley WA, Everest DJ, Petrovska L, Jansen VA, Woodward MJ (2014) SPI-23 of *S. Derby*: role in adherence and invasion of porcine tissues PLoS One 9:e107857 doi:10.1371/journal.pone.0107857
- Hayward MR, Petrovska L, Jansen VA, Woodward MJ (2016) Population structure and associated phenotypes of *Salmonella enterica* serovars Derby and Mbandaka overlap with host range BMC Microbiol 16:15 doi:10.1186/s12866-016-0628-4
- HCCA (2015) La filière porcine française. Haute conseil de la Coopération Agricole -France. [https://www.hcca.coop/Documents%20partages/Etude%20de%20la%20fili%C3%A8re%20porcine%20\(2015\).pdf](https://www.hcca.coop/Documents%20partages/Etude%20de%20la%20fili%C3%A8re%20porcine%20(2015).pdf).
- Hendriksen RS, Vieira AR, Karlslose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC, Aarestrup FM (2011) Global monitoring of *salmonella* serovar distribution from the world health organization global foodborne infections network country data bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007 Foodborne Pathog Dis 8:887-900 doi:10.1089/fpd.2010.0787
- Hensel M (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2 Mol Microbiol 36:1015-1023
- Hensel M (2004) Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica* Int J Med Microbiol 294:95-102 doi:10.1016/j.ijmm.2004.06.025
- Hensel M, Shea JE, Baumler AJ, Gleeson C, Blattner F, Holden DW (1997) Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12 J Bacteriol 179:1105-1111
- Hoelzer K, Moreno Switt AI, Wiedmann M (2011) Animal contact as a source of human nontyphoidal salmonellosis Vet Res 42:34 doi:10.1186/1297-9716-42-34
- Holzer SU, Schlumberger MC, Jackel D, Hensel M (2009) Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of Type III secretion systems in *Salmonella enterica* Infect Immun 77:5458-5470 doi:10.1128/IAI.00871-09
- Hoorfar J (2011) Rapid Detection, Characterization, and Enumeration of Foodborne Pathogens. American Society of Microbiology,
- Hotes S, Kemper N, Traulsen I, Rave G, Krieter J (2010) Risk factors for *Salmonella* infection in fattening pigs - an evaluation of blood and meat juice samples Zoonoses Public Health 57 Suppl 1:30-38 doi:10.1111/j.1863-2378.2010.01361.x

- Huang TH, Uthe JJ, Bearson SM, Demirkale CY, Nettleton D, Knetter S, Christian C, Ramer-Tait AE, Wannemuehler MJ, Tuggle CK (2011) Distinct peripheral blood RNA responses to *Salmonella* in pigs differing in *Salmonella* shedding levels: intersection of IFNG, TLR and miRNA pathways PLoS One 6:e28768 doi:10.1371/journal.pone.0028768
- Humphries RM, Linscott AJ (2015) Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis Clin Microbiol Rev 28:3-31 doi:10.1128/CMR.00073-14
- Hur J, Lee JH (2010) Immunization of pregnant sows with a novel virulence gene deleted live *Salmonella* vaccine and protection of their suckling piglets against salmonellosis Vet Microbiol 143:270-276 doi:10.1016/j.vetmic.2009.11.034
- Hurd HS, Gailey JK, McKean JD, Rostagno MH (2001) Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment Am J Vet Res 62:1194-1197
- IFIP (2004) La selection porcine collective en France.
- INAPORC (2017) L'elevage du porc en France. http://inaporc.lnet.fr/Sopexa_Inaporc/elevage-porc-en-france.php.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987) Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product J Bacteriol 169:5429-5433
- ISO IOFS (2010) ISO TS 6579-2: 2010 Association Francaise de normalisation
- Ivanek R, Osterberg J, Gautam R, Sternberg Lewerin S (2012) *Salmonella* fecal shedding and immune responses are dose- and serotype- dependent in pigs PLoS One 7:e34660 doi:10.1371/journal.pone.0034660
- Jackson BR, Griffin PM, Cole D, Walsh KA, Chai SJ (2013) Outbreak-associated Salmonella enterica serotypes and food Commodities, United States, 1998-2008 Emerg Infect Dis 19:1239-1244 doi:10.3201/eid1908.121511
- Jensen AN, Dalsgaard A, Stockmarr A, Nielsen EM, Baggesen DL (2006) Survival and transmission of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in an outdoor organic pig farming environment Appl Environ Microbiol 72:1833-1842 doi:10.1128/AEM.72.3.1833-1842.2006
- Junqueira JC (2012) *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives Virulence 3:474-476 doi:10.4161/viru.22493
- Karuppiah V, Collins RF, Thistlethwaite A, Gao Y, Derrick JP (2013) Structure and assembly of an inner membrane platform for initiation of type IV pilus biogenesis Proc Natl Acad Sci U S A 110:E4638-4647 doi:10.1073/pnas.1312313110
- Kerouanton A, Hirchaud E, Rose V, Esnault E, Naquin D, Denis M (2015) First Complete Genome Sequence of a *Salmonella* enterica subsp. enterica Serovar Derby Strain Associated with Pork in France Genome announcements 3 doi:10.1128/genomeA.00853-15
- Kerouanton A, Marault M, Lailler R, Weill FX, Feurer C, Espie E, Brisabois A (2007) Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne *Salmonella* enterica serotype discrimination Foodborne Pathog Dis 4:293-303 doi:10.1089/fpd.2007.0090
- Kerouanton A, Rose V, Even M, Houard E, Denis M Prevalence and genetic diversity of Salmonella in organic and conventional pig productions in France. In: International Symposium of Salmonella I3S, Saint-Malo, 2013a. pp 279-280
- Kerouanton A, Rose V, Weill FX, Granier SA, Denis M (2013b) Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* enterica serotype derby isolated from pigs, pork, and humans in France Foodborne Pathog Dis 10:977-984 doi:10.1089/fpd.2013.1537
- Kidgell C, Reichard U, Wain J, Linz B, Torpdahl M, Dougan G, Achtman M (2002) *Salmonella* Typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old Infect Genet Evol 2:39-45
- Knetter SM, Bearson SM, Huang TH, Kurkiewicz D, Schroyen M, Nettleton D, Berman D, Cohen V, Lunney JK, Ramer-Tait AE, Wannemuehler MJ, Tuggle CK (2015) *Salmonella* enterica serovar Typhimurium-infected pigs with different shedding levels exhibit distinct clinical, peripheral cytokine and transcriptomic immune response phenotypes Innate Immun 21:227-241 doi:10.1177/1753425914525812

- Knodler LA, Celli J, Hardt WD, Vallance BA, Yip C, Finlay BB (2002) *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems *Mol Microbiol* 43:1089-1103
- Koskiniemi S, Gibbons HS, Sandegren L, Anwar N, Ouellette G, Broomall S, Karavis M, McGregor P, Liem A, Fochler E, McNew L, Rosenzweig CN, Rhen M, Skowronski EW, Andersson DI (2013) Pathoadaptive mutations in *Salmonella enterica* isolated after serial passage in mice *PLoS One* 8:e70147 doi:10.1371/journal.pone.0070147
- Kranker S, Alban L, Boes J, Dahl J (2003) Longitudinal study of *Salmonella enterica* aerotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds *Journal of clinical microbiology* 41:2282-2288
- Kukkonen M, Raunio T, Virkola R, Lahteenmaki K, Makela PH, Klemm P, Clegg S, Korhonen TK (1993) Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type I fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin *Mol Microbiol* 7:229-237
- Kurstak E, Vega, E. (1967) Infection bactérienne à *Salmonella* Typhimurium chez un invertébré, *Galleria mellonella* L. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/m68-039>.
- Kyrova K, Stepanova H, Rychlik I, Polansky O, Leva L, Sekelova Z, Faldyna M, Volf J (2014) The response of porcine monocyte derived macrophages and dendritic cells to *Salmonella* Typhimurium and lipopolysaccharide *BMC Vet Res* 10:244 doi:10.1186/s12917-014-0244-1
- Lailler M, Grout J, Marault M, Oudart C, Moury F, Brisabois A (2013) Methode de confirmation moléculaire des souches de *Salmonella* variants monophasiques et immobiles du sérovar Typhimurium Euroreference, cahier de la Référence No 11
- Lalmanach AC, Lantier F (1999) Host cytokine response and resistance to *Salmonella* infection *Microbes Infect* 1:719-726
- Lanzas C, Lu Z, Grohn YT (2011) Mathematical modeling of the transmission and control of foodborne pathogens and antimicrobial resistance at preharvest *Foodborne Pathog Dis* 8:1-10 doi:10.1089/fpd.2010.0643
- Laorden L, Herrera-Leon S, Martinez I, Sanchez A, Kromidas L, Bikandi J, Rementeria A, Echeita A, Garaizar J (2010) Genetic evolution of the Spanish multidrug-resistant *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- monophasic variant *J Clin Microbiol* 48:4563-4566 doi:10.1128/JCM.00337-10
- Larsson JT, Torpdahl M, Petersen RF, Sorensen G, Lindstedt BA, Nielsen EM (2009) Development of a new nomenclature for *Salmonella* Typhimurium multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) *Euro Surveill* 14:1-5
- Le Minor L, Popoff MY (1987) Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., norn. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella* *Int J Syst Bacteriol* 37:465-468
- Leblanc-Maridor M, Denis M, Chidaine B, Rossero A, Seegers H, Beaudeau F, Belloc C (2011) Genetic instability of *Campylobacter coli* in the digestive tract of experimentally infected pigs *Vet Microbiol* 154:171-179 doi:10.1016/j.vetmic.2011.07.002
- Leclerc V, Moury F, Noel V, Berta-Vanrullen I, Cadels-Six S, Lailler M (2016) Le réseau *Salmonella*, un dispositif de surveillance des salmonelles sur la chaîne alimentaire: bilan 2015. *Bulletin épidémiologique, santé animales et alimentation vol 77. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*
- Lee KM, Runyon M, Herrman T, Phillips R, Hsieh J (2015) Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety *Food control* 47:264-276 doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>
- Letellier A, Messier S, Lessard L, Chenier S, Quessy S (2001) Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine *Can J Vet Res* 65:168-172
- Lindstedt BA, Heir E, Gjernes E, Kapperud G (2003) DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci *J Clin Microbiol* 41:1469-1479
- Litrup E, Torpdahl M, Malorny B, Huehn S, Christensen H, Nielsen EM (2010) Association between phylogeny, virulence potential and serovars of *Salmonella enterica* *Infect Genet Evol* 10:1132-1139 doi:10.1016/j.meegid.2010.07.015
- Liu JZ, Pezeshki M, Raffatellu M (2009) Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: dichotomies of help and harm *Cytokine* 48:156-160 doi:10.1016/j.cyto.2009.07.005

- Lo Fo Wong DM, Dahl J, Stege H, van der Wolf PJ, Leontides L, von Altrock A, Thorberg BM (2004) Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds Preventive Veterinary Medicine 62:253-266 doi:10.1016/j.prevetmed.2004.01.001
- López F, Pescaretti M, Morero R, Delgado MA (2012) *Salmonella* Typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath? Food Research International 45:842-851 doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.009>
- Lovell MA, Barrow PA (1999) Intestinal colonisation of gnotobiotic pigs by *Salmonella* organisms: interaction between isogenic and unrelated strains Journal of Medical Microbiology 48:907-916 doi:10.1099/00222615-48-10-907
- Loynachan AT, Harris DL (2005) Dose determination for acute *Salmonella* infection in pigs Appl Environ Microbiol 71:2753-2755 doi:10.1128/AEM.71.5.2753-2755.2005
- Loynachan AT, Nugent JM, Erdman MM, Harris DL (2004) Acute infection of swine by various *Salmonella* serovars J Food Prot 67:1484-1488
- Lynch H, Arguello H, Walia K, Lawlor PG, Duffy G, Gardiner GE, Leonard FC (2017) Evaluation of an Alternative Experimental Infection Method, Which Closely Mimics the Natural Route of Transmission of Monophasic *Salmonella* Typhimurium in Pigs Foodborne Pathog Dis 14:23-28 doi:10.1089/fpd.2016.2193
- MacKenzie KD, Palmer MB, Koster WL, White AP (2017) Examining the Link between Biofilm Formation and the Ability of Pathogenic *Salmonella* Strains to Colonize Multiple Host Species Front Vet Sci 4:138 doi:10.3389/fvets.2017.00138
- Mainar-Jaime RC, Atashparvar N, Chirino-Trejo M (2008) Estimation of the diagnostic accuracy of the invA-gene-based PCR technique and a bacteriological culture for the detection of *Salmonella* spp. in caecal content from slaughtered pigs using Bayesian analysis Zoonoses Public Health 55:112-118 doi:10.1111/j.1863-2378.2007.01096.x
- Mainar-Jaime RC, Casanova-Higes A, Andres-Barranco S, Vico JP (2017) Looking for new approaches for the use of serology in the context of control programmes against pig salmonellosis Zoonoses Public Health:1-7 doi:10.1111/zph.12432
- Malorny B, Lofstrom C, Wagner M, Kramer N, Hoorfar J (2008) Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment Appl Environ Microbiol 74:1299-1304 doi:10.1128/AEM.02489-07
- Mannion C, Lynch PB, Egan J, Leonard FC (2007) Seasonal effects on the survival characteristics of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby in pig slurry during storage J Appl Microbiol 103:1386-1392 doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03384.x
- Marineli F, Tsoucalas G, Karamanou M, Androustos G (2013) Mary Mallon (1869-1938) and the history of typhoid fever Ann Gastroenterol 26:132-134
- Marshall JM, Gunn JS (2015) The O-Antigen Capsule of *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium Facilitates Serum Resistance and Surface Expression of FliC Infect Immun 83:3946-3959 doi:10.1128/IAI.00634-15
- Mastroeni P (2002) Immunity to systemic *Salmonella* infections Curr Mol Med 2:393-406
- Mastroeni P, Clare S, Khan S, Harrison JA, Hormaeche CE, Okamura H, Kurimoto M, Dougan G (1999) Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent *Salmonella* Typhimurium Infect Immun 67:478-483
- Matiasovic J, Stepanova H, Kudlackova H, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I, Chlebova K, Leva L, Osvaldova A, Gebauer J, Faldyna M (2014) Immune response of pigs to *Salmonella enterica* serovar Derby and Typhimurium infections Veterinary Microbiology 170:284-290 doi:10.1016/j.vetmic.2014.02.003
- Maxam AM, Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA Proc Natl Acad Sci U S A 74:560-564
- McChesney DG, Kaplan G, Gardner P (1995) FDA survey determines *Salmonella* contamination. Feedstuffs 7:20-23
- McClelland M, Sanderson KE, Clifton SW, Latreille P, Porwollik S, Sabo A, Meyer R, Bieri T, Ozersky P, McLellan M, Harkins CR, Wang C, Nguyen C, Berghoff A, Elliott G, Kohlberg S, Strong C, Du F, Carter J, Kremizki C, Layman D, Leonard S, Sun H, Fulton L, Nash W, Miner T, Minx P, Delehaunty K, Fronick C, Magrini V, Nhan M, Warren W, Florea L, Spieth J, Wilson RK (2004) Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-

- restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid Nat Genet 36:1268-1274 doi:10.1038/ng1470
- McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, Hou S, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R, Wilson RK (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 Nature 413:852-856 doi:10.1038/35101614
- McQuiston JR, Waters RJ, Dinsmore BA, Mikoleit ML, Fields PI (2011) Molecular determination of H antigens of *Salmonella* by use of a microsphere-based liquid array J Clin Microbiol 49:565-573 doi:10.1128/JCM.01323-10
- McWhorter AR, Davos D, Chousalkar KK (2015) Pathogenicity of *Salmonella* strains isolated from egg shells and the layer farm environment in australia Appl Environ Microbiol 81:405-414 doi:10.1128/AEM.02931-14
- Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity Nat Rev Immunol 1:135-145 doi:10.1038/35100529
- Meemken D, Tangemann AH, Meermeier D, Gundlach S, Mischok D, Greiner M, Klein G, Blaha T (2014) Establishment of serological herd profiles for zoonoses and production diseases in pigs by "meat juice multi-serology" Preventive Veterinary Medicine 113:589-598 doi:10.1016/j.prevetmed.2013.12.006
- Meriardi G, Barigazzi G, Bonilauri P, Tittarelli C, Bonci M, D'Incau M, Dottori M (2008) Longitudinal study of *Salmonella* infection in Italian farrow-to-finish swine herds Zoonoses Public Health 55:222-226 doi:10.1111/j.1863-2378.2008.01111.x
- Michiels J, Missotten J, Rasschaert G, Dierick N, Heyndrickx M, De Smet S (2012) Effect of organic acids on *Salmonella* colonization and shedding in weaned piglets in a seeder model J Food Prot 75:1974-1983 doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-210
- Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ (1989) A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence Proc Natl Acad Sci U S A 86:5054-5058
- Mittrucker HW, Kohler A, Kaufmann SH (2002) Characterization of the murine T-lymphocyte response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection Infect Immun 70:199-203
- Moore MM, Feist MD (2007) Real-time PCR method for *Salmonella* spp. targeting the stn gene J Appl Microbiol 102:516-530 doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03079.x
- Mughini-Gras L, Enserink R, Friesema I, Heck M, van Duynhoven Y, van Pelt W (2014) Risk factors for human salmonellosis originating from pigs, cattle, broiler chickens and egg laying hens: a combined case-control and source attribution analysis PLoS One 9:e87933 doi:10.1371/journal.pone.0087933
- Mughini-Gras L, Franz E, Van Pelt W (2017) New paradigms for *Salmonella* source attribution based on microbial subtyping Food Microbiol doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.002>
- Mukherjee K, Altincicek B, Hain T, Domann E, Vilcinskis A, Chakraborty T (2010) *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis Appl Environ Microbiol 76:310-317 doi:10.1128/AEM.01301-09
- Murugkar HV, Rahman H, Dutta PK (2003) Distribution of virulence genes in *Salmonella* serovars isolated from man & animals Indian J Med Res 117:66-70
- Nakano M, Yamasaki E, Ichinose A, Shimohata T, Takahashi A, Akada JK, Nakamura K, Moss J, Hirayama T, Kurazono H (2012) *Salmonella enterotoxin (Stn)* regulates membrane composition and integrity Dis Model Mech 5:515-521 doi:10.1242/dmm.009324
- Nataro JP, Bopp C, Fields P, J. K., Strockbine N (2011) Escherichia, Shigella, and Salmonella. In: Versalovic J, Carroll ,K., Funke , G., Jorgensen, J., Landry, M., Warnock, D. (ed) Manual of Clinical Microbiology,. 10th Edition. edn. ASM Press, Washington, DC, pp p 603-626. doi: doi: 10.1128/9781555816728.ch35
- Nauciel C, Espinasse-Maes F (1992) Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella Typhimurium* infection Infect Immun 60:450-454
- Nollet N, Houf K, Dewulf J, Duchateau L, De Zutter L, De Kruif A, Maes D (2005) Distribution of *Salmonella* strains in farrow-to-finish pig herds: a longitudinal study Journal of food protection 68:2012-2021

- Nollet N, Maes D, De Zutter L, Duchateau L, Houf K, Huysmans K, Imberechts H, Geers R, de Kruif A, Van Hoof J (2004) Risk factors for the herd-level bacteriologic prevalence of *Salmonella* in Belgian slaughter pigs *Prev Vet Med* 65:63-75 doi:10.1016/j.prevetmed.2004.06.009
- Odumeru J, Leon-Velarde C (2012) *Salmonella* Detection Methods for Food and Food Ingredients. In: Mahmoud B (ed) *Salmonella-A Dangerous Pathogen*. In Tech,
- Ohno H, Kanaya T, Williams IR (2012) M cell differentiation: distinct lineage or phenotypic transition? *Salmonella* provides answers *Cell Host Microbe* 12:607-609 doi:10.1016/j.chom.2012.11.003
- OIE WOAH (2008) Salmonellosis. OIE. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.09.09_SALMONE_LLOSIS.pdf.
- Okamura N, Spitznagel JK (1982) Outer membrane mutants of *Salmonella* Typhimurium LT2 have lipopolysaccharide-dependent resistance to the bactericidal activity of anaerobic human neutrophils *Infect Immun* 36:1086-1095
- Olsen JE, Brown DJ, Baggesen DL, Bisgaard M (1992) Biochemical and molecular characterization of *Salmonella* enterica serovar Berta, and comparison of methods for typing *Epidemiol Infect* 108:243-260
- Osterberg J, Lewerin SS, Wallgren P (2009) Patterns of excretion and antibody responses of pigs inoculated with *Salmonella* Derby and *Salmonella* Cubana *Vet Rec* 165:404-408 doi:10.1186/1751-0147-14-404 [pii]
- Osterberg J, Lewerin SS, Wallgren P (2010) Direct and indirect transmission of four *Salmonella* enterica serotypes in pigs *Acta Vet Scand* 52:1-7 doi:10.1186/1751-0147-52-30 [pii] 10.1186/1751-0147-52-30
- Osterberg J, Wallgren P (2008) Effects of a challenge dose of *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Yoruba on the patterns of excretion and antibody responses of pigs *Vet Rec* 162:580-586
- Ouellette AJ (2006) Paneth cell alpha-defensin synthesis and function *Curr Top Microbiol Immunol* 306:1-25
- Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y (2008) The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation *Immunity* 28:454-467 doi:10.1016/j.immuni.2008.03.004
- Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Pickard D, Wain J, Churcher C, Mungall KL, Bentley SD, Holden MT, Sebaihia M, Baker S, Basham D, Brooks K, Chillingworth T, Connor P, Cronin A, Davis P, Davies RM, Dowd L, White N, Farrar J, Feltwell T, Hamlin N, Haque A, Hien TT, Holroyd S, Jagels K, Krogh A, Larsen TS, Leather S, Moule S, O'Gaora P, Parry C, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG (2001) Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella* enterica serovar Typhi CT18 *Nature* 413:848-852 doi:10.1038/35101607
- Peckham CF, Savage WG (1923) An Outbreak of Pork Pie Poisoning at Derby *J Hyg (Lond)* 22:69-76
- Perna NT, Plunkett G, 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Posfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dimalanta ET, Potamousis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 *Nature* 409:529-533 doi:10.1038/35054089
- Petrovska L, Mather AE, AbuOun M, Branchu P, Harris SR, Connor T, Hopkins KL, Underwood A, Lettini AA, Page A, Bagnall M, Wain J, Parkhill J, Dougan G, Davies R, Kingsley RA (2016) Microevolution of Monophasic *Salmonella* Typhimurium during Epidemic, United Kingdom, 2005-2010 *Emerg Infect Dis* 22:617-624 doi:10.3201/eid2204.150531
- Popoff MY (2001) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. World Health Organisation Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella* Institut Pasteur France,
- Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL (2003) Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann-White scheme *Res Microbiol* 154:173-174 doi:10.1016/S0923-2508(03)00025-1
- Pui CF, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Jeyaletchumi P, Noor Hidayah MS, Ubong A, Farinazleen MG, Cheah YK, Son R (2011) *Salmonella*: A foodborne pathogen *International Food Research Journal* 18:465-473
- Raetz CR, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins *Annu Rev Biochem* 71:635-700 doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414

- Raguenaud ME, Le Hello S, Salah S, Weill FX, Brisabois A, Delmas G, Germonneau P (2012) Epidemiological and microbiological investigation of a large outbreak of monophasic *Salmonella* Typhimurium 4,5,12:i:- in schools associated with imported beef in Poitiers, France, October 2010 Euro Surveill 17:1-7
- Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D (2012) The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis J Vis Exp:e4392 doi:10.3791/4392
- Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M (2015) The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications Biochimie 117:119-128 doi:10.1016/j.biochi.2015.03.025
- Ren J, Sang Y, Qin R, Cui Z, Yao YF (2017) 6S RNA is involved in acid resistance and invasion of epithelial cells in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Future Microbiol 12:1045-1057 doi:10.2217/fmb-2017-0055
- Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet Foodborne Pathog Dis 3:59-67 doi:10.1089/fpd.2006.3.59
- Ridley AM, Threlfall EJ, Rowe B (1998) Genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis J Clin Microbiol 36:2314-2321
- Robbins JD, Robbins JB (1984) Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of *Salmonella* Typhi J Infect Dis 150:436-449
- Robinault C, Houdayer C, Rouxel S, Labbé A, Tircot A, Denis M, Fravallo P (2008) Estimation de la prévalence de la contamination par *Salmonella* spp des porcs charcutiers français à l'abattoir. JPR, Paris
- Roguet C, Perrot C, Gallot S, Rieu M Les types d'exploitations agricoles ayant des porcs en France en 2010 : identification, caractéristiques et évolution. In: Journées de la Recherche Porcine, Paris, 2014, pp 229-234
- Romling U, Bian Z, Hammar M, Sierralta WD, Normark S (1998) Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation J Bacteriol 180:722-731
- Rostagno MH, Callaway TR (2012) Pre-harvest risk factors for *Salmonella enterica* in pork production Food Research International 45:634-640
- Rostagno MH, Hurd HS, McKean JD, Ziemer CJ, Gailey JK, Leite RC (2003a) Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica* Appl Environ Microbiol 69:4489-4494
- Rostagno MH, Hurd HS, McKean JD, Ziemer CJ, Gailey JK, Leite RC (2003b) Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica* Appl Environ Microbiol 69:4489-4494
- Rotger R, Casadesus J (1999) The virulence plasmids of *Salmonella* International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology 2:177-184
- Royer E, Alibert L, Feurer C, Corregé I Enquête sur la contamination en *Salmonella* des aliments fabriqués à la ferme et les facteurs de risque associés. In: Journées Recherche Porcine, Paris, 2014, pp 175-176.
- Ruggeri J, Pesciaroli M, Foresti F, Giacomini E, Lazzaro M, Ossiprandi MC, Corradi A, Lombardi G, Pasquali P, Alborali GL (2015) Inactivated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant (S. Typhimurium 1,4,[5],12:i-) in sows is effective to control infection in piglets under field condition Vet Microbiol 180:82-89 doi:10.1016/j.vetmic.2015.07.029
- Ruppitsch W (2016) Molecular typing of bacteria for epidemiological surveillance and outbreak investigation. Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment 67:199-224
- Ryan MP, O'Dwyer J, Adley CC (2017) Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella* Biomed Res Int 2017:3782182 doi:10.1155/2017/3782182
- Salazar-Gonzalez RM, Srinivasan A, Griffin A, Muralimohan G, Ertelt JM, Ravindran R, Vella AT, McSorley SJ (2007) *Salmonella* flagellin induces bystander activation of splenic dendritic cells and hinders bacterial replication in vivo J Immunol 179:6169-6175

- Sanchez-Vargas FM, Abu-El-Haija MA, Gomez-Duarte OG (2011) *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention Travel Med Infect Dis 9:263-277 doi:10.1016/j.tmaid.2011.11.001
- Sanders E, Sweeney FJ, Jr., Friedman EA, Boring JR, Randall EL, Polk LD (1963) An Outbreak of Hospital-Associated Infections Due to *Salmonella* Derby JAMA 186:984-986
- Sanger F, Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase J Mol Biol 94:441-448
- Schbath S, Martin V, Zytynicki M, Fayolle J, Loux V, Gibrat JF (2012) Mapping reads on a genomic sequence: an algorithmic overview and a practical comparative analysis J Comput Biol 19:796-813 doi:10.1089/cmb.2012.0022
- Schmidt H, Hensel M (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis Clin Microbiol Rev 17:14-56
- Schnaitman CA, Klena JD (1993) Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria Microbiol Rev 57:655-682
- Schultz M (2008) Theobald Smith Emerg Infect Dis 14:1490-1492 doi:10.3201/eid1412.081188
- Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis Cell 37:67-75
- Silverman M, Zieg J, Hilmen M, Simon M (1979) Phase variation in *Salmonella*: genetic analysis of a recombinational switch Proc Natl Acad Sci U S A 76:391-395
- Singh V (2013) *Salmonella* serovars and their host specificity Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry 1:1-3 doi:10.15744/2348-9790.1.301
- Soyer Y, Moreno Switt A, Davis MA, Maurer J, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ, Dumas NB, Root T, Warnick LD, Grohn YT, Wiedmann M (2009a) *Salmonella* enterica serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones J Clin Microbiol 47:3546-3556 doi:10.1128/JCM.00546-09
- Soyer Y, Orsi RH, Rodriguez-Rivera LD, Sun Q, Wiedmann M (2009b) Genome wide evolutionary analyses reveal serotype specific patterns of positive selection in selected *Salmonella* serotypes BMC Evol Biol 9:264 doi:10.1186/1471-2148-9-264
- Srinivasan A, Salazar-Gonzalez RM, Jarcho M, Sandau MM, Lefrancois L, McSorley SJ (2007) Innate immune activation of CD4 T cells in *Salmonella*-infected mice is dependent on IL-18 J Immunol 178:6342-6349
- Stevens MP, Gray JT (2013) *Salmonella* Infections in Pigs vol 1, Ed.2 edn. CAB International, UK
- Stevens MP, Humphrey TJ, Maskell DJ (2009) Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364:2709-2723 doi:10.1098/rstb.2009.0094
- Suez J, Porwollik S, Dagan A, Marzel A, Schorr YI, Desai PT, Agmon V, McClelland M, Rahav G, Gal-Mor O (2013) Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans PLoS One 8:e58449 doi:10.1371/journal.pone.0058449
- Swanenburg M, Berends BR, Urlings HA, Snijders JM, van Knapen F (2001) Epidemiological investigations into the sources of *Salmonella* contamination of pork Berl Munch Tierarztl Wochenschr 114:356-359
- Switt A, Soyer Y, Warnick L, Wiedmann M (2009a) Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i Foodborne Pathog Dis 6:407-415 doi:10.1089/fpd.2008.0213
- Switt AI, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M (2009b) Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i Foodborne Pathog Dis 6:407-415 doi:10.1089/fpd.2008.0213
- Takeuchi A (1967) Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella* Typhimurium The American journal of pathology 50:109-136
- Tessier C (2015) Risques associés à *Salmonella* spp. dans la filiere porcine: l'exemple de l'Ile de la Reunion., Université de la Reunion

- Tessier C, Parama Atiana L, Lagadec E, Le Minter G, Denis M, Cardinale E (2016) Wild fauna as a carrier of *Salmonella* in Reunion Island: Impact on pig farms Acta Trop 158:6-12 doi:10.1016/j.actatropica.2016.01.027
- Tindall BJ, Grimont PA, Garrity GM, Euzeby JP (2005) Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella* Int J Syst Evol Microbiol 55:521-524 doi:10.1099/ijs.0.63580-0
- Tizard I (2013) Veterinary Immunology vol 1. Ninth edn. Elsevier,
- Tsai CJ, Loh JM, Proft T (2016) *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing Virulence 7:214-229 doi:10.1080/21505594.2015.1135289
- Uribe JH, Collado-Romero M, Zaldivar-Lopez S, Arce C, Bautista R, Carvajal A, Cirera S, Claros MG, Garrido JJ (2016) Transcriptional analysis of porcine intestinal mucosa infected with *Salmonella* Typhimurium revealed a massive inflammatory response and disruption of bile acid absorption in ileum Vet Res 47:1-10 doi:10.1186/s13567-015-0286-9
- USDA (2013) Cost Estimates of Foodborne Illnesses. Economic Research Service
- Uthe JJ, Qu L, Couture O, Bearson SM, O'Connor AM, McKean JD, Torres YR, Dekkers JC, Nettleton D, Tuggle CK (2011) Use of bioinformatic SNP predictions in differentially expressed genes to find SNPs associated with *Salmonella* colonization in swine J Anim Breed Genet 128:354-365 doi:10.1111/j.1439-0388.2011.00935.x
- Uthe JJ, Royae A, Lunney JK, Stabel TJ, Zhao SH, Tuggle CK, Bearson SM (2007) Porcine differential gene expression in response to *Salmonella enterica* serovars Choleraesuis and Typhimurium Molecular immunology 44:2900-2914 doi:10.1016/j.molimm.2007.01.016
- Uthe JJ, Wang Y, Qu L, Nettleton D, Tuggle CK, Bearson SM (2009) Correlating blood immune parameters and a CCT7 genetic variant with the shedding of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in swine Vet Microbiol 135:384-388 doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.074
- Vagene AJ, Herbig A, Campana MG, Robles Garcia NM, Warinner C, Sabin S, Spyrou MA, Andrades Valtuena A, Huson D, Tuross N, Bos KI, Krause J (2018) *Salmonella enterica* genomes from victims of a major sixteenth-century epidemic in Mexico Nat Ecol Evol doi:10.1038/s41559-017-0446-6
- van Asten AJ, van Dijk JE (2005) Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp FEMS Immunol Med Microbiol 44:251-259 doi:10.1016/j.femsim.2005.02.002
- Van Cauteren D, De Valk H, Sommen C, King LA, Jourdan-Da Silva N, Weill FX, Le Hello S, Megraud F, Vaillant V, Desenclos JC (2015) Community Incidence of Campylobacteriosis and Nontyphoidal Salmonellosis, France, 2008-2013 Foodborne Pathogens and Disease 12:664-669 doi:10.1089/fpd.2015.1964
- Van Cauteren D, Le Strat Y, Sommen C, Bruyand M, Tourdjman M, Da Silva NJ, Couturier E, Fournet N, de Valk H, Desenclos JC (2017) Estimated Annual Numbers of Foodborne Pathogen-Associated Illnesses, Hospitalizations, and Deaths, France, 2008-2013 Emerg Infect Dis 23:1486-1492 doi:10.3201/eid2309.170081
- Van Damme I, Mattheus W, Bertrand S, De Zutter L (2018) Quantification of hygiene indicators and *Salmonella* in the tonsils, oral cavity and rectal content samples of pigs during slaughter Food Microbiol 71:120-128 doi:10.1016/j.fm.2017.03.012
- Van Parys A, Boyen F, Leyman B, Verbrugghe E, Haesebrouck F, Pasmans F (2011) Tissue-specific *Salmonella* Typhimurium gene expression during persistence in pigs PLoS One 6:e24120 doi:10.1371/journal.pone.0024120
- Van Parys A, Boyen F, Leyman B, Verbrugghe E, Maes D, Haesebrouck F, Pasmans F (2013) Induction of seroconversion and persistence of *Salmonella* Typhimurium in pigs are strain dependent Comp Immunol Microbiol Infect Dis 36:465-471 doi:10.1016/j.cimid.2013.03.007
- Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks WT, Fang FC (1999) Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes Nature 401:804-808 doi:10.1038/44593
- Verbrugghe E, Boyen F, Van Parys A, Van Deun K, Croubels S, Thompson A, Shearer N, Leyman B, Haesebrouck F, Pasmans F (2011) Stress induced *Salmonella* Typhimurium recrudescence in pigs coincides with cortisol induced increased intracellular proliferation in macrophages Vet Res 42:118 doi:10.1186/1297-9716-42-118

- Vico JP, Mainar-Jaime RC (2011) The use of meat juice or blood serum for the diagnosis of *Salmonella* infection in pigs and its possible implications on *Salmonella* control programs Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 23:528-531 doi:10.1177/1040638711403432
- Vico JPM, R.C (2012) Serological survey of *Salmonella* spp. in infection in finishing pigs from northeastern Spain and associated risk factors Spanish Journal of Agricultural Research 10:372-382 doi:http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2012_102-446-11
- Viegas SC, Mil-Homens D, Fialho AM, Arraiano CM (2013) The virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in the insect model *Galleria mellonella* is impaired by mutations in RNase E and RNase III Appl Environ Microbiol 79:6124-6133 doi:10.1128/AEM.02044-13
- Vieira-Pinto M, Tremudo P, Dominguez L, Fernandez Garayzabal JF, Vela AI, Bernardo F, Lobo C, Oliveira M (2012) Virulence Characterization of *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:-, the New Pandemic Strain. In: Anous B, Gurtler JB (eds) *Salmonella* - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies. doi:DOI: 10.5772/30242
- Vignaud ML, Amirouche M, Cadels-Six S, Jeuge S, Ellouze M, Le Hello S, Lallier R (2016) MLVA Profiles stability of *Salmonella* isolated from dry saussages during production and shelf life In: International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis I3S, Saint Malo France, 6-7-8 june 2016 2016. pp 1-230
- Vignaud ML, Cherchame E, Marault M, Chaing E, Le Hello S, Michel V, Jourdan-Da Silva N, Lallier R, Brisabois A, Cadel-Six S (2017) MLVA for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Dublin: Development of a Method Suitable for Inter-Laboratory Surveillance and Application in the Context of a Raw Milk Cheese Outbreak in France in 2012 Front Microbiol 8:295 doi:10.3389/fmicb.2017.00295
- Vigo GB, Cappuccio JA, Pineyro PE, Salve A, Machuca MA, Quiroga MA, Moredo F, Giacoboni G, Cancer JL, Caffer IG, Binsztein N, Pichel M, Perfumo CJ (2009) *Salmonella enterica* subclinical infection: bacteriological, serological, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial resistance profiles--longitudinal study in a three-site farrow-to-finish farm Foodborne Pathogens and Disease 6:965-972 doi:10.1089/fpd.2008.0239
- Virlogeux-Payant I, Popoff MY (1996) The Vi antigen of *Salmonella* Typhi Bulletin Institut Pasteur 94:237-250
- Vo AT, van Duijkeren E, Fluit AC, Hendriks HG, Tooten PC, Gaastra W (2007) Comparison of the in vitro pathogenicity of two *Salmonella* Typhimurium phage types Comp Immunol Microbiol Infect Dis 30:11-18 doi:10.1016/j.cimid.2006.09.003
- Wagner C, Hensel M (2011) Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica* Adv Exp Med Biol 715:17-34 doi:10.1007/978-94-007-0940-9_2
- Wales AD, McLaren IM, Bedford S, Carrique-Mas JJ, Cook AJ, Davies RH (2009) Longitudinal survey of the occurrence of *Salmonella* in pigs and the environment of nucleus breeder and multiplier pig herds in England Vet Rec 165:648-657 doi:165/22/648 [pii]
- Wang KC, Huang CH, Ding SM, Chen CK, Fang HW, Huang MT, Fang SB (2016) Role of yqiC in the Pathogenicity of *Salmonella* and Innate Immune Responses of Human Intestinal Epithelium Front Microbiol 7:1614 doi:10.3389/fmicb.2016.01614
- Wattiau P, Boland C, Bertrand S (2011) Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives Appl Environ Microbiol 77:7877-7885 doi:10.1128/AEM.05527-11
- Weaver T, Valcanis M, Mercoulia K, Sait M, Tuke J, Kiermeier A, Hogg G, Pointon A, Hamilton D, Billman-Jacobe H (2017) Longitudinal study of *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- shedding in five Australian pig herds Prev Vet Med 136:19-28 doi:10.1016/j.prevetmed.2016.11.010
- WHO (2015) WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases. World Health Organization,
- WHO (2017) *Salmonella* (non-typhoidal). World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. 2017
- Wiedemann A, Virlogeux-Payant I, Chausse AM, Schikora A, Velge P (2014) Interactions of *Salmonella* with animals and plants Front Microbiol 5:791 doi:10.3389/fmicb.2014.00791
- Wong KK, McClelland M, Stillwell LC, Sisk EC, Thurston SJ, Saffer JD (1998) Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella*

- pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 Infect Immun 66:3365-3371
- Wood MW, Jones MA, Watson PR, Hedges S, Wallis TS, Galyov EE (1998) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella enteropathogenicity* Mol Microbiol 29:883-891
- Wuyts V, Mattheus W, De Laminne de Bex G, Wildemauwe C, Roosens NH, Marchal K, De Keersmaecker SC, Bertrand S (2013) MLVA as a tool for public health surveillance of human *Salmonella* Typhimurium: prospective study in Belgium and evaluation of MLVA loci stability PLoS One 8:e84055 doi:10.1371/journal.pone.0084055
- Xu C, Ren X, Feng Z, Fu Y, Hong Y, Shen Z, Zhang L, Liao M, Xu X, Zhang J (2017) Phenotypic Characteristics and Genetic Diversity of *Salmonella enterica* Serotype Derby Isolated from Human Patients and Foods of Animal Origin Foodborne Pathog Dis 14:593-599 doi:10.1089/fpd.2017.2278
- Yue M, Schifferli DM (2014) Allelic variation in *Salmonella*: an underappreciated driver of adaptation and virulence Front Microbiol 4:419 doi:10.3389/fmicb.2013.00419
- Zdybicka-Barabas A, Cytrynska M (2011) Involvement of apolipoprotein III in antibacterial defense of *Galleria mellonella* larvae Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 158:90-98 doi:10.1016/j.cbpb.2010.10.001
- Zeng H, Carlson AQ, Guo Y, Yu Y, Collier-Hyams LS, Madara JL, Gewirtz AT, Neish AS (2003) Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella* J Immunol 171:3668-3674
- Zhu L, Zhao X, Yin Q, Liu X, Chen X, Huang C, Suo X (2017) Mucosal IgA and IFN-gamma(+) CD8 T cell immunity are important in the efficacy of live *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis vaccines Sci Rep 7:46408 doi:10.1038/srep46408

ANNEXES

ANNEXE 1: Liste des publications et communications

• Publications

Cevallos-Almeida M., Fablet, C., Dorenlor V., Eono F., C., Denis M., Kerouanton, A.
Dynamic of *Salmonella* seroconversion of pigs from birth to slaughterhouse.
Soumis à Veterinary Record Open.

Cevallos-Almeida M., Fablet, C., Houdayer C., Rose V., Denis M., Kerouanton A.
Dynamic of excretion and immune response of experimentally infected pigs with
monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium serovar 1,4,[5],12:i:-. *Soumis à
Foodborne Pathogens and Disease, en cours de révision.*

Cevallos-Almeida M., Martin, L., Houdayer C., Rose V., Guillonet J.M., Paboeuf F.,
Denis M., Kerouanton A. Experimental infection of pigs by *Salmonella* Derby,
Typhimurium and its monophasic variant : comparison of colonization and
serology. *A soumettre dans Foodborne Pathogens and Disease.*

Cevallos-Almeida M., Rincé, A., Rincé I., Denis M., Kerouanton A. Virulence
characterization of *Salmonella* Derby, *Salmonella* Typhimurium and its
monophasic variant 1,4[5], 12:i:- isolated from pigs through in vivo Galleria
mellonella model and in vitro Caco-2 assay. *A soumettre dans Plos One.*

• Communications orales

Cevallos-Almeida, M., Fablet., C., Dorenlor V., Eono F., C., Denis M., Kerouanton, A.
“Dynamic of *Salmonella* seroconversion of pigs from birth to slaughterhouse”.
Symposium I3S (International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis), Saint-
Malo, 6, 7, 8 Juin 2016. (cf Résumé Annexe 3)

Cevallos-Almeida M., Fablet, C., Houdayer C., Rose V, Denis M., Kerouanton A.
“Dynamic of excretion and immune response of experimentally infected pigs with
monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium Serovar 1, 4[5], 12: i: -”.
National Symposium on Zoonosis Research 2016, Berlin, 13-14 October 2016. (cf
Résumé Annexe 4)

Cevallos-Almeida M., Fablet, C., Houdayer C., Rose V, Denis M., Kerouanton A.
“Dynamique d’excrétion et réponse immunitaire des porcs infectées
expérimentalement avec *Salmonella* Typhimurium variant monophasique serovar
1,4[5], 12:i:- ”. Journée de Doctorants et Post Doctorants ANSES Maisons Alfort,
6 Octobre 2016.

Cevallos-Almeida M., Fablet, C., Houdayer C., Rose V., Denis M., Kerouanton A.
“Dynamique d’excrétion et réponse immunitaire des porcs infectées
expérimentalement avec *Salmonella* Typhimurium variant monophasique serovar
1,4[5], 12:i:- ”. Journée d’échange en Filière Porcine, ISPAIA, Ploufragan, 6
décembre 2016.

Cevallos-Almeida M., Fablet, C., Houdayer C., Rose V., Denis M., Kerouanton A.
“Dynamic of excretion and immune response of experimentally infected pigs with monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium Serovar 1, 4[5], 12: i: -”. SAFEPORK (International Symposium on the Epidemiology and Control of Biological Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork), Foz de Iguacu, Brésil, 21, 22 and 23 août, 2017 (cf Résumé long Annexe 5)

Kerouanton A., **Cevallos-Almeida M.**, Jacquin, J., Denis M., “Evaluation of the colonizing ability on IPEC-J2 cells and the pathogenicity on Caco-2 cells of the 3 major French pig’ *Salmonella* serovars. SAFEPORK (International Symposium on the Epidemiology and Control of Biological Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork), Foz de Iguacu, Brésil, 21, 22 and 23 août, 2017 (cf Résumé long Annexe 6)

Cevallos-Almeida M., Fablet, C., Houdayer C., Rose V., Denis M., Kerouanton A.
“Dynamique d’excrétion et réponse immunitaire des porcs infectées expérimentalement avec *Salmonella* Typhimurium variant monophasique serovar 1,4[5], 12:i:- ” SPACE, Salon de l’élevage, Rennes, 15 septembre 2017.

https://www.anses.fr/fr/system/files/SPACE2017_CEVALLOS_ALMEIDA.pdf

- **Communication affichée**

Cevallos-Almeida M., Jacquin, J., Denis M., Kerouanton A. “Evaluation in vitro du pouvoir colonisateur et pathogène de 3 serovars de *Salmonella* d’origine porcine». Congrès SFM, Société Française de Microbiologie., Paris, 11,12 et 13 septembre 2017 (Cf Poster Annexe 7).

ANNEXE 2 : Liste des Formations et participation à congrès ou journées d'informations

Formation

1. Diplôme d'Université « Expérimentation Animale- Conception et Réalisation de Procédures Expérimentales », Dispensé par le Laboratoire de Physiopathologie Animale et Pharmacologie Fonctionnelle de l'Ecole Vétérinaire de Nantes ONIRIS, du 7 au 16 Octobre 2015.
2. « Sensibilisation au management qualité », Anses Ploufragan, le 3 et 10 de novembre 2015.
3. « Sensibilisation à la qualité Métrologie », Anses Ploufragan, le 17 de novembre 2015
4. « Initiation au Logiciel R », Anses Ploufragan, le 28 avril 2016.
5. « Les illustrations scientifiques » Université de Rennes 1, le 16 de juin 2016.
6. « Ethique dans la recherche » Université de Rennes 2, le 1 mars 2017.
7. Stage dans le Laboratoire des Risques microbiens, sur pathogénicité sur insectes, Université de Caen (Normandie), du 29/05/2017 au 2/06/2017 et du 19/06/2017 au 23/05/2017.

Congrès ou journée d'information

1. International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis (I3S), 6,7 et 8 juin 2016, Saint Malo, France
2. National Symposium on Zoonoses Research 2016, 13-14 Octobre 2016, Berlin, Allemagne
3. 12th International Symposium on the Epidemiology and Control of Biological Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork (Safepork), 21-24 août 2017, Foz de Iguacu, Brésil.
4. Congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM), 9-10-11 septembre 2017, Paris, France.

Journée d'information

1. Journée des doctorants et Post-doctorants, 19 novembre 2015, Anses, Maison Alfort Paris.
2. Journée *Salmonella* en Filière Porcine, 6 décembre 2016, Ploufragan, France
3. Space, Salon International de l'Elevage, 15 septembre 2017, Rennes

ANNEXE 3 : Résumé de la communication orale présentée au Symposium I3S

I3S, 6, 7 et 8 juin 2016, Saint Malo, France.

Session 2: Ecology and Epidemiology along the food chain

Dynamic of *Salmonella* seroconversion of pigs from birth to slaughterhouse

CEVALLOS Maria ^{1,3}, HOUDAYER Catherine ¹, DORENLOR Virginie ², EONO Florent ², FABLET Christelle ², DENIS Martine ¹, KEROUANTON Annaëlle ¹.

¹ ANSES, Laboratoire de Ploufragan, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, Université Bretagne Loire, BP53, 22440 Ploufragan, France.

² ANSES, Laboratoire de Ploufragan, Unité Epidémiologie et Bien Être porcin, Université Bretagne Loire, BP53, 22440 Ploufragan, France.

³ Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnic. Central University of Ecuador, PO Box 17-03-100 Quito, Ecuador.

Salmonella colonization in pig intestine and subsequent excretion determine a high risk of meat contamination for humans. In France, several studies have determined prevalence of *Salmonella* and distribution of these serotypes and genotypes in pig farms; but very little is known about the dynamic of *Salmonella* infection during the raising period. In order to evaluate the dynamic of the immune response against *Salmonella*, the seroconversion of three fattening pig farms (F3, F5 and F6) were investigated. In each farm, three successive herds (H1, H2 and H3) including each 10 sows and 40 piglets (4 piglets par sow) were sampled. Blood was collected at the farm from sows and piglets at weeks W1, and from pigs at weeks W6, W10, W14, W18, W22 and at slaughterhouse. A total of 2520 serums (280 per herd) were analyzed for the detection of Swine *Salmonella* Antibody using the ELISA Test Kit IDEXX[®]. Pigs with a percentage of OD value greater than or equal to 15% were considered as positive.

At W1, sows exhibited a high level of antibody varying from 30%OD to 55%OD in mean according the herd. There was a strong correlation between this level for the sows and the one of their piglets at W1 (0.84) and W6 (0.78).

Among the 9 herds, pigs in herd F5-H3 stayed always negative (mean < to 15%) including at slaughterhouse. In three herds (F3-H1, F5-H1 and H2), pigs were detected positive only at slaughterhouse. The others herds were detected positive at farm from W18 (F3-H2), or from W14 (F3-H3, F6-H1, H2 and H3).

In two farms (F5 and F6), the seroconversion followed the same pattern in the three successive herds of the farm. In farm F5, the %OD value stayed low and reached only 17.1%, 17.4% and 14.5% in mean at slaughterhouse. In farm F6, the pigs of the 3 herds became all positive from W14. In farm F1, the situation is different; seroconversion appeared earlier progressively as the herds follow; at slaughterhouse, at W18 and W14, for H1, H2 and H3, respectively.

There were correlation for the %OD value between W14 and W18 (0.62), between W18 and W22 (0.60) and between W22 and slaughterhouse (0.69).

This study confirmed that piglets were protected with mother's antibody at maternity. They loosed then their immunity after weaning. The configuration of the different herds was for some of them very similar, with an increase of antibody levels during fattening. However this increase is more or less early indicating that some farm managements could be favorable to infection by *Salmonella*.

ANNEXE 4 : Résumé de la communication orale présentée au Symposium Nationale de Maladies Zoonotiques 2016

13-14 Octobre 2016 Berlin, Allemagne

Session 3: Risk assessment, epidemiology and modelling

Dynamic of excretion and immune response of experimentally infected pigs with monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium serovar 1,4[5],12:i:-

M. Cevallos^{1,4}, C. Houdayer¹, Y. Bailly², F. Paboeuf², C. Fablet³, M. Denis¹, A. Kerouanton¹

¹ANSES, Laboratoire de Ploufragan, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, Université Bretagne Loire, Ploufragan, France; ²ANSES, Laboratoire de Ploufragan, Service de Production de Porcs Assainis et d'Expérimentation, Université Bretagne Loire, Ploufragan, France; ³ANSES, Laboratoire de Ploufragan, Unité Epidémiologie et Bien-être du Porc, Université Bretagne Loire, Ploufragan, France; ⁴Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnic, Central University of Ecuador, Quito, Ecuador

Keywords: monophasic Salmonella Typhimurium, pigs, excretion

In the last years, monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium was highly prevalent in human salmonellosis. This serovar is also one of the most dominant in pigs. We followed the dynamic of excretion and the immune response of pigs infected by this serovar through an experimental trial.

8 SPF piglets of 7 week old were orally inoculated with 10⁸ UFC of a monophasic *S. Typhimurium* strain. Then during 12 weeks, individual feces and blood were collected twice or once a week respectively. At the end of the trial, tonsils, mesenteric ganglions, and content of duodenum, jejunum, ileum and caeca were sampled. *Salmonella* were numerated in UFC/g and Swine *Salmonella* antibodies in serum were dosed in %OD using IDDEX ELISA Kit.

Pigs excreted *Salmonella* just after inoculation and remain positive during all the trial. The level of excretion varied from 1 to 4.4 log₁₀ CFU/g of feces, and fluctuates over time. *Salmonella* was present in all type of samples from autopsies except in ganglions. Tonsils were highly contaminated. *Salmonella* antibodies were present for two pigs within one week and for all pigs 6 weeks after inoculation. No correlation was observed between the quantity of *Salmonella* present in feces and the level of *Salmonella* antibodies.

This study allowed us to see the ability of this serovar to persist a long time in pigs after infection. Although individual carriage was variable, the persistence of the bacteria in the pig group is certainly due to contamination between animals.

ANNEXE 5 : Résumé long de la communication orale présentée au Congrès Safepork

SafePork, 21-24 août 2017, Foz de Iguazu Brésil.



12th International Symposium on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork
Foz do Iguacu - Brazil | August 21-24, 2017

DYNAMIC OF EXCRETION AND IMMUNE RESPONSE OF EXPERIMENTALLY INFECTED PIGS WITH MONOPHASIC VARIANT OF *SALMONELLA* TYPHIMURIUM SEROVAR 1,4[5], 12:i:-

María Cevallos-Almeida^{1,4}, Catherine Houdayer¹, Valerie Rose¹, Yann Bailly², Frédéric Paboef², Christelle Fablet³, Martine Denis¹, Annaëlle Kerouanton¹

¹Hygiene and Quality of Poultry and Pig Products Unit, ANSES-Bretagne Loire University, BP53, site des Croix, Ploufragan 22440, France

²SPF Pig Production and Experimental Unit ANSES, BP53, site des Croix, Ploufragan 22440, France

³Swine Epidemiology and Welfare Research Unit, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), BP 53, 22440 Ploufragan, France

⁴Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, Central University of Ecuador, PO Box 17-03-100 Quito, Ecuador

Key words: monophasic *S. Typhimurium*, pigs, excretion, immunity, antibodies, interferon.

Introduction

In recent years *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 1,4[5],12:i:- (monophasic variant of *S. Typhimurium* or vmST) was focused as a major zoonotic problem because produce human gastroenteritis outbreaks in many countries. Human disease caused by this serovar is considered as emergent in European Union countries and actually is ranked as the third most reported serotype after *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* (EFSA, 2016; Fernandes et al., 2016).

Swine (pig and pork products) was reported as reservoir of vmST. In pig production systems, *Salmonella* colonization in the pig intestine, and subsequent excretion, determine the possible contamination of the meat for human consumption. Extensive information about colonization and immune response in pigs are available for *S. Typhimurium* but not for vmST.

Thus, the aim of this work was to study the dynamic of excretion and immunological response of pigs after inoculation with a vmST, using an experimental Specific Pathogen Free (SPF) pig model. Excretion was followed twice a week by numeration of *Salmonella*. Moreover, from blood serum, the antibody presence was measured by ELISA assay to assess the humoral response in pigs (Osterberg & Wallgren, 2008) and the mesure of interferon Gamma (INF- γ) was used as marker of innate immunity for *Salmonella* infection (Huang et al., 2011; Uthe et al., 2009).

Materials and methods

The trial was conducted on 32 SPF piglets, born into ANSES Ploufragan protected animal house. Piglets aged of 5 weeks were placed in hermetic and separated experimental animal houses. Inoculated experimental herd of 24 piglets was placed in three separate rooms (8 piglets per room), each one containing 2 pens. Four piglets were placed in each pen. The three groups of 8 pigs (G1, G2 and G3) were slaughtered at different ages, were followed respectively during 21, 49 and 84 days post inoculation (p.i.). Control herd of 8 pigs was kept in 2 separate rooms.

Pigs were monitored daily for surveillance of clinical manifestations and body temperature control. Food consumption and body weight were reported weekly.

A field strain of vmST was used for the experiment. In order to easily enumerate the strain in fecal samples, it was transformed in strain resistant to Rifampicin (SRif). At seven weeks of age, piglets were orally inoculated with 10 ml of a solution containing a SRif bacterial solution of 10^8 CFU per ml. Control herd received only 10 ml of Tryptone Salt Broth. Fecal samples were taken twice a week, directly from the animal rectum. Blood samples were taken from the jugular vein once a week, beginning at day 7 p.i. for G3 and at day 3 p.i. for G1 and G2.

Fecal samples were diluted 1: 10 with Buffered Peptone Water (BPW). 5 ml of this dilution (10^{-1}) were taken and serial dilutions were performed in Salt Tryptone Broth tubes until dilution 10^{-4} . 1 ml of 10^{-1} dilution was seeded in 3 plates of Xylose Lysine Desoxycholate agar supplemented with Rifampicin (XLD+Rif). 100 μ l of dilutions 10^{-2} and 10^{-4} were also plated in XLD+ Rif. Plates were incubated at 37 ° C for 24 hours. Typical black colonies of *Salmonella* were counted and expressed in Log₁₀ CFU/g. When enumeration was negative, a *Salmonella* detection protocol was performed following NF-U47-102.

For antibody screening, IDEXX Swine *Salmonella* Ab Test® (IDDEX, Montpellier, France) was used. Samples with OD% values equal to or greater than 15 % (S/P=0.375) were considered as positive.

Interferon γ response was measured in serum samples, using Porcine IFN γ ELISA Kit ® (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France), according to the manufacturer instruction. Results were expressed in pg/ml and they were compared with LLD (Lower Limit of Detection) calculated for each plaque.

Pigs were euthanized and autopsied at 21 days (8 inoculated pigs and 2 controls), at 49 days (8 inoculated pigs and 2 controls) and 84 days (8 inoculated pigs and 4 controls). We took in aseptic conditions tonsils, mesenteric lymph nodes, and different parts of the intestinal content: duodenum, jejunum, ileum and caecum. All samples were analyzed following the microbiological protocol describe above for the feces.

Statistical analysis

To establish the excretion kinetic we compared the excretion levels of pigs each day after inoculation (24 pigs during 21 days, 16 pigs during 49 days and 8 pigs during 84 days). Area Under Curve (AUC) was measured for individual excretion for all pigs until day 21 post inoculation (p.i.). AUC obtained were compared with non-parametric method (Kruskal-Wallis test). Pearson's correlations ($p < 0, 05$) were performed between the results of pigs excretion and the antibody and interferon response.

Results

Excretion in feces

All groups of inoculated pigs had shed vmST continuously during respectively 21, 49 and 84 days p.i. with daily variations of excretion (Figure 1).

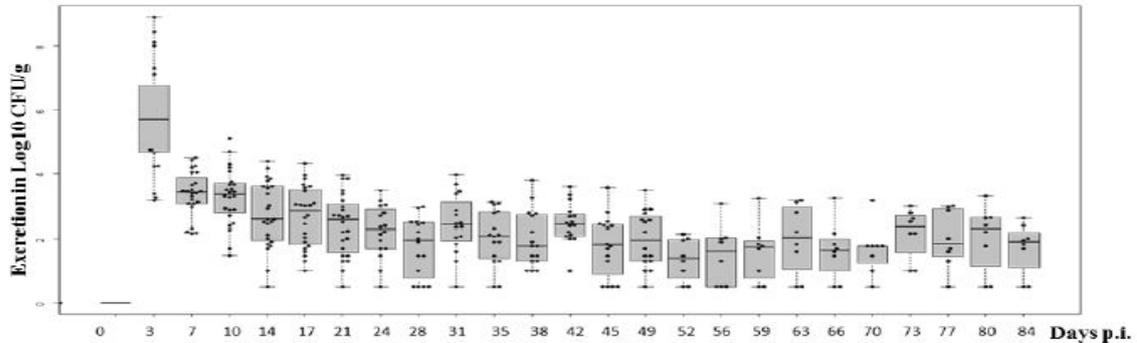


Figure 1. Box plot representing the excretion kinetic for all pigs during 84 days (in Log₁₀ CFU/g).

After a peak of excretion just post inoculation (5.8 ± 1.6 log₁₀ CFU / g at day 3), the mean amount excreted decreased significantly (2.4 log₁₀CFU/g at day 7). The lower amount was detected at day 53 (1.4 ± 0.7 log₁₀ CFU / g).

Comparison of AUC (Area under curve) measured for each pigs using Kruskal-Wallis test did not show a significant difference between the 32 pigs ($p > 0.05$) for excretion in feces from day 0 to day 21. Inside G1 and G2 we did not find significant differences between pigs ($p = > 0.05$). However in G3, we found significant difference in pig's excretion levels ($p < 0.001$). Control group remained negative for *Salmonella* during all the trial.

Immune response

Kinetics of individual seroconversion

Antibody response started at day 7 p.i. with variability among experimental groups and pigs. 100% of pigs from Group 2 and 3 were seroconverted at day 49 p.i. and remained positives until the end of experiment (Figure 2). A positive correlation was found between excretion of vmST in feces and serological results with Pearson test $p = -0.29$

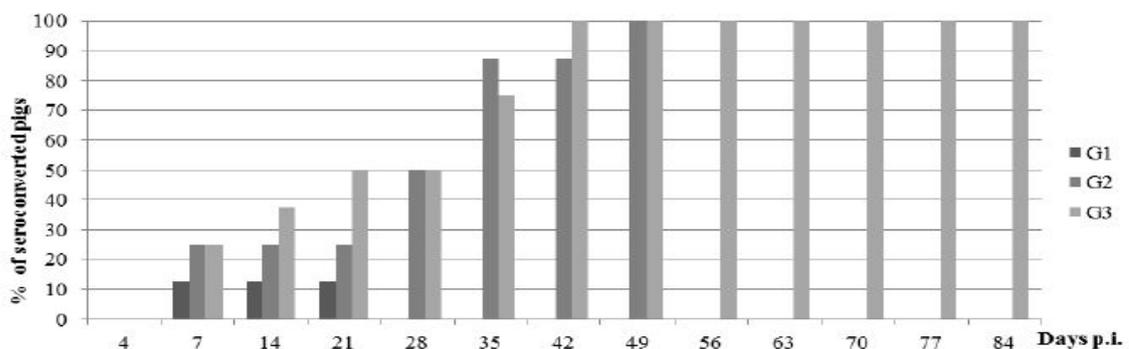


Figure 2. Frequency (%) of seropositive pigs during 84 days.

Interferon γ level in serum

50 % of pigs showed IFN γ levels higher than 50 pg/ ml at day 3 p.i. (Figure 3). These levels decreased at day 7, and became lower than 15 pg /ml in 80% of pigs. At day 14, IFN γ were not detectable. Positive correlation between IFN γ and excretion levels was found at day 3.

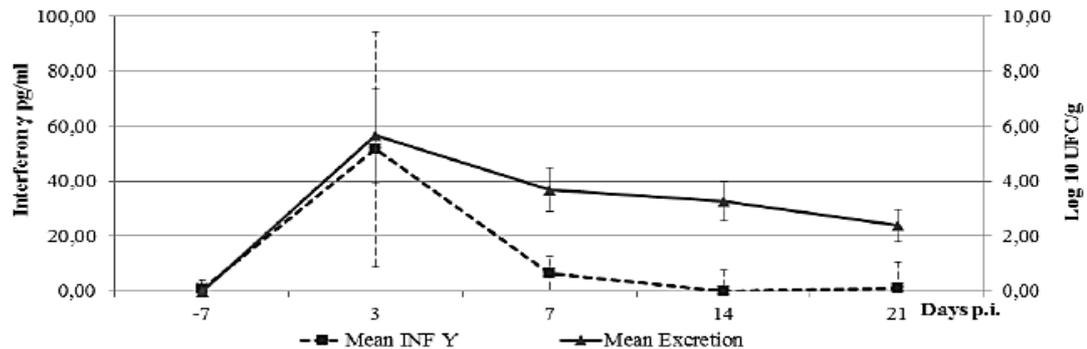


Figure 3. Interferon γ average and excretion levels in pigs artificially contaminated with *Salmonella* during 21 days. (Group 1 and 2).

Conclusion

To our knowledge this work is the first description of excretion dynamic and immunological response of experimental pigs after infection with a monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium strain. Fecal shedding of the 24 pigs used was persistent and continuous during 84 days. At the autopsies, the highest contamination was evidenced in tonsils and the lowest in mesenteric lymphatic nodes, for all pigs of the three experimental groups. Concerning antibody response, seroconversion begins at day 7, and all pigs followed during 49 and 84 days seroconverted at day 49 post-inoculation. The highest levels of INF- γ were highlighted 3 days after inoculation with the monophasic variant of *S. Typhimurium*.

Acknowledgments

We acknowledge SENESCYT-ECUADOR (Secretaría de Educación Superior Ciencia y Tecnología del Ecuador; Programa de Becas para Docentes Universitarios <http://www.educacionsuperior.gob.ec>) for funding this work.

References

- EFSA. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 2016, 14(12)(4634), 231. doi:doi:10.2903/j.efsa.2016.4634.
- Fernandes, L., Centeno, M., Couto, N., Nunes, T., Almeida, V., Alban, L., & Pombo, C. (2016). Longitudinal characterization of monophasic *Salmonella* Typhimurium throughout the pig's life cycle. *Veterinary Microbiology*, 192, 231-237. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.07.018>.

Huang, T. H., Uthe, J. J., Bearson, S. M., Demirkale, C. Y., Nettleton, D., Knetter, S., . . . Tuggle, C. K. (2011). Distinct peripheral blood RNA responses to *Salmonella* in pigs differing in *Salmonella* shedding levels: intersection of IFNG, TLR and miRNA pathways. *PLoS One*, 6(12), e28768. doi:10.1371/journal.pone.0028768.

Osterberg, J., & Wallgren, P. (2008). Effects of a challenge dose of *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Yoruba on the patterns of excretion and antibody responses of pigs. *Vet Rec*, 162(18), 580-586.

Uthe, J. J., Wang, Y., Qu, L., Nettleton, D., Tuggle, C. K., & Bearson, S. M. (2009). Correlating blood immune parameters and a CCT7 genetic variant with the shedding of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in swine. *Vet Microbiol*, 135(3-4), 384-388. doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.074.

ANNEXE 6 : Résumé long de la communication orale présentée au Congrès Safepork

SafePork, 21-24 août 2017, Foz de Iguazu Brésil.



12th International Symposium on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork
Foz do Iguaçu - Brazil | August 21-24, 2017

EVALUATION OF THE COLONIZING ABILITY ON IPEC-J2 CELLS AND OF THE PATHOGENICITY ON CACO-2 CELLS OF THE 3 MAJOR FRENCH PIG *SALMONELLA* SEROVARS

Annaëlle Kerouanton¹, María Cevallos-Almeida^{1,2}, Justine Jacquin¹,
Martine Denis¹

¹Anses (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety), Hygiene and Quality of Poultry and Pig Products Unit, University of Bretagne-Loire, Ploufragan, France

²Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny. Central University of Ecuador, Quito, Ecuador

Key words: Salmonella, in vitro assays, colonization, IPEC-J2, pathogenicity, Caco-2.

Introduction

Salmonella enterica subspecies *enterica* is recognized as the etiological agent of Salmonellosis, a zoonotic disease transmitted in humans through contaminated food. In 2015, *Salmonella s. p.* was reported as the second bacterial agent responsible of gastroenteritis in the European Union (EFSA, 2016). Pig consumption is considered as a major source of human *Salmonella* infections (Bonardi, 2017). *Salmonella* subspecies can be divided in 1530 serovars based on different epitopes and surface antigens. Associations exist between serovars and livestock species. In Pigs, in France, *Salmonella* Typhimurium, Derby and recently the monophasic variant of *S. Typhimurium* (vmST) are the most frequently isolated serovars (Denis *et al.*, 2013; Kerouanton *et al.*, 2013). The presence of monophasic variant of *S. Typhimurium* is also described in pigs in Europe (Bonardi *et al.* 2016).

To assess their colonization ability in pigs and their pathogenicity in humans, we tested *in vitro* a panel of 15 strains of these three serovars on respectively non-transformed cell line IPEC-J2 derived from porcine jejunal epithelial (Shierack *et al.*, 2006) and human colon adenocarcinoma Caco-2 cells.

Materials and methods

Strains

Five strains per serovar have been studied. They have been isolated from pigs between 2007 and 2014, from feces, lymph nodes or carcass swabs (Table 1).

Table 1. *Salmonella* strains used for the study.

Serovar	Strain number	Isolation year	Origin
S. Derby	07CR553	2007	Lymph nodes of conventional slaughtered pig
	07CR179	2007	Lymph nodes of conventional slaughtered pig
	07CR223	2007	Lymph nodes of conventional slaughtered pig
	S12AK059	2012	Carcass swab of conventional slaughtered pig
	S12AK118	2012	Fecal sample of conventional slaughtered pig

Serovar	Strain number	Isolation year	Origin
<i>S. Typhimurium</i>	07CR073	2007	Lymph nodes conventional pig at slaughter
	07CR095	2007	Lymph nodes conventional pig at slaughter
	08MD138	2008	Fecal sample of conventional breeding pig
	08MD869	2008	Fecal sample of conventional slaughtered pig
	S12AK086	2012	Fecal sample of conventional slaughtered pig
Monophasic variant of <i>S. Typhimurium</i>	S14CH63	2014	Fecal sample of pig at farm
	S12AK050	2012	Fecal sample of conventional slaughtered pig
	S12AK070	2012	Carcass swab of organic slaughtered pig
	S12AK100	2012	Fecal sample of organic slaughtered pig
	S12AK107	2012	Fecal sample of conventional slaughtered pig

Assays

Intestinal cells, IPEC-J2 or Caco-2, were seeded in DMEM medium at 2.10^5 cells per well in a 24 well-plate. Then, 2.10^7 bacteria (m.o.i. of 200) of each strain were added in two wells, one to numerate adhesive and invasive bacteria and the other, to numerate invasive bacteria. Cells were incubated for 3h at 37°C with 5% CO₂ to allow bacterial adhesion and invasion. To determine the adherence, cells were washed three times with PBS solution and then the monolayer was lysed with 0.1% triton X-100 for 15 minutes at 37°C, and total bacteria (intracellular and adherent bacteria) were enumerated by serial dilutions in Tryptone salt (TS) by plating on PCA agar plates.

To determine invasion, the monolayer was washed three times in PBS solution, and 1ml of DMEM containing gentamicin at 480 mg/L was added to kill extracellular bacteria. After 2-hour incubation, the monolayer was washed twice in PBS solution and lysed with 0.1% Triton X-100 as described above. After serial dilution in TS, released intracellular bacteria were enumerated by the colony count method on PCA agar plates.

Invasion ability (Invasion percentage) was expressed as the percentage of the inoculum surviving the gentamicin treatment, and adherent bacteria (Adhesion percentage) were expressed as the total number of bacteria counted without antibiotic treatment relative to the initial inoculum. Three to four technical replicates were performed for each experiment.

Statistical analyses

Statistical analyses have been performed in the R software (R version 3.2.4). The significance of the differences observed was tested using Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney test. The differences were found to be significant when the test results gave $p \leq 0.05$.

Results

On IPEC-J2 cells, significant difference was observed between serovars for adhesion ($p=0.002$). *S. Derby* and monophasic variant of *S. Typhimurium* had the highest capacity of adhesion (56.41% and 33.80%, respectively) compared to *S. Typhimurium* (24.36%). The invasion varied from 0.69 % to 18.58 % with a mean of

4.81% (Figure 1). The highest values of invasion are obtained for monophasic variant strains but in mean for this serovar the difference is not significant with others serovars ($p=0.07$).

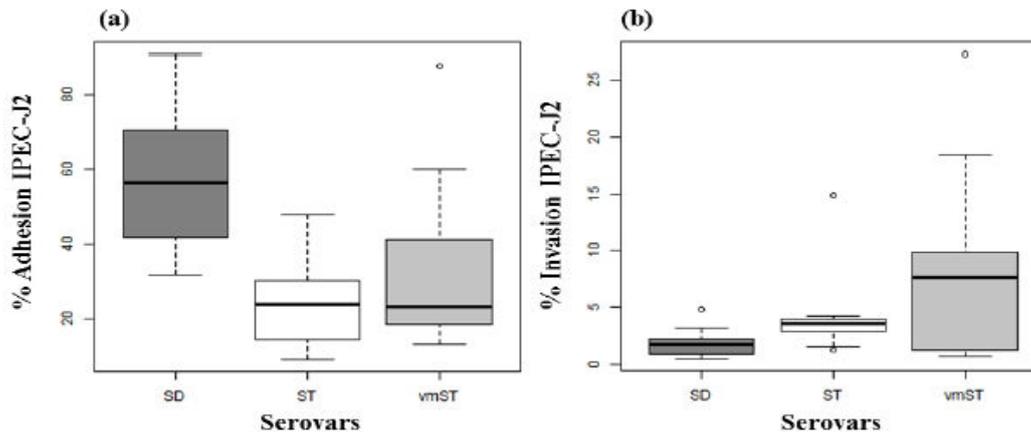


Figure 1. Box-Plot representing the adhesion percentage (a) and the invasion percentage (b) on IPEC-J2 cells according to serovars (SD = *S. Derby*; ST= *S. Typhimurium*; vmST = monophasic variant of *S. Typhimurium*).

In a hierarchical classification analysis based on IPEC-J2 invasion results, 4 strains particularly invasive clustered, three of them are variant monophasic of *S. Typhimurium* and one is a *S. Typhimurium*. The hierarchical classification analysis based on IPEC-J2 adhesion and invasion gave three clusters. None cluster is link to a specific serovar, each cluster contained 2 or 3 different serovars.

On Caco-2 cells, monophasic variant of *S. Typhimurium* showed the highest capacity of adhesion (46.17%) and *S. Derby* the lowest (26.28%), but there was no significant difference between the three serovars ($p=0.15$). Even if invasion was low for all strains (1.91% in mean), a significant difference was observed between serovars ($p=0.008$), and, surprisingly, even if it no so often associated with human cases than the two others serovars, *S. Derby* showing the highest capacity of invasion (2.39%).

Hierarchical classification analysis based on Caco-2 adhesion and invasion highlighted four clusters. A cluster contained 2 monophasic strains (the most adhesive strains, with respectively 69.02 and 74.58% adhesion) but in the 3 others clusters the 3 serovars studied were represented (Figure 2).

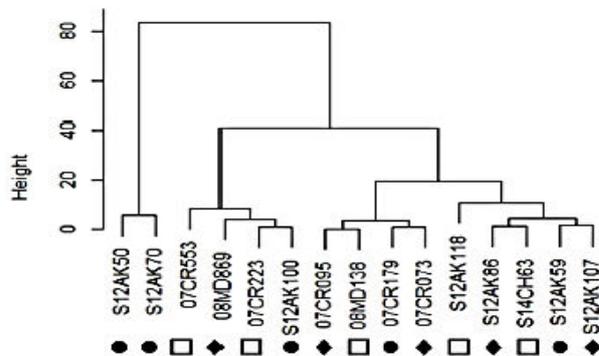


Figure 2. Dendrogram representing the hierarchical classification of strains on the basis of Caco-2 adhesion% and invasion% results (S. Derby □; S. Typhimurium ◆; monophasic variant of S. Typhimurium ●).

Conclusion

Our results didn't allow us to clearly differentiate the serovars on the basis of their ability to adhere and invade IPEC-J2 or Caco-2 cells. However, monophasic variant of *S. Typhimurium* strains showed a good ability to adhere to those pig or human cells, and to invade pig cells, which could explain its importance in pig colonization and human infections, in France. However, in Caco-2 model, *S. Derby* strains showed the highest invasion ability. To complete this study, the virulence of these 15 strains will be evaluated using *Galleria mellonella* pathogenesis model.

Acknowledgments

We acknowledge SENESCYT-ECUADOR (Secretaría de Educación Superior Ciencia y Tecnología del Ecuador; Programa de Becas Docentes Universitarios <http://www.educacionsuperior.gob.ec>) for funding this work.

References

- Bonardi S, Alpigiani I, Bruini I, Franco Brindani EB, Morganti M, Cavallini P, Bolzoni L, Pongolini S, 2016. Detection of *Salmonella enterica* in pigs at slaughter and comparison with human isolates in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 218: 44-50.
- Bonardi S. (2017). *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. *Epidemiol Infect*, 145(8), 1513-1526.
- Denis, M., Houard, E., Fablet, A., Rouxel, S., Salvat, G. (2013). Distribution of serotypes and genotypes of *Salmonella enterica* species in French pig production. *Veterinary Record*, 173(15), 1-7.
- EFSA. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), 4634, 1-231.
- Kerouanton, A., Rose, V., Even, M., Houard, E., Denis, M. (2013). Prevalence and genetic diversity of *Salmonella* in organic and conventional pig productions in France. *Proceedings I3S, Saint-Malo*, 279-280.
- Schierack P, Nordhoff M, Pollmann M, Weyrauch KD, Amasheh S, Lodemann U, Jores J, Tachu B, Kleta S, Blikslager A, Tedin K, Wieler LH. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol*. 2006; 125 : 293-305

ANNEXE 7 : Poster présenté au Congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM)

SFM, 9, 10 et 11 octobre, Paris

Evaluation *in vitro* du pouvoir colonisateur et pathogène de 3 sérovars de *Salmonella* d'origine porcine

Maria Cevallos-Almeida^{1,2}, Justine Jacquin¹, Martine Denis¹ et Annaëlle KEROUANTON¹

¹ANSES, Laboratoire d'Hygiène et Qualité des Produits Aviaires et Porcines-Université Bretagne-Loire, Ploufragan, France

²Université Centrale de l'Equateur, Quito, Equateur
maria.cevallos@anses.fr



Connaître, évaluer, protéger

Introduction

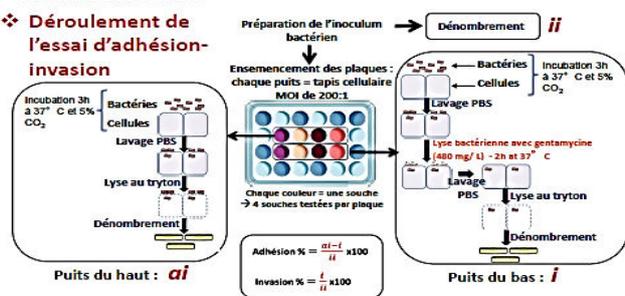
L'objectif de ce travail était d'évaluer *in vitro* le pouvoir colonisateur et le pouvoir pathogène de souches de *Salmonella* appartenant aux trois sérovars majeurs trouvés dans la filière porcine en France, *Salmonella* Derby (SD), Typhimurium (ST), et le variant monophasique de *S. Typhimurium* (vmST). Les essais de cultures cellulaires ont été menés sur des cellules intestinales porcines (IPEC-J2) et humaines (Caco-2).

Matériels et Méthodes

❖ 15 souches étudiées (5 souches par sérovar)

Sérovar	N° souche	Année	Isolément Origine	Lieu
Derby (SD)	07CR553	2007	Ganglion de porc charcutier conventionnel	abattoir
	S12AK059	2012	Carcasses de porc charcutier conventionnel	abattoir
	S12AK118	2012	Fèces de porc charcutier conventionnel	abattoir
	07CR179	2007	Ganglion de porc charcutier conventionnel	abattoir
	07CR223	2007	Ganglion de porc charcutier conventionnel	abattoir
Typhimurium (ST)	S12AK086	2012	Fèces de porc charcutier conventionnel	abattoir
	07CR073	2007	Ganglion de porc charcutier conventionnel	abattoir
	07CR095	2007	Ganglion de porc charcutier conventionnel	abattoir
	08MD138	2008	Fèces de porc charcutier	ferme
	08MD869	2008	Fèces de porc charcutier	ferme
Variant monophasique (vmST)	S14CH63	2014	Fèces de porc	ferme
	S12AK050	2012	Fèces porc charcutier conventionnel	abattoir
	S12AK070	2012	Carcasse porc charcutier biologique	abattoir
	S12AK100	2012	Fèces porc charcutier biologique	abattoir
	S12AK107	2012	Fèces porc charcutier conventionnel	abattoir

❖ Déroulement de l'essai d'adhésion-invasion



Résultats

❖ Colonisation sur cellules intestinales porcines (IPEC-J2):

- ❖ **Adhésion:** Différence significative entre sérovars (Kruskal-Wallis $p=0,002$). Les SD et vmST ont montré la plus haute capacité d'adhésion (56,41% et 33,80% respectivement). L'adhésion des ST était plus faible (24,36%).
- ❖ **Invasion:** Les résultats d'invasion varient entre 0,69 % et 18,58 % avec un moyenne de 4,81% (figure 1). Les résultats les plus élevés ont été obtenus pour les vmST, mais la différence n'est pas significative avec les autres sérovars (Kruskal-Wallis $p=0,07$). Dans un analyse de classification hiérarchique basé sur les résultats d'invasion, 4 souches, 3 vmST et 1 ST, sont regroupées dans un cluster du fait de leur plus forte invasion.

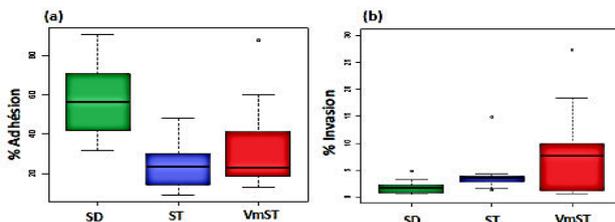


Figure 1: Représentation en boxplot des pourcentages d'adhésion (a) et d'invasion (b) sur les cellules IPEC-J2 selon les sérovars.

❖ Pathogénicité sur cellules intestinales humaines (Caco-2):

- ❖ **Adhésion:** Le vmST a montré la plus forte capacité d'adhésion, (46,17%) et SD la plus faible (26,28%). Cependant, la différence entre les trois sérovars n'était pas significative (Kruskal-Wallis, $p=0,15$).
- ❖ **Invasion:** Même si l'invasion s'est montrée faible quelque soit le sérovar (1,91% en moyenne), une différence significative a été observée entre sérovars (Kruskal-Wallis $p=0,008$). Ce sont les SD qui ont montré la plus forte capacité d'invasion (2,39%), alors que ce sérovar n'est pas fortement prévalent dans les cas de salmonellose humaine (8^{ème} rang en France, 126 cas recensés par le CNR *Salmonella* en 2014).
- ❖ **Adhésion/Invasion:** Les analyses de classification hiérarchique basées sur l'adhésion et l'invasion ont mis en évidence 4 clusters. Un cluster rassemble 2 souches vmST ayant démontré de forte capacité d'adhésion (69,02 and 74,58%). Les autres clusters ne sont pas spécifiques d'un sérovar, chacun rassemblant 2 ou 3 sérovars (figure 2).

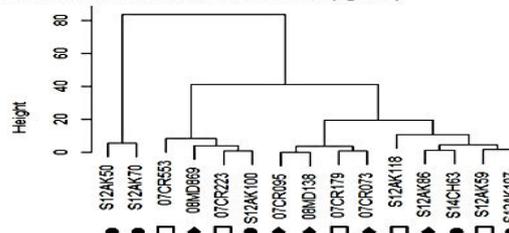


Figure 2: Le dendrogramme montre le classification hiérarchique des souches sur la base des résultats d'adhésion et invasion sur cellules Caco-2 (SD □; ST ♦; vmST ●).

Conclusion

Ces essais de cultures cellulaires ne nous ont pas permis de différencier clairement les sérovars de *Salmonella* en fonction de leur capacité à adhérer et à envahir les cellules intestinales porcines IPEC-J2 ou humaines Caco-2. Les souches du variant monophasique de *S. Typhimurium* ont cependant montré une bonne capacité à adhérer sur les 2 types de cellules et à envahir les cellules porcines, ce qui pourrait expliquer l'importance du variant dans la colonisation des porcs et dans les infections humaines en France. Sur les cellules humaines, les souches de *S. Derby* ont présenté la plus grande capacité d'invasion. Pour compléter cette étude, la virulence des 15 souches sera évaluée *in vivo* à l'aide du modèle de pathogénicité sur l'insecte *Galleria mellonella*.

Références:

Denis, M., Houard, E., Fablet, A., Rouxel, S., Salvat, G. (2013). Distribution of serotypes and genotypes of *Salmonella enterica* species in French pig production. *Veterinary Record*, 173(15), 1-7.
Kerouanton, A., Rose, V., Even, M., Houard, E., Denis, M. (2013). Prevalence and genetic diversity of *Salmonella* in organic and conventional pig productions in France. *Proceedings 135, Saint-Malo*, 279-280.
Schierack P, Nordhoff M, Pollmann M, Weyrauch KD, Amasheh S, Lodemann U, Jores J, Tachu B, Kleta S, Blikslager A, Tedin K, Wieler LH. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol*. 2006; 125 : 293-305

Remerciements

Cette étude a fait l'objet d'un financement par SENESCYT-ECUADOR (Secretaría de Educación Superior Ciencia y Tecnología del Ecuador; Programa de Becas Docentes Universitarias <http://www.educacionsuperior.gob.ec>).



anses.fr

***Salmonella* en filière porcine : dynamique d'infection, pouvoir colonisateur et virulence**

Salmonella est la deuxième cause de zoonoses humaines dans l'Union Européenne et représente un enjeu majeur pour la filière porcine. Les sérovars, *S. Typhimurium*, *S. Derby* et le variant monophasique de *S. Typhimurium* sont très prévalents chez le porc et également chez les humains. Les objectifs de ces travaux étaient d'établir la dynamique d'infection chez le porc par *Salmonella* en condition d'élevage conventionnel et expérimental, d'évaluer le pouvoir colonisateur chez le porc et le pouvoir pathogène chez les humains des trois sérovars. En élevage conventionnel, le suivi sérologique des anticorps anti-*Salmonella* a permis d'évaluer l'âge moyen de séroconversion à 137 jours et d'identifier un « effet ferme » sur l'âge de séroconversion. Le premier essai en condition expérimentale a mis en évidence que les porcs inoculés avec le variant monophasique de *S. Typhimurium* excrétaient ce sérovar de façon continue dans les fèces. Aux dates d'autopsies 21, 49 ou 84 jours après inoculation, les salmonelles ont été retrouvées dans les différentes parties de l'intestin, dans les nœuds lymphatiques et à des niveaux très élevés dans les amygdales. Après passage dans le tractus digestif, des profils MLVA différents de celui de la souche inoculée ont été identifiés suggérant que le génome de la souche a évolué. Le deuxième essai visant à comparer le pouvoir colonisateur chez le porc des trois sérovars a montré que la dynamique d'excrétion et de colonisation était similaire quel que soit le sérovar. Cependant, la quantité excrétée était significativement différente ; plus élevée avec le variant monophasique par rapport à *S. Typhimurium*. Le pouvoir pathogène chez l'homme de 15 souches d'origine porcine appartenant aux 3 sérovars a été évalué *in vivo* sur un modèle insecte *Galleria mellonella*, et *in vitro* sur cellules Caco-2. Les souches se sont révélées être potentiellement virulentes. Sur Caco-2, le variant monophasique avait un pourcentage d'adhésion aux cellules le plus élevé et Derby le plus bas. Différents niveaux de virulence ont été observés entre souches d'un même sérovar. Ce travail a apporté des nouvelles connaissances sur la problématique *Salmonella* en filière porcine

Mots-clés : *Salmonella*, porcs, sérologie, colonisation, virulence, stabilité génétique

***Salmonella* in the pig production: dynamic of infection, colonizing ability and virulence**

Salmonella is the second leading cause of human zoonoses in the European Union and represents a major challenge for the pork industry. Serovars *S. Typhimurium*, *S. Derby* and the monophasic variant of *S. Typhimurium*, implicated in human salmonellosis, are highly prevalent in pigs and also in human. The objectives of this research were to establish the infection dynamics in pigs by *Salmonella* under conventional and experimental rearing conditions, to evaluate pig colonization ability and pathogenicity in humans of the three serovars. In conventional farms, the serological monitoring of *Salmonella* antibodies allowed to evaluate the average age of seroconversion at 137 days and to identify a "farm effect" on the age of seroconversion. The first trial under experimental conditions revealed that pigs inoculated with the monophasic variant of *S. Typhimurium* excreted this serovar continuously in the feces. At autopsy dates 21, 49 or 84 days after inoculation, *Salmonella* were found in the different parts of the intestine, in the lymph nodes and at very high levels in the tonsils. After passage through the digestive tract, different MLVA profiles from that of the inoculated strain were identified suggesting that the genome of the strain has evolved. The second attempt to compare the colonizing ability in the pigs of the three serovars showed that the dynamics of excretion and colonization were similar regardless of the serovar. However, the amount excreted was significantly different: higher with the monophasic variant compared to *S. Typhimurium*. The pathogenicity in humans of 15 strains of porcine origin belonging to the 3 serovars was evaluated *in vivo* on an insect model *Galleria mellonella*, and *in vitro* on Caco-2 cells. The strains were found to be potentially virulent. On Caco-2, the monophasic variant had the highest cell adhesion percentage and Derby, the lowest. Different levels of virulence were observed between strains of the same serovar. This work brought new knowledge on the *Salmonella* issue in the pig sector.

Key words: *Salmonella*, pigs, serology, colonization, virulence, genetic stability