

Université
de Liège



ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES
SERVICE DE BACTERIOLOGIE

***Salmonella enterica* dans les mortalités de pintadeaux au Bénin : Etude de terrain, comparaison des souches, et activité antibactérienne des extraits de plantes locales**



***Salmonella enterica* in keet mortality in Benin: Field study, comparison of isolates, and antibacterial activity of local plant extracts**

Cyrille Kadoéito BOKO

THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN
SCIENCES VETERINAIRES – ORIENTATION SANTE ET PRODUCTIONS
ANIMALES

ANNEE ACADEMIQUE 2011-2012

Université
de Liège



ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE

UNIVERSITE DE LIEGE

FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE

DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES

SERVICE DE BACTERIOLOGIE

***Salmonella enterica* dans les mortalités de pintadeaux au Bénin : Etude de terrain, comparaison des souches, et activité antibactérienne des extraits de plantes locales**



***Salmonella enterica* in keet mortality in Benin: Field study, comparison of isolates, and antibacterial activity of local plant extracts**

Cyrille Kadoéito BOKO

Promoteur : Professeur Jacques Mainil

Directeur béninois de thèse : Professeur Marc T. Kpodékon

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN
SCIENCES VETERINAIRES – ORIENTATION SANTE ET PRODUCTIONS
ANIMALES**

ANNEE ACADEMIQUE 2011-2012

A mon épouse, Flore
A mes filles, Foumilayo Laetitia, Modoukpè Marie-Ange
A mon fils, Olouwatobi F.K. Hornick

Sommaire

Remerciements	v
Résumé	vii
Summary	x
Liste des abbreviations.....	xii
Première partie : Introduction générale et synthèse de la littérature.....	1
1.1. Introduction générale.....	2
1.2. Objectifs de ce travail.....	3
1.3. Article de synthèse : Contraintes techniques et sanitaires de la production traditionnelle de pintade en Afrique subsaharienne	5
Deuxième partie: Présentation des résultats.....	30
2.1. Etude I. Etude des contraintes sanitaires dans les élevages de pintades locales dans le Département du Borgou au Bénin	31
2.1.1. Article 1: Farmer perceptions and pathological constraints in helmeted guinea fowl farming in the Borgou Department in North-East Benin	32
2.2. Etude 2: Identification des salmonelles et évaluation <i>in vivo</i> de la virulence de 5 sérotypes	43
2.2.1. Article 2: Identification and typing of <i>Salmonella</i> serotypes isolated from guinea fowl (<i>Numida meleagris</i>) farms in Benin during four laying seasons (2007–2010)	44
2.2.2. Article 3: <i>In vivo</i> assessment of the virulence of five <i>Salmonella enterica</i> serotypes isolated from helmeted guinea fowl (<i>Numida meleagris</i>) in Benin	71
2.3. Etude 3 : Composition chimique et test d'efficacité <i>in vitro</i> des huiles essentielles extraites de feuilles fraîches du basilic commun (<i>Ocimum basilicum</i>) et du basilic tropical (<i>Ocimum gratissimum</i>) sur <i>Salmonella enterica</i> sérotype Oakland et <i>Salmonella enterica</i> sérotype Legon ...	81
2.3.1. Article 4 : Composition chimique et test d'efficacité <i>in vitro</i> des huiles essentielles extraites de feuilles fraîches du basilic commun (<i>Ocimum basilicum</i>) et du basilic tropical (<i>Ocimum gratissimum</i>) sur <i>Salmonella enterica</i> sérotype Oakland et <i>Salmonella enterica</i> sérotype Legon	82
Troisième partie : Discussion générale et perspectives	100
3.1. Discussion générale.....	101
3.1.1 Contraintes sanitaires dans les élevages de pintade locale au Bénin.....	101
3.1.2. Identification et rôle des salmonelles	103
3.1.3. Traitement des infections bactériennes	105
3.2. Conclusion générale et perspectives.....	106
Références générales	110

Remerciements

Je tiens à exprimer ma chaleureuse reconnaissance à toutes les personnes physiques et morales, ayant contribué de manière directe ou indirecte à la réalisation de ce travail.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma profonde gratitude au Professeur Jacques Mainil, Promoteur de cette thèse. Au cours de cette formation doctorale, j'ai pu bénéficier de sa disponibilité, de son suivi rigoureux, de son soutien, de son expérience, et de sa rigueur scientifique. Il a toujours répondu promptement à toutes mes sollicitations. Il m'a encouragé dans les moments difficiles. J'ai été particulièrement très touché par sa simplicité et ses qualités humaines. Qu'il trouve ici le témoignage de ma plus vive reconnaissance.

Qu'il me soit permis d'exprimer toute ma profonde gratitude au Professeur Kpodékon T. Marc, Directeur béninois de cette thèse, pour sa disponibilité, et sa rigueur scientifique. Il a toujours répondu promptement à toutes mes sollicitations. Il m'a encouragé dans les moments difficiles. J'ai été aussi particulièrement très touché par sa simplicité et ses qualités humaines. Qu'il trouve ici le témoignage de ma plus vive reconnaissance.

J'exprime toute ma reconnaissance aux membres de mon comité de thèse. Nos échanges enrichissants et leur disponibilité ont été déterminantes dans la qualité de ce document.

Je remercie les membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer mon travail.

Je remercie le Professeur Bertrand Losson qui m'a encouragé à m'inscrire en thèse.

Je remercie le Professeur Anick Linden pour sa contribution.

Je remercie Dr Taminiau Bernard, M^r Duprez Jean-Noel, Dr Muylaert Adeline Dr Ote Isabelle, M^{me} Duchesnes Christiane et M^{lle} Bardiau Marjorie pour leur assistance technique.

Je remercie Dr Grégoire Fabien, Dr Nahayo Adrien, Dr Wirtgen Marc, Dr Volpe Rosario, Paternostre Julien, M^{lle} Pirson Jessica et M^r Aloïs Vionnet pour leur collaboration.

Je remercie le Dr Anne Vermeylen pour son soutien indéfectible.

Je remercie le Dr Jean-Luc HORNICK pour ses divers soutiens.

Je remercie le Professeur Yalacé Yamba Kaboret pour sa contribution.

Ce travail a été rendu possible grâce au financement du Budget National Béninois dans le cadre du programme de formation des formateurs à l'Université d'Abomey-Calavi (UAC). Je tiens à exprimer aux autorités Béninoises ma profonde gratitude.

Je remercie l'Agence Universitaire de la Francophonie pour le soutien de ce travail à travers le programme «Horizons Francophones ».

Je remercie la fondation Alice Seghers et la Coopération Universitaire au Développement « Fonds Social » qui, à travers le Centre de la Coopération au Développement de l'Université de Liège (CECODEL), m'ont apporté des aides sociales pour finaliser cette thèse.

Je tiens particulièrement à exprimer toute ma reconnaissance à tous les Enseignants du Département de Production et Santé Animales de l'Ecole Polytechnique d'Abomey Calavi de l'Université d'Abomey-Calavi qui ont vivement et unanimement recommandé mon inscription en thèse.

Je remercie Dr Adjakpa Boco Jacques pour son soutien indéfectible.

Je remercie le Directeur de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, le Recteur de l'Université d'Abomey Calavi et les membres du Conseil scientifique de l'Université d'Abomey-Calavi qui m'ont autorisé à suivre cette formation doctorale.

Je remercie tous les Enseignants du Département de Productions Animales de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université d'Abomey-Calavi, pour leur assistance.

Mes parents (Boko Nazaire et Abo Henriette), mes frères et sœur (Boko Jean, Boko Yacinthe, Boko Frédéric, Boko Marguerite, Boko Alexis), mes oncles (Toyé Michèl, Amoussou Emmanuel, Lawin Victor), mes cousins (Lawin Louis, Lawin Louise), je vous remercie pour votre soutien et vos prières.

A la famille du Professeur Youssao Issaka, je dis merci.

Au Professeur Koutinhouin Benoit et à sa famille je dis merci.

Je remercie le Dr Dahouda Mahamadou pour son assistance permanente.

Je remercie le Dr Dossou Katina Sylvestre pour son soutien indéfectible.

Je remercie mes collaborateurs de grande qualité qui ont été très déterminants pour la réalisation de ce travail. Il s'agit des Ir Sessou Philipe, Frédéric Faïzoun et Mr François Dossa qui ont participé avec beaucoup de motivation aux divers travaux de recherches.

Je remercie mon collègue Yehouénou Boniface pour sa disponibilité et sa contribution précieuse.

Je remercie Bani Bio pour son accueil chaleureux lors de la collecte des données à Parakou.

Je remercie mes amis, Woroucoubou Habibou, Dr Azon Aimé, Corrado Boyi, Sambieni Emmanuel, Adégbola Romaric, Glèlè Stéphanie, Sarah, Shifaou pour leur soutien.

Je remercie tous les éleveurs de pintades du département du Borgou qui ont spontanément adhéré à ce projet de recherche et l'ont soutenu en étant motivés et disponibles au cours des travaux de terrain.

Je remercie le Dr Elie Montchowui, Dr Adjolohoun Sébastien, Dr Babatoundé Sévérin, Mr Houndonougbo Venant pour leur collaboration.

J'ai un profond souvenir pour les regrettés Bruno Michiels et André Buldgen, qui m'ont donné l'opportunité de travailler dans les projets FSA5. Leur passage au Bénin restera gravé dans ma mémoire.

Je voudrais aussi exprimer mes sincères remerciements à Didier Woirin pour sa contribution précieuse.

Je ne peux terminer sans remercier la famille Dossa, pour son soutien moral et son sacrifice.

Résumé

L'évaluation de la pathogénicité des différents sérotypes de l'espèce *Salmonella enterica* isolés dans les élevages de pintade (*Numida meleagris*) dans plusieurs communes du département du Borgou au Nord-Est du Bénin est le sujet majeur de ce projet de recherche.

Dans la première partie du travail, le contexte et les objectifs de l'étude sont présentés ainsi qu'une synthèse bibliographique des contraintes techniques et sanitaires de l'élevage de la pintade en Afrique subsaharienne. Cette partie met en exergue les contraintes qui limitent la production de la pintade en élevage traditionnel africain en général et béninois en particulier.

La deuxième partie du manuscrit regroupe les résultats de trois études. La première qui a été conduite dans plusieurs élevages situés dans le Nord-Est du Bénin (Département du Borgou) avait pour objectifs (i) d'établir un lien entre le système d'élevage traditionnel et les pourcentages de morbidité et mortalité des pintadeaux, et (ii) d'identifier les facteurs non biologiques et biologiques responsables de la mortalité des pintadeaux. L'élevage de la pintade est basé sur un élevage en liberté dans lequel les animaux divaguent pendant la journée à la recherche de nourriture et d'eau, puis passent la nuit dans des bâtiments surpeuplés. Les œufs sont retirés des pintades, juste après la ponte, de telle sorte qu'elles poursuivent la ponte sans interruption. Les œufs sont incubés et les pintadeaux sont élevés par des poules « mères de substitution » présentes dans les mêmes élevages. Naturellement, ce système d'élevage prédispose à l'apparition et à la diffusion des maladies parasitaires et microbiennes, avec un taux de mortalité (+/- 70 %) influencé par la pluviométrie mensuelle et le rythme circadien de la température. Aucun signe clinique, ni aucune lésion macroscopique observée lors des autopsies n'ont pu être mis en relation avec une maladie parasitaire ou bactérienne spécifique. En conséquence, à l'exception de *Salmonella enterica*, les bactéries isolées représentaient des bactéries d'invasion post mortem et/ou des pathogènes secondaires et les espèces d'helminthes identifiées étaient de faible pathogénicité. En conclusion, la réussite de la pratique de l'élevage de la pintade dans le système en liberté passe par l'amélioration des conditions d'hygiène, tels que le logement, la densité des animaux dans les logements, les conditions d'alimentation et d'abreuvement.

La deuxième étude concerne l'identification des salmonelles isolées à partir des pintadeaux morts dans ces élevages traditionnels et la mise en évidence de leur virulence. Une série d'analyses (biotypage, sérotypage, pulsotypage, virulotypage, profils plasmidiques, sensibilités aux antibiotiques et pathogénicité *in vivo*) a été réalisée sur ces souches de salmonelles. Au cours de chacune des quatre années de l'enquête (2007 à 2010), *Salmonella enterica* fut isolée de +/- 15 % des pintadeaux autopsiés. Quinze sérotypes différents ont été mis en évidence parmi 66 souches isolées au total. Parmi les sérotypes identifiés, cinq (Farakan, Kingston, Legon, Oakland and Sangalkam) se sont révélés plus fréquents et furent aussi isolés de matières fécales des pintades pondeuses et des poules « mères de

substitution ». Cette étude a donc permis de montrer que la poule couveuse peut jouer un rôle déterminant dans la transmission des souches de *Salmonella enterica* qui représentent une menace potentielle non seulement pour la santé des pintadeaux, mais aussi pour les populations humaines de l'aire d'étude auxquelles est destinée la production de viande de volaille.

La comparaison des souches de ces cinq sérotypes par biotypage, pulsotypage et virulotypage a montré leur grande homogénéité à l'intérieur de chaque sérotype, avec des variations observées pour quelques souches de sérotypes Kingston, Legon et Oakland dans le biotypage et seulement pour le sérotype Oakland dans le pulsotypage qui présentait deux profils PFGE différents, mais proches. Ces deux profils PFGE du sérotype Oakland étaient reliés aux biotypes observés jusqu'à un certain point. Toutes ces souches hébergeaient la majorité des gènes de virulence recherchés par PCR. Cependant le gène *ssaU* ne fut pas détecté dans une souche des sérotypes Farakan, Kingston et Sangalkam et dans près de la moitié (11/27) des souches du sérotype Oakland. De plus, les gènes *sitC* et *spaI* ne furent pas détectés dans une de ces 11 souches du sérotype Oakland. Aucune relation ne fut cependant observée entre les deux profils PFGE et les deux virulotypes principaux du sérotype Oakland, mais bien avec la commune d'origine et l'année d'isolement, comme pour les quatre autres sérotypes.

Par ailleurs, la pathogénicité de cinq sérotypes de *Salmonella enterica* (Farakan, Kingston, Legon, Oakland et Teshie) isolés de pintadeaux au cours des deux premières années de l'enquête (2007 et 2008) a été expérimentalement évaluée par administration par voie orale à 25 groupes de 18 pintadeaux âgés de deux semaines de 0,5ml de bouillons de culture titrant de 10^4 à 10^8 CFU/ml. Des signes cliniques ont été observés dans tous les groupes à l'exception des pintadeaux inoculés à l'aide du sérotype Teshie à 10^4 CFU/ml, bien que de façon moins sévère que les signes cliniques observés lors des enquêtes de terrain. Les scores cliniques étaient significativement ($p < 0.05$) plus élevés avec les plus hautes concentrations d'inoculum à l'intérieur de chaque sérotype, mais différaient entre les sérotypes. Sept cas de mortalités ont été observés uniquement avec les sérotypes Legon et Oakland. L'excrétion fécale de *Salmonella enterica* a été effective avec tous les sérotypes au 7^{ème} jour après inoculation et/ou au 15^{ème} jour après inoculation avec les concentrations 10^6 , 10^7 et/ou 10^8 CFU/ml. *Salmonella enterica* a été également isolée des caeca de deux pintadeaux sacrifiés dans chaque groupe au 15^{ème} jour après inoculation aux concentrations d'inoculum de 10^7 et 10^8 CFU/ml (à l'exception du sérotype Teshie), mais d'aucun prélèvement de sang du cœur et d'un seul prélèvement de foie.

Pour ce qui concerne l'antibiogramme, seule l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole était efficace contre toutes les souches. La majorité des souches montraient aussi des résistances aux β -lactames et autour de 15% aux antibiotiques suivants : ampicilline, oxacilline, cefuroxime, sulfaméthoxazole, colistine, acide nalidixique, flumequine. Ces profils de résistance pourraient être associés à la présence de plasmide(s) de tailles entre 2,5 et 60 MegaDalton dans 60 des 66 souches. Dès lors, le but de la troisième étude était la recherche d'une alternative thérapeutique basée sur les activités antimicrobiennes de plantes médicinales locales. Ainsi, les compositions chimiques et les activités

antibactériennes des huiles essentielles extraites de feuilles fraîches d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* sur *Salmonella enterica* sérotype Oakland et *Salmonella enterica* sérotype Legon, deux bactéries impliquées dans la mortalité de pintades dans les élevages au Nord du Bénin, ont été identifiées et déterminées. Suite à une extraction par hydrodistillation et une analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) et Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/SM), les composés majoritaires identifiés étaient respectivement : pour *Ocimum basilicum* l'estragole (31,3 %), le linalol (24,0 %) et l'eugénol (21,7 %) et pour *Ocimum gratissimum*, le thymol (43,4 %), le para-cymène (12,3 %) et le γ -terpinène (12,1 %). Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) déterminées pour les deux huiles variaient respectivement de 8.10^{-3} mg/ml à 18.10^{-3} mg/ml et de 16.10^{-3} mg/ml à 144.10^{-3} mg/ml, ce qui démontre que les deux huiles possèdent une activité contre les deux sérotypes étudiés de *Salmonella enterica*.

En conclusion, cette étude révèle que les salmonelles isolées de pintadeaux dans des élevages du département du Borgou dans le Nord Est du Bénin sont bien pathogènes, mais que la salmonellose seule n'est pas une cause majeure de mortalité de ces pintadeaux. Cette mortalité des pintadeaux est d'origine multifactorielle (système d'élevage, agents pathogènes, conditions climatiques, ...) agissant en synergie pour favoriser l'apparition et le développement des maladies dont la salmonellose. L'impact respectif de ces différents facteurs sur la production de la pintade en milieu villageois devra être précisé lors d'études ultérieures pour améliorer la qualité et le rendement de ce système traditionnel d'élevage, ainsi que l'activité *in vivo* contre *Salmonella enterica* des huiles essentielles extraites de feuilles fraîches d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum*.

Summary

The pathogenicity assessment of the *Salmonella enterica* serotypes isolated in rural Guinea fowl (*Numida meleagris*) breeding farms in several townships of the department of Borgou in North East Benin is the major topic of this research project.

In the first part of this work, the objective and the context of the study are described followed by a literature review on the sanitary and technical constraints of the Guinea fowl production in sub-Saharan Africa. This chapter highlights the most important constraints limiting the production of Guinea fowl in the traditional raising system in Africa rural areas, particularly in Benin.

The second part of the manuscript presents the results of three studies. The purpose of the first one that was conducted in the Borgou department in North East Benin was (i) to correlate the traditional farming systems with the keet morbidity and mortality rates; and (ii) to identify non-biological and biological factors responsible for keet death. The scavenging farming system is the basis of the Guinea fowl farming and breeding system with all poultry divagating during daytime searching for food and water and with overnight housing in overcrowded coops. The eggs are taken away from the laying Guinea fowls so that they can continue to lay eggs without any interruption. The eggs are subsequently incubated and the newborn keets, raised by surrogate hens from the same farm. This traditional farming system therefore exposes the young keets to the onset and spreading of microbial and parasitic diseases, with a mortality rate (ca. 70 %) also influenced by the monthly rainfall and the circadian rhythm of temperature. None of the clinical signs or organ lesions at necropsy was specific to any microbial or parasitic disease. Accordingly, with the exception of salmonellae, the isolated bacteria represented post-mortem invaders and/or secondary pathogens and the helminth species identified were of low pathogenicity. In conclusion, the Guinea fowl farming and breeding within the scavenging system can only be successful after improvement of hygienic parameters, such as housing, crowding, feeding and watering conditions ...

The second study was carried out to identify the *Salmonella enterica* isolates from dead keets, their virulence properties and their relatedness following a series of tests (biotyping, serotyping, pulsotyping, virulotyping, plasmid profiles, antibiotic sensitivity patterns, and *in vivo* pathogenicity). During each of the four sampling years (2007 to 2010) *Salmonella enterica* was isolated from about 15% of necropsied keets. Fifteen different serotypes were identified amongst the 66 isolates and five of them (Farakan, Kingston, Legon, Oakland and Sangalkam) were not only most frequent, but also isolated from faecal samples of laying Guinea fowl and surrogate hen mothers. Surrogate hens may therefore play an important role in the transmission of *Salmonella enterica* that represents a permanent

potential threat not only for keets, but also for humans via consumption of poultry meat in the study area.

The comparison of the isolates belonging to these five serotypes by biotyping, pulsotyping and virulotyping highlighted their high degree of homogeneity within each serotype with variation observed for a very few Kingston, Legon and Oakland serotype isolates in biotyping and for only the serotype Oakland in pulsotyping, with two different but related PFGE profiles. The two PFGE profiles of the serotype Oakland were to some extent associated to the different biotypes. All isolates harbored most of the virulence genes that were tested by PCR. Nevertheless, the *ssaU* gene was not detected in one isolate of the serotypes Farakan, Kongston and Sangalkam and in almost half of the isolates (11/27) of serotype Oakland. Furthermore, the genes *stiC* and *spaI* were not detected in one of these 11 isolates of serotype Oakland. No relationship was present between the two PFGE profiles and the most frequent two virulotypes of serotype Oakland or the host, but well with the township and year of isolation, as for the other four serotypes.

The pathogenicity of five *Salmonella enterica* serotypes (Farakan, Kingston, Legon, Oakland, Teshie) isolated from Guinea fowl in Benin during the two first years of the survey (2007 and 2008) was experimentally assessed by oral challenge of 25 groups of 18 two week-old keets using 0.5 ml of 10^4 to 10^8 CFU/ml of overnight broth culture. Clinical signs were observed in all groups, except in keets inoculated with serotype Teshie at 10^4 CFU/ml, though they were less dramatic to those observed during the field surveys. Clinical scores were significantly higher ($p < 0.05$) at the highest inoculum concentrations within each serotype, but were different between serotypes. Seven deaths were recorded, only with serotypes Legon and Oakland. *Salmonella enterica* was isolated from faeces with all serotypes at day 7 and/or day 15 post-inoculation at the inoculum concentrations of 10^6 , 10^7 and/or 10^8 CFU/ml. *Salmonella enterica* was also recovered from the caeca of two keets of each group sacrificed at day 15 post-inoculation at the inoculum concentrations of 10^7 and 10^8 CFU/ml (except with serotype Teshie), but not from the heart blood and only once from the liver samples.

The association thrimetoprim-sulfamethoxazol was the only antibiotics that were active against all of the isolates. Conversely the majority of isolates have clinical resistance levels to β -lactams and about 15% to ampicillin, oxacillin, cefuroxim, sulfamethoxazol, colistin, nalidixic acid, flumequine. This resistance profile may be correlated with the presence of plasmid band(s) from 2.5 to 60 MegaDalton in 60 out of 66 isolates. Therefore the purpose of the third study is to study of alternative antimicrobial therapeutic options using local medicinal plants. The study determined the chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils extracted from fresh leaves of *Ocimum basilicum* and *Ocimum gratissimum* against *Salmonella enterica* serotype Oakland et *Salmonella enterica* serotype Legon two bacteria implied in the Guinea fowl mortality in the north of Benin breedings. After extraction by hydrodistillation and analysis by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS), the major components identified were respectively: for *Ocimum*

basilicum, estragole (31.3 %), linalol (24.0 %) and eugenol (21.7 %) and for *Ocimum gratissimum*, thymol (43.4 %), para-cymene (12.3 %) and γ -terpinene (12.1 %). The Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) and the Minimal Bactericide Concentrations (MBC) of the two essential oil extracts varied respectively from 8.10^{-3} mg/ml 18.10^{-3} mg/ml and from 16.10^{-3} mg/ml to 144.10^{-3} mg/ml confirming their activity against the two studied serotypes of *Salmonella enterica*.

In conclusion this study reveals that the salmonellae isolated from keets in rural Guinea fowl breeding farms in the Borgou department in North East Benin are pathogens, but that salmonellosis alone is not any major cause of the keet mortality. Keet mortality is associated with several factors (breeding system, pathogen agents, climatic conditions ...) that act in synergy to create favorable conditions for different disease outbreaks, including salmonellosis. The respective impact of these different factors on rural Guinea fowl production must be specified in future studies to improve the quality and efficiency of the traditional breeding and farming system, as much as the *in vivo* activity against *Salmonella enterica* of the essential oil extracts from fresh leaves of *Ocimum basilicum* and *Ocimum gratissimum*.

Liste des abbreviations

CDT 3 : Cytolethal Distending toxin type 3

CECODEL : Centre de Coopération au Développement

CFU : Colony Format Unit

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inibitrice

CNF 2 : Cytotoxic Necrotizing Factor type 2

EPAC: Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation

LAPHE : Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles

LERCA : Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie Appliquée

MAEP : Ministère de l'Agriculture de l'Elevage et de la Pêche

MBC : Minimal Bactericide Concentration

MIC : Minimal Inhibitory Concentration

PCR : Polymerisation Chain Reaction

Projet FSA5 : Projet de Recherche-Développement en faveur de l'élevage dans le Borgou

SAS: Statistical Analysis system

UAC : Université d'Abomey-Calavi

UE : Union Européenne

UFC : Unité Formant Colonie

Première partie : Introduction générale et synthèse de la littérature

1.1. Introduction générale

L'Afrique sub-saharienne a été et continue d'être confrontée à de nombreux défis, notamment une forte incidence de la sous-alimentation et de la malnutrition. Afin de couvrir le déficit en protéines animales, beaucoup de gouvernements africains ont soutenu le développement de l'élevage des espèces à cycle court de reproduction (volaille, petits ruminants, porcs, lapins) dans l'espoir de fournir aux populations humaines africaines des produits animaux de haute valeur nutritive, à bon marché. En ce sens, ils favorisent en particulier l'élevage de la volaille. Le Bénin n'est pas en marge de cette situation. D'après les statistiques de la Direction de l'Elevage, au Bénin, la volaille constitue la deuxième source de viande, après les bovins, 21 % contre 58 % pour les bovins, 13 % pour les ovins/caprins et 7 % pour le porc (MAEP, 2005). En matière d'aviculture traditionnelle, la mélagriculture (l'élevage de la pintade) occupe une place de choix. Cet élevage est particulièrement plus développé au nord du pays compte tenu de son importance sociale, économique et culturelle dans la vie des populations.

Dans le département du Borgou, au Nord-Est du Bénin, l'élevage de la pintade est conduit suivant un mode traditionnel extensif, caractérisé par l'utilisation de la poule locale pour l'incubation des œufs de pintades et l'accompagnement des jeunes pintadeaux après l'éclosion jusqu'à l'âge de 2 à 3 mois. Malheureusement, le développement de cet élevage subit de nombreuses contraintes. Le souci majeur des éleveurs dans ce système d'élevage est qu'ils enregistrent un taux de mortalité pouvant atteindre 70 % parmi les jeunes pintades (pintadeaux) de la tranche d'âge de 0 à 3 mois le plus souvent avec, comme signes cliniques, de la frilosité, de la prostration, de la diarrhée blanchâtre et une perte d'appétit (Boko, 2004). Plusieurs facteurs peuvent conduire à ces signes cliniques qu'ils soient physiques, chimiques, mécaniques ou biologiques.

Au Bénin, tout comme dans les autres pays de la zone tropicale, les travaux de recherche sur la pintade locale en milieu tropical sont très limités, sommaires et anciens. Ceux qui existent abordent plus les paramètres zootechniques et de reproduction que les aspects sanitaires. Il y a presque 20 ans qu'au Bénin, une séroprévalence de 22 % a été rapportée sur la salmonellose à *Salmonella Gallinarum* de la pintade locale (Chrysostome *et al.*, 1993).

De plus, dans les élevages de pintades au nord du Bénin, certains éleveurs utilisent des antibiotiques dans les traitements des sujets malades sans aucun diagnostic préalable et en fonction des molécules disponibles sur place en ce moment. Or l'utilisation des antibiotiques sans un diagnostic précis peut être à l'origine d'échecs thérapeutiques majeurs et d'acquisition de résistances aux antibiotiques, ce qui peut aussi être préjudiciable au développement de cet élevage. D'autres éleveurs, du fait de leur faible pouvoir d'achat, ou pour des raisons de difficultés d'approvisionnement en produits

pharmaceutiques dans les zones reculées, utilisent les vertus supposées mais non prouvées scientifiquement, des plantes locales pour traiter les animaux.

Au regard de cette situation, des travaux préliminaires ont été réalisés en 2001-2002. Dans 15 élevages situés dans un rayon de 10 km autour de Parakou dans le Département du Borgou (Nord – Est Bénin), 568 pintadeaux ont été suivis. Au cours de ce suivi, deux actions principales ont été menées. D'une part, l'utilisation d'un vermifuge (LEVALAP, 20 % de chlorhydrate de levamisole) par voie orale et d'autre part, l'isolement de bactéries présumées pathogènes à partir des pintadeaux morts. Il ressort de ces travaux que : i) les pintadeaux de 0 à 2 mois présentent une proportion plus importante de mortalité que les sujets âgés de plus de 2 mois et *Escherichia coli*, et *Salmonella* sp ont respectivement été isolés chez 30 % et 12 % des sujets de 0 à 2 mois morts dans les élevages ; ii) les mortalités ont une origine multifactorielle: maladies-inanition, vols, accidents d'élevage, suspicion d'intoxication ; iii) la vermifugation a permis de réduire de moitié le nombre d'œuf par gramme de matière fécale d'*Ascaridia* sp et de *Syngamus* sp. Ces deux genres de parasites sont les plus prévalents dans les élevages selon les travaux réalisés en élevage villageois de pintades par Chrysostome *et al.* (1997).

Profitant des travaux d'un assistant de recherche au Service de Bactériologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège, 81 souches d'*E. coli* isolées ont ensuite été testées par séro-agglutination pour vérifier la présence des sérotypes (O1, O2, O78) qui sont fréquemment isolés en Europe d'élevage de volailles (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). Par ailleurs, parmi les 81 souches, 15 ont été testées par « Polymerisation Chain Reaction (PCR) » pour la présence de quelques facteurs de virulence classiques des souches envahissantes d'*E. coli*: Cytotoxic Necrotizing Factor type 2 (CNF2) (toxine), Cytolethal Distending toxin type 3 (CDT3) (toxine), PapA (adhésine), Afa8 (adhésine). Aucune souche ne s'est révélée positive à l'issue de ces deux séries de tests (travail non publié).

Depuis cette étude préliminaire, force est de constater que la situation sanitaire des pintadeaux n'a pas connue une véritable amélioration par rapport au taux élevé de mortalité. C'est pour apporter notre contribution aux efforts de développement de cet élevage que nous avons choisi de mener des études à plus grande échelle sur les élevages du Borgou en ciblant les bactéries du genre *Salmonella*, quitte à envisager par la suite, d'autres pistes de recherches complémentaires (*E. coli*, Parasites, virus, mycoplasmes).

1.2. Objectifs de ce travail

Le principal objectif de cette thèse est donc d'évaluer le rôle joué par les infections à *Salmonella enterica* dans les mortalités observées chez les pintades au Bénin (département du Borgou) entre 0 et 2 mois d'âge, et d'évaluer l'effet antibactérien potentiel des plantes couramment utilisées par les éleveurs.

Plus spécifiquement, l'étude vise à :

- Evaluer les contraintes sanitaires liées à l'élevage de la pintade locale dans le département du Borgou au Bénin ;
- Isoler et identifier les bactéries et parasites chez les pintadeaux et pintades morts ;
- Comparer au niveau bactériologique et moléculaire les souches de salmonelles isolées dans la zone d'étude ;
- Evaluer la virulence des souches de salmonelles isolées par inoculation expérimentale ;
- Tester *in vitro* sur les salmonelles, l'efficacité des extraits de plantes médicinales telles que *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum*.

1.3. Article de synthèse : Contraintes techniques et sanitaires de la production traditionnelle de pintade en Afrique subsaharienne

Soumis pour publication dans les Annales de Médecine Vétérinaire

Boko K. C.^{1, 2*}, Kpodekon T. M.¹, Dahouda M.³, Marlier D.⁴, Mainil G. J.²

¹Université d'Abomey-Calavi, Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Département de Production et Santé Animales/Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, 01 BP 2009, Cotonou, République du Bénin

²Université de Liège, Faculté de Médecine vétérinaire, Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires (Service de Bactériologie), 20, Boulevard de Colonster, Bâtiment B43a, 4000 Liège, Belgique

³Université d'Abomey-Calavi, Faculté des Sciences Agronomiques, Département des Productions Animales, BP 526, Cotonou, République du Bénin.

⁴Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département-clinique des animaux de compagnie et des équidés/Médecine des oiseaux, des lagomorphes et des rongeurs, Boulevard de Colonster, 20, bâtiment B42, 4000 Liège, Belgique, Belgique.

* adresse de correspondance : cyrilleboko@yahoo.fr

Résumé

Des travaux relatifs à l'élevage de la volaille locale, particulièrement la pintade de l'Afrique subsaharienne, ont été passés en revue afin de mieux en cerner les principales contraintes.

Parmi les difficultés rapportées, les contraintes techniques et sanitaires sont celles qui ont un effet négatif sur la productivité de la pintade. L'élevage du poulet et de la pintade est intimement lié dans le mode d'élevage extensif adopté dans la zone. Sur le plan sanitaire, la maladie de Newcastle, les salmonelloses et les colibacilloses ont été évoquées. La maladie de Newcastle affecte principalement les poulets et secondairement la pintade. Une sero prévalence à *Salmonella* Gallinarum de 5,8 % à 22,33 % a été rapportée respectivement pour le poulet et la pintade, témoignant ainsi que cette souche circule dans les élevages traditionnels bien que les valeurs soient faibles comparativement aux valeurs observées sur les mêmes espèces exotiques. L'importance des infestations parasitaires a été également signalée. L'application des mesures préventives, le respect des règles d'hygiène dans l'élevage et l'amélioration de l'alimentation permettraient d'augmenter la productivité de ces espèces de volaille traditionnelle.

Mots clés : Poulet, Pintade, Afrique Subsaharienne, *Salmonella* Gallinarum, maladie de Newcastle

Sanitary and technical constraints in rural guinea fowl production in sub-saharan region of Africa

Summary

Constraints against rural poultry (chickens, and guinea fowl) in sub-Saharan scavenging breeding were reviewed. In the both species, lower productivity is associated to technical and sanitary constraints. Guinea fowl breeding is intimately depending on poultry breeding in the scavenging system in the area.

On a sanitary point of view, colibacillosis, salmonellosis and Newcastle have been reported. Newcastle disease most affects chickens than guinea fowl. *Salmonella Gallinarum* seroprevalence reached 5,8 to 22,33% in both species. This suggests the presence of this strain in rural breeding, although the prevalence was lower than the values observed in the same exotic species. The importance of parasitic infestations was also reported.

In order to increase productivity in rural poultries, feed improvement, hygienic and sanitary preventive program have to be applied.

Key words: Chickens, Guinea fowl, Sub-Saharan Africa, *Salmonella Gallinarum*, Newcastle disease.

1. INTRODUCTION

L'alimentation des populations Africaines reste déficitaire en protéines animales malgré l'augmentation de la production des ruminants dans les pays de l'Afrique au sud du Sahara et l'importation massive des viandes. Cette situation serait imputable à l'avancée démographique dans les pays concernés (Faye et Alary, 2001). Les gouvernements promeuvent ainsi le développement de la production des animaux à cycle court en l'occurrence la volaille. Mais malgré ces efforts soutenus en faveur du développement du secteur de l'élevage, la consommation de produits avicoles reste encore fortement tributaire des importations, notamment en provenance de l'Union Européenne (U.E) et du Brésil (Horman, 2004).

L'aviculture familiale est très importante dans les pays économiquement faibles et à déficits vivriers d'Afrique, d'Asie, d'Amérique Latine et du Pacifique du Sud. Elle représente un moyen d'épargne, d'investissement et d'assurance pour les petits fermiers et procure une source de revenus aux populations rurales (Sonaiya et Swan, 2004). Elle constitue une source de revenus réguliers et facilement mobilisables pour l'acquisition de nourriture en cas d'insuffisance de récoltes. La surveillance et l'entretien des volailles sont assurés par les femmes, avec souvent l'aide des enfants. Cette activité représente un emploi durant la saison morte de cultures (Gueye, 2005) et est considérée comme une source majeure de revenus pour les fermiers marginalisés, sans terre, et les femmes en particulier (Guèye, 2000 ; Rashid, 2003).

En matière d'aviculture, le volet « élevage de la pintade ou méléagriculture » est d'une importance particulière. La pintade est couramment offerte comme cadeau à un étranger, à la belle famille et est utilisée lors des sacrifices rituels (Belco, 1985). Au Bénin, la couche socio-culturelle Bètammaribè utilise la pintade lors de son festival annuel (Dahouda, 2003). La conduite de l'élevage de la pintade est assurée par les femmes des ménages, mais, officiellement, ce sont les hommes qui sont les propriétaires des animaux. Cette situation permet de résoudre plus aisément les conflits qui peuvent surgir au sujet de l'origine des œufs pondus dans un même nid par des pintades appartenant à différents élevages car, de manière générale, les conflits sont arbitrés par les hommes. Du point de vue nutritionnel, la pintade représente des sources potentiellement importantes de protéines animales (Agwunobi et Ekpenyong, 1990 ; Ayorinde, 1991 ; Mallia, 1999). Un rendement carcasse intéressant (70,4 % à 56 semaines d'âge) a été obtenu à partir de la pintade locale élevée en station au Burkina Faso dans les conditions améliorées par rapport au milieu villageois (Sanfo *et al.*, 2008). L'élevage de la pintade ne fait pas l'objet d'un interdit mais malheureusement, son développement connaît des obstacles.

Ce travail vise à faire l'inventaire des principales contraintes techniques, et sanitaires majeures contribuant à la faible productivité de la pintade en vue de leur levée.

2. PRESENTATION DE LA PINTADE

2.1 Caractéristiques zoologiques de la pintade

La pintade appartient à l'ordre des Galliformes, à la famille des *Phasianideae*, sous-famille des *Numideae* qui regroupe 4 genres, dont *Numida*. *Numida meleagris galeata*, la pintade commune ou pintade à caroncule rouge, constitue l'espèce principale et la plus domestiquée de l'Afrique (Ayeni, 1983; Ayorinde, 1991; Le coz Doin, 1992). Le climat qui convient le mieux à cette espèce est de type chaud, sec et ensoleillé. De même, elle préfère un sol sablonneux (Le coz Doin, 1992).

L'élevage de la pintade s'est d'abord répandu dans toute l'Afrique sous forme d'élevage fermier (Nwagu et Alawa, 1995), puis s'est étendu par la suite en Europe, en Asie et en Amérique. Sa production industrielle s'effectue en Europe, en Amérique du Nord et en Australie, à l'aide des souches issues d'une sélection génétique caractérisée par de meilleures performances (vitesse de croissance rapide) comparativement à la souche originelle d'Afrique. Les souches adaptées à la zone de l'Afrique au sud du Sahara sont celles appartenant à la variété de grande taille (2 à 2,5kg de poids vif à l'âge adulte) dans la zone sahélienne, à la variété de taille moyenne (0,9 à 1,2 kg) dans la zone soudanienne et à la variété de petite taille (moins d'un kg) dans la zone soudano-guinéenne. Ces souches sont qualifiées de rustiques, car elles n'ont fait l'objet que d'une sélection génétique naturelle. Elles sont caractérisées par une vitesse de croissance très lente.

2.2 Mœurs comportementales de la pintade

La pintade vit en générale en bandes grégaires, mais forme, au moment de la reproduction, des couples isolés. Quand elle panique, elle est bruyante et se réfugie dans un endroit obscur ou sur les perchoirs, et s'immobilise. Elle provoque des dégâts aux cultures à cause de sa préférence alimentaire pour les végétaux. Pour s'alimenter, elle ne gratte pas le sol de ses pattes comme le fait le poulet, mais utilise son bec pour déchirer brusquement. Ceci entraîne aussi un gaspillage des aliments farineux dans la mangeoire (Le coz Douin, 1992). La pintade est par ailleurs très habile dans la chasse aux insectes qui font partie de son alimentation quotidienne complémentaire (Ayeni, 1983).

3. L'ELEVAGE DE LA PINTADE EN MILIEU TRADITIONNEL AFRICAIN

L'aviculture traditionnelle est en général basée sur l'exploitation de petits effectifs de volailles locales constituées en majorité de poulets et pintades, accessoirement de dindons, de canards, pigeons dans la basse-cour. Chez la plupart des familles, la taille des troupeaux de volailles varie de 5 à 95 sujets, avec 5 à 20 adultes (Kabatange et Katule, 1990; Traoré, 1997; Guèye, 2003).

3.1 Contraintes techniques

3.1.1. Mode d'élevage et habitat

Le système d'élevage le plus répandu est le mode traditionnel qui est intégré aux systèmes agropastoraux en tant qu'activité secondaire. L'élevage est du type extensif et pratiqué en totale liberté autour des concessions, sans distinction d'âge ou d'espèces (poules, pintades), et selon les techniques d'élevage rudimentaire. La taille des troupeaux est en général réduite et se situe entre 9 et 18 adultes en moyenne (Laurenson, 2002).

L'élevage de la pintade est intimement lié à celui de la poule. En effet, les mauvaises performances de couveuse et de meneuse de la pintade font que ses œufs sont récupérés par les éleveurs dès leur ponte puis confiés aux poules qui en assurent l'incubation, ainsi que la conduite des pintadeaux jusqu'à l'âge de 2 à 3 mois, moment à partir duquel la jeune pintade cesse de suivre la poule meneuse. Cette pratique s'observe dans la plupart des pays de l'Afrique au sud du Sahara, même si certains éleveurs utilisent la pintade elle-même comme couveuse (Bessin et al.1998; Maganga et Haule, 1998; Brancaert et Gueye, 1999; Kitanyi, 1999; Obun, 2004, Saina, 2005). Dans ce système d'élevage, les animaux sont en divagation durant la journée et passent les nuits dans des abris sommaires ou dans la cour sur tout objet pouvant leur servir de perchoir (Bengaly, 1997). Dans ces abris (habitats) sommaires, les règles d'hygiène sont pratiquement absentes. Le nettoyage du plancher du poulailler se fait une fois l'an par exemple. Par ailleurs, le chauffage de l'habitat n'est pas assuré par les éleveurs. Or, les jeunes poussins tout comme les pintadeaux ont besoin d'une température optimale pour leur développement, leur système de thermorégulation étant inefficaces pendant les premières semaines de la vie. Ce n'est que vers l'âge de 30 jours que celui du pintadeau devient efficace (Le Coz Douin, 1992). La fourchette de température appropriée dans l'atmosphère d'un poulailler est de 27-29°C (Le Coz Douin, 1992).

D'autres contraintes sont l'hétérogénéité et la densité des bandes d'oiseaux appartenant à un même éleveur. En effet, poussins, poules adultes, pintadeaux et pintades passent la nuit dans un même local. Un tel environnement pose le problème du non respect de la densité requise autorisant une circulation équitable de l'air à l'intérieur du local. On peut ainsi observer plus de 50 oiseaux au mètre carré contre la norme de 22 oiseaux au mètre carré, couramment utilisée en cages de ponte de type commercial (Sonaiya et Swan, 2004). Ce non respect des normes zootechniques et hygiéniques vont conduire sans doute à une baisse de la productivité numérique des pintades et poules.

Dans les conditions pré-citées, les animaux sont aussi exposés aux prédateurs qui circulent la nuit, les serpents et les musaraignes notamment.

3.1.2. Reproduction

Dans ce système d'élevage en liberté, le sex ratio moyen couramment observé est de 3 sujets femelles pour un mâle et la ponte commence entre 7 et 8 mois d'âge. La pintade connaît une ponte saisonnière

(Ayorinde, 1991). Elle a lieu au cours de la période de la saison des pluies (Avril-octobre) lorsque les animaux disposent de toute une diversité de végétaux et d'insectes pour se nourrir (Ayeñi, 1983; Maganga et Haule, 1998). Ce qui montre que cet élevage a des limites. La période de ponte de la pintade au cours d'une saison est de 25 à 32 semaines, dans les conditions tropicales, alors qu'elle atteint 40 semaines dans les zones tempérées. La production d'œufs en une saison de ponte peut varier de 50 à 180, avec une moyenne de 75-80 œufs par femelle (Sanfo *et al.*, 2007; Dahouda *et al.*, 2008a; Kondombo, 2008; Moussa Amadou *et al.*, 2010). Le sexage reste un problème avec la pintade tout comme l'ont rapporté Teye et Adam (2000) dans une enquête réalisée à Damongo au Ghana. Bien que, en général, la tête du mâle soit plus grosse, sa protubérance cornée plus développée, et ses barbillons, turgescents et écartés, ces différences sont toutefois légères (Le Coz Douin, 1992 ; Umosen *et al.*, 2008). Cette difficulté de sexage fait qu'il existe des troupeaux où le nombre de pintades femelles dépasse largement le ratio de 3 pour 1 comme indiqué ci-dessus. Dans ces conditions, la probabilité de produire des œufs non fertiles est élevée, ce qui diminue d'autant la productivité de la pintade dans ces élevages.

3.1.3. Incubation des œufs de pintade

En zone rurale, la majorité des éleveurs utilisent la poule locale pour l'incubation des œufs de pintade avec une durée d'incubation variant entre 26 et 28 jours à une température de 37°C (Laurenson, 2002 ; Obun, 2004 ; Saina *et al.*, 2005; Sanfo *et al.*, 2007). Chaque couvée comprend de 15-20 œufs (Maganga et Haule, 1998; Laurenson, 2002). Le taux d'éclosion fréquemment obtenu dans ces élevages varie de 71 à 92% (Laurenson, 2002; Saina *et al.*, 2005 ; Moussa Amadou *et al.*, 2010). Une étude, réalisée sur la pintade locale au Nigéria, a révélé qu'il existe des facteurs affectent la fertilité et l'éclosabilité des œufs de la pintade (Nwagu, 1997). Cet auteur a indiqué que de sévères déficiences nutritionnelles de la pintade femelle, comme par exemple la biotine, la vitamine A et E, l'acide pantothénique sont à l'origine d'un retard de développement ou d'une mortalité au troisième jour d'incubation des pintadeaux. Les mauvaises manipulations des œufs et conditions de stockage, de température, d'humidité et/ou de ventilation, de même que les problèmes de sex ratio et de maturité des reproducteurs sont également considérés comme des facteurs dont il faut tenir compte pour optimiser la fertilité des œufs, poursuit le même auteur. Un sex ratio de 2 femelles pour 1 mâle a été indiqué au Bénin (Laurenson, 2002), alors que ce paramètre est de 3 femelles pour 1 mâle au Burkina Faso en élevage traditionnel (Hien *et al.*, 2001; Sanfo *et al.*, 2007). Toutefois du fait de la difficulté liée au sexage de la pintade, des éleveurs enregistrent des femelles dont le nombre peut être 2 ou 3 fois supérieur à la valeur indiquée dans le sex-ratio précédent. Ce qui serait sans doute à l'origine d'une baisse de la fertilité des œufs produits dans ces élevages.

3.1.4. L'alimentation et l'abreuvement

Dans ce système d'élevage en totale liberté, les éleveurs donnent en général quelques poignées de mil, de sorgho, de maïs et/ou de riz, et des fragments de termitières aux animaux. Cet acte est surtout destiné à domestiquer les animaux en les habituant à revenir à la ferme après leur journée de divagation (Dahouda *et al.*, 2007). La plupart des éleveurs ne disposent pas de mangeoires et/ou abreuvoirs et les aliments sont servis directement à même le sol. Les abreuvoirs disponibles sont constitués le plus souvent des morceaux de canaris (marmites de fabrication locale) ou de morceau de bois sur lequel un creux est aménagé. Les oiseaux s'abreuvent également dans les mares, les marigots ou tout autre point d'eau se situant dans les environs immédiats de leur passage. Les oiseaux divaguent aux alentours des maisons durant la journée, puis élaborent leur alimentation principalement à partir des restes de cuisine, d'insectes et de graines (Kabatange et Katule, 1990; Pandey, 1992, Dahouda *et al.*, 2007 ; Moussa Amadou *et al.*, 2010). Dans ces conditions d'alimentation et d'abreuvement, les animaux sont exposés en permanence aux infections et infestations. Durant la saison sèche, les pintades ont accès au cours de la divagation à des ressources alimentaires de faible qualité (Saina, 2005). Des observations similaires ont été faites au Bénin suite à une étude réalisée sur le contenu du jabot des pintades en élevage traditionnel (Dahouda *et al.*, 2008b). Ce travail a permis non seulement de connaître l'effet de la saison sur le régime alimentaire de la pintade divagante, mais aussi la qualité des aliments ingérés au cours de l'année en fonction des saisons. Pour éviter la concurrence alimentaire entre l'homme (l'éleveur) qui distribue les graines de céréales et les animaux qui les reçoivent, il serait souhaitable d'encourager la stratégie qui consisterait à développer les ressources alimentaires non conventionnelles. Dans cette optique, de récentes études ont été réalisées. C'est ainsi que Dahouda et collaborateurs (2009) ont montré qu'il est possible d'incorporer des quantités significatives de graines de mucuna bouillies ou torréfiées dans l'alimentation des pintades adultes.

3.1.5. Performances pondérales de la pintade

L'intérêt économique de la pintade se mesure au poids à l'abattage, à l'âge d'entrée en ponte, à la quantité d'œufs produite par saison de ponte, à la période d'incubation, à la fertilité des œufs, à l'éclosabilité des œufs et au pourcentage de survie des pintadeaux (Ayorinde *et al.*, 1989, Nwagu et Alawa, 1995). Dans une étude récente au Burkina Faso, il a été rapporté que le nombre de pintades adultes par femelle par an est de $5,3 \pm 1,2$ témoignant la faible productivité de la pintade locale (Sanfo *et al.*, 2007). La souche ayant subi une sélection génétique et bénéficiant d'une alimentation équilibrée peut être abattue à l'âge de trois mois avec un poids vif de 1,5 kg permettant de réaliser ainsi 3 à 4 bandes de pintade de chair par an (Le Coz Douin, 1992). La souche rustique élevée selon le système traditionnel villageois en Afrique au Sud du Sahara pèse 25 à 30g à la naissance pour atteindre 100 à 400 g du 2^{ème} au 3^{ème} mois (Laurenson, 2002; Dahouda *et al.*, 2008a ; Dei *et al.*,

2009). A l'âge adulte, elle dépasse rarement 1500g. Cette observation est en accord avec les travaux de Laurenson, (2002) qui a rapporté un poids moyen de 1231g chez des pintades adultes d'un an dans les conditions d'élevage en divagation. Cette valeur est proche de celles obtenues sur la même souche de pintade mais élevée en station (milieu amélioré par rapport au milieu villageois) et recevant une alimentation formulée et distribuée ad libitum (Oke *et al.*, 2004; Dahouda et al. 2008a ; Sanfo *et al.*, 2008). Ceci suggère que les animaux en liberté auraient probablement réussi à sélectionner des aliments qui leur ont permis d'équilibrer leur ration. Le fait que les animaux élevés en station aient des poids comparables à ceux qui sont élevés en totale liberté montre le système d'élevage en claustration totale présente aussi des limites vis-à-vis de la souche de pintade bien que les aliments utilisés en station soient conformes aux recommandations, de Larbier et Leclercq (1992) et de Sales et Du Preez (1997). Ceci pourrait être associé par le faible potentiel de croissance du matériel animal utilisé en station ou à un problème de consanguinité, ou par le stress lié à la claustration et à la température trop élevée. Malgré ces limites ci-dessus énumérés, il faut cependant reconnaître que l'élevage en milieu contrôlé présente des taux de mortalité plus faibles que ceux obtenus en liberté. Un de taux de mortalité 12 % a été enregistré en milieu contrôlé contre plus de 40 % enregistré en milieu rural sur des sujets de 0 à 6 mois d'âge (Dahouda *et al.*, 2008a).

3.1.6 La prédation et les accidents

Dans le mode traditionnel d'élevage de la volaille en milieu villageois, la prédation compte parmi les contraintes les plus importantes. Au Bénin, les prédateurs fréquemment incriminés dans les élevages des pintades sont : les serpents, les musaraignes, les chiens, les porcs, les cannes, les chats, les lézards (Dahouda *et al.*, 2007). En élevage traditionnel de poulet au Zimbabwe, les prédateurs rapportés sont les rapaces, les chats sauvages, les chiens domestiques, les serpents et les rats (McAinsh *et al.*, 2004). Lors de la divagation certains oiseaux sont également écrasés par des véhicules. D'autre sont tués par des jeunes qui se livrent à la chasse de gibier à l'aide d'un instrument de fabrication artisanale (lance-pierre).

3.2. Principales pathologies infectieuses et parasitaires des pintades en élevage traditionnel

Les conditions générales d'élevage traditionnel des pintades en milieu villageois les exposent à de nombreux agents pathogènes, de nature bactérienne, parasitaire et virale, toutes favorisées par les conditions particulières de nutrition et d'habitat. Sur le plan sanitaire, les poules locales ne sont pas non plus à l'abri des pathologies infectieuses et parasitaires malgré leur rusticité (Dembelé *et al.*, 1996 ; Diabaté, 1987). Ces infections peuvent ensuite être transmises aux pintades.

De manière générale, certaines maladies ont été décrites chez la pintade. On peut citer la maladie de Newcastle, l'entérite transmissible, la maladie foudroyante, la proventriculite, pour les maladies virales ; la salmonellose à *Salmonella Gallinarum* pour les maladies bactériennes; la capillariose dans le groupe des maladies parasitaires (Le Coz Doin, 1992). La situation étant très peu connue en Afrique

au sud du Sahara, seules quelques-unes ont été décrites. En effet, la plupart des études dans le domaine de l'infectiologie ont porté sur les parasites.

3.2.1 Maladies virales :

De plus en plus, des études évoquent les infections liées au virus de la maladie de Newcastle en Afrique au Sud du Sahara.

- **La maladie de Newcastle**

En élevage traditionnel en Afrique au sud du Sahara, la dominante pathologique parmi les maladies virales est de loin la maladie de Newcastle qui affecte la poule (Gueye, 1998). Elle est à l'origine des mortalités atteignant 80-100 % des animaux dans certains élevages. Chez la pintade, la manifestation de cette maladie semble être diversement appréciée. Quelques souches lentogènes circulent dans les élevages de pintades en Europe (Le Coz Douin, 1992). Cette maladie a été diagnostiquée par Durojaye et Adene (1988) sur la pintade locale dans le système d'élevage intensif à Ibadan au Nigéria. Plus tard, dans ce même pays, l'apparition de foyers naturels de cette maladie avec des souches du type vélogène a été rapportée sur la pintade locale (Haruna *et al.*, 1993).

Par ailleurs, des inoculations expérimentales de deux souches cliniques de virus isolées de poules ou de pintades par voie oro-nasale à de jeunes pintadeaux de 4 semaines indemnes d'anticorps anti-virus de Newcastle ont démontré que, bien qu'elle soit sensible à la maladie, la pintade développe des signes cliniques de plus faible intensité par rapport aux poules. De plus, les taux de mortalités enregistrés sont de 50 % chez les sujets infectés à l'aide de la souche isolée chez la poule, mais de 8 % seulement chez les sujets infectés à l'aide de la souche isolée chez la pintade suggérant que cette dernière soit moins pathogène (Mishra *et al.*, 2001).

Les résultats des tests de séroprévalence de cette infection sur les pintades locales en élevage villageois montrent des différences selon le pays : 20 % au Burkina Faso (Bessin *et al.*, 1998), 13 % au Niger et au Bénin (Idi *et al.*, 2001; Boko, 2004). Quant aux poules, les études menées ont révélé que la séro-prévalence se situe entre 60-65 % au Bénin (Chrysostome *et al.*, 1995 ; Dossa *et al.*, 2005) et au Niger (Courtecuisse *et al.*, 1990).

Au total, ces informations autorisent à conclure que la pintade est bien sensible à la maladie de Newcastle, mais à un degré moindre par rapport à la poule, celle-ci payant le plus lourd tribut dans un élevage traditionnel n'ayant pas bénéficié d'une couverture vaccinale. Rappelons que la non disponibilité de poules couveuses et meneuses affecte dangereusement la productivité de la pintade par une forte réduction de la production de pintadeaux.

- **La maladie de Gumboro**

Des études réalisées par rapport à cette maladie dans les élevages traditionnels de volaille dans la sous région Ouest Africaine. En effet, une enquête sérologique a été menée pour déterminer la prévalence

d'anticorps contre la maladie de Gumboro chez des canards et des pintades locales élevés en élevage traditionnel au Nigeria. Le test s'est révélé négatif aussi bien pour les canards que pour les pintades (Mai *et al.*, 2004). En outre, dans ce même pays, un test de susceptibilité de la pintade par rapport à la maladie de Gumboro a été réalisé sur des pintadeaux locaux d'un mois d'âge dans une station de recherche où les oiseaux ont bénéficié des conditions d'élevage meilleures à celles observées en milieu rural (aliment rationné, eau potable et chauffage...). L'inoculum a été administré par voie oculaire. Une légère dépression et un appétit transitoire d'une durée ne dépassant pas 24 heures ont été observés sur 33% des pintadeaux inoculés. Les observations morphométriques révèlent qu'aucune différence significative ($p>0.05$) n'a été observée entre les pintadeaux du groupe contrôle et le groupe des infectés. Il a été conclu que les pintades ne sont pas susceptibles à la maladie de Gumboro, mais peuvent constituer un grand réservoir du virus de cette maladie pour les autres espèces de volaille élevé dans la même basse cour qu'elles (Onyeausi *et al.*, 2009). Par ailleurs, des études de séro-prévalence de cette maladie, conduites sur des poulets locaux dans les élevages traditionnels, ont révélé des prévalences de 47 % au Niger (Courtecuisse *et al.*, 1990) et de 84 % au Bénin (Dossa *et al.*, 2005). Ces études témoignent que les poulets sont plus vulnérables à cette maladie dans les élevages traditionnels.

3.2.2. Maladies Bactériennes

Plusieurs maladies bactériennes ont été décrites chez la pintade, mais la salmonellose et la colibacillose sont considérées comme les pathologies bactériennes les plus fréquemment observées.

- **La salmonellose**

La salmonellose est provoquée par une bactérie du genre *Salmonella*, une bactérie pathogène intracellulaire facultative causant des infections locales ou systémiques et qui appartient à la famille *Enterobacteriaceae*. Selon Grimont et Weill (2007), le genre *Salmonella* comprend actuellement 2500 sérovars appartenant à deux espèces : (1) *Salmonella enterica* qui compte 6 sous-espèces (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*); (2) *Salmonella bongori*. La sous-espèce *enterica* comprend, à elle seule, près de 99 % des souches isolées chez l'homme et les animaux à sang chaud. Cette espèce a la possibilité d'être hébergée par un grand nombre d'hôtes différents (mammifères, oiseaux, hommes) et la faculté de survivre pendant de longues périodes en dehors de l'hôte.

En aviculture, il existe deux types d'infection due à *Salmonella enterica subsp. enterica*: i) les infections par le sérovar spécifique Gallinarum/Pullorum (sans flagelle) responsable de la fièvre typhoïde (Carli *et al.*, 2001 ; Shivaprasad et Barrow, 2008) ; ii) les infections par des sérovars ubiquistes, mobiles, impliqués surtout dans la problématique de l'hygiène des denrées alimentaires (Gast, 2008).

La salmonellose à *Salmonella* Gallinarum/Pullorum se manifeste en aviculture traditionnelle subsaharienne. Elle a été révélée chez les poulets à travers des séroprévalences qui varient de 5,8 %

à 15 % (Bell *et al.*, 1990 ; Courtecuisse *et al.*, 1990 ; Chrysostome *et al.*, 1995 ; Arbelot *et al.*, 1997 ; Mourad *et al.*, 1997). Par contre, très peu de données ont été publiées sur cette salmonellose chez les pintades dans les élevages traditionnels au Sud du Sahara. En effet, au Bénin, Chrysostome (1993) indique une séroprévalence de 22 % de *Salmonella* Gallinarum/Pullorum pour les pintades en milieu villageois, sans qu'un isolement de ce germe n'ait été réalisé au laboratoire. Au Nigéria, il a été rapporté que *Salmonella* Gallinarum/Pullorum est l'une des causes probables de la mortalité embryonnaire, de l'infertilité et de la réduction de l'éclosabilité des œufs de pintades (Nwagu, 1997). En dehors du sérotype Gallinarum/Pullorum reconnu comme étant spécifique à la volaille, il existe d'autres sérovars moins ou non spécifiques, également responsables du développement d'infections des volailles (oiseaux) et, de plus, impliqués dans des problèmes de santé publique via la consommation de denrées alimentaires d'origine animale. Les mauvaises conditions de l'environnement, l'intervention des infections virales et bactériennes intercurrentes et le parasitisme élevé jouent un rôle important dans la sévérité de ces infections chez la volaille.

Pathogénie de l'infection

Les facteurs de virulence identifiés chez les salmonelles sont à déterminisme chromosomique ou plasmidique (Grimont *et al.*, 1994).

a) Colonisation de l'organisme

En général, l'infection par la bactérie débute par son ingestion par voie orale. *Salmonella* est tout à fait capable de survivre à l'acidité de l'estomac et peut donc passer dans l'intestin (Kwon et Ricke, 1998). Les caeca constituent le site le plus important pour la colonisation intestinale chez la volaille (Desmidt *et al.*, 1997 ; 1998). Les bactéries s'attachent ensuite aux cellules épithéliales. L'attachement aux cellules cibles, étape nécessaire à la colonisation et à la pénétration dans les cellules, est sous la dépendance d'au moins trois types d'appendices dont les plus communs sont les pili de type 1. Mais cette interaction initiale entre pathogène et cellules épithéliales à travers le processus d'attachement demeure sommairement connue (Barrow *et al.*, 2010). Par ailleurs, il existe des plasmides de virulence qui sont essentiels pour procéder à la colonisation et ont été trouvés dans la plupart des sérotypes associés aux maladies systémiques (Barrow *et al.*, 2010). Les plasmides de virulence chez *Salmonella* codent pour un complexe protéique situé sur la paroi de la bactérie, qui permet à la bactérie d'adhérer sur des récepteurs hydrocarbonnés situés à la surface de certaines cellules (Singleton, 2005).

b) Invasion : la phase intestinale

Après la phase d'attachement, la bactérie peut envahir les cellules épithéliales. L'invasion des cellules épithéliales constitue une étape cruciale dans la pathogenèse. Au moment où la bactérie s'attache à la cellule épithéliale du caecum, elle injecte une série de protéines bactériennes dans la cellule de l'hôte par le biais du système de sécrétion de type 3 (TSS). Ces protéines sont codées par l'îlot de

pathogénicité numéro 1 (*Salmonella* Pathogenicity Island, SPI-1) (Zhou et Galman, 2001). Ce système de sécrétion de type 3 est constitué d'une sorte d' « aiguille » sur la membrane externe de la bactérie dont la fonction est d'injecter des protéines de la bactérie dans la cellule eucaryote (Hueck, 1998 ; Galan et Collmer, 1999 ; Cornelis et Van Gijsegem, 2000). L'effet principal des protéines injectées est une réorganisation du squelette de la cellule épithéliale afin de pouvoir pénétrer la cellule. Après ce processus, la bactérie se retrouve dans une vacuole à l'intérieur de la cellule. Ce phénomène génère un environnement dans lequel la bactérie peut se multiplier à l'abri du système immunitaire de l'hôte. Les protéines codées par le SPI-1 sont également impliquées dans l'attraction des cellules immunitaires de l'hôte vers la paroi intestinale (Van Immerseel *et al.*, 2002). Les macrophages peuvent ingérer les bactéries qui passent à travers la muqueuse caecale, ce qui constitue le début de la phase systémique de l'infection.

c) Invasion : la phase systémique

Les bactéries sont ingérées par les macrophages de la sous-muqueuse par phagocytose. *Salmonella* peut y survivre et se multiplier dans les phagosomes. Les macrophages peuvent passer dans le sang et se disséminer vers les organes tels que le foie et la rate, où ils se retrouvent en abondance (Barrow, 1999). La multiplication de *Salmonella* dans les macrophages est sous le contrôle du système de sécrétion de type 3 (TSS) codé par l'îlot de pathogénicité 2 (SPI-2). Ce TSS SPI-2 a également la structure d'une « aiguille » par laquelle des protéines de la bactérie sont injectées à travers la membrane de la vacuole de phagocytose (Hensel, 2000). Ces protéines vont inhiber la fusion entre la vacuole contenant des *Salmonella* et le lysosome (qui contient des substances toxiques pour la bactérie). Ainsi le terrain reste favorable à la multiplication des bactéries.

d) Polysaccharide capsulaire

L'antigène Vi (Typhi, Paratyphi c, Dublin) est un polysaccharide capsulaire protégeant les bactéries de l'action opsonisante du complément.

e) Lipo-polysaccharide

L'antigène O joue un rôle important en protégeant les bactéries du système du complément par inhibition de la fixation du complexe d'attaque des membranes dans les membranes bactériennes. Les mutants dépourvus d'antigène O (mutant « rough ») sont avirulents ou moins virulents. Le lipide A ou endotoxine est indirectement responsable de la fièvre, de l'anorexie, de l'abattement et du choc septique, observés lors des septicémies, en provoquant la libération de cytokines par les macrophages.

f) Synthèse des toxines

En dehors de l'endotoxine, les salmonelles peuvent synthétiser une cytotoxine thermolabile de 26 kda identifiée chez les sérotypes Choleraesuis, Enteritidis, Typhi, Typhimurium et une entérotoxine

thermolabile identifiée chez les sérotypes Typhi, Typhimurium, Saint Paul apparentée immunologiquement et fonctionnellement à la toxine cholérique de *Vibrio cholerae* et à la toxine LT de *Escherichia coli* (Euzébi, 1997).

g) Système de captation du fer

Le fer est un élément indispensable à la multiplication des salmonelles. Elles synthétisent des systèmes de captation de fer ou sidérophores, leur permettant d'entrer en compétition avec la transferrine (fer dans le sérum), la lactoferrine (fer dans les sécrétions) ou l'ovotransferrine (fer dans les œufs).

- **La colibacillose**

La colibacillose est une infection bactérienne due à *Escherichia coli* (*E. coli*) une bactérie à Gram-négative asporulée, appartenant aussi à la famille Enterobacteriaceae. *E. coli*, peut pousser en aérobie ou en anaérobie. Contrairement aux mammifères, *E. coli* provoque peu d'entérite chez les oiseaux. Les colibacilles réputées pathogènes sont des hôtes normaux du tube digestif aviaire qui s'installent sur des lésions préexistantes qui colonisent l'appareil respiratoire affaibli par une atmosphère viciée, des poussières d'élevage, des agents biologiques comme le virus de la bronchite infectieuse, le virus de la maladie de Newcastle, le virus de la maladie de Gumboro et/ou *Mycoplasma gallisepticum* (Villate, 2001; Nakamura *et al.*, 1992). Ces souches d'*E. coli*, désignées par le terme « Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) », se disséminent ensuite dans plusieurs organes internes et causent la colibacillose caractérisée par une infection systémique et fatale (La Regione et Woodward, 2002 ; Barnes *et al.*, 2008). L'intervention unique du colibacille en pathologie aviaire est rare et n'est le fait que de souches très virulentes (Villate, 2001).

Très peu de colibacilles (10 % à 15 %) de la flore normale du tube digestif des oiseaux sont réputés pathogènes. Ces souches sont caractérisées par l'appartenance à un nombre restreint de sérotypes et par la production de propriétés spécifiques de virulence (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

La plupart des espèces aviaires sont susceptibles à la colibacillose. Les signes cliniques sont souvent rapportés sur les poulets, les dindons et les canards. Des infections naturelles ont aussi été rapportées sur les cailles, les faisans, les pigeons, les pintades (Barnes *et al.*, 2008). Les jeunes oiseaux sont plus fréquemment affectés et la sévérité de la maladie est plus importante chez ces jeunes sujets.

A ce jour cependant, la colibacillose en aviculture villageoise n'a pas été décrite concrètement. Même si des isollements ont été réalisés à partir d'une proportion importante de pintadeaux morts dans les élevages villageois respectivement au Burkina Faso (24 %) et au Bénin (33 %) (Bessin *et al.*, 1998 ; Boko *et al.*, 2011a), les sérotypages et les pathotypages moléculaires restent à effectuer pour mieux connaître le statut de ces colibacilles par rapport aux pathologies observées.

Pathogénie de l'infection

a) Colonisation de l'organisme

La contamination se fait par voie respiratoire à partir des fientes séchées en suspension. Les poussières pénètrent dans les voies respiratoires jusqu'aux sacs aériens dont elles traversent la paroi et se disséminent ensuite via la circulation sanguine dans plusieurs organes internes causant ainsi une colibacillose systémique fatale pour les animaux (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999 ; Barnes *et al.*, 2008). Des études ont montré que les sérotypes O1, O2, O78 pathogènes aviaires reconnus et fréquemment isolées. Il existe aussi d'autres sérotypes qui sont représentés de manière significative: O8, O15, O18, O35, O88, O109, O115 et O116 (Dho-Moulin *et al.*, 1990 ; Blanco *et al.*, 1997 ; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999 ; Barnes *et al.*, 2008).

Plusieurs facteurs sont à l'origine de la virulence des souches APEC. Parmi ceux-ci on peut citer, les adhésines fimbriaires ou afimbriaires.

Des études ont été réalisées essentiellement sur les fimbriae de type 1 et de type P. In vivo, les *fimbriae* de type 1 sont exprimés surtout dans la trachée, les poumons et les sacs aériens. Leur expression ne fut jamais observée dans d'autres organes ni dans le sang (Dozois *et al.*, 1994). Le rôle des fimbriae du type P reste encore à définir. Selon Dozois et collaborateurs (1992), la présence des *fimbriae* de type P est significativement plus fréquente chez les souches isolées de poulets septicémiques que chez des souches isolées de poulets sains.

Il existe aussi une adhésine afimbriaire dénommée hémagglutinin thermosensible (Tsh). Il a été montré que le gène *tsh* d'une souche APEC de poulet est localisé sur un plasmide et associé préférentiellement à ces souches alors qu'il ne se retrouve pas chez des souches d'*E. coli* isolées de fèces d'animaux sains (Provence et Curtiss, 1994). Selon Dozois et collaborateurs (2000), l'hémagglutinine peut contribuer au développement des lésions dans les sacs aériens, mais n'est pas nécessaire à la bactérie pour coloniser l'ensemble des organes internes de l'animal et pour créer des lésions de péricardite, périhépatite et induire de la septicémie.

Des études menées par Stordeur et collaborateurs (2002) ont permis de mettre en évidence la présence de gènes codant pour d'autres adhésines fimbriaires Sfa (F17), ou afimbriaires (Afa8) qui jusque là étaient observées chez les mammifères (Mainil *et al.*, 1997 ; Mainil *et al.*, 2000). Toutefois, le rôle de ces adhésines F17 et afa8 n'a pas été élucidé (Stordeur *et al.*, 2004).

b) Résistance au sérum

Différentes structures bactériennes comme la capsule, le lipopolysaccharide, certaines protéines de la membrane externe des souches APEC, régulent la résistance à l'effet bactéricide du complément dans le sérum en empêchant le dépôt du complexe d'attaque membranaire dans la membrane externe.

c) Aéro bactéine

La plupart des souches APEC (73-98 %) possède le système d'acquisition du fer appelé aéro bactéine, alors que les souches non pathogènes le produisent moins fréquemment (Lafont *et al.*, 1987 ; Emery *et al.*, 1992). Le rôle principal de ce système serait de permettre aux bactéries de se multiplier dans le sang ou les organes autres que l'intestin (Wooley *et al.*, 2000).

d) Les toxines

Les APEC tendent à être moins toxigènes que les *E. coli* pathogènes pour les mammifères (Blanco *et al.*, 1997). Les toxines classiques d'*E. coli* ne semblent donc jouer aucun rôle dans la pathogénie des souches APEC.

3.2.3 Maladies Parasitaires

L'importance des maladies parasitaires en élevage de volaille en milieu villageois est souvent négligée, alors qu'elles contribuent tout au moins indirectement dans la baisse de la productivité des oiseaux.

- **Les parasites internes (endoparasites)**

Les helminthes sont les plus importants et les plus communs endoparasites chez la volaille en divagation, spécialement les nématodes et les cestodes. Les résultats des examens helminthologiques réalisés après autopsie de poulets élevés selon le mode d'élevage en divagation indiquent des prévalences de 36 % pour *Ascaridia galli* et de 46 % pour *Raillietina tetragona* en Ethiopie (Eshetu *et al.*, 2001). Des études réalisées au Bénin sur des pintades locales adultes apparemment saines indiquent des prévalences de 96 % de nématodes et de 20 % de cestodes par inventaire du parasitisme du tube digestif et de la trachée (Salifou *et al.*, 2003) et de 88% pour *Ascaris sp* et 74 % pour *Syngamus sp* par examen coprologique (Boko, 2004). Dans les élevages villageois de pintades, des associations d'infestations par les helminthes sont de règle: « ascaris–*capillaria* » (14 %) et « ascaris–*syngamus* » (31 %) (Chrysostome, 1997 ; Boko *et al.*, 2011). De telles prévalences de ces parasites dans le tractus digestif des volailles créent une concurrence au niveau des nutriments assimilables par les volailles et les parasites qui cherchent à survivre. Ces prévalences extrêmement élevées seraient liées aux modes d'élevage tels que décrits plus haut, dans lesquels les éleveurs investissent très peu pour les soins aux animaux et n'assurent presque pas le nettoyage des poulaillers dans lesquels poulets et pintades excrètent les matières fécales au quotidien. Dans cette atmosphère, la réinfestation des animaux partageant le même habitat la nuit serait une évidence permanente.

Il est à noter qu'en dehors des helminthes, la présence d'ookystes de coccidies dans les caeca a également été mise en évidence par examen coprologique. Il est cependant souvent difficile de mesurer conséquence de l'infestation par ce protozoaire d'autant plus que dans la plupart des cas, elle est associée à d'autres agents pathogènes. Une étude réalisée dans les élevages traditionnels de pintade

au Bénin a permis d'obtenir une prévalence de 32 % d'ookystes coccidiens (Boko, 2004). Une prévalence de 38 % de ce parasite a été rapportée par Sylla et collaborateurs (2011) dans son étude réalisée sur les poulets et les pintades en élevage traditionnel au Mali. Ces différentes valeurs indiquées montrent que, négliger ce parasitisme serait une erreur dans l'élevage.

- **Les parasites externes (ectoparasites)**

Chez les volailles en divagation, on peut observer des poux, des acariens et des tiques. Une étude conduite au Nord-Est du Bénin par Salifou et collaborateurs (2004) a permis d'enregistrer des prévalences de 63 % pour *Goniodes meleagridis* et *Lipeurus caponis* (poux) et de 30 % de *Hyalomma* sp (acariens). Trois ans plus tard, la présence de ces parasites a été révélée sur les pintades par Salifou et collaborateurs (2007) dans une étude réalisée sur les oiseaux de la basse cour dans le Nord-Ouest du Bénin. Par ailleurs, dans la sous région, une étude similaire a été réalisée au Burkina Faso sur les parasites externes de poulets, pintades, dindons en élevage traditionnel et a révélé une infestation non seulement sur poulets mais également des pintades par *Argas persicus* (Hien *et al.*, 2011). Au Sénégal, une étude a révélé la présence des larves d'*Argas persicus* durant toutes les saisons de l'année sur les poulets en élevage traditionnel villageois (Guèye *et al.*, 2004). Ces données témoignent de la circulation des ectoparasites ci-dessus cités dans les élevages traditionnels de la pintade dans ces pays respectifs. Ces ectoparasites exercent une action mécanique qui se traduit par les irritations produites par ceux-ci et qui peuvent empêcher la volaille de s'alimenter normalement et, donc, être à l'origine des retards de croissance dans les élevages. Ceci montre que les ectoparasites peuvent constituer une menace permanente pour ce type d'élevage. Il importe de procéder à des contrôles permettant d'apprécier la prévalence de ceux-ci quitte à réaliser des traitements adéquats pour soulager les animaux et leur permettre d'exprimer au mieux leur performance dans ce système d'élevage.

4. CONCLUSION

Le développement de l'élevage de la volaille locale (poulet et pintade) maintenue dans le mode de production traditionnel extensif en Afrique subsaharienne connaît de nombreuses contraintes qui contribuent à une faible productivité. Ces contraintes sont d'ordre sanitaire et technique (alimentation, mode d'élevage, hygiène). Bien qu'à des degrés différents du poulet, la pintade est aussi sensible à de nombreuses pathologies d'une façon générale : (1) les maladies virales (la maladie de Newcastle), (2) les maladies bactériennes (la salmonellose et la colibacillose), (3) les helminthes gastro-intestinaux et (4) les parasites externes. En Afrique Sub-saharienne, très peu de données de terrain sont disponibles sur ces différentes maladies. Des études plus poussées méritent donc d'être entreprises pour compléter les connaissances actuelles relativement maigres et pour construire les bases d'une meilleure connaissance afin d'améliorer les performances de production des pintades.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail nous adressons nos reconnaissances à l'Etat Béninois ainsi qu'à l'Agence Universitaire de la Francophonie à travers son programme Horizon Francophone pour leur soutien financier. Nos reconnaissances vont également à l'endroit du Dr VANDENPUT Sandrine, Responsable Scientifique de l'Antenne vétérinaire de la Bibliothèque des Sciences de la vie pour son aide lors de nos recherches bibliographiques.

REFERENCES

- AGWUNOBI N. L., EKPENYONG E.T. Nutritive and economic value of guinea fowl (*Numida meleagris*) production in developing countries. *J. Sci .Food Agric.*, 1990, **52**, 301-308.
- ARBELOT B., DAYON J.F., MAMIS D., GUEYE J.C., TALL F., SAMB H. Enquête sérologique sur la prévalence des principales pathologies aviaires au Sénégal. *Rapport*. Dakar, Sénégal, Isra, Laboratoire de pathologies aviaires, 1997, 9 p.
- AYENI J.S.O. Studies of grey breasted helmet guinea fowl (*Numida meleagris galeata pallas*) in Nigeria. *Worlds Poult. Sci. J.*, 1983, **39**, 143-151.
- AYORINDE K.L. Guinea fowl (*numida meleagris*) as a protein supplement in Nigeria. *Worlds Poult. Sci. J.*, 1991, **47**, 21-26.
- AYORINDE K.L., AYENI J.S.O., OLUYEMI J.A. Laying characteristics and reproductive performance of four indigenous helmeted guinea fowl varieties (*Numidia meleagris galeata pallas*) in Nigeria. *Trop. Agric.*, 1989, **66**, 277-280.
- BARNES H.J., LISA K.N., VAILLANCOURT J.P. Colibacillosis. In: SAIF Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R, Mcdougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E. (Eds), *Diseases of Poultry*. Blackwell Publishing, 12th Edition: Ames, IA, USA, 2008, 691-716.
- BARROW P.A. Virulence of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. In: Saeed, A.M. (Eds), *Salmonella* enterica serovar Enteritidis in humans and animals. Iowa State University Press : Ames, 1999, 173-181.
- BARROW P.A. JONES M.A. THOMSON N. Salmonella. In : Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G., Thoen C.O. (Eds), *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Willey-Blackwell Publishing, Fourth Edition : Ames, Iowa, USA, 2010, 231-265.
- BELCO, L.B.K. Contribution à l'étude des modes actuels et de l'importance socioéconomiques de l'élevage de pintade au Bénin (Thèse d'Ingénieur Agronome). Université Nationale du Bénin : Cotonou, 1985, 143 p.
- BENGALY K. Amélioration de l'aviculture villageoise: cas de la zone du Mali-Sud. In : Proceedings INFPD workshop, M'Bour, Sénégal, 9-13 décembre 1997, 1997, 72-78.
- BELL J.G., KANE M., LEJANC. An investigation of the disease status of village poultry in Mauritania. *Prev. vet. Med.*, 1990, **8**, 291-294.

- BESSIN R., BELEM A.M.G., BOUESSINI H., COMPAORE Z., KABORET Y. Enquête sur les causes des mortalités des pintadeaux au Burkina Faso. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 1998, **51**, 87- 93.
- BOKO K.C. Contribution à l'amélioration de l'élevage villageois de la pintade locale dans le Département du Borgou, Nord-Est du Bénin (Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Spécialisés en Gestion des Ressources Animales et végétales en Milieux Tropicaux). Université de Liège: Liège, 2004, 40 p.
- BOKO C.K., KPODEKON M.T. FAROUGOU S. DAHOUDA M. YOUSAO A.K.I. APLOGAN G.L. ZANOU J. MAINIL J.G. Farmer perceptions and pathological constraints in helmeted guinea fowl farming in the Borgou Department in North-East Benin. *Afr. J. Agric. Res.*, 2011a, **6**, 2348-2357.
- BLANCO J.E., BLANCO M., MORA A., BLANCO J. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**, 2953-2957.
- BRANCKAERT R.D.S., GUEYE E.F. FAO's program for support to family poultry production. In: Proceedings of a Workshop: Poultry as a Tool in Poverty Eradication and Promotion of Gender Equality held, Tune Landboskole, March 22-26, 1999, 1999, 244-256.
- CARLI K.F., UNAL C.B., CANER V., EYIGOR A. Detection of Salmonellae in chicken faeces by a combination of Tetrathionate broth enrichment, Capillary PCR and Capillary Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 1871-1876.
- CHRYSTOSTOME, C. Possibilités et problèmes liés à l'élevage de la pintade en milieu villageois. In : Production avicole villageoise en Afrique, International workshop, Rabat (Morocco), 7-11 May 1993, 1993, 57-65.
- CHRYSTOSTOME C, ALLARD P, DEMEY F, BELL JG, WERTHNER JP. Enquête sérologiques et parasitologiques sur la pintade en élevage villageois au Bénin. In : Deuxième journée de la recherche avicole, Tours, 1997, 73-76.
- CHRYSTOSTOME C.A.M., BELLE J.G. DEMEY F. VERHUST A. Serosurveillance of three diseases in village chickens in Benin. *Prev. Vet. Med.*, 1995, **22**, 257-261.
- CORNELIS G.R., VAN GJSEGEN F. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000, **54**, 735-774.
- COURTECUISSE C., JAPIOT F., BLOCH N., DIALLO I. Enquête sérologique sur la maladie de Newcastle et de Gumboro, la pasteurellose et la pullorose chez les poules de race locale au Niger. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, **43**, 27-29.
- DAHOUDA, M. Elevage de la pintade locale dans le Département du Borgou au Bénin: comparaison des caractéristiques de production en station et en milieu rural (Mémoire de DEA). Université de Liège : Liège, 2003, 35 p.

- DAHOUDA M., TOLEBA S.S., YOUSAO A.K.I., BANI KOGUI S., YACOUBOU ABOUBAKARI S., HORNICK J.L. Guinea fowl rearing constraints and flock composition under traditional management in Borgou Department, Benin. *Family Poult.*, 2007, **17**, 1 et 2.
- DAHOUDA M., SENOU M., TOLEBA S.S., BOKO C.K., ADANDEDJAN J.C., HORNICK J.L. Comparaison des caractéristiques de production de la pintade locale (*Meleagris numida*) en station et dans le milieu villageois en zone soudano guinéenne du Bénin. *Livest. Res. Rural Dev.*, 2008a, **20**, 12.
- DAHOUDA M., TOLÉBA S.S., YOUSAO A.K.I., MAMA ALI A. A., HAMBUCKERS A., HORNICK J-L. Seasonal variations in the crop contents of scavenging Helmeted Guinea Fowls (*Numida meleagris*, L) in Parakou (Benin). *Br. Poult. Sci.*, 2008b, **49**, 751-759.
- DAHOUDA M., TOLEBA S.S., YOUSAO A.K.I., MAMA ALI A.A., DANGOU-SAPOHO R.K., AHOUNOU S.G., HAMBUCKERS A. HORNICK J-L. The Effects of Raw and Processed *Mucuna pruriens* Seed Based Diets on the Growth Parameters and Meat Characteristics of Benin Local Guinea Fowl (*Numida meleagris*, L). *Int. J. Poult. Sci.*, 2009, **8**, 882-889.
- DEI, H.K., ALIDU, I., OTCHERE, E.O., DONKOH, A., BOA-AMPONSEM, K. AND ADAM, I.. Improving the brooding management of local guinea fowl (*Numida meleagris*). *Family Poult.*, 2009, **18**, 3-8.
- DEMBELE P., GNOUMOU D., FREDERIC P. L'élevage de la pintade au Burkina Faso. Ouagadougou, Burkina Faso, Réseau documentaire élevage, 1996, 8. (n° 4 spécial octobre).
- DESMIDT M., DUCATELLE R., HAESBROUCK F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage type four after experimental infection of young chickens. *Vet. Microbiol.*, 1997, **56**, 99-109.
- DESMIDT M., DUCATELLE R., MAST J., GODDEERIS B.M., KASPERS B., HAESBROUCK F. Role of the humoral immune system in *Salmonella* enteritidis phage type four infection in chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1998, **63**, 355-367.
- DHO-MOULIN M., FAIRBROTHER J.M. Avian Pathogenic Escherichia Coli (APEC). *Vet. Res.*, 1999, **30**, 299-316.
- DHO-MOULIN M., VAN DEN BOSCH J.F., GIRARDEAU J.P., BREE A., BARAT T., LAFONT J.P. Surface antigens from *Escherichia coli* O2 and O78 strains of avian origin. *Infect. Immun.*, 1990, **58**, 740-745.
- DIABATE B. Etude de l'aviculture villageoise en zone Mali-Sud: cas des villages de Djinigorola et Yaban (Mémoire Ingénieur Sciences appliquées). Institut Polytechnique rural de Katibougou : Bamako, 1987, 48p.
- DOSSA S.C., SAVI R.A., SALIFOU S., DOSSOU-GBETE G.S.O., MENSAH S.E. Profils sérologiques des poulets d'élevages traditionnels au Bénin. *R.A.S.P.A.*, 2005, **3**, 27-31.
- DOZOIS C.M., CHANTELOUP N., DHO-MOULIN M., BREE A., DESAUTELS C., FAIRBROTHER J.M. Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (Type 1) fimbrial

- antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis.*, 1994, **38**, 231-239.
- DOZOIS C.M., DHO-MOULIN M., BREE A., FAIRBROTHER J.M., DESAUTELS C., CURTISS R. Relationship between the tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 4145-4154.
- DOZOIS C.M., FAIRBROTHER J.M., HAREL J., BOSSE M. Pap and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 2648-56.
- DUROJAIYE, O.A., ADENE, D.F. Newcastle disease and egg drop syndrome'76 in Guinea Fowls (*Numida meleagris galeata* Pallas). *J. Vet. Med. B.*, 1988, **35**, 152-154.
- EMERYD A., NAGARAJA K.V., SHAW D.P., NEWMAN J.A., WHITE D.G. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis.*, 1992, **36**, 504-511.
- ESHETU Y., MULUALEM E., IBRAHIM H., BERHANU A. ABERRA K. Study of gastro-intestinal helminths of scavenging chickens in four rural districts of Amhara region, Ethiopia. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2001, **20**, 791-796.
- EUZEBY J.P. Les salmonelles et les salmonelloses aviaires dues aux sérovars ubiquistes. *Revue Méd.vét.*, 1997, **148**, 61-76.
- FAYE B., ALARY V. Les enjeux des productions animales dans les pays du sud. *INRA Prod. Anim.*, 2001, **14**, 3-13.
- GALÁN J.E., COLLMER A. Type III secretion machines : bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 1999, **284**, 1322-1328.
- GAST R.K. Paratyphoid infections. In : Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R, McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E. *Diseases of Poultry*. Blackwell Publishing, 12th Edition: Ames, IA, USA, 2008, 636-665.
- GRIMONT P.A.D., GRIMONT F., BOUVET P.J.M. Salmonella. In : Freyney J., Renaud F., Hansen W. et Bollet C. *Manuel de bactériologie clinique*, volume 2, 2^{ème} édition. Elsevier: Paris, 1994, 1017-1042.
- GRIMONT P.A.D., WEILL F-X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 9th edition : Institut Pasteur, Paris, 2007, 166p.
- GUEYE E. H. F. Village egg and fowl meat production in Africa. *Worlds Poult. Sci. J.*, 1998, **54**, 73-86.
- GUEYE, E.F. The role of family poultry in poverty alleviation food security and the promotion of gender equality in rural Africa. *Outlook Agric.*, 2000, **29**, 129-136.
- GUEYE E.F. Gender issues in family poultry production systems in low-income food-deficit countries. *Am. J. Altern. Agric.*, 2003, **18**, 185-195.

- GUEYE, E.F. La nécessité de repenser les approches pour le développement de l'élevage, avec un accent particulier sur les volailles et les petits ruminants. In : Atelier Régional sur "Le rôle de la volaille villageoise et des petits ruminants dans la réduction de la pauvreté et la facilitation de la sécurité alimentaire", Ouagadougou, 7-8 novembre 2005, 2005, 1-23.
- GUEYE A., SYLLA M., DIOUF A., TOURE I., CAMICAS J.L. Distribution et variations d'abondance saisonnières d'*Argas persicus* au Sénégal. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 2004, **57**, 65-70.
- HARUNA E.S., SHAMAKI D., ECHEONWU G.O.N., MADJIYABGE K.A., SHUAIBU Y., DU, D.R. A natural outbreak of Newcastle disease in Guinea-fowl (*Numida Meleagris Galeata*) in Nigeria. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 1993, **12**, 887-893.
- HENSEL M. *Salmonella* pathogenicity Island 2. *Mol. Microbiol.*, 2000, **36**, 1015-1023.
- HIEN O.C., DIARRA B., DABIRE R., WANGRAWA J., SAWADO L. Effects of External Parasites on the Productivity of Poultry in the Traditional Rearing System in the Sub-humid Zone of Burkina Faso. *Int. J. Poult. Sci.*, 2011, **10**, 189-196.
- HIEN O.C., NIANOGO A.J., SAWADO L. L'élevage traditionnel de la pintade locale dans la zone centre-ouest du Burkina. *Science et Technique, Sciences naturelles et agronomie*. 2001, **25**, 2.
- HORMAN D. Chicken connection. Le poulet africain étouffé par l'Europe. Gresea, Bruxelles, 2004, 136 p.
- HUECK C.J. Type III secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, **62**, 379-433.
- IDI A., MAIKANO I., BAKO I., GARBA D., NDOMBA N. Serological and parasitological survey on local guinea fowl at village level in Niger. *Bulletin RIDAF*, 2001, **11**, 11-18.
- KABATANGE M.A. KATULE, A.M. Rural poultry production systems in Tanzania. In: Sonaiya, E. B. (Ed.), *Proceedings of an International Workshop on Rural Poultry Development in Africa*, Ile-Ife, 1990, 171-176.
- KITALYI, A.J. Family poultry management systems in Africa: the First International Network for Poultry Development, FAO Electronic Conference on Poultry, 1999, **3**, 1-6.
- KONDOMBO S. R. Revue du secteur avicole: Importance et perspectives du secteur avicole au Burkina Faso. FAO : Rome, 2008, 34p.
- KWON Y.M., RICKE S.C. Induction of acid resistance of *Salmonella* Typhimurium by exposure to short-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 3458-3463.
- LAFONT J.P., DHO M., D'HAUTEVILLE H.M., BREE A., SANSONETTI P.J. Presence and expression of aerobactin genes in virulent strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1987, **55**, 193-197.
- LA RAGIONE R.M., WOODWARD M.J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticemia. *Res. Vet. Sci.* 2002, **73**, 27-35.

- LARBIER M., LECLERCQ B. Nutrition et alimentation des volailles. INRA Editions : Paris, 1992, 355 p.
- LAURENSEN P. Détermination des paramètres zootechniques de la pintade locale dans la région du Borgou, Bénin, (Mémoire d'Ingénieur Agronome), Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux : Gembloux, 2002, 131p.
- LE COZ-DOUIN J. L'élevage de la pintade. Edition point vétérinaire : Paris, 1992, 252 p.
- MAGANGA S.L.S, HAULE K.S. Domestication of guinea fowl : a case of Morogoro Municipal, Tanzanie. *Int. J. Nat. Conserv. Afr.*, 1998, **14**, 14-28.
- MAI H.M., OGUNSOLA O.D., OBASI O.L. Serological Survey of the Newcastle disease and infectious bursal disease in local ducks and local guinea fowls in Jos, Plateau State, Nigeria. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 2004, **57**, 41-44.
- MAINIL J.G., GERARDIN J., JACQUEMIN E. Identification of the F17 fimbrial subunit and adhesin encoding (f17A and f17G) gene variants in necrotoxicogenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans. *Vet. Microbiol.*, 2000, **73**, 327-335.
- MAINIL J.G., JACQUEMIN E., HERAULT F., OSWALD E. Presence of pap-, sfa-, and afa-related sequences in necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from cattle : evidence for new variants of the AFA family. *Can. J. Vet. Res.*, 1997, **61**, 193-199.
- MALLIA J.D. Observations on family poultry units in parts of Central America and sustainable development opportunities. *Livest. Res. Rural Dev.*, 1999, **11**, 3.
- MCAINSH C.V., KUSINA J., MADSEN J., NYONI O. Traditional chicken production in Zimbabwe. *Worlds Poult. Sci. J.*, 2004, **60**, 233-246.
- MISHRA S, KATARIA J.M, SAH R.L., VERMA K.C., MIHRA J.P. Studies on the pathogenicity of Newcastle disease virus isolate in guinea fowl. *Trop. Anim. Health. Prod*, 2001, **33**, 313-320.
- MOURAD M., BAH A.S., GBANAMOU. Evaluation de la productivité et de la mortalité de la poule locale sur le plateau du Sankaran, Faranah, Guinée, en 1993-1994. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1997, **50**, 343-349.
- MOUSSA AMADOU B., IDI A., BENABDELJELIL K. Aviculture familiale rurale au Niger: alimentation et performances zootechniques. *Bulletin RIDAF*, 2010, **19**, 3-10.
- NAKAMURA K., COOK J.K., FRAZIER J.A., NARITA M. *Escherichia coli* multiplication and lesions in the respiratory tract of chickens inoculated with infectious bronchitis virus and/or *Escherichia coli*. *Avian Dis.*, 1992, **36**, 881-890.
- NWAGU B.I. ALAWA C.B.I. Guinea fowl production in Nigeria. *Worlds Poult. Sci. J.*, 1995, **51**, 260-270.
- NWAGU B.I. Factors affecting fertility and hatchability of guinea fowl eggs in Nigeria. *Worlds Poult. Sci. J.*, 1997, **53**, 279-285.
- OBUN C.O. Hatching and brooding of Guinea fowl (*Numida meleagris galeata pellas*) egg using local hen. *Global J. Agric. Sci.*, 2004, **3**, 75-77.

- OKE, U.K., HERBERT U., NWACHUKWU E.N. Association between body weight and some egg production traits in the guinea fowl (*Numida meleagris galeata pallas*). *Livest. Res. Rural Dev.*, 2004, **16**, 9.
- ONYEANUSI B.I., ONYEANUSI C.G., IBE C.S. Susceptibility of Guinea Fowl (*Numida Meleagris Galeata*) to Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). *Int. J. Poult. Sci.*, 2009, **8**, 595-597.
- PANDEY V.S. Epidemiology and economics of village poultry production in Africa: Overview. In: Pandey V.S., Demey F (Ed.), *Proceedings of an International Workshop on Village Poultry Production in Africa*, Rabat, 7-11 May 1992, 1992, 124-128.
- PROVENCE D.L., CURTISS R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 1369-1380.
- RASHID M.M. Nutritional status of scavenging chickens with special emphasis on energy and protein supplementation under rural conditions in Bangladesh (Master of Science). Royal Veterinary and Agricultural University : Denmark, 2003, 38 p.
- SAINA H. Guinea fowl (*Numida meleagris*) production under smallholder farmer management in Guruve district, Zimbabwe (Master thesis). University of Zimbabwe: Zimbabwe, 2005, 108 p.
- SAINA H., KUSINA N.T., KUSINA J.F., BHEBHE E., LEBEL S. Guinea fowl production by indigenous farmers in Zimbabwe. *Livest. Res. Rural Dev.*, 2005, **17**, 9.
- SALES J. DU PREEZ J.J. Protein and energy requirements of the pearl grey guinea fowl. *Worlds Poult. Sci. J.*, 1997, **53**, 381-385.
- SALIFOU S., DOKO S.Y., SALIFOU A.N., PANGUI L.J. Acariens et insectes parasites de la pintade domestique (*Numida meleagris galeata*) dans les régions de l'Alibori et du Borgou (Nord-Est du Bénin). *R.A.S.P.A.*, 2004, **2**, 43-46.
- SALIFOU S., GOUDEGNON M., PANGUI L.J., TOGUEBAYE B.S. Faune parasitaire helminthique du tube digestif et de la trachée de la pintade domestique (*Numida meleagris galeata*) dans le Nord-Est du Bénin. *R.A.S.P.A.*, 2003, **1**, 25-29.
- SALIFOU S., LAFIA K.B., EMMANUEL-ALI N., OFFOUMON T., PANGUI L.J. Acariens et insectes parasites des oiseaux de la basse-cour dans le Nord-Ouest du Bénin et effets insecticide des huiles essentielles de *Lantana camara* (*Lamiales, verbanaceae*). *R.A.S.P.A.*, 2007, **5**, 1-2.
- SANFO R., BOLY H., SAWADO L. BRIAN O. Performances pondérales de la pintade locale (*Numida meleagris*) en système d'alimentation améliorée dans la zone centrale du Burkina Faso. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 2008, **61**, 135-140.
- SANFO R., BOLY H., SAWADO L., OGLE B. Caractéristique de l'élevage villageois de pintade locale (*Numida meleagris*) au centre du Burkina Faso. *Tropicultura*, 2007, **25**, 31-36.
- SHIVAPRASAD H.L., BARROW P.A. Pullorum disease and fowl typhoid. In: Saif, Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E. *Diseases of Poultry*, 12th Edition. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA, 2008, 620-630.

- SINGLETON P. Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. Traduit de l'anglais par Jean Dusart, 6^{ème} édition, Dunod : Paris, 2005, 526p.
- SONAIYA E. B., SWAN S. E. Production en Aviculture familiale. Organisation Des Nations Unies Pour L'Alimentation et L'Agriculture: Rome, 2004, 140p.
- STORDEUR P., BREE A., MAINIL J., MOULIN-SCHOULEUR M. Pathogenicity of *pap*-negative avian *Escherichia coli* isolated from septicemic lesions. *Microb. Infect.*, 2004, **6**, 637-645.
- STORDEUR P., MARLIER D., BLANCO J., OSWALD E., BIET F., DHO-MOULIN M., MAINIL J. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. *Vet. Microbiol.*, 2002, **84**, 231-241.
- SYLLA M., SIDIBÉ S., TRAORÉ B., DIALLO F.C., BALLO A., KEITA S. KONÉ N.G. Importance du parasitisme interne chez le poulet et la pintade en milieu rural du Mali. *Communications en Aviculture Familiale*, 2011, **20**, 7-15.
- TEYE G A., ADAM M. Constraints to Guinea fowl production in northern Ghana : A case study of the Damongo area. *Ghana J. agric. Sci.*, 2000, **33**, 153-157.
- TRAORE B. Caractérisation des élevages avicoles traditionnels en zone soudanienne et soudano-guinéenne du Mali. In : Proceeding INFPD workshop, M'Bour Sénégal, 9–13 décembre 1997, 1997, 133-139.
- UMOSEN A.D., ONYEANUSI B.I., SALAMI S.O., NZALAK J.O., IMAM J., IBE C.S. Observations on the Wattles of Adult Helmeted Guinea Fowls (*Numida meleagris galeata*). *Int. J. Poult. Sci.*, 2008, **7**, 1204-1206.
- VAN IMMERSEEL F., DE BUCK J., DE SMET I., HAESEBROUCK F., DUCATELLE R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. *Dev. Comp. Immunol.*, 2002, **26**, 355-364.
- VILLATE D. Maladies des volailles. France Agricole, 2^{ème} édition: Paris, 2001, 400 p.
- WOOLEY R.E., GIBBS P.S., BROWN T.P., MAURER J.J. Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* isolates. *Avian Dis.*, 2000, **44**, 318- 324.
- ZHOU D., GALÁN J. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect.*, 2001, **3**, 1293-1298.

Deuxième partie: Présentation des résultats

2.1. Etude I. Etude des contraintes sanitaires dans les élevages de pintades locales dans le Département du Borgou au Bénin

Préambule

Cette étude a pour but de déterminer de manière systématique et à grande échelle les pratiques d'élevage (aspect zootechniques et conditions hygiéniques) de la pintade locale béninoise dans le département du Borgou. Les résultats attendus devraient permettre de mieux définir les principales contraintes sanitaires, la saisonnalité des pathologies observées, l'âge d'apparition des pathologies et leurs effets sur la productivité de la pintade élevée en milieu villageois. L'étude vise aussi à la compréhension des facteurs à gérer en priorité pour permettre un développement de cet élevage, notamment au travers de la formation des éleveurs. Enfin, la systématisation des analyses nécropsiques devrait permettre de confirmer les fréquences relatives de différents agents pathogènes, bactéries et parasites pouvant être identifiés chez la pintade.

A cet effet, une enquête a été réalisée sur la base d'un questionnaire qui a permis d'interroger 210 éleveurs de pintades appartenant à 7 communes dans le département du Borgou (Banikoara, Bembèrèkè, Gogounou, Kandi, N'Dali, Parakou, Tchaourou). Elle a permis de s'enquérir du système d'élevage de la pintade dans le département, l'organisation de l'élevage d'une façon générale (alimentation, hygiène, système de chauffage, contraintes sanitaires). Cette première phase a permis d'identifier ou de recenser quelques contraintes qui freinent le développement de l'élevage selon les éleveurs, mais d'autres points étaient encore à clarifier.

Il était donc apparu judicieux d'organiser une seconde enquête complémentaire, à travers un suivi des élevages de pintades pour identifier les agents jouant un rôle éventuel dans la mortalité des pintadeaux. A cet effet, une série d'observations cliniques, d'autopsies, d'analyses bactériologiques et parasitologiques ont été réalisées dans 39 élevages dans les communes de Banikoara, Bembèrèkè, Kandi, N'Dali, Parakou, Tchaourou. Par contre, suite à la situation de terrain et aux difficultés techniques, aucune analyse virologique n'a pu être réalisée durant cette enquête.

2.1.1. Article 1: Farmer perceptions and pathological constraints in helmeted guinea fowl farming in the Borgou Department in North-East Benin

Published in African Journal of Agricultural Research vol.6 (10), pp. 2348-2357, 18 May 2011

C. K. Boko^{1*}, M. T. Kpodekon¹, S. Farougou¹, M. Dahouda², A. K. I. Youssao¹, G. L. Aplogan³, J. Zanou³, and J. G. Mainil⁴

¹Université d'Abomey-Calavi, Ecole Polytechnique d'Abomey Calavi/ Département de Production et Santé Animales, Benin, Republic of Benin

²Université d'Abomey-Calavi, Faculté des Sciences Agronomiques/ Département de Production Animale, Republic of Benin

³Laboratoire de Diagnostic Vétérinaire et de séro-surveillance, Parakou, Republic of Benin

⁴Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département des Maladies Infectieuses et parasitaires/Bactériologie, Belgium

Corresponding author. E-mail: cyrilleboko@yahoo.fr

Full Length Research Paper

Farmer perceptions and pathological constraints in helmeted guinea fowl farming in the Borgou department in North-East Benin

C. K. Boko^{1*}, M. T. Kpodekon¹, S. Farougou¹, M. Dahouda², A. K. I. Youssao¹, G. L. Aplogan³, J. Zanou³ and J. G. Mainil⁴

¹Université d'Abomey-Calavi, Ecole Polytechnique d'Abomey Calavi/ Département de Production et Santé Animales, Republic of Benin.

²Université d'Abomey-Calavi, Faculté des Sciences Agronomiques/ Département de Production Animale, Republic of Benin.

³Laboratoire de Diagnostic Vétérinaire et de séro-surveillance, Parakou, Republic of Bénin.

⁴Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département des Maladies Infectieuses et parasitaires/Bactériologie, Belgium.

Accepted 22 April, 2011

Though the raising of helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*) is an important part of rural farming in West-Africa, the death rate of keets within the first two months of life reaches values higher than 50%. The aim of this study conducted in North East Benin (Borgou department) was (i) to correlate the farming systems to keet morbidity and mortality rates; and (ii) to identify non-biological and biological factors responsible for keet deaths. The scavenging farming system is the basis of guinea-fowl breeding with overnight housing in overcrowded coops and “natural” feeding/watering conditions. This farming system is therefore understandably predisposed to the onset and spread of microbial and parasitic diseases, but the mortality rate (ca. 70%) was also influenced by the monthly rainfall and the circadian rhythm of temperature. None of the clinical signs or organ lesions at necropsy was specific to any microbial or parasitic disease. Accordingly, with the exception of salmonellae, the isolated bacteria represented post-mortem invaders and/or secondary pathogens and the helminth species identified were of low pathogenicity. In conclusion, the practice of guinea fowl breeding within the scavenging system will only be successful after improvement of hygienic parameters, such as housing, crowding, feeding, and watering conditions.

Key words: Guinea fowl, scavenging system, morbidity, mortality, bacteria, parasites, Benin.

INTRODUCTION

Today, agriculture represents the most important income source for developing countries. Within agriculture, poultry farming plays a very important role in the struggle against poverty by producing a cheap source of protein, and local poultry represents the majority of animals raised by farming populations for their own consumption, sale, and cultural and social uses (Branckaert, and Gueye, 1999). In Africa, Asia and Latin America, 80% of farmers raise poultry via the scavenging system (FAO,

2004). This system of raising in which young poultry walk freely around the coops mixing with adult poultry of different species and mostly feeding upon local flora and fauna, inevitably comes up against numerous sanitary constraints.

In the Borgou department of North-East Benin, the raising of helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*) is an important part of rural farming (Belco, 1985). According to Galor (1990), 75% of pathologies in guinea fowl occur before six-week-old. In Benin, the death rate of keets within the first two months of life varies between 68 and 87% (Belco, 1985; Boko, 2004). Similar observations have been made in Burkina Faso (Bessin et al., 1998)

*Corresponding author. E-mail: cyrilleboko@yahoo.fr.

with a death rate of 73 to 80% during the first three months of life.

Infestation by parasites, mainly helminths, is very high and probably responsible for a high proportion of keet deaths. Indeed, several surveys have indicated a high prevalence of parasites in different African countries: 85 to 89% in Burkina Faso (Vercruysse et al., 1985; Bessin et al., 1998); 40 to 92% in Niger (Idi, 1998); and 87 to 97% in Benin (Chrystophe et al., 1997; Salifou et al., 2003). In the Borgou department of Benin, anthelmintic (levamisole chlorhydrate 20%) treatment and prophylaxis have been shown to cause a two-fold reduction in the number of ascaridia and syngamus eggs per gram of faeces (Boko, 2004).

On the other hand, very few studies have been published on infection rates in guinea fowl by bacteria and viruses. In a study in Benin, the sero-prevalence of *Salmonella* serovar Pullorum was shown to be 1.1% (Chrystostome et al., 1997), but no bacterial isolation was performed. In a study in Burkina Faso, the most frequent bacteria isolated from dead keets (0-3 months) were *Escherichia coli* (24%), *Salmonella* sp. (23%), and *Proteus* sp. (10%) (Bessin et al., 1998). In Nigeria, Okaeme (1981) suspected a 10% prevalence of salmonellosis on the basis of clinical signs and lesions observed in local guinea fowl, but no laboratory analysis was performed.

Furthermore, most of the few existing viral studies have concerned the Newcastle virus infection with a sero-prevalence between 5 and 13% in Benin (Chrystostome, 1997; Boko, 2004) and of 20% in Burkina Faso (Bessin et al., 1998).

The aim of this study was (i) to perform a wide-scale questionnaire-based field survey to record precisely the conditions and constraints of the local guinea-fowl farming systems in the department of Borgou, Benin; (ii) to record the keet morbidity and mortality rate during the 2006 raising season in farms chosen on the basis of the answers to the questionnaire; and (iii) to identify putative non-biological and biological (focusing on bacteria and helminths) parameters responsible for the clinical signs, organ lesions and death of keets on those farms.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The farms involved in the study are located in North-East Benin (Borgou Department), a territory covering 52093 square kms, that is, 46% of Benin's surface area, and situated between latitude 8°45' and 12°30', North; longitude 2° and 3°15' East. This region is characterised by a soudano-guinean climate with a rainy relatively cold season from April to October and a dry, very hot season from November to March. Annual rainfall varies from 900 to 1200 mm and extreme average temperatures are 30.8°C in February (dry season) and 24.4°C in August (rainy season). The economy is essentially based on the agricultural sector with up to 80% of the population earning their resources from crop production, animal breeding and/or fishing. But rural populations maintain a traditional

type of farming characterised by a low output (Annual report, 2000).

First field survey

A wide scale-questionnaire-based field survey was carried out from January to March 2006 in seven townships in Borgou (Figure 1): Banikoara (37 breeders), Bembèrèkè (27 breeders), Gogounou (27 breeders), Kandi (26 breeders), N'dali (31 breeders), Parakou (34 breeders), and Tchaourou (28 breeders). The 210 guinea fowl breeders received a questionnaire regarding their whole management system: the general level of outdoor and indoor hygiene, sanitary constraints, and materials used for feeding and watering and their maintenance, and the heating system. The breeders were also asked to report all information relating to diseases, death rates and treatments carried out during the previous (2005) laying season. Since morbidity rates, disease conditions and mortality rates vary according to age (Okaeme, 1983), two groups were studied: from hatching to 2 months (hereafter named keets) and from 2 to 18 months (hereafter named adults).

Second field survey

A second field survey was carried out during the 2006 laying season, which corresponds to the rainy season (from April to November), with guinea fowl farmers chosen on the basis of their behaviour and answers given to the questionnaire during the first field survey. Each breeder was chosen according to his ability to work in a team, his past - experience in raising guinea fowl, the presence of a minimum of three laying guinea fowls in his flock and the ease of access to his farm. These farms were visited three times a week on Monday, Wednesday and Friday by a technician specialised in animal husbandry in each township. During these visits, information was gathered on the general management of the flock, as in the questionnaire distributed in the first survey. In addition, the report on each visit included the result of a clinical examination of the animals, with information on the type of clinical signs observed in individuals, their time of onset, and their evolution in the following days, on the duration of the illness in the flock, on the morbidity and mortality rates, and on the treatment applied, if any. The mortality rates of the 2006 laying season were calculated according to the two age groups described earlier.

Laboratory analysis

The dead and some diseased guinea fowls (following euthanasia) were placed in sealed bags, and transported in an icebox to the Bacteriological Department of the Veterinary Diagnostic and Serological Monitoring Laboratory of Parakou (Benin) in order to perform necropsy and complementary bacteriological and parasitological analyses. Lesions in internal organs (spleen, kidney, vitellin, liver, intestine, caecum, lungs and/or heart) were recorded and sampled for complementary bacteriological analysis.

Samples for bacterial growth were inoculated onto sheep blood agar. After overnight incubation at 37°C, the different colony types were transferred onto sheep blood, McConkey's and/or Chapman agar plates and incubated further for 18 h. Colonies growing on McConkey's agar were further transferred onto SS (*Salmonella-Shigella*) agar plates for presumptive identification of *Salmonellae*. All agar plates were prepared at the Laboratory of Production and Animal Health Department of the Polytechnic School of Abomey-Calavi (Benin) according to the instructions of the manufacturer (Becton Dickinson, Belgium). Identification of the colonies was performed according to classical procedures (Barrow and Feltham,

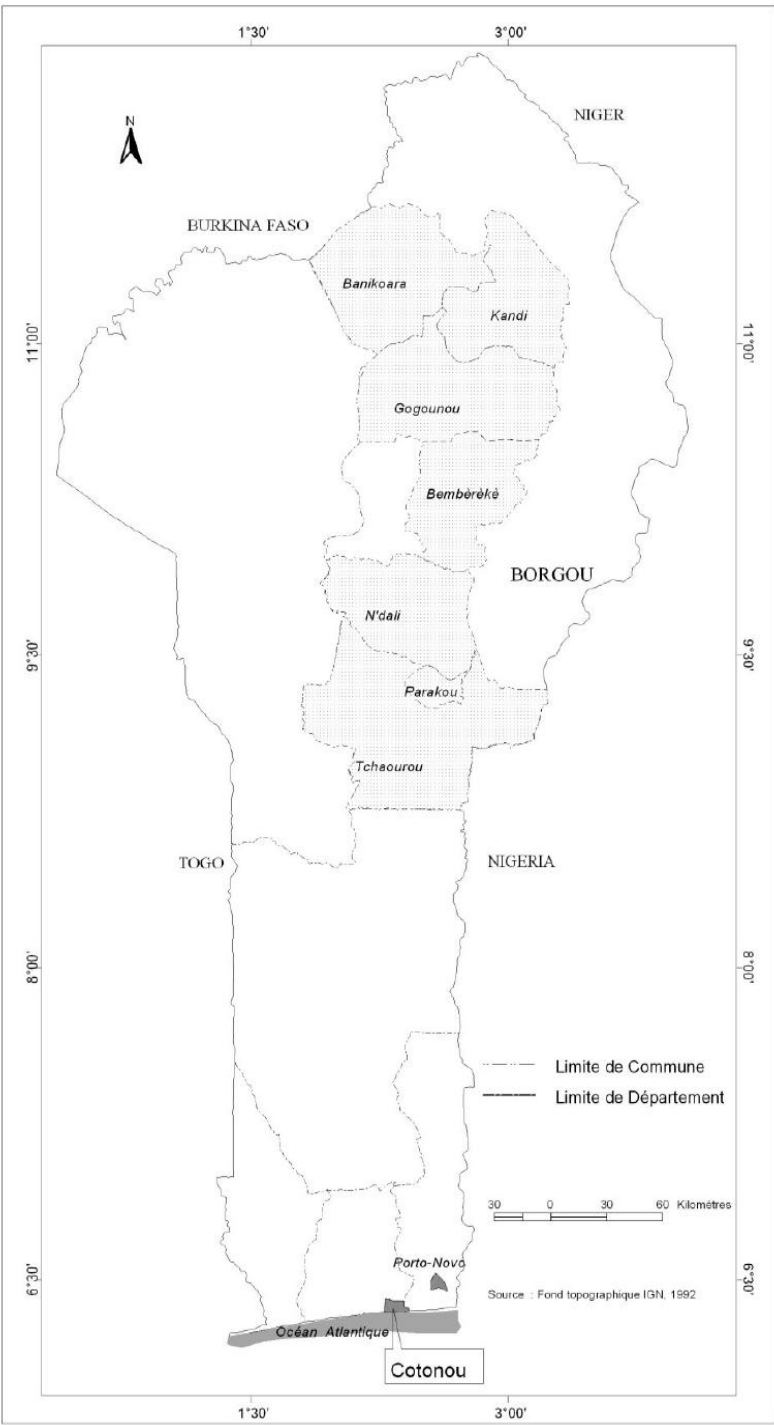


Figure 1. Map of Benin, of the Borgou department, and of the 7 townships of the study area.

1993): Gram staining, catalase reaction, peroxidase reaction, motility, mini sugar sets and API 20 E sugar sets (BioMérieux, France), as recommended by the manufacturer.

A concentration method for faecal and intestinal content examination using saturated sodium chloride flotation solution was employed and performed to identify guinea fowl worm eggs. Two



Figure 2. A typical coop used to house poultry overnight.

grams (2 g) of fresh faeces or intestinal content were diluted in 90 ml of saturated sodium chlorite and strained through a fine sieve to retain large particles. A cover glass was then carefully placed on top of the liquid phase for half an hour, removed, then placed on glass slide and examined with a microscope at 400X (Thienpont et al., 1986).

Data analysis

Comparison of the mortality rates in the different townships and age groups was performed using the Z test (SAS, 1991).

RESULTS

Farmer perceptions on losses in guinea fowl

Most of the guinea fowl breeders (95%) practised a traditional farming system characterised by free-range (or scavenging) farming and keet raising conditions. Half of the flocks (53%) had a size of 7 to 12 adult male and female guinea fowls. Depending on the period of the year and on the farmer's need for money, guinea fowls were ready for sale at market between 8 and 18 months.

Young keets were raised according to the scavenging system by 93% of the farmers. Guinea fowl eggs were incubated and hatched by local hens so that the female guinea fowls could continue to lay eggs constantly. On

those farms, the keets walked freely around the coops and followed the surrogate hen mothers until weaning age (2 months) along with the chicks, as they would with their biological mothers. Therefore, in all farm yards, keets very closely cohabitated with various poultry species, especially chickens of different ages. Overnight, the keets, chicks and surrogate hen mothers were housed in chicken coops, while adults roosted in trees in 74% of the farms. There were different coop designs generally made with local materials (Figure 2). Only 23% of the breeders cleaned the coops once during the laying season.

Although all interviewed farmers provided a handful of maize grain, sorghum, rice bran, and/or kitchen waste and household refuse on the ground, they did so only once a day, either in the morning or in the evening. Since all poultry must supplement their meagre daily ration while scavenging in their surroundings, the majority of the keet daily ration is therefore based on a wide variety of locally available flora and fauna specimens, such as earthworms, insects, the harvest residues and vegetable leaves. For watering, 35% of the farmers used rudimentary containers known locally as "canaries" (made of pieces of other broken vessels), but basically anything that can contain water. These containers were cleaned only once during the laying season. The remaining

Table 1. Mortality rates of keets (0-2 months of age) and adults (2-18 months of age) recorded during the 2005 laying season in 210 farms in 7 townships of the Borgou department (Benin) (First field investigation).

Townships (No. farms)	Keets(0-2 months)		Adults(2-18months)	
	Numbers	Mortalityrates (%)	Numbers	Mortalityrates(%)
Banikoara (37)	553	73 ^a	149	16 ^a
Bembèrèkè (27)	289	71 ^{ab}	84	16 ^a
Gogounou (27)	297	65 ^c	100	7 ^b
Kandi (26)	294	67 ^{bc}	97	8 ^b
N'Dali (31)	440	72 ^{ab}	123	15 ^a
Parakou (34)	521	70 ^{abc}	156	7 ^b
Tchaourou (28)	310	68 ^{abc}	100	15 ^a
Borgou Department	2704	70	809	12

^{a, b, c} Means on the same column with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

65% of farmers revealed that their animals were watered at natural water ponds.

Not surprisingly, the major burden reported by all farmers was the high keet mortality rate. Regarding the onset of diseases, the first clinical signs reported by all farmers were loss of appetite, prostration, somnolence, diarrhoea, and dehydration. Mortality usually started 24 to 48 h later and could persist for one week within the flock.

For the year 2005, the overall mortality rate reported for young keets from hatching to 2 months of age was 70%, with little variation between the townships (65 to 73%), and 12% for older and adult guinea fowls (7 to 16%) (Table 1). Most of the farmers (81%) suspected the most important causes of morbidity and mortality of keets to be due to bacteria and to sensitivity to the relative drop in temperature during the nights of the 2005 rainy season (between 29.7 and 36.2°C during the days down to between 21.6 and 24.4°C during the night) (Annual report, 2006). For adult guinea fowl, predators (dogs, pigs, snakes and ducks), road accidents (bicycles, motorcycles and cars) and children using catapults were viewed as the most important causes.

Nevertheless, only 12% of the farmers kept the keets in their own kitchen overnight, in closed baskets made from the bark of palm trees (*Elaeis guineensis*). The basket were sometimes covered with blankets and/or heated with petrol lamps to provide warmth. Only 10% of farmers reported the therapeutic use of antibiotics, in particular flumequine, because of the cost of such treatments.

Clinical signs of losses in guinea fowl in the farming systems

Based on the answers to the questionnaire, a second field investigation was performed during the 2006 laying season in 39 chosen guinea fowl farms in 6 townships (8 in Banikoara, 6 in Bembèrèkè, 6 in Kandi, 6 in N'dali, 7 in

Parakou and 6 in Tchaourou: Figure 1). The aim of this second investigation was to collect more specific information about the causes of high morbidity and mortality rates in the keets and to define more precisely the circumstances and parameters involved.

During the 3 weekly visits made by the technician, a total of 1209 keets were followed: 1007 (83%) showed clinical signs and 810 died (67%) (Table 2). The most frequent clinical signs observed were identical to those recorded in the questionnaire: loss of appetite, prostration, somnolence, diarrhoea, and dehydration. Whitish diarrhoea was observed in 486 and respiratory distress in 130 of the diseased keets (48 and 13%, respectively). Also as reported in the questionnaire, disease and clinical signs extended progressively through the flock for about one week before becoming less frequent. The morbidity rate was lower (13%) amongst the 409 adult guinea fowls followed (Table 2). The prominent clinical signs were prostration and chronic dehydration of the feet (2%), but the majority of deaths were caused by predators (dogs, pigs, etc), road accidents (bicycles, motorcycles, etc) and children using catapults.

As reported during the first survey, death usually began between 24 and 48 h after the onset of the clinical signs in the flock and reached a peak after 48 to 72 h, mostly as a consequence of starvation, dehydration, and/or increased sensitivity to the relative drop in temperature during the night (from between 29.8 and 38.8°C during the day down to between 21.6 and 24.6°C during the night in 2006 rainy season) (Anonyme, 2006).

The mortality rates in these 39 breeding farms were very close between the six townships with no statistically significant difference (Table 2) with mean values of 67% in the keets and 13% in the older and adult guinea fowls. Nevertheless, the keet mortality rate was clearly influenced by environmental factors, particularly the monthly rainfall values (Figure 3) with both parameters

Table 2. Mortality rates of keets (0-2 months of age) and adults (2-18 months of age) recorded during the 2006 laying season in 39 farms in 6 townships of the Borgou department (Benin) (Second field investigation).

Townships(N° farms)	Keets(0-2 months)		Adults(2-18months)	
	Numbers	Mortality rates (%)	Numbers	Mortality rates(%)
Banikoara(8)	245	68 ^a	78	14 ^a
Bembérékè (6)	178	66 ^a	61	14 ^a
Kandi (6)	176	64 ^a	63	12 ^a
N'Dali (6)	195	65 ^a	68	15 ^a
Parakou (7)	227	68 ^a	73	10 ^a
Tchaourou (6)	188	65 ^a	66	13 ^a
Borgou Department	1209	66	809	13

^a Means on the same column with the same superscripts not differ significantly ($p < 0.05$).

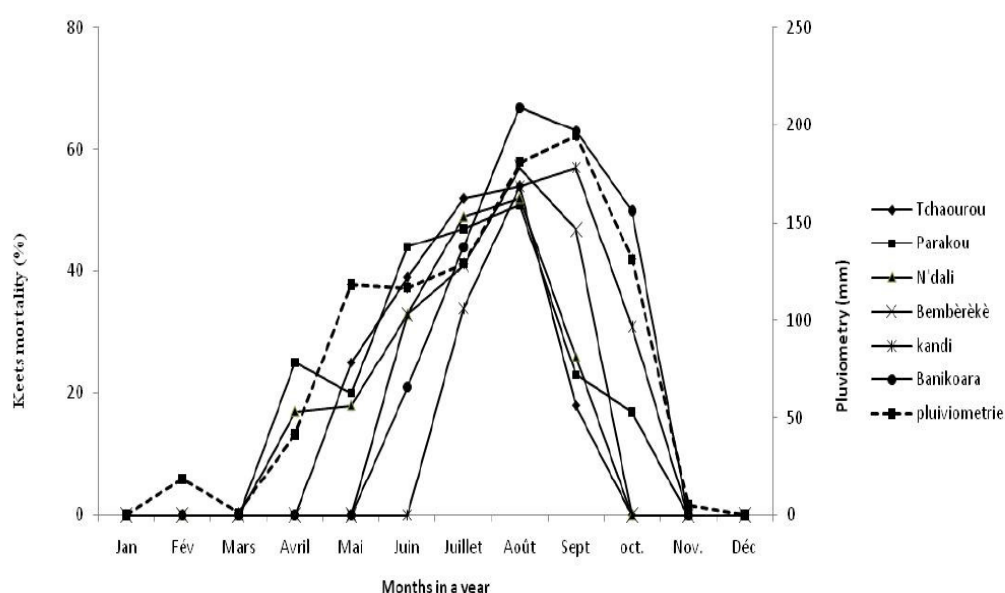


Figure 3. Keet (0-2 months of age) mortality rate (%) in the 6 townships of the second field survey and monthly pluviometry values in the Borgou department during the 2006 laying season.

reaching peak values between July and September.

Bacteriological and parasitological results from post-mortem examination and analyses

In order to identify more precisely the cause of the keet morbidity and mortality, necropsy and complementary bacteriological and parasitological analyses were performed on 120 of the dead or diseased (following euthanasia) keets. No post-mortem examination was performed on adult guinea - fowl. Lesions were observed on the intestines and on most internal organs (Table 3) with the digestive and respiratory tract organs most frequently affected. Lesions were more frequent and

larger on the liver, intestines and caecum, umbilicus and vitellus, kidneys, and respiratory tract, while less frequent and smaller lesions were observed on the spleen, muscles, eyes, heart and feet.

Two hundred and seventy-two internal organs with gross lesions were sampled and inoculated onto different agar plates as described earlier, of which 160 (59%) gave a positive bacterial growth. The organs with only small lesions were not sampled for bacterial growth, neither were the lesions of the respiratory tract in 27 keets sampled for bacterial growth. Sampling was not necessary because the lesions in these keets were attributed to the attachment of *Syngamus* parasites, since 26 (96%) out of the 27 keets that were positive for the presence of *Syngamus* eggs in their intestinal contents

Table 3. Organ lesions recorded at necropsy in keets (0-2 months of age) during the second field survey in 39 farms in 6 townships of the Borgou department.

Organs	Type of lesions	No. Keets	% keets
Liver	Inflammation, discoloration	108	90
Intestine, caecum	Inflammation	84	70
Umbilicus-vitellin	Omphalitis	50	42
Kidney	Inflammation	30	25
Respiratory tract	Inflammation, discoloration	27	22
Spleen	Discoloration	18	15
Muscle	Inflammation	7	6
Eye	Keratoconjunctivitis	4	3
Heart	Inflammation	4	3
Feet	Malformation	4	3

Table 4. Worm eggs identified in the intestinal contents of the 84 keets (0-2 months of age) with large lesions on the intestine/caecum at necropsy (see Table 3) during the second field survey in 39 farms in 6 townships of the Borgou department.

No. samples (%)	Helminth species and number of positive samples (%)			
	<i>Ascaris</i> sp.	<i>Ascaris-capillaria</i>	<i>Ascaris-Syngamus</i>	<i>Raillietina</i> sp.
84(100)	7(8)	12(14)	26(31)	1(1)

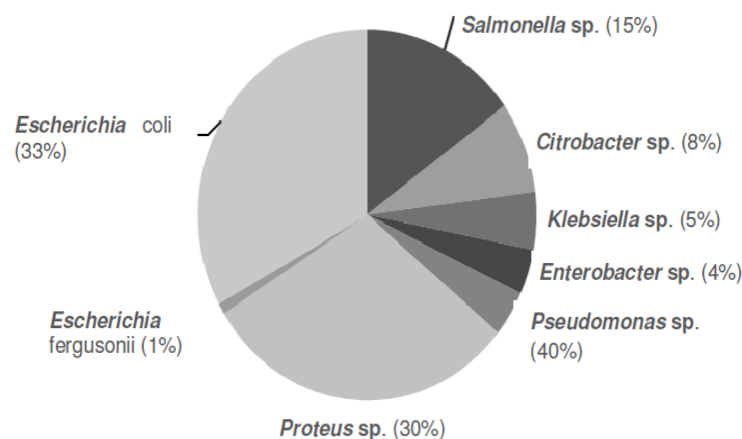


Figure 4. Bacterial genera and species identified in 160 cultures obtained from 272 internal organs with gross lesions from dead keets (0-2 months old) in the Borgou department during the 2006 laying season.

(Tables 3 and 4). The most frequent bacterial species identified (Figure 4) were *E. coli* (33%), *Proteus* sp. (30%) and *Salmonella enterica* (15%).

Parasitological examination was performed on the intestinal contents sampled from the 84 intestines/caeca with large lesions. The most frequent helminth parasite eggs belonged to three genera: *Ascaris* (54%), *Syngamus* (31%) and *Capillaria* (14%) (Table 4). Associations between *Ascaris* and *Syngamus* or *Ascaris*

and *Capillaria* were observed in 45% of the samples. Moreover bacteria and helminths were associated in 45 keets (Table 5).

DISCUSSION

According to the answers given by the farmers in the questionnaire and to the observations made during the

Table 5. Associations of bacteria and parasites recorded in 45 dead keets (0-2 months of age) during the second field survey in 39 farms in 6 townships of the Borgou department.

Associations	Numbers of samples	%
<i>Ascaris-Syngamus-E-coli-salmonella</i>	11/45	24
<i>Ascaris-Syngamus-E-coli</i>	14/45	31
<i>Ascaris-Capillaria-E-coli</i>	12/45	27
<i>Ascaris -E coli</i>	7/45	16
<i>Railletina-E coli</i>	1/45	2

two field surveys, guinea fowl (*Numida meleagris*) farming and breeding systems in Borgou (North East Benin territory) have not changed for decades. They are still very similar, if not identical to previous descriptions made not only in Benin (Belco, 1985; Dahouda et al., 2007), but also in several other sub-Saharan African countries: Burkina Faso (Bessin et al., 1998), Niger (Bessin et al., 1998), Tanzania (Maganga and Haule, 1998), and Zimbabwe (Saina, 2005). In this scavenging system, none of the raising and farming conditions, and certainly not the housing and the management of feeding/watering, is optimal for keet survival, nor is it an efficient system for meat production.

Although the present study reveals that three out of four farmers housed animals in coops overnight, the housing conditions were unhygienic in almost all cases: no cleaning at all or only once during the laying season, cohabitation with various other poultry species of all ages, overcrowding, lack of aeration, etc. Feeding and watering procedures were, as expected, inappropriate for keet growth and meat production. These procedures were also unhygienic with keets supplementing their meagre daily grain ration from the surrounding wildlife fauna (insects, earth worms, etc) and flora (grains, leaves, etc), particularly abundant and diverse during the rainy season, and from household refuse. The keets also drank from stagnating water in natural ponds and/or in rudimentary containers cleaned only once (maximum) during the laying season. In reality, the approach to feeding used by breeders is aimed at keeping keets and guinea fowls close to their house in order to "domesticate" them rather than at facilitating guinea fowl growth, fattening and meat production (Belco, 1985; Ayorinde, 1990). In summary, though keet growth is facilitated by the higher efficacy of helmeted guinea fowls compared to chickens in consuming non-conventional feed from the local fauna and flora (Bonds, 1997), the overall feeding policy is neither appropriate, nor rational for optimal meat production. Regarding the level of hygiene, although not all keet deaths are the consequence of infections and/or infestations, such housing and feeding/watering conditions undoubtedly predispose all poultry species to the onset and spread of infectious diseases and parasite infestations among all poultry species, especially young birds (Maganga and Haule, 1998; Bessin, 1998; Villate, 2001; Dahouda, 2007).

The obvious consequence of these unhygienic management conditions is that the farmer invariably has to bear the major burden of high keet mortality (Table 2). Here again, our findings are in full agreement with those of previous studies in Benin (Belco, 1985) and in other sub-Saharan African countries: Burkina Faso (Bessin et al., 1998), Nigeria (Nwagu and Alawa, 1995), and Ghana (Teye and Adam, 2000). In addition to the general lack of hygiene and to the presence of infectious and parasitic agents, our second field survey of 2006 reveals that the mortality rate is also influenced by climatic factors, particularly by monthly rainfall values and the circadian rhythm of temperature. This last factor can represent an important non-infectious cause of mortality because thermo-regulation system in young guinea fowl is not very efficient during the first month of life (Le Coz Doin, 1992). As a result, young keets are very sensitive to the differences between day and night temperatures during the rainy season (up to 8.1 °C in 2005 and up to 8.2 °C in 2006). Nevertheless, we found that only a minority of breeders (12%) took measures to protect keets against this nightly drop in temperature. In contrast, a high proportion of the mortality rate of adult guinea fowls during the dry season (13%; Table 2) was found to be caused by accidents, predators, road accidents and "hunters" (children with catapults), and not by infectious diseases to which these birds are also more resistant.

The role of climatic factors is perhaps the most indirect and somewhat double edged. On the one hand, the raised hygrometry in the coop during the rainy season favours the survival and multiplication of pathogenic microorganisms and parasites (Carlson and Whenham, 1968; Smith, 1997) and hygrometry of up to 75% also increases the sensitivity of animals to infections and infestations (Brugère et al., 1987). On the other hand, high rainfall and hygrometry values also reduce the dust concentration in the air, decreasing the contamination rates of keets and older guinea fowl via the aerosol route (Beard and Anderson, 1967).

The most frequent clinical signs and lesions were observed at the height of the intestinal tract (Table 3), but none was specific to any particular bacterial, viral, or parasitic disease. These observations are identical to those in the studies carried out in other African countries on local helmeted guinea fowls: Nigeria (Okaeme, 1981, 1983), Burkina Faso (Bessin et al., 1998) and Tanzania

(Cooper et al., 1996). They are also comparable to the observations on commercial guinea fowls in France (Galor, 1990; Le Coz Doin, 1992).

In agreement with all these observations, no specific pathogenic bacterial and/or parasite species could be isolated from the different samples that were examined, here. Similar results were also previously reported in Nigeria (Okaeme, 1981) and Burkina Faso (Bessin et al., 1998; Sanfo et al., 2007). Moreover, with the exception of *Salmonella* sp., the isolated bacteria are not considered primary pathogens. Instead, they mostly represent members of the resident commensal microbiota, which invade the body around or after death. Nevertheless, some bacterial species and strains of at least three genera (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) are clearly secondary pathogens (Dho-Moulin and Fairbrother, 1999) benefiting from favourable conditions (stress, weakening, cold, viral infection, heavy parasitism). In that respect, the helminth species identified in this study are considered to be of low pathogenicity, responsible primarily for a decrease in productivity, for a predisposition to bacterial or viral infections and/or for an increased sensitivity to adverse environmental conditions (Fabiyl and Offiong, 1979; Hien et al., 2009). Such associations of different infectious and non-infectious causes have often been observed (Bessin et al., 1998; Boko, 2004). Further bio-, sero-, patho-, and antibio-typing of different bacterial species (*Salmonella* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp.) and *in vivo* challenge experiments would help to better understand their actual primary or secondary aetiological role in the high mortality rate of keets. Such *in vivo* experimental studies of disease reproduction would also aid in the investigation of the medicinal power of local plants and in the recommendation to breeders of easy-to-apply and inexpensive therapeutic alternatives.

Although the struggle against bacteria, viruses and parasites is of the utmost importance, guinea fowl breeding via the scavenging system practised in sub-Saharan African countries will be successful only after; first, improvement of hygienic parameters, such as housing, crowding, feeding, and watering conditions. Also, there is need to consider the general raising conditions, such as the presence of predators, the incidence of vehicle accidents and catapult hunting by children. In order to reduce morbidity and mortality rates, simple hygienic measures need to be implemented before any prophylactic and/or therapeutic policy. These measures include: ventilation and regular cleaning of the coops (once a month, or ideally up to once a week), indoor housing of keets during the night (from 5 pm to 9 am), a well formulated diet for the birds using local natural resources and the use of clean containers for food and water distribution. Only then, will it be possible to go one step further and reduce the actual incidence and prevalence of viruses, bacteria and parasites. This involves the efficient and successful training of breeders

on how to take proper care of keets during the most critical period of their life, from July to September.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the animal husbandry technicians, Adjitoré Sévérin, Atihou Julien, Sabi Koto Abibou, and Sèchégbé Rodrigue, who performed the field surveys, and to all breeders who willingly provided the required information during the surveys.

REFERENCES

- Annual Report (2000). Activity report for 1999. Breeding office, Cotonou, Benin, pp. 6-7.
- Annual Report (2006). Monthly climatology report in Borgou. Madagascar and Africa Aerial security agency, Parakou, Benin, pp. 2-3.
- Ayorinde KL (1990). Problems and prospects of Guinea fowl production in the rural areas of Nigeria. In: Sonaiya EB (eds) Proceedings of an International Workshop on Rural Poultry Development in Africa, Ile Ife, Nigeria, pp.106-115.
- Barrow GI, Feltham RKA (1993). Cowan and Steel's Manual for identification of medical bacteria 3th edition. Cambridge University Press, pp. 50-164.
- Beard CW, Anderson DP (1967). Aerosol studies with avian mycoplasma. I. Survival in the air. Avian Dis., 11: 54-59.
- Belco LBK (1985). Contribution of the study of socio - economic importance and the actual guinea fowl breeding system in Benin. Thesis of agronomist, Agricultural Sciences Faculty, National University of Benin, Cotonou, Benin, pp. 77-97.
- Bessin R, Belem AMG, Boussini H, Compaore Z, Kaboret Y, Dembele M A (1998). Causes of young guinea fowl mortality in Burkina Faso. Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop., 51(1): 87-93.
- Boko KC (2004). Contribution for local guinea fowl rural breeding improvement Borgou Department (North-Est Benin). Master of Sciences in Vegetable and Animal Management resources in Tropical Area, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium, pp.19-25.
- Bonds H (1997). Alternative Farming: A "United Nations" of alternative farming on the Mornington Peninsula. Available: www.independentnewsgroup.com.au/archive/helmi/, date accessed: 19 November 2001, pp 1-4.
- Brankaert RDS, Gueye EF (1999). FAO's program for support to family poultry production. Proceedings of a Workshop: Poultry as a Tool in Poverty Eradication and Promotion of Gender Equality held at Tune Landboskole, Denmark, pp. 244-256.
- Brugère-Picoux J, sayada N (1987). Environment, respiratory pathology and stress in poultries. Revue Méd. Vét., 138(4): 333-340.
- Carlson HC, whenham GR (1968). Coliform bacteria in chicken broiler house dust and their possible relationship to colisepticemia. Avian Dis., 12: 297-302.
- Cooper JE, Max RA, Mbassa GK (1996). Health studies on a group of captive helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*) in Tanzania, Avian Pathol., 25:135-145.
- Chrysostome C, Allard P, Demey F, Bell JG, Werthner JP (1997). Serological and Parasitological surveys on guinea fowl at village level in Benin. 2nd poultry research day, Tours, pp. 73-76.
- Dahouda M, Toleba SS, Youssao AKI, Bani Kogui S, Yacoubou Aboubakari S, Hornick JL (2007). Guinea fowl rearing constraints and flock composition under traditional management in Borgou Department, Benin. Fam. Poult., 17: 3-14.
- Dho-Moulin M, Fairbrother JM (1999). Avian Pathogenic *Escherichia Coli* (APEC). Vet. Res., 30: 299-316.
- Fabiyl JP, Offiong SA (1979). Clinical syngamiasis in the grey-breasted helmet guinea fowl (*Numida meleagris galeata*) and its treatment with thiabendazol. Vet. Record, 104: 348.

- FAO (2004). Small-scale poultry production, technical guide. Rome Italy, pp. 29-47.
- Galor (1990). Broiler breeding Guinea fowl Program. Galorfrance, Paris, pp. 14-21.
- Hien OC, Ouedraogo CL, Diarra B, Traore B (2009). Effect of Endoparasitism on the Local Production of Guinea Fowl in Burkina Faso. *Tropicultura*, 27(3): 184-190.
- Idi A (1998). Peasant practices in traditional poultry farming in Niger. Résultats de recherche. International Network for Family Poultry Development (INFPD), Newsletter, 8(3): 2-4.
- Le Coz Douin J (1992). Guinea fowl Breeding. Edition Point vétérinaire : Maison Alfort, pp.149-182.
- Maganga SLS, Haule KS (1998). Domestication of guinea fowl: A case of Morogoro Municipal, Tanzania. In: Fao (eds) Wildlife and nature. *Int. J. Nat. Conserv. Afr.*, 14(1): 14-28.
- Nwagu BI, Alawa CBI (1995). Guinea fowl production in Nigeria. *World's Poult. Sci. J.*, 51: 261-270.
- Okaeme AN (1981). Diseases of young guinea fowl helmeted (*Numida Meleagris galeata*, Pallas) in experimental research center in Nigeria. *Bull. Anim. Health. Prod. Afr.*, 29: 349-351.
- Okaeme AN (1983). Disease conditions in guinea fowl production in Nigeria. *wildelife/Range Division*, Kanji Lake research Institute, pp. 179-184.
- Saina H (2005). Guinea fowl (*Numida meleagris*) production under smallholder farmer management in Guruve district, Zimbabwe. M.Phil. Thesis, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zimbabwe.
- Salifou S, Goudegnon M, Pangui JL, Toguebaye BS (2003). Helminthical parasitic fauna of digestive tract and trachea of Guinea fowl (*Numida meleagris galeata*) in North-East of Benin. *Rev. Afr. Sant. Prod. Anim.*, 1: 25-29.
- Sanfo R, Boly H, Sawadogo L, Ogle B (2007). The Characteristics of Rural Guinea Fowl (*Numida meleagris*) Breeding System in the Centre of Burkina Faso. *Tropicultura*, 25 (1): 31-36.
- Smith (1997). Poultry breeding. Edition Maisonneuve et Larose, Paris, 1: 83-109.
- SAS (1991). User's Guide Ressource Electronique), 4th eds. SAS Institute, Inc., SAS/Stat: Cary, Version 6. New York.
- Teye GA, Adam M (2000). Constraints to Guinea fowl production in northern Ghana: A case study of the Damongo area. *Ghana J. Agric. Sci.*, 33: 153-157.
- Thienpont D, Rochette F, Vanpariss OFJ (1986). Diagnosing helminthiasis by coprological examination. Janssen Research Foundation, Second Edition, Belgium, pp. 31-34.
- Vercruysse J, Harris EA, Bray RA, Nagalo M, Pangui M, Gibson DI (1985). A survey of gastrointestinal helminths on the common helmet Guinea fowl (*Numida meleagris galeata*) in Burkina Faso. *Avian Dis.*, 29: 742-745.
- Villate D (2001). Poultry diseases, 2th Edition. France Agricole: Paris, pp. 226-337.

2.2. Etude 2: Identification des salmonelles et évaluation *in vivo* de la virulence de 5 sérotypes

Préambule

D'après les résultats de l'étude précédente, les colibacilles et les salmonelles constituent les bactéries les plus fréquemment associées aux pathologies. L'hypothèse de leur contribution au développement des signes cliniques présentés par les pintadeaux et aux pertes d'animaux observées dans les élevages peut donc être émise. Cependant, bien que le pourcentage d'isolement des colibacilles soit nettement supérieur à celui des salmonelles, les résultats négatifs de sérotypage et de pathotypage partiel obtenus en 2001-2002 avec les souches d'*E. coli* nous ont amené à limiter cette étude, à l'évaluation de la part de responsabilité des salmonelles dans les mortalités des pintadeaux.

En effet, les salmonelles jouent un rôle important en pathologie animale comme en pathologie humaine. Du point de vue animal, et plus particulièrement chez les oiseaux, *Salmonella Gallinarum/Pullorum* est souvent à l'origine des pertes économiques importantes dans les élevages. Grâce aux mesures draconiennes mises en place en Europe et en Amérique du Nord, on assiste à sa quasi disparition. Mais, il existe également des infections de volaille par des sérotypes ubiquistes avec deux conséquences majeures (Euzébi, 1997):

- i) importance économique liée aux limitations commerciales qui découlent de l'infection alors que les pertes réelles observées en élevage sont souvent mineures. Cependant, les problèmes pathologiques ne sont pas négligeables chez les jeunes des espèces dinde, canard, pintade;
- ii) importance hygiénique liée à l'augmentation de l'incidence des toxi-infections alimentaires collectives faisant suite à la consommation des viandes, des œufs, et des ovoproduits (Molbak et Neiman, 2002 ; Molla et Mesfin, 2003 ; Karraouan *et al.*, 2010).

Ainsi, dans la présente étude, il s'agira d'isoler des souches de salmonelles non seulement à partir des pintadeaux morts dans les élevages mais aussi à partir des matières fécales des espèces animales vivant dans la même écologie que la pintade (pintades adultes, poules couveuses, autres espèces animales,... ainsi que de l'homme (éleveur) et de l'environnement). Les résultats de cette étude permettront d'établir une carte épidémiologique de la salmonellose dans la zone d'étude.

Par ailleurs, il sera également procédé au développement d'un modèle expérimental en milieu contrôlé (un cadre amélioré et différent des conditions en milieu villageois) dans lequel des pintadeaux vivant vont subir une inoculation par voie orale à partir des sérotypes Oakland, Legon, Kingston, Farakan et Teshie, isolés dans les deux premières années dans le cadre de cette étude et ce, suivant un gradient de concentrations. Le but final est de vérifier si ces sérotypes sont bien pathogènes vis-à-vis des pintadeaux.

2.2.1. Article 2: Identification and typing of *Salmonella* serotypes isolated from guinea fowl (*Numida meleagris*) farms in Benin during four laying seasons (2007–2010)

In preparation

K. C Boko^{1, 2}, T.M. Kpodekon¹, J-N. Duprez², H. Imberechts³, B. Taminiau², S. Bertrand⁴, and J.G.Mainil^{2*}

¹ Université d'Abomey-Calavi, Ecole Polytechnique d'Abomey Calavi, Département de Production et Santé Animales/Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, 01BP 2009, Cotonou, Benin

² Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires, Laboratoire de Bactériologie, Boulevard du Colonster 20, Bâtiment 43a, 4000 Liège, Belgium

³ Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques, CERVA-CODA, Uccle, Bactériologie, 99 Groeselenberg, 1180 Brussels, Belgium

⁴ Institut Scientifique de Santé Publique, ISP/WIV, Section Bactériologie, Centre National de Référence des *Salmonella* et *Shigella*, 14 Rue Juliette Wytsman, 1050 Brussels, Belgium

*Corresponding author E mail: jg.mainil@ulg.ac.be

SB & JGM equally supervised this work

Summary

The main problem of local guinea fowl (*Numida meleagris*) traditional farming and breeding system in North-East Benin is the high mortality rate of the keets (up to 70 %) due to combinations of climatic, nutritional, hygienic and infectious causes. The present study was carried out to evaluate the prevalence of *Salmonella enterica* during four laying seasons (2007-2010) and to compare the different isolates from necropsied keets, laying Guinea fowls, surrogate hen mothers, other contact animals species and breeders, by biotyping, serotyping, pulsotyping, virulotyping, plasmid typing and antibiotyping. *Salmonella enterica* belonging to eight different serotypes (Adelaide, Farakan, Kingston, Legon, Luke, Oakland, Sangalkam, Teshie, and one untypable strain) were isolated from 14% to 18% of the necropsied keets. The serotypes Adelaide, Farakan, Luke, Sangalkam, Teshie and the untypable strain were isolated only in one township during one year of sampling, while serotypes Oakland, Legon, Kingston were present in 2 to 3 townships for 2 to 3 years of sampling. Five of the serotypes (Farakan, Kingston, Legon, Oakland and, Sangalkam) were also isolated from faecal samples of laying Guinea fowls and/or surrogate hen mothers, which most probably represent the origin of the contamination of the keets. Further comparison of the isolates highlighted the high degree of homogeneity within each of those five serotypes supporting their respective clonal origin. Only the association of trimethoprim-sulfamethoxazol was effective against all *Salmonella* isolates emphasizing the raise of antibiotic resistance and the need for alternative therapies.

Keywords: *Salmonella* - guinea fowl - serotypes - Pulsed Field Gel Electrophoresis - virulotyping

1. Introduction

The under-feeding is a plague characterizing developing countries. In this context, improving food ration becomes imperious to determine precisely the best means to stimulate agricultural and animal productions. Poultry breeding development is one of the solutions to increase animal protein production, especially in Sub-Saharan Africa.

In the current animal policy development, Benin government encourages local guinea fowl production (*Numida meleagris*), particularly in North-East Benin, where raising of this poultry species is of high socio-economic importance for the population. Guinea fowl is raised according to the scavenging system using local surrogate hens for incubation and hatching of the Guinea fowl eggs and for raising the keets till weaning age (2 months). So the female Guinea fowls can continue to lay eggs without interruption (Boko *et al.*, 2011a). The main problem in this traditional raising system is the high mortality rate of the keets, up to 70 %, with clinical signs, like loss of appetite, prostration, chills, somnolence, whitish diarrhoea, dehydration, lameness and respiratory distress (Boko, 2004; Boko *et al.*, 2011a).

Several bacterial species have been isolated from dead keets (Bessin *et al.*, 1998; Boko 2004; Boko *et al.*, 2011a) but, they can not be considered primary pathogens with the exception of *Salmonella enterica* isolates (Boko *et al.*, 2011b). Indeed, they mostly represent members of the resident commensal microbiota, which invade the body around or after death, or secondary pathogens (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) benefiting from favourable conditions (stress, weakening, cold, viral infection, heavy parasitism).

Salmonellae can be important zoonotic pathogens that can cause different serious diseases, like enteritis, septicaemia, abortions, etc, in animals and humans, but also asymptomatic infections, or healthy carrier state, mostly in the intestinal tract, liver, gallbladder and/or mesenteric lymph nodes (Bäumler *et al.*, 1998; Coburn *et al.*, 2007; Andrews-Polymenis *et al.*, 2010). Excretion of the organism causes widespread contamination of the environment and of foods and feeds (Oosterom, 1991).

The purpose of this study was to identify and compare *Salmonella enterica* isolated from different field samples collected in 36 guinea-fowl breeding farms of six townships in Benin (Borgou department) during four laying seasons (2007-2010), by biotyping, serotyping, pulsotyping, virulence typing, plasmid typing and antibiotyping.

2. Materials and methods

2.1. Sampling and isolation of *Salmonella*

The field samples were collected from 199 two month-old dead keets at necropsy and 75 guinea fowl eggs with dead embryos from 171 Guinea fowl, 171 surrogate hen, 55 human breeder, 36 mouse, and 6 duck faecal samples.

Faecal samples (1g) were at first pre-enriched by overnight incubation in 9 ml of buffered peptone water (BPW) at 37°C. For selective enrichment of *Salmonella*, 0.1ml BPW broth or 1g of intestinal and caecal contents, liver, lung, or dead embryos were inoculated into 10 ml of Rappaport-Vassiliadis broth (RV) and incubated at 42°C for 24 h, adapted to the procedure described by International Standard Method ISO, 6579: 2002 (Anon, 2002). A loopful of the RV-enriched culture was then plated onto two Xylose-Lysine-Desoxicholate (XLD) (Oxoid, England) and two *Salmonella-Shigella* agar (SS) plates and incubated at 37°C for 24h. In parallel, one drop of sterily collected heart blood at necropsy was directly streaked onto two 5% sheep blood Columbia and two MacConkey's agar plates (Oxoid, England) and incubated at 37°C for 24 h. Three suspect *Salmonella* colonies were transferred onto nutrient agar plates and subsequently subjected to the following tests: from staining, oxidase test, catalase test, O/F test, followed by a mini sugar set (indol, H₂S, urea, lactose, glucose) (Barrow and Feltham, 1993; Quinn, 1999). All agar plates and broth medium were prepared from dehydrated powders (Oxoid, England) at the Bacteriological Department of the Veterinary Diagnostic and Serological Monitoring Laboratory of Parakou (Benin) where pre-identification tests were also performed.

2.2. Biotyping and serotyping

One positively pre-identified colony per sample was confirmed as *Salmonella enterica* with API20E kit (Biomérieux, l'Etoile, France) and with OM immunoserums, (OMA, OMB, OMC) (Bio-Rad, Belgium) in the Bacteriology Laboratory of the Department of Infectious Diseases of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Liege (Belgium) (Import permit numbers, No 145749, 380852, 569716). Confirmed *Salmonella* isolates were referred to the Bacteriology Department of the Veterinary and Agrochemical Research Centre (VAR, Brussels, Belgium) and to the National Reference Centre for *Salmonella* and *Shigella* of the Scientific Institute of Public Health (ISP, Brussels, Belgium) for serotyping. Serotyping of *Salmonella enterica* strains was carried out by slide agglutination with commercial

monospecific antisera (Bio-Rad, Belgium) following the Kauffmann-White scheme (Grimont & Weill, 2007).

2.3. Pulsed field gel electrophoresis

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis was performed according to the Pulse Net Europe protocol (www.cdc.gov/pulsenet) (Bertrand *et al.*, 2009). The genomic DNA of the *Salmonella* strains isolated from dead keets, faeces of laying Guinea fowls, and faeces of surrogate hens and three other strains (*Salmonella* Kingston, *Salmonella* Legon, *Salmonella* Oakland) present in the ISP reference collection (internal controls) were digested with restriction enzyme *Xba*I (Fermentas, Germany). *Salmonella* Braenderup H9812 digested with *Xba*I was used as a size marker. Finally, Fingerprint II Informatix Software (Bio-Rad, Hercules, CA) was used to compare the PFGE profiles. The bands generated were analysed by using the dice coefficient and the unweighted pair group method with averages with a tolerance of 1%.

2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR) Virulotyping

The confirmed *Salmonella* isolates were screened by the polymerase chain reaction (PCR) for the presence of several virulence-associated genes (table 1) located on *Salmonella* Pathogenicity Islands (SPI) 1 to 5 (Courtney *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2006; Gassama-Sow *et al.*, 2006; Hughes *et al.*, 2008; Skyberg *et al.*, 2006). The DNA content was extracted by the boiling procedure (China *et al.*, 1996). The PCR reaction mixtures contained: dNTP: 5µl, buffer 10x: 5µl, Primer1: 2,5µl, Primer2: 5µl, distilled sterile water: 31,8 µl, DNA: 3µl. DNA amplification was carried out in a Mastercycler (Eppendorf, Le Pecq, France)

The PCR products were visualized after electrophoresis in a 1.5 % agarose gel in TAE (Tris-acetate-EDTA) buffer under ultra-violet light 365 nm (Proxima 16 Phi+ ISOGEN Live Science, Netherlands). The molecular weight marker was the SmartLadder MW-1700-10 lanes (Eurogentec, Belgium) ranging from 200 bp to 10 kbp.

2.5. Plasmid profiles

Plasmid profiles of confirmed *Salmonella* strains were obtained by the Kado and Liu procedure (Kado & Liu, 1981) as modified by Broes *et al.* (1988). Extracted plasmids were separated by overnight electrophoresis at 40V in 0.5% agarose gel. The four plasmids (98, 42, 23.9 and 4.6 MDa) of the *Escherichia coli* strain 39R681 (Mainil *et al.*, 1997) were the size markers.

2.6. Antibiotic sensitivity assay

The *in vitro* sensitivity patterns of the *Salmonella* isolates to antimicrobial agents were determined by the disc diffusion method on Mueller-Hinton agar plates (Becton Dickinson, Belgium) (Bauer *et al.*, 1966). The antimicrobial discs were: ampicillin (10 micrograms [μg]), enrofloxacin (5 μg), gentamicin (10 μg), nalidixic acid (30 μg), trimethoprim-sulfamethoxazol (1.25 μg /23.75 μg), tetracyclin (30 μg), oxacillin (5 μg), colistin (10 μg), neomycin (30 μg), cefuroxim (30 μg), sulfamethoxazol (250 μg) (Becton Dickinson, Belgium), and flumequine (30 μg) (Oxoid, France). These antibiotics are frequently used in poultry herds in Benin. The inhibition zones were interpreted on the basis of the French Committee on Guidelines for susceptibility testing (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, CASFM, 2010).

3. Results

3.1. Bacteriology

A total of 66 strains were confirmed *Salmonella enterica* by API20E biotyping (Table 2 and 3). They were isolated from 31 dead keets (15.3 %), three dead embryos in eggs (4 %), 10 laying Guinea fowl faecal samples (5.8 %), 19 surrogate hens mothers faecal samples (11.1 %), two human faecal samples (3.6 %), and one mouse faecal samples (2.8 %). Sixty-five of them could be serotyped and belonged to 15 different serotypes (table 3). The serotypes Adelaide, Farakan, Kingston, Legon, Luke, Oakland, Sangalkam, Teshie and one untypable strain were isolated from dead keets and/or embryos (34 isolates). The serotypes Farakan, Kingston, Legon, Oakland, and Sangalkam were also isolated from faecal samples of laying Guinea fowls and/or of surrogate hens mothers, along with serotypes Agama, Typhimurium var. Copenhagen, Uganda and Nima (29 isolates). The serotypes isolated from mouse and human faecal samples were different (Table 3). *Salmonella* isolates of serotypes Kingston and Legon belonged to 2 different biotypes, and of serotype Oakland to 3 different biotypes (table 3), while isolates from others serotypes belonged to only 1 biotype.

The five serotypes isolated from necropsied keets, dead embryos, laying Guinea fowls and/or brooding hens (Farakan, Kingston, Legon, Oakland, and Sangalkam) were geo-mapped to compare their yearly (2007 to 2010) presence in the six townships of the study area (Figure 1). The serotypes Farakan and Sangalkam were isolated only in one township during one year of sampling, Banikoara in 2008 and Kandi in 2009, respectively, while serotypes Oakland, Legon, Kingston were present in 2 to 3 townships for 2 to 3 years of sampling; Parakou and

Tchaourou in 2007, 2008, 2010, N'Dali in 2007, 2008, Banikoara in 2008; Parakou and N'Dali in 2007, 2008, 2010; Parakou in 2008, 2009, Tchaourou and Bembèrèkè in 2008; respectively (Figure 1).

3.2. Pulsed field gel electrophoresis

The isolates belonging to the five serotypes Farakan, Kingston, Legon, Oakland, and Sangalkam isolated from dead keets and/or embryos, and faeces of either laying Guinea fowls or surrogate hens mothers were compared by PFGE after *Xba*1 restriction. PFGE profiles were different between the 5 serotypes, but a very high level of similarity was recorded between *Salmonella enterica* isolates of serotypes Farakan (98%; Figure 2a), Kingston (99 %; Figure 2b), Legon (98 %; Figure 2b) and Sangalkam (100 %; Figure 2c). On the other hand, two PFGE similarity groups were recorded within the serotype Oakland (Figure 2d). The PFGE profile of the *S. Kingston* and *S. Legon* control strains were different from the profiles of the isolates from Benin, while the profile of the *S. Oakland* control strain was identical to the profile 1 of the isolates from Benin. The Oakland isolates with profile 1 belonged to one biotype while the isolates with profile 2 belonged to the other 2 biotypes (table 3). The Oakland profile 1 was observed at Tchaourou, Parakou, N'Dali, Banikoara, only in 2008 (14), while Oakland profile 2 was observed at Tchaourou, Parakou, N'Dali in 2007 (4), 2008 (1), 2010 (8) (Figure 1).

3.3. PCR Virulotyping

All isolates belonging to those 5 serotypes were also positive by PCR for most of the tested genes (Table 4). PCR for *ssaU* gene was negative with the following isolates: one Farakan, one Kingston, 12 Oakland, and one Sangalkam. Moreover PCR for *stiC*, *spaI*, and *ssaU* genes were negative with one Oakland isolate (Q/08). No relationship was observed between the 2 PFGE profiles and the virulotyping results of the Oakland serotype isolate.

3.4. Plasmid profiles

A total of 60 strains were positive for plasmid bands whose sizes varied between 2.5 to 60 Mega Dalton (Md). Although there are two PFGE profiles in Oakland serotype, the plasmid band profile is the same for the two groups.

3.5. Antibiotyping

All isolates were resistant to oxacillin, sulfamethoxazol and colistin while they all were susceptible to trimethoprim/sulfamethoxazol. More than 85 % of the isolates were also susceptible to nalidixic acid, flumequine, enrofloxacin, tetracyclin, neomycin, and gentamicin, but less than half of were susceptible to ampicillin (30%) and cefuroxim (45%).

4. Discussion

During this 4 year long survey (2007-2010), the yearly rate of *Salmonella enterica subsp enterica* isolation from necropsied keets in the six townships of the Borgou department in North-East Benin was between 14 % and 18 %, in agreement with earlier results (Boko *et al.*, 2011a). Though different non-infectious and infectious causes (climate, dirty housing, overcrowding, underfeeding, underwatering, accidents, parasites, viruses, ...) synergistically participate to the development of disease by weakening the host prior to the onset of bacterial infection (Gast, 2008; Boko *et al.*, 2011a), *Salmonella* is in general considered as one important pathogen in animals. Surprisingly enough, none of the 34 isolates from dead keets or embryos belonged to recognised avian pathogenic serotypes, like Gallinarum/Pullorum, Typhimurium or Typhimurium var. Copenhagen, (Euzéby, 1997; Bornert, 2000; Villate, 2001; Shivaprasad & Barrow, 2008), but to eight “exotic” serotypes (Adelaide, Farakan, Kingston, Legon, Luke, Oakland, Sangalkam, Teshie), and one isolate could not be serotyped. It is therefore important (i) to confirm these serotypes are actual pathogens in Guinea-fowls; (ii) to identify the source of contamination; (iii) to check whether all isolates of one serotype isolated from different sources are clonal.

The pathogenicity of the serotypes Farakan, Kingston, Legon, Oakland, and Teshie was experimentally assessed by oral challenge of 2 week-old keets (Boko *et al.*, 2011b). These five *Salmonella* serotypes are not only able to colonize keet intestines, but also to cause general clinical signs similar, though less dramatic to those observed during field surveys, emphasizing the contribution of other infectious and non infectious parameters to the high morbidity and mortality scores observed in field conditions. Virulence of salmonellae actually depends on an array of pathogenicity island (SPI)-localized genes mediating intestinal colonisation, intracellular survival, invasiveness and damage to host tissue (Marcus *et al.*, 2000; Chakravorty *et al.*, 2002 ; Barrow *et al.*, 2010). Nevertheless, the intensity of the clinical signs was significantly different between the serotypes (Boko *et al.*, 2011b) suggesting that they may differ by other properties related to their relative adaptation to 2-

week-old guinea fowl and/or by presence/absence of some well-known genes, like some isolates of this study. The virulotyping results (Table 4) indeed confirm that the majority but not all of *Salmonella* serotype Farakan, Kingston, Legon, Oakland and Sangalkam isolates possess the genes necessary not only for enteropathogenicity in keets, but also for the invasion of the blood stream and internal organs: for instance, SPI-1 and SPI-2 *invA*, *spiC* and *ttrB* genes encoding type 3 secretion systems (T3SS) which are essential virulence determinants for invasion of host cells and intracellular survival of *Salmonella* (Darwin *et al.*, 1999 ; Hensel, 2004 ; Cornelis, 2006 ; Akopyan *et al.* 2011) ; SPI-3 and SPI-5 *misL* and *pipD* genes which are also required for bacterial entry into the intestinal epithelial cells and for growth and survival of bacteria in the host (Marcus *et al.*, 2000 ; Malik-Kale *et al.*, 2011) ; SPI-4 *orfL* gene) which is involved in the secretion of toxins that induce apoptosis of immune cells and required for survival in macrophages (Schmidt & Hensel, 2004). Alternatively the isolates negative for one (*ssaU*) or three (*ssaU*, *sitC*, *spaI*) PCR (Table 4) may still harbour alleles of the targeted genes.

Of the eight serotypes isolated from dead embryos and keets, five were also isolated from laying Guinea fowls and/or surrogate hen mothers (Farakan, Kingston, Legon, Oakland, Sangalkam). Conversely none was isolated from other content animal species or breeders, although the number of isolates from those other sources was quite low. The comparison of the isolates belonging to these five serotypes by biotyping, pulsotyping and virulotyping (Tables 3 and 4; Fig. 2) highlights their high degree of homogeneity with variation observed for a very few Kingston, Legon and Oakland serotype isolates in biotyping and for only the serotype Oakland in pulsotyping. The two PFGE profiles of the serotype Oakland are quite closely related (Tenover *et al.*, 1995) and to some extent associated with one of the three biotypes observed (Table 3). No relationship is present between the two PFGE profiles and the most frequent two virulotypes of serotype Oakland or the host, but well with the township and year of isolation: the profile 1 was present in Parakou, Tchaourou, N'Dali, Banikoara in 2008, and the profile 2 in Parakou in 2007 and 2010, in N'Dali in 2007, and in Tchaourou in 2010.

Therefore according to all typing results the origin of the infection of young keets by the serotypes Farakan, Kingston, Legon, Oakland, Sangalkam, most probably resides in the intestinal contamination and faecal excretion of laying Guinea fowls and/or surrogate hen mother following a faecal-egg or a faecal-oral route of contamination. Such horizontal transmission of salmonellae between adult poultry and keets is of course favoured by several traditions: (i) the raising of Guinea fowls according to the scavenging system with the keets

walking freely around the coops and following the surrogate hen mothers until weaning age (2 months) along with the chicks (Boko et al., 2011a); (ii) the offering of Guinea fowls as presents to honour socially important guests, like in-laws or strangers (Belco, 1985; Bessin et al., 1998; Dahouda, 2003) ; (iii) the purchase in local markets of poultry coming from other townships or departments and their immediate placing without any quarantine in the backyard in close contacts with other poultry; etc. Such social and commercial practice may also explain the resurgence of serotypes Oakland, Legon, Kingston in 2 to 3 townships for 2 to 3 years of sampling (Table 3, Fig1). More longitudinal and transversal surveys are of course necessary to confirm these findings, to follow the evolution of *Salmonella* serotypes, to uncover the origin of the infection by the remaining three serotypes Adelaide, Luke, Teshie, and by the untypable strain that were isolated only once or twice from dead keets in one township during one sampling year (Table 3) and to further check whether other serotypes (Korlebu, Nima, Saint Paul, Typhimurium var. Copenhagen and Uganda) present in faecal samples of laying Guinea fowls and/or surrogate hen mothers (Table 3) also be pathogen for young keets.

Another very important concern is the zoonotic potential of such “exotic” serotypes isolated from some Guinea fowls, that were reported at first time in humans or in foodstuffs or animal products in equatorial and tropical country (Caribbean Islands and Africa) (Le Minor et al., 1975). But, there is a general lack of data in developing countries about such serotypes. Still they have always been very rarely identified in developed countries as much in humans (<0,01% in Europe) as in animals (Ball et al., 1964; Boqvist et al., 2003; HPA-CDR, 2004, 2006; CDC, 2005). So, such “exotic” serotypes may have a geographic or host specificity or at least preferential association. The answer to this question is not possible at this time due to the low numbers of isolates of those serotypes worldwide. But in support of this hypothesis the internal control strains of serotypes Kingston and Legon have a different PFGE profile compared to the keet isolates (Figures 2). Conversely the internal control strain of serotype Oakland belongs to the PFGE profile 1 of the Guinea fowl isolates (see Figure 2). So the actual zoonotic potential may differ between serotypes even if the virulotypes of the same three human control strains are identical to the most frequent virulotypes of the Guinea fowl isolates (Table 4). In summary, it is not possible at this stage to rule out that Guinea fowls might still be a source of infection for humans in Benin if their meat is not thoroughly cooked before consumption. Therefore, the authors of this work suggest that the regular surveillance of *Salmonella* should be undertaken in Guinea fowl to ensure that it is safe for human consumption.

The antimicrobial susceptibility patterns that only the association trimethoprim/sulfamethoxazol is active on all *Salmonella* isolates. Conversely the majority of isolates have clinical resistance levels to beta-lactams and about 15 % for nalidixic acid, tetracycline, neomycin, gentamicin and flumequine. This resistance profile may be associated to the presence of a large plasmid band in the isolates. The reduction in the susceptibility to flumequine must be regarded as an alarm signal since this fluoroquinolone is the resort antibiotic used by breeders to treat any disease problems in Guinea fowls without any laboratory diagnosis. Their only alternative is phytotherapy using local plant extracts (Nakamura *et al.*, 1999 ; Adebolu & Oladimeji, 2005 ; Adiguzel *et al.*, 2005 ; Bassolé *et al.*, 2010) relying on local population tradition but whose actual value in treating bacterial disease has not been proved.

In summary, this survey identified eight *Salmonella enterica* exotic serotypes as a cause of infection of Guinea fowl keets and five of them were most frequently isolated. These five serotypes were also isolated from faecal samples of laying Guinea fowls and/or surrogate hen mothers, which therefore most probably play an important role in the contamination of young keets and in the persistence of *Salmonella enterica* in the breeding farms. The biotypes, pulsotypes, and virulotypes confirm that the isolates belonging to these five serotypes are clonal within each serotype, maybe with the exception of the serotype Oakland. Moreover the presence of several virulence factor-encoding genes necessary for enteropathogenicity and invasion of the blood stream and internal organs suggests that these isolates have the ability to cause diseases in Guinea fowl keets. Finally the occurrence of the resistance to flumequine and several other antibiotics constitutes an additional threat for the breeding system.

5. Acknowledgments

The authors are grateful to Benin State and French-speaking world University Agency, Alice Seghers Foundation, Cooperation Universitaire au Developpement for financial support of this study. They are grateful to Dr Aplogan G. L., the Director of Bacteriological Department of the Veterinary Diagnostic and Serological Monitoring Laboratory of Parakou (Benin) who gave us the permission to use of the Laboratory for Bacterial test.

6. References

- Adebolu, T.T. & Oladimeji, S.A. (2005). Antimicrobial activity of leaf extracts of *Ocimum gratissimum* on selected diarrhoea causing bacteria in southwestern Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 4, 682 - 684.
- Adiguzel, A., Gulluce, M., Sengul, M., Ogutcu, H., Sahin, F. & Karaman, I. (2005). Antimicrobial effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) extract. *Turkish Journal of Biology*, 29: 155 - 160.
- Akopyan, K., Edgren, T., Wang-Edgren, H., Rosqvist, R., Fahlgren, A., Wolf-Watz, H. & Fallman M. (2011). Translocation of surface-localized effectors in type III secretion. *Science Sessions: The PNAS Podcast Program*, 108, 1639-1644.
- Andrews-Polymenis, H. L., Baumber, A. J., McCormick, B. A. & Fang, F. C. (2010). Taming the elephant : *Salmonella* biology, pathogenesis, and prevention. *Infection and Immunity*, 78, 2356–2369.
- Anon (2002). Microbiology of food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. ISO 6579: 2002. 4th edn. Geneva. , Switzerland. *International Organization for Standardisation*. 1-27.
- Ball M.M., McWhorter A.C., & McConnaughey J. (1964). An undescribed *Salmonella* serotype: *S. Oakland*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*, 14, 65-66.
- Barrow, G.I. & Feltham, R.K.A. (1993). *Manual for the identification of medical bacteria*. Third edition, N.Y : Cambridge University Press.
- Barrow, P.A., Jones, M.A. & Thomson, N. (2010). *Salmonella*. In C.L., Gyles, J.F., Prescott, J., Glenn Songer, & C.O. Thoen (Eds.), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* 4th edn (pp. 231-265). Ames : Wiley-Blackwell.
- Bassolé, I.H.N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C. & Dicko, M.H. (2010). Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination. *Molecules*, 15, 7825-7839.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. & Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.
- Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., Ficht, T.A. & Adams, L.G. (1998). Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, 66, 4579-4587.

- Belco, L.B.K. (1985). Contribution à l'étude des modes actuels et de l'importance socioéconomiques de l'élevage de pintade au Bénin (Thèse d'Ingénieur Agronome). Université Nationale du Bénin : Cotonou, 143 p.
- Bertrand, S., Dierick, K., Heylen, K., De Baere, T., Pochet, B., Robesyn, E., Lokietek, S., Meervenne, E.V., Imberechts, H., De Zutter, L. & Collard, J-M. (2009). Lessons learned from the management of a national outbreak of *Salmonella* Ohio linked to pork meat processing and distribution. *Journal of Food Protection*, 000, 1-7.
- Bessin, R., Belem, A.M.G., Boussini, H., Compaore, Z., Kaboret, Y. (1998). Enquête sur les causes des mortalités des pintadeaux au Burkina Faso. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 51, 87- 93.
- Boko, C. K., Kpodekon, M.T., Farougou, S., Dahouda, M., Youssao, A.K.I., Aplogan, G.L., Zanou, J. & Mainil, J.G. (2011a). Farmer perceptions and pathological constraints in helmeted guinea fowl farming in the Borgou Department in North-East Benin. *African Journal of Agricultural Research*, 6, 2348-2357.
- Boko, K. C., Kpodekon, T. M., Farougou, S., Youssao, A. K. I. & Mainil, J. G. (2011b). *In vivo* assessment of the virulence of five *Salmonella enterica* serotypes isolated from helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*) in Benin. *International Research Journal of Microbiology*, 2, 356-364.
- Boko, K.C. (2004). Contribution à l'amélioration de l'élevage villageois de la pintade locale dans le Département du Borgou (Nord-Est du Bénin). Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Spécialisés en Gestion des Ressources Animales et végétales en Milieux Tropicaux, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Liège, Belgique, 40 p.
- Boqvist, S., Hansson, I., Nord, B., Jerselius, U., Hamilton, C., Wahlström, H., Noll, B., Tysen, E. & Engvall, A. (2003). *Salmonella* isolated from animals and feed production in Sweden between 1993 and 1997. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44, 181-197.
- Bornert, G. (2000). Poultry without *Salmonellae*: myth or reality? *Revue Médecine Vétérinaire*, 151, 1083-1094.
- Broes, A., Fairbrother, J.M., Mainil, J.G., Harel, J. & Lariviere, S. (1988). Phenotypic and genotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O8, KX105 and O8, K2829 strains isolated from piglets with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 2402-2409.
- China, B., Vinciane, P., & Jacques M. (1996). Typing of Bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by Multiplex in Vitro Amplification of Virulence-Associated Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3462–3465.

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2005). *Salmonella* Annual Summary. Available online at http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2005/SalmonellaTable3_2005.pdf. (Accessed 14 November 2011).
- Chakravorty, D., Hansen-Wester, I. & Hensel, M. (2002). Salmonella pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular Salmonella from reactive nitrogen intermediates. *The Journal of Experimental Medicine* 195, 1155-1166.
- Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85, 112–118.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, CASFM, Recommandation 2010.
- Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nature Review Microbiology*, 4, 811–825.
- Cortez, A.L.L., Carvalho, A.C.F.B., Ikuno, A.A. Bürger, K.P. & Vidal-Martins, A.M.C. (2006). Identification of *Salmonella* spp isolated from chicken abattoirs by multiplex – PCR. *Research in Veterinary Science*, 81, 340-344.
- Courtney, S., Mossoba, M.E., Hammack, T.S., Keys, C. & Al-Khalidi, S.F. (2006). Using PCR, amplification to increase the confidence level of *Salmonella* Typhimurium DNA microarray chip hybridization. *Molecular and Cellular Probes*, 20, 163-171.
- Dahouda, M. (2003). Elevage de la pintade locale dans le Département du Borgou au Bénin: comparaison des caractéristiques de production en station et en milieu rural (Mémoire de DEA). Université de Liège : Liège, 35 p.
- Darwin, K.H. & Miller, V.L. (1999). Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 405-428.
- Euzeby, J.P. (1997). Les salmonelles et les salmonelloses aviaires dues aux sérovars ubiquistes. *Revue Médecine Vétérinaire*, 148, 61-76.
- Gassama-Sow, A. Wane, A.A., Canu, N.A., Uzzau, S., Aidara-Kane, A. & Rubino S. (2006). Characterization of virulence factors in the newly described *Salmonella enterica* serotype Keurmassar emerging in Senegal (sub-Saharan Africa). *Epidemiology and Infection*, 134,741-743.
- Gast, R.K. (2008). Paratyphoid infections. In Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan & D.E. Swayne (Eds.), *Diseases of Poultry* 12th edn (pp.636-665). Ames, IA, USA : Blackwell Publishing.

- Grimont, P.A.D. & Weill, F-X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. In OMS (Eds.). *World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*, 9th edition (p. 166). Institut Pasteur, Paris.
- Health Protection Agency-Communicable Disease Report (HPA-CDR), (2004, 2006). Available on line at URL address: <http://www.hpa.org.uk/cdr/Weekly-Enteric Infection Reports- Volume 16 No 10.htm> (accessed 16 April 200).
- Hensel, M. (2004). Evolution of Pathogenicity Island of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, 294, 95-102.
- Hughes, L.A., Shopland, S., Wigley, P., Bradon, H., Howard Leatherbarrow, A., Williams, N.J., Bennett, M., Elizabeth de Pinna, Lawson, B., Cunningham, A. & Chantrey, J. (2008). Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005 – 2006. *BMC Vet. Res.*, 4, 1-10.
- Kado, C.I. & Liu, S.T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*, 145, 1365-1373.
- Le Minor, L.S., Le Coueffic, E., Le Priol, A., Lefèvre, M., Ducilassin, M., Chippaux, C., Boche, R., Mered, B., Saliou, P. & Darrigol, J. (1975). Quinze nouveaux sérotypes de salmonella du sous-genre I isolées en Afrique. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 547-555.
- Mainil, J.G., Jacquemin, E., Herault, F. & Oswald, E. (1997). Presence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences in necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from cattle: evidence for new variants of the AFA family. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 61, 193-199.
- Malik-Kale, P., Jolly, C. E., Lathrop, S., Winfree, S., Luterbach, C., & Steele-Mortimer, O. (2011). *Salmonella* – at home in the host cell. *Frontiers in Microbiology*, 2, 125.
- Marcus, S.L., Brumell, J.H., & Pfeifer, C.G. (2000). Brett B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection*, 2, 145-156.
- Nakamura, C.V., Nakamura, T.U., Bando, E., Melo, A.F.N., Cortez, D.A.G. & Dias Filho, B.P. (1999). Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 675-678.
- Oosterom, J. (1991). Epidemiological studies and proposed preventive measures in the fight against human salmonellosis. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 41-52.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., & Carter, G.R. (1999). *Clinical Veterinary microbiology*. London: Wolfe Publings.
- Schmidt, H., & Hensel, M. (2004). Pathogenicity Island in Bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 14-56.

- Shivaprasad, H.L. & Barrow, P.A. (2008). Pullorum disease and fowl typhoid. In Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, & D.E. Swayne (Eds.), *Diseases of Poultry* 12th edn (pp.620-630). Ames, IA, USA: Blackwell Publishing.
- Skyberg, J.A., Logue, C.M. & Nolan, L.K. (2006). Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. *Avian Diseases*, 50, 77-81.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. & Swaminathan B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2233-2239.
- Villate, D. (2001). *Maladies des volailles* (2^{ème} édition). Paris : France Agricole.

Table1: Virulence genes and PCR primers used to test screen *Salmonella* isolates

SPI	Target gene	Primer sequence (5' → 3')	Denaturation	Annealing	Extention	No cycle	Reference
SPI-1	<i>prgH</i>	F: GCGGAGCAGCCTGAGAAGTTAGAAA R: TGAAATGAGCGCCCCTTGAGCCAGTC	94°C/1mn	62.6°C/1mn	72°C/mn	30x	Hughes <i>et al.</i> (2008)
	<i>invA</i>	F: TTGTTACGGCTATTTTGACCA R: CTGACTGCTACCTTGCTGATG	94°C/30s	55°C/1mn	72°C/mn	35x	Cortez <i>et al.</i> (2006)
	<i>sitC</i>	F: CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC R: CGGGGCGAAAATAAAGGCTGTGATGAAC	94°C/1mn	60°C/1mn	72°C/mn	30x	Hughes <i>et al.</i> (2008)
	<i>spaI</i>	F: GTGGGTGGGATACTCAGTAT R : TTTCTGCTCAGATACAGGTG	94°C/1mn	57.9°C/15s	72°C/mn	30x	Hughes <i>et al.</i> (2008)
	<i>invE</i>	F: ACCGAAGGCGAAGCAAATAT R: GCTGTTCTGCCATTTTCATGC	94°C/1mn	57.9°C/1mn	72°C/mn	40x	This study
SPI-2	<i>spiC</i>	F: CCTGGATAATGACTATTGAT R: AGTTTATGGTGATTGCGTAT	94°C/1mn	57.9°C/1mn	72°C/mn	30x	Hughes <i>et al.</i> (2008)
	<i>ssaU</i>	F : TGCTTTATTAGAGTCACTGA R : TTATGGTGTTTCGGTAGAAT	94°C/1mn	64.6°C/1mn	72°C/mn	30x	This study
	<i>ttrB</i>	F: ATGTGCACGGGAGTCAATATCG R: GTGGCGATGCGGCTATGG	94°C/25s	65°C/25s	72°C/30s	35x	Courtney <i>et al.</i> (2006)
SPI-3	<i>mgcT</i>	F : GTGTTATGCGGCTTAGGGCA R : CTCCAGTGAATTGCGGTGAT	94°C/1mn	62°C/1mn	72°C/mn	30x	This study
	<i>misL</i>	F: GTCGGCGAATGCCGCGAATA R: GCGCTGTTAACGCTAATAGT	94°C/1mn	62.6°C/1mn	72°C/mn	35x	Hughes <i>et al.</i> (2008)
SPI-4	<i>orfL</i>	F: GGAGTATCGATAAAGATGTT R: GCGCGTAACGTCAGAATCAA	94°C/1mn	56°C/1mn	72°C/mn	30x	Hughes <i>et al.</i> (2008)
SPI-5	<i>pipD</i>	F: CGGCGATTTCATGACTTTGAT R: CGTTATCATTTCGGATCGTAA	94°C/1mn	61.1°C/1mn	72°C/mn	35x	Hughes <i>et al.</i> (2008)

Table 2: Prevalence of *Salmonella enterica* isolated in Borgou Department from 2007 to 2010

Type of samples	Year	No. Of samples	No positive samples
Dead Keets Tissues	2007	29	4 (13.8 %)
	2008	93	14 (15.0 %)
	2009	42	6 (14.3 %)
	2010	38	7 (18.4 %)
Total		202	31 (15.3 %)
Guinea Fowl Eggs	2007	75	3 (4.0 %)
Total		75	3 (4.0 %)
Laying Guinea Fowl Faeces	2008	64	5 (7.8 %)
	2009	60	3 (5.0 %)
	2010	47	2 (4.2 %)
Total		171	10 (5.8 %)
Surrogate Hen Mother Faeces	2008	64	9 (14.0 %)
	2009	60	5 (8.3 %)
	2010	47	5 (10.6 %)
Total		171	19 (11.1 %)
Breeder Faeces	2009	55	2 (3.6 %)
Mouse Faeces	2009	36	1(2.8 %)
Duck Faeces	2009	4	0 (0 %)
	2010	2	0 (0 %)
Total		97	3 (3.1 %)

Table 3: Different serotypes of *Salmonella* isolated from six townships in Borgou Department (2007-2010)

Serotypes	Serological group	Biotypes	Biological origin	Geographical origin	N° Isolates (year)
S. Adelaide	O	670475257	Dead Keet Caecum	Parakou	1 (2009)
S. Agama	B	670455257	Laying Guinea Fowl-Faecal Sample	N'Dali	1 (2009)
			Surrogate Hen-Faecal Sample	N'Dali	1 (2009)
S. Farakan	M	670475217	Dead Keet Caecum	Banikoara	4 (2008)
		670475217	Surrogate Hen-Faecal Sample	Banikoara	3 (2008)
S. Kingston	B	470455217	Dead Keet Caecum	Bembéréké	1 (2008)
			Dead Keet Caecum	Tchaourou	1 (2008)
			Dead Keet Liver	Parakou	1 (2008)
			Surrogate Hen-Faecal Sample	Parakou	1 (2008)
		670455257	Dead Keet Caecum	Parakou	2 (2009)
S. Korlebu	E4	670455257	Breeder-Faecal Sample	Bembéréké	2 (2009)
S. Legon	B	670475257	Guinea Fowl-Eggs	N'Dali	2 (2007)
			Dead Keet Liver	Parakou	1 (2007)
			Dead Keet Caecum	N'Dali	2 (2009)
		470475217	Surrogate Hen-Faecal Sample	Parakou	1 (2008)
S. Luke	X	670455257	Dead Keet Livers	N'Dali	2 (2009)
S. Nima	M	670455257	Surrogate Hen-Faecal Sample	Banikoara	2 (2009)
S. Oakland*	C1	670451217	Dead Keet Caecum	Banikoara, Parakou, N'Dali	4 (2008)
			Dead Keet Livers	Parakou, N'Dali	2 (2008)

			Surrogate Hen-Faecal Sample	Parakou	3 (2008)
			Laying Guinea Fowl-Faecal Sample	Parakou, Tchaourou, N'Dali	5 (2008)
S. Oakland**		670475257	Dead Keet Caecum	Parakou	1 (2007)
		670451257	Guinea Fowl-Eggs	Parakou	1 (2007)
			Dead Keet Caecum	N'Dali	1 (2007)
			Dead Keet Caecum	Parakou, Tchaourou	4 (2010)
			Dead Keet Liver	Parakou	1 (2007)
			Surrogate Hen-Faecal Sample	Tchaourou	2 (2010)
			Laying Guinea Fowl-Faecal Sample	Parakou	2 (2010)
			Surrogate Hen-Faecal Sample	Parakou	1 (2008)
S. Saint Paul	B	670475257	Surrogate Hen-Faecal Sample	Bembéréké	1 (2009)
S. Sangalkam	D2	670455257	Dead Keet Caecum	Kandi	1 (2009)
			Laying Guinea Fowl-Faecal Sample	Kandi	3 (2009)
			Surrogate Hen-Faecal Sample	Kandi	1 (2009)
S. Stanley	B	670455257	Mouse-Faecal Sample	Bembéréké	1 (2009)
S. Teshie	X	670455317	Dead Keet Caecum	Kandi	1 (2008)
S. Typhimurium var. Cop.	B	670455257	Surrogate Hen-Faecal Sample	Parakou	1 (2009)
S. Uganda	E1	670455257	Surrogate Hen-Faecal Sample	Tchaourou	1 (2010)
<i>Salmonella enterica</i> UT ^a	D2	670455257	Dead Keet Caecum	Banikoara	1 (2010)

*: *Xba*1 PFGE Profile 1, **: *Xba*1 PFGE Profile 2, ^a untypable strain

Table 4: Virulotyping of the *Salmonella* isolates from keet tissues and laying guinea fowl or brooding hen faecal samples.

serotype	strains	Target gene											
		<i>prgH</i>	<i>invA</i>	<i>sitC</i>	<i>spaI</i>	<i>invE</i>	<i>spiC</i>	<i>ssaU</i>	<i>ttrB</i>	<i>mgcT</i>	<i>misL</i>	<i>orfL</i>	<i>pipD</i>
		SPI-1	SPI-1	SPI-1	SPI-1	SPI-1	SPI-2	SPI-2	SPI-2	SPI-3	SPI-3	SPI-4	SPI-5
S. Farakan	(6x)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	(1x)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
S. Kingston	Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	(5x)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	(1x)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
S. Legon	Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	(6x)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Oakland	Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	(7x)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	(6x)*	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	(1x)*	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
	(8x)**	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	(5x)**	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
S. Sangalkan	(1x)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	(4x)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Typhimurium	Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Code: Number in “strains” column, means number of strains with the same virulotyping profile

+: presence of gene virulence, - : absence of gene virulence

*: *Xba*1 PFGE Profile 1, **: *Xba*1 PFGE Profile 2

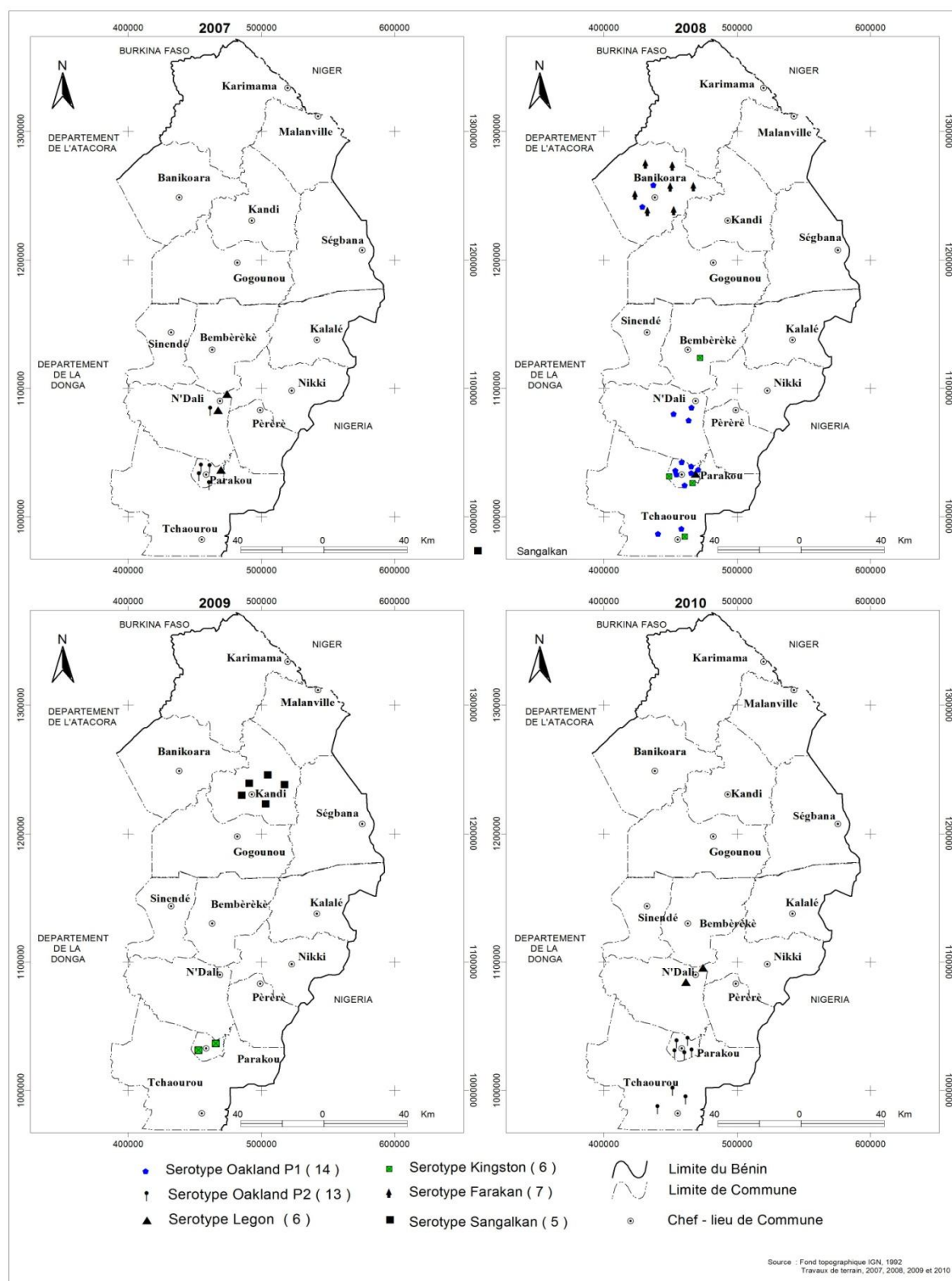
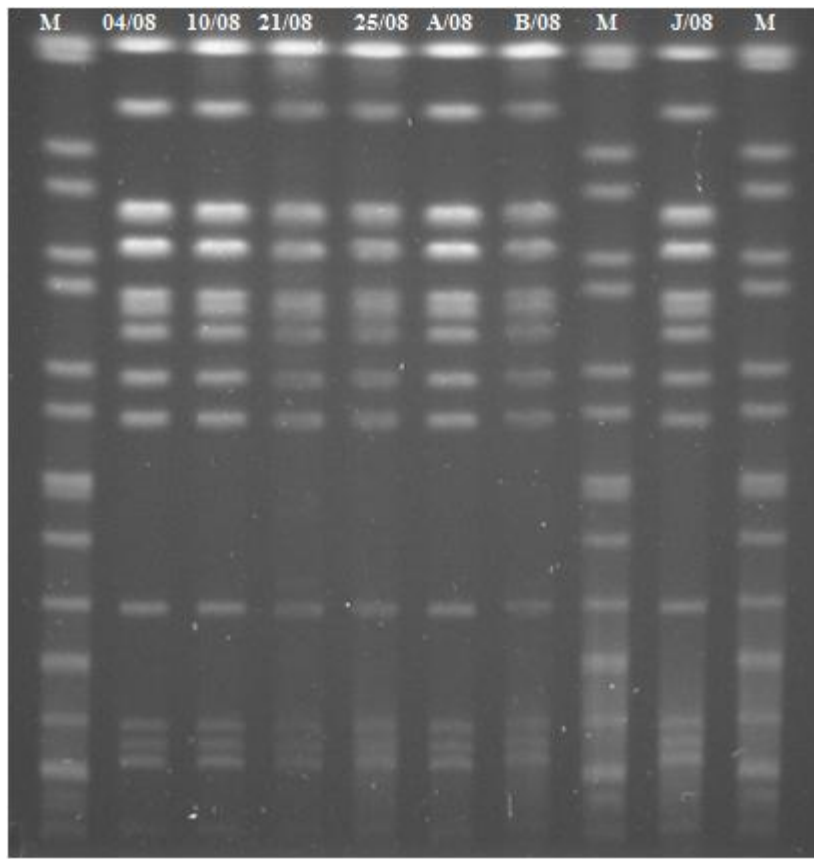


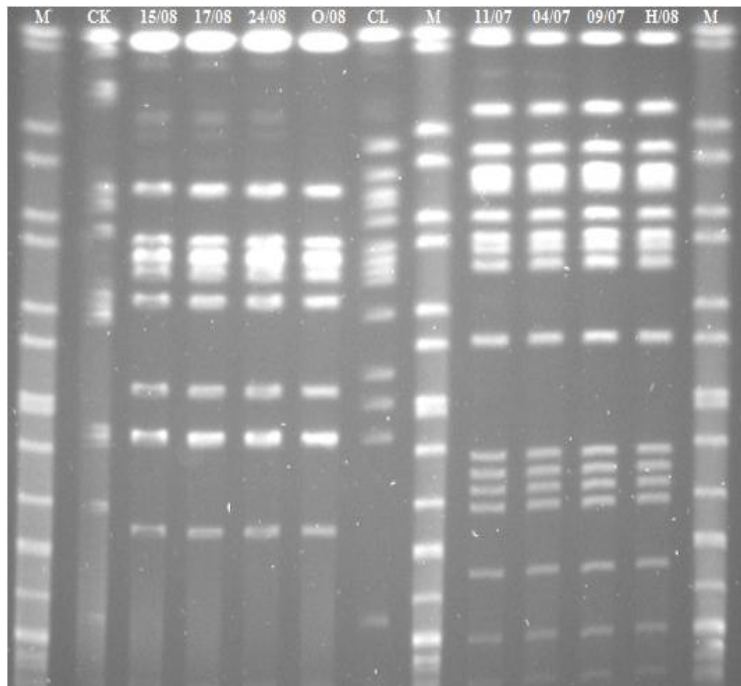
Figure 1: Geographic localization of the five *Salmonella* serotypes isolated from dead keets and embryos, laying Guinea fowls and/or surrogate hen mothers in Borgou Department



2a

Figure 2a: Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) pattern of the *S. Farakan* isolates with restriction using *Xba*1 in the study area.

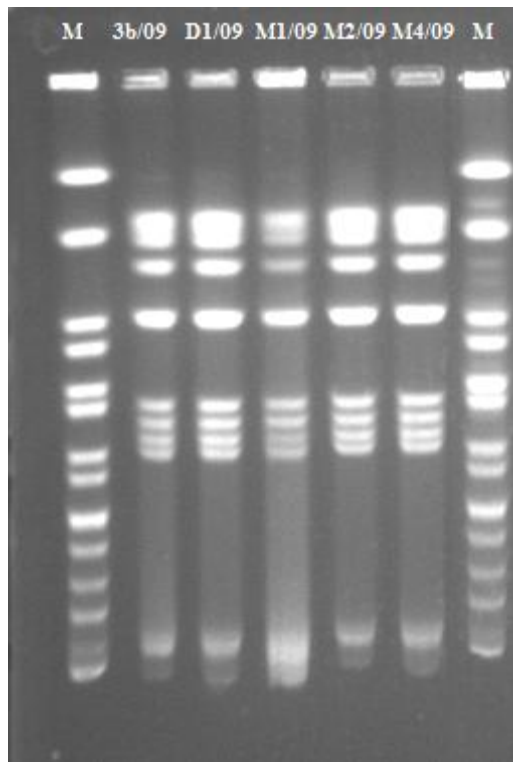
M= *S. Braenderup*, 04/08= *S. Farakan*, *Xba*1 profile 1, 10/08= *S. Farakan*, *Xba*1 profile 1, 21/08= *S. Farakan* *Xba*1 profile 1, 25/08= *S. Farakan* *Xba*1 profile 1, A/08= *S. Farakan*, *Xba*1 profile 1, B/08= *S. Farakan* *Xba*1 profile 1, M= *S. Braenderup*, J/08= *S. Farakan* *Xba*1 profile 1, M: *S. Braenderup*



2b

Figure 2b: Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) pattern of the *S. Kingston* and *S. Legon* isolates with restriction using *Xba*1 in the study area.

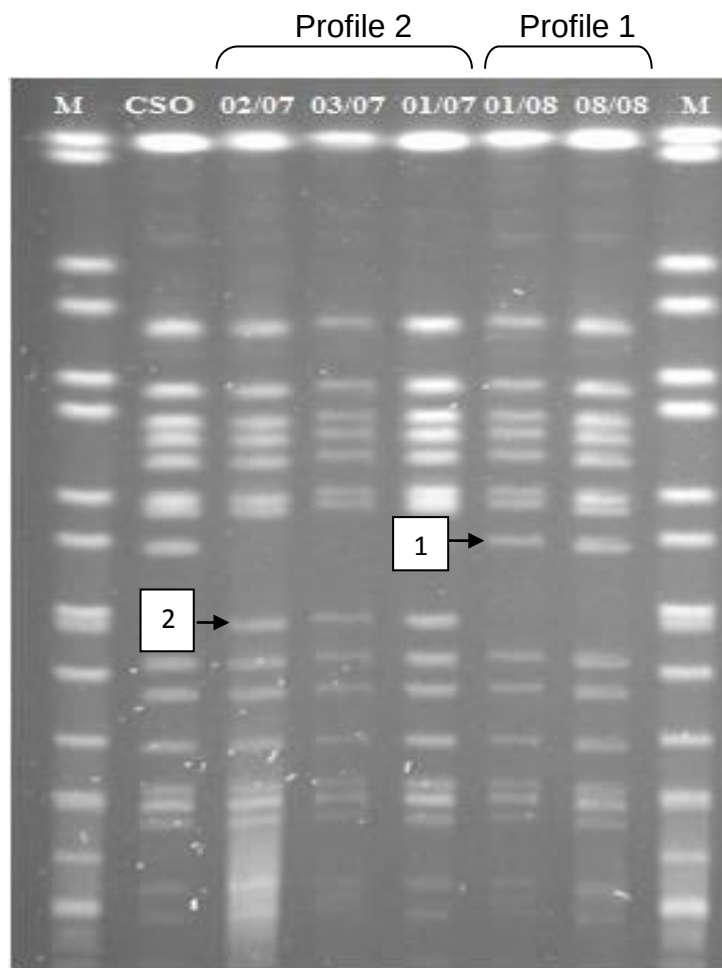
M= Marker *S. Braenderup*, CK= Control *S. Kingston*, *Xba*1 profile 1, 15/08= *S. Kingston* *Xba*1 profile 2, 17/08= *S. Kingston*, *Xba*1 profile 2, 24/08= *S. Kingston*, *Xba*1 profile 2, O/08= *S. Kingston*, *Xba*1 profile 2, CL= Control *S. Legon*, *Xba*1 profile 1, M= Marker *S. Braenderup*, 11/07= *S. Legon*, *Xba*1 profile 2, 04/07= *S. Legon*, *Xba*1 profile 2, 09/07= *S. Legon*, *Xba*1 profile 2, H/08= *S. Legon*, *Xba*1 profile 2, M= Marker *S. Braenderup*.



2c

Figure 2c: Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) pattern of the *S. Sangalkam* isolates with restriction using *Xba*1 in the study area

M= Marker *S. Braenderup*, 3b/09= *S. Sangalkam*, D1/09= *S. Sangalkam*, M1/09= *S. Sangalkam*, M2/09= *S. Sangalkam*, M4/09= *S. Sangalkam*, M= Marker *S. Braenderup*



2d

Figure 2d: Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) pattern of *S. Oakland* isolates with restriction using *Xba*1 in the study area.

M = Marker *S. Braenderup*, CSO = Control *S. Oakland Xba*1profile 1, 02/07 = *S. Oakland Xba*1profile 2, 03/07= *S. Oakland Xba*1 profile 2, 01/07= *S. Oakland Xba*1 profile 2, 01/08= *S. Oakland Xba*1 profile 1, 08/08= *S. Oakland Xba*1 profile 1 M= Marker *S. Braenderup* 11/08= *S. Oakland Xba*1 profile 1, 02/08= *S. Oakland Xba*1 profile 1

- 1 PFGE profile1
- 2 PFGE profile 2

Figure 2: Pulsed Field Gel Electrophoresis analysis

2.2.2. Article 3: *In vivo* assessment of the virulence of five *Salmonella enterica* serotypes isolated from helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*) in Benin

Published in International Research Journal of Microbiology, vol 2(9) pp.356-364, October 2011

K. C. Boko^{1, 2*}, T. M. Kpodekon¹, S. Farougou¹, A. K. I. Youssao¹, and J. G. Mainil²

¹ Université d'Abomey-Calavi, Ecole Polytechnique d'Abomey Calavi, Département de Production et Santé Animales/Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, 01 BP 2009, Cotonou Bénin

² Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires/ Laboratoire de Bactériologie, Boulevard de Colonster 20 Bâtiment 43a, 4000 Liège Belgique

* Corresponding author E-mail: cyrilleboko@yahoo.fr

Full Length Research Paper

***In vivo* assessment of the virulence of five *Salmonella enterica* serotypes isolated from helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*) in Benin**

K. C. Boko^{1, 2*}, T. M. Kpodekon¹, S. Farougou¹, A. K. I. Youssao¹, and J. G. Mainil²

¹ Université d'Abomey-Calavi, Ecole Polytechnique d'Abomey Calavi, Département de Production et Santé Animales/Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, 01 BP 2009, Cotonou Bénin

² Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires/Laboratoire de Bactériologie, Boulevard de Colonster 20 Bâtiment 43a, 4000 Liège Belgique

October 05 August, 2011

The pathogenicity of five *Salmonella enterica* serotypes (Farakan, Kingston, Legon, Oakland, Teshie) isolated from guinea fowl in Benin was experimentally assessed by oral challenge of 25 groups of 18 two week-old keets using 0.5 ml of 10⁴ to 10⁸ CFU/ml of overnight broth culture. One additional unchallenged group formed a control group. Keets were observed twice daily for clinical signs until day 15 post-inoculation. Clinical signs were observed in all groups, except in keets inoculated with serotype Teshie at 10⁴ CFU/ml. Clinical scores were higher ($p < 0.05$) at the highest inoculum concentrations within each serotype, but also differed between serotypes. Seven deaths were recorded only in serotypes Legon and Oakland. *Salmonella* was isolated from faeces with all serotypes at D7 and/or D15 PI at inoculum concentrations of 10⁶, 10⁷ and/or 10⁸ CFU/ml. *Salmonella* was also recovered at D15 PI from the caecum of two keets of each group at 10⁷ and 10⁸ CFU/ml (except serotype Teshie), but not from the heart blood; there was only one from the liver. These five *Salmonella* serotypes are not only able to colonize keet intestines but also cause clinical signs similar, though less dramatic to those observed during field surveys.

Keywords: *Salmonella enterica*, serotypes, guinea fowl, oral challenge virulence, morbidity, mortality, packed cell volume, faecal excretion.

INTRODUCTION

In the Borgou Department of North-East Benin, the raising of helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*) is an important part of rural farming, both for farmers' own consumption, and for sale for various cultural and social uses (Branckaert and Gueye, 1999). Traditional guinea fowl breeding has for decades been based on the scavenging system, in which young keets roam freely around the coops mixing with the young and adults of different poultry species, all feeding predominantly on local flora and fauna. This raising system inevitably comes up against numerous sanitary constraints. Not surprisingly the death rate of keets within the first two months of life varies between 65 and 70% as a

consequence of poor and unhygienic housing and feeding conditions, as well as infectious and parasitic diseases (Boko, 2004; Sonaiya and Swan, 2004; Dahouda et al., 2007; Boko et al., 2011).

Several bacterial species have been isolated from dead keets during different surveys, but (with the exception of *Salmonella enterica*) they are not considered primary pathogens. Instead, they mostly represent members of the resident commensal microbiota, which invade the body around or after death, or secondary pathogens (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) benefiting from favourable conditions (stress, weakening, cold, viral infection, heavy parasitism) (Bessin et al., 1998; Boko, 2004; Boko et al., 2011).

S. enterica is subdivided into 6 subspecies and more than 2500 serotypes with different host range specificity (Tindall et al., 2005; Grimont and Weill, 2007). The

*Corresponding author E-mail: cyrilleboko@yahoo.fr

poultry specific serotype Gallinarum/Pullorum has been reported worldwide, including in sub-Saharan countries, causing major economic losses in commercial poultry flocks as a consequence of high rates of morbidity and mortality of chicks during the first days of life (Pope, 2000; Villate, 2001; MAEP, 2005; Shivaprasad and Barrow, 2008). The Gallinarum/Pullorum serotype has also been described in guinea fowl in Europe (Galar, 1990; Le Coz-Doin, 1992; Shivaprasad and Barrow, 2008). In Benin, a sero-prevalence of 22% was reported in guinea fowl in a study conducted almost 20 years ago (Chrysostome et al., 1993) but unfortunately no more recent data are available. During a wide-scale survey in 2007/2008 in the rural area of Borgou, different *S. enterica* serotypes were isolated from 15% of dead keets, but none belonged to the Gallinarum/Pullorum serotype. Instead the *Salmonella* isolates belonged to different "exotic" serotypes, the most frequent being Farakan, Kingston, Legon and Oakland (Boko et al., 2008).

The objective of the present investigation was to assess the virulence of those "exotic" *Salmonella* serotypes by experimental infections of two week-old keets, using the oral route.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

A total of 468 keets hatched from local guinea fowl eggs were purchased from five farms in the Borgou Department of North-East Benin. The eggs were incubated at the Production and Animal Health Department Research Farm of the Polytechnic School of Abomey-Calavi (Benin). At one-day-old the keets were distributed between 26 groups, each containing 18 individuals. Each group was kept in a separate pen within the same building. The keets were raised under strict hygiene and heat conditions. Local commercial antibiotic-free food and water were provided *ad libitum*. They were given an anticoccidial (Amprolium 20%, LAPROVET, France) from 8 to 12 days of age. At 14 days of age, they were de-wormed with an oral anthelmintic powder of pure piperazine citrate (LAPROVET, France).

Bacterial isolates

Challenge strains were confirmed *S. enterica* strains isolated from dead rural keets in 2007 or 2008 and belonging to five different serotypes: Farakan, Kingston, Legon, Oakland, and Teshie (Boko et al., 2008). Serotyping of *S. enterica* strains was carried out by slide agglutination with commercial monospecific antisera following the Kauffmann-White scheme (Grimont and Weill, 2007). It was performed at the Veterinary and Agrochemical Research Centre, Brussels, Belgium (Dr

Hein Imberechts) and confirmed at the *Salmonella-Shigella* National Reference Centre of the Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium (Dr Sophie Bertrand).

Each strain was cultivated on *Salmonella-Shigella* agar (Oxoid, England) and incubated at 37°C overnight. Isolated colonies were transferred using sterile swabs into 10 ml sterile Laury Broth base (LB broth, Acros, Belgium) until reaching the optical density of 0.8 at 560 nm (water analysis spectrophotometer DR/2500, Orchid's, France) corresponding to the value of 10^8 Colony Forming Units (CFU)/ml. The bacterial suspension was then 10-fold serially diluted in LB broth to the corresponding value of 10^4 CFU/ml.

Experimental challenge and keet surveillance

At 15 days of age, the 18 keets in each of the first 25 groups were orally inoculated with 0.5 ml of one dilution of one serotype, i.e. 90 keets per serotype. One group remained non-inoculated (negative control group) and received 0.5 ml of sterile LB broth. All animal experiments were carried out according to Ethical and Animal Welfare Regulation of the Polytechnic School of Abomey Calavi (University of Abomey Calavi, Benin).

All keets were observed twice daily for clinical signs (prostration, chills, somnolence, lack of appetite, whitish diarrhoea, arthritis, respiratory distress) and fatality cases, until 15 days post-inoculation (PI). Any clinical sign observed in any one animal was recorded as a positive observation. So in theory as many as 540 positive observations (2 daily observations x 18 animals x 15 days) were possible per group. Haematocrit, or Packed Cell Volume (PCV) was the only blood parameter measured at days (D) 0, D7 and D15 PI following standard procedure. One drop of blood was collected from the wing vein and centrifuged with a micro-haematocrit centrifuge (HAWKSLEY, England).

Fatality cases were recorded and necropsied. Moreover at D15 PI, two of the surviving keets from each group were randomly chosen, killed by cervical dislocation and necropsied

Bacteriological analysis

S. enterica faecal excretion was estimated by collecting about 3g of faeces from each pen on D0, D7, and D15 PI. 1 g was subsequently suspended in 9 ml of sterile LB broth after thorough mixing (Lab Blender, Model 400, Seward Medical, London, UK) for 30 seconds (Moro Valliente, 2007). Heart blood, caecal content and liver samples were collected during necropsy of dead and sacrificed keets for isolation of *S. enterica*. The caecum and the liver were removed with a sterile scalpel, and 1 g was weighed and placed into a stomacher bag (Seward,

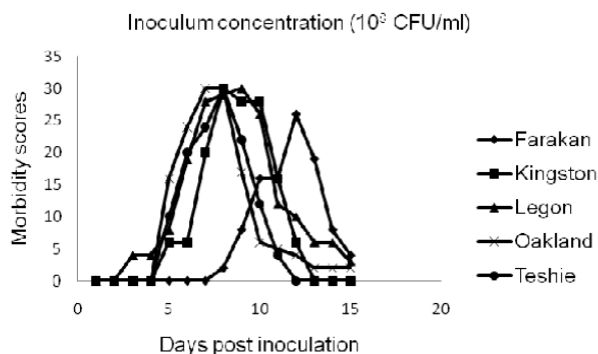


Figure 1a. Inoculum concentration of 10^8 CFU/ml.

Stomacher lab system, circulator 400, UK) containing 9 ml of sterile LB broth. The samples were then mixed (Lab Blender, Model 400, Seward Medical, London, UK) for 1 min before being 10-fold diluted. 0.1ml of each dilution was streaked onto two ready-to-use Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) plates (Oxoid, UK) and incubated at 37°C for 24 - 48 h in order to perform *Salmonella* counts (Quinn et al., 1999; Bauwens et al., 2006). Only plates that yielded between 30 and 300 colonies were recorded.

One drop of heart blood was collected at necropsy following sterile procedure and streaked onto two 5% sheep blood Columbia and two MacConkey's agar plates (Oxoid, UK) prepared from dehydrated powders at the Production and Animal Health Department Laboratory of the Polytechnic School of Abomey-Calavi (Benin).

Three presumptive *Salmonella* colonies from each plate were transferred onto nutrient agar (Nutrient Medium, Oxoid, England), grown overnight at 37°C, and tested with urea broth, indol broth and Triple Sugar Iron (TSI) agar slant (Oxoid, England) tests for identification. All colonies with *Salmonella*-compatible test results (urea-negative, indol-negative, TSI with red slant surface, yellow bottom and H₂S production) were sub-cultured overnight at 37°C on nutrient agar before performing rapid slide agglutination using OMA (Kingston, Legon), OMB (Oakland), OMC(Farakan) antisera (Bio-Rad, France).

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using the Statistical Analysis System (S.A.S) (1991). The procedure Proc. freq of SAS (1991) was used to calculate keet morbidity scores. A chi-square test was used to compare keet morbidity scores according to the inoculum concentrations and to the *Salmonella* serotypes. Additionally, a bilateral z-test was used to compare, two

by two, the morbidity scores for each concentration and each serotype.

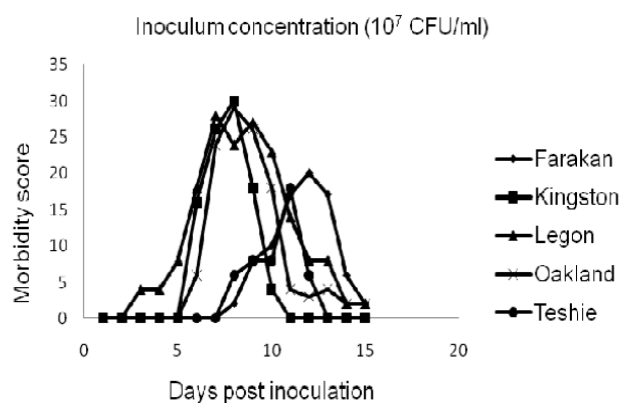
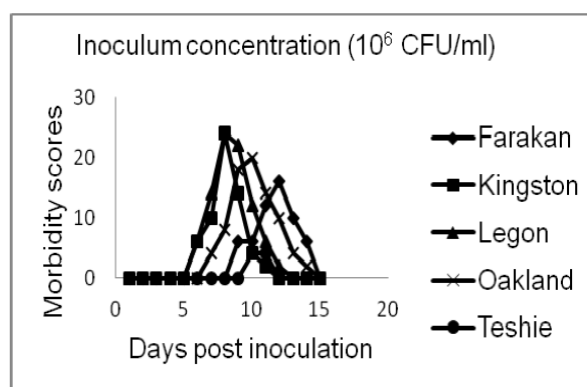
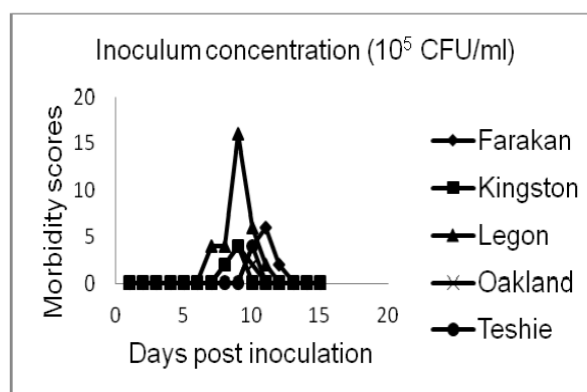
Finally, the serotype, the concentration and the days post inoculation were recorded as factors of variation of the haematocrit values. The PCV data were analysed according to General Linear Model procedure (GLM) of SAS (1991). Then, average PCV values were calculated per group of inoculated keets according to sampling day and compared two by two by using student's test.

RESULTS

Morbidity and mortality score

Clinical signs were observed in all groups of inoculated keets, with the exception of keets inoculated with serotype Teshie at the lowest concentration (10^4 CFU/ml). However, signs observed were qualitatively and quantitatively different according to the serotype (Table 1a) and to the inoculum concentration (Table 1b). The highest morbidity score were recorded with serotype Legon at the highest four concentrations (10^5 to 10^8 CFU/ml), and the lowest with the serotype Teshie at the lowest four concentrations of the inoculum (10^4 to 10^7 CFU/ml) (Tables 1a and 1b; Figures 1a-e). Mortality was recorded with only two serotypes between days D5 to D7 PI: serotype Legon with 2 and 3 dead keets at the inoculum concentrations of 10^7 and 10^8 CFU/ml respectively, and serotype Oakland with 2 dead keets at the inoculum concentration of 10^8 CFU/ml. Neither morbidity, nor mortality was observed in the control group before the end of trial.

For all serotypes, clinical signs started between D2 and D7 PI at the highest two concentrations of the inoculum (10^7 and 10^8 CFU/ml; Figs. 1a and 1b), and started between D5 and D9 PI at the inoculum concentrations of 10^5 and 10^6 CFU/ml (Figures 1c and 1d). Their magnitude (peak daily scores between 17-30) and duration (between 5 and 13 days) were very similar, if not

Figure 1b. Inoculum concentration of 10^7 CFU/ml.Figure 1c. Inoculum concentration of 10^6 CFU/ml.Figure 1d. Inoculum concentration of 10^5 CFU/ml.

identical, at the highest two concentrations, but were lower and/or shorter at the concentrations of 10^5 and 10^6 CFU/ml (peak daily scores between 4-26; duration between 1 and 8 days). At the lowest inoculum

concentration (10^4 CFU/ml) of serotypes Farakan, Kingston and Legon, clinical signs appeared at D8 or D9 PI, lasting for 1 to 3 days and reaching a peak score of between 2 and 4 (Figure 1e). It is also noteworthy that

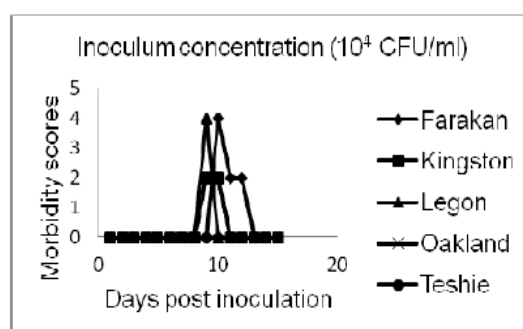
Figure 1e. Inoculum concentration of 10⁴ CFU/ml.

Table 1a. Statistical significance by serotype.

Inoculum concentration Serotypes	Morbidity score (%) *				
	10 ⁴ CFU/ml	10 ⁵ CFU/ml	10 ⁶ CFU/ml	10 ⁷ CFU/ml	10 ⁸ CFU/ml
Farakan	1.48 ^a	2.22 ^b	10.37 ^c	15.18 ^c	18.33 ^c
Kingston	0.74 ^a	1.11 ^b	11.11 ^{bc}	17.40 ^{bc}	25.92 ^b
Legon	0.74 ^a	5.93 ^a	15.93 ^a	33.07 ^a	36.93 ^a
Oakland	0.74 ^a	1.48 ^b	14.81 ^{ab}	21.85 ^b	27.16 ^b
Teshie	0	0.74 ^b	1.48 ^d	8.51 ^d	22.59 ^{bc}

*Maximum score 540 (see Materials and methods); except serotype Legon at inoculum concentration 10⁷ CFU/ml (maximum score 514) and at inoculum concentration 10⁸ CFU/ml (maximum score 501), and serotype Oakland at inoculum concentration 10⁶ CFU/ml: maximum score 508), due to early deaths. ^{a,b,c,d}: Morbidity scores in the same column with different superscripts differed significantly (p<0.05).

Table 1b. Statistical significance by inoculum concentration.

Inoculum concentration Serotypes	Morbidity score (%) *				
	10 ⁴ CFU/ml	10 ⁵ CFU/ml	10 ⁶ CFU/ml	10 ⁷ CFU/ml	10 ⁸ CFU/ml
Farakan	1.48 ^c	2.22 ^c	10.37 ^b	15.18 ^a	18.33 ^a
Kingston	0.74 ^d	1.11 ^d	11.11 ^c	17.40 ^b	25.92 ^a
Legon	0.74 ^d	5.93 ^c	15.93 ^b	33.07 ^a	36.93 ^a
Oakland	0.74 ^d	1.48 ^d	14.81 ^c	21.85 ^b	27.16 ^a
Teshie	0 ^d	0.74 ^c	1.48 ^c	8.51 ^b	22.59 ^a

* Maximum score of 540 (see Materials and methods); except serotype Legon at inoculum concentration 10⁷ CFU/ml (maximum score 514) and at inoculum concentration 10⁸ CFU/ml (maximum score 501), and serotype Oakland at inoculum concentration 10⁶ CFU/ml: maximum score 508), due to early deaths. ^{a,b,c,d}: Morbidity scores in the same line with different superscripts differed significantly (p < 0.05).

clinical signs with serotype Farakan began and peaked later than with the other serotypes at all inoculum concentrations.

After reaching their respective peak scores, morbidity scores progressively decreased in all groups. At D15 PI, surviving keets were clinically healthy at all inoculum concentrations with the serotypes Kingston and Teshie, and at the lowest three inoculum concentrations (10⁴, 10⁵, and 10⁶ CFU/ml) with serotypes Farakan, Legon, Oakland (Figures 1a-e).

PCV values

The average PCV values of the control group were stable at D0, D7 and D15 PI, and decreased at D7 PI with all serotypes at all concentrations. The average PCV values rose again at D15 PI with serotypes Legon, Oakland and Kingston, but continued to decrease with serotypes Farakan and Teshie at all concentrations (Tables 2a, b, c). Nevertheless, only the PCV values at D7 and D15 PI of the groups inoculated with all five serotypes at the

Table 2. Statistical comparison of average PCV values per group of inoculated keets according to sampling day. The average PCV values (PCV %) and standard deviation (SD) of the non-inoculated group were respectively: D0 (41.11^a, 0.75), D7 (41.05^a, 0.72), D15 (41.27^a, 0.66).

Inoculum Serotype	D PI	10 ⁴ CFU			10 ⁵ CFU			10 ⁶ CFU			10 ⁷ CFU			10 ⁸ CFU		
		PCV (%)	SD	PS	PCV (%)	SD	PS	PCV (%)	SD	PS	PCV (%)	SD	PS	PCV (%)	SD	PS
Farakan	0	41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8	
	7	39.61 ^a	0.5	NS	39.33 ^a	0.48	NS	39.11 ^a	0.47	NS	39.16 ^b	0.38	***	38.00 ^b	0.97	***
	15	39.66 ^a	0.48		39.61 ^a	0.5		39.61 ^a	0.5		36.77 ^c	0.64		36.11 ^c	0.96	
Kingston	0	41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8	
	7	39.61 ^a	0.5	NS	39.27 ^a	0.57	NS	38.50 ^a	0.7	NS	36.38 ^b	1.19	***	36.88 ^b	0.9	***
	15	39.72 ^a	0.46		39.61 ^a	0.5		39.61 ^a	0.5		39.11 ^c	0.83		38.72 ^c	0.66	
Legon	0	41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.57		41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8	
	7	39.72 ^a	0.46	NS	39.40 ^a	0.5	NS	38.61 ^a	0.69	NS	35.77 ^b	1.35	***	34.44 ^b	0.7	***
	15	39.72 ^a	0.46		39.61 ^a	0.5		39.61 ^a	0.5		39.18 ^c	0.83		38.53 ^c	0.51	
Oakland	0	41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.72		41.05 ^a	0.83		41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8	
	7	39.66 ^a	0.48	NS	39.33 ^a	0.48	NS	38.77 ^a	0.54	NS	36.66 ^b	1.41	***	35.77 ^b	1.16	***
	15	39.72 ^a	0.46		39.61 ^a	0.5		39.61 ^a	0.5		39.44 ^c	0.61		38.64 ^c	0.49	
Teshie	0	41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8		41.05 ^a	0.8	
	7	39.61 ^a	0.5	NS	39.33 ^a	0.48	NS	39.11 ^a	0.47	NS	39.16 ^b	0.38	***	38.00 ^b	0.97	***
	15	39.66 ^a	0.48		39.61 ^a	0.5		39.61 ^a	0.5		36.72 ^c	0.75		36.05 ^c	1.05	

a, b, c, : Average PCV values in the same column with different superscripts differed significantly ($P < 0.001$); D PI: Days Post Inoculation; PCV: Packed Cell Volume; SD: Standard Deviation; PS: Percentage Significance; NS: Not Significant.

highest concentrations (10^7 and 10^8 CFU/ml) were significantly different from the respective D0 and from the control group values ($p < 0.001$).

Isolation of *Salmonella* from clinical samples and gross lesions

The faecal excretion tested positive for *Salmonella* sp. (10^3 to 3×10^5 CFU/g) with all serotypes at D7 and/or D15 PI with inoculum concentrations of 10^6 , 10^7 and/or 10^8 CFU/ml (Table 3). At necropsy, a slightly swollen caecum was observed in the five keets dead at D5 to D7

PI, but no apparent lesion was observed in any sacrificed keet at D15 PI.

Salmonella sp. was also isolated from the caecal contents of the 7 dead keets at D5 to D7 PI (2×10^7 to 3×10^7 CFU/g) and that of the keets sacrificed at D15 PI (10^2 to 10^6 CFU/g), inoculated with serotypes Farakan, Kingston, Legon, and Oakland, at the two highest concentrations (10^7 and/or 10^8 CFU/ml; Table 4). *Salmonella* sp. was also isolated from the liver sample (50 CFU/g) of one keet inoculated with the serotype Farakan at the concentration of 10^8 CFU/ml. Conversely no *Salmonella* sp. was isolated from any heart blood sample.

DISCUSSION

Though *S. enterica* is usually regarded as a primary pathogen in animals, the intensity of the clinical signs and lesions is often dependent on the serotype of the *Salmonella* strain and on adjuvant infectious (parasitism, viral infection) or non-infectious circumstances (diet, stress etc.), particularly in birds (Le Coz Doiun, 1992; Villate, 2001). For instance, the most pathogenic serotypes in birds are Gallinarum/Pullorum, Typhimurium, Typhimurium var. Copenhagen, Enteritidis etc. (Euzéby, 1997; Bornert G. 2000; Villate, 2001). The five serotypes in this

Table 3. *Salmonella* excretion (CFU/g) in keet faeces at D0, D7 and D15 PI. No faecal sample from the non-inoculated group tested positive.

Serotypes	D PI	Inoculum concentration (CFU/ml)				
		10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
Farakan	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	10^5 CFU/g	1.5×10^5 CFU/g
	15	0	0	0	2×10^5 CFU/g	3×10^5 CFU/g
Kingston	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	10^3 CFU/g	2×10^3 CFU/g	3×10^3 CFU/g
	15	0	0	0	10^3 CFU/g	10^3 CFU/g
Legon	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	1.2×10^4 CFU/g	2×10^4 CFU/g	3×10^4 CFU/g
	15	0	0	0	10^3 CFU/g	10^3 CFU/g
Oakland	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	10^3 CFU/g	1.2×10^4 CFU/g	1.4×10^4 CFU/g
	15	0	0	0	0	10^3 CFU/g
Teshie	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	10^3 CFU/g
	15	0	0	0	0	0

D PI: Days Post Inoculation; CFU/g: Colony Form Units of *Salmonella* per gram of faeces.**Table 4.** *Salmonella* isolation per gram of caecal content of the two keets sacrificed at D15 PI according to serotype and inoculum concentration.

Group	Inoculum concentration (CFU/ml)	<i>Salmonella</i> counts (CFU/g of caecal content)				
		Farakan	Kingston	Legon	Oakland	Teshie
Control	None	0	0	0	0	0
	10^4	0	0	0	0	0
	10^5	0	0	0	0	0
	10^6	0	0	0	0	0
Infected	10^7	a) 4×10^5 b) 3×10^5	0	a) 3×10^5 b) 3.5×10^5	a) 3.5×10^4 b) 5×10^4	0
	10^8	a) 1.5×10^5 b) 10^5	a) 10^2 b) 2×10^2	a) 5×10^5 b) 4×10^5	a) 8×10^4 b) 7.5×10^4	0

a) b) : animal identification.

trial are very rare, both in developed and in developing countries, and equally in mammals (including man) and birds (Le Minor et al., 1975; Boqvist et al., 2003; HPA, 2006). Moreover, their actual virulence is unknown. Therefore, in the present study, keets were experimentally inoculated in order to assess the potential virulence of these serotypes.

The clinical signs recorded after oral inoculation of 5×10^3 to 5×10^7 CFU are similar to, though less dramatic than, those observed in keets during a field survey in Benin (Boko et al., 2011). They are also similar to the clinical signs observed in commercial guinea fowl in France during a salmonellosis outbreak caused by *Salmonella* Gallinarum (Le Coz Doin, 1992), and to those reproduced in one-day-old white Leghorn chicks

inoculated with 5×10^7 CFU of serotype Enteritidis strain BN92R1, isolated from guinea fowl in France (Millemann et al., 2005). The clinical signs can be associated with the colonization of keets by, and subsequent growth of, *Salmonella* strains, since they were observed neither in the non-inoculated control group, nor during the fifteen days of acclimation before inoculation.

Nevertheless, the intensity of the clinical signs (morbidity scores) significantly differ between the serotypes (with serotype Legon being the most pathogenic in terms of score and duration, and serotype Teshie being the least pathogenic) suggesting that they differ either by some virulence-associated properties, or by their relative adaptation to 2-week-old guinea fowl. The study of the different repertoires of virulence genes

located in mobile genetic elements such as plasmids, *spvC* gene (Okamoto et al., 2009), or *Salmonella* pathogenicity islands (SPI), *InvA*, *spiC*, *misL*, *pipD* gene present in SPI-1, SPI-2, SPI-3 and SPI-5 could help to explain these differences (Gassama-sow et al., 2006; Skyberg et al., 2006). Alternatively, morbidity scores might have been higher if one-day-old keets had been inoculated in place of older birds, as birds are most probably contaminated at that early age in field conditions. It is also noteworthy that the least pathogenic serotype Teshie had been isolated only once during the field study in contrast to the other serotypes which occurred more frequently (Boko et al., 2008). It is also important to note that the presence of maternal antibody prior to the inoculation could not be excluded since no antigen kits of these serotypes are available for serum control before inoculation, although at two weeks of age the antibody level should already have significantly decreased.

Not surprisingly, the morbidity scores are positively correlated to the inoculum concentration. In agreement with the morbidity scores, the intestinal colonization of the keets (evidenced by *Salmonella* isolation from faeces and caecal contents) differs according to the *Salmonella* serotype and is positively correlated to the inoculum concentration.

Nonetheless, only seven mortality cases were recorded at the highest two inoculum concentrations with serotypes Legon and Oakland. Death during salmonellosis is usually the consequence either of dehydration caused by intense enteritis and diarrhoea, or of invasion of the blood stream and internal organs (septicemia and polyserositis). Neither was observed during this experimental procedure, as illustrated by the absence of positive blood cultures and by only one positive liver culture. The observed low mortality score and invasive properties of the inoculated strains are confirmed by other published results on studies of one-day-old *Salmonella* enteritidis orally challenged chickens (Desmidt et al., 1997; Millemann et al., 2005). These low mortality score may likewise offer similar explanations as for morbidity score (actual virulence properties, no full adaptation to the host), but may also reflect the importance of adjuvant circumstances in the development of clinical salmonellosis, such as those described in field surveys (Boko et al., 2011).

The average PCV values recorded before inoculation are similar to the values reported in literature in one-month-old healthy guinea fowl in India (Kundu et al., 1993) and eight-month-old healthy guinea fowl in Ghana (Awotwi and Boohene, 1992). The average PCV values decrease in infected keets during the first week PI specifically around the peak of morbidity scores in all infected groups. This anaemia is also linked to lack of appetite and reduced growth rate of diseased keets. Christensen et al. (1996) suggest that low haematocrits are linked to the presence of viable bacteria in liver and

caecal content during an experimental study of *Salmonella* Gallinarum orally inoculated chickens. Unfortunately no bacterial analysis was performed at D7 of the present study. Nevertheless, in agreement with the above mentioned hypothesis regarding lack of appetite and reduced growth rate, the increase of the average PCV values at D15 PI coincides with the progressive disappearance of the clinical signs, the improvement of appetite, and the decrease of *Salmonella* faecal excretion (i.e. the progressive recovery of surviving keets from the infection), during the second week PI. Additionally, although *Salmonella* sp. could still be isolated from the caecal contents, only one liver sample tested positive.

The results of this study confirm that, besides the classical avian serotypes, the five "exotic" serotypes of *Salmonella* isolated from dead keets in Benin are actually virulent and able to reproduce clinical infection in keets similar to, though less dramatic than, natural infections (Boko et al., 2011), with only a few recorded deaths. Some differences were also observed in the pathogenicity of these serotypes, particularly at lower inoculum concentrations, possibly reflecting difference in host adaptation. We may therefore conclude that adjuvant field circumstances (age of the keets, parasitism, cold, rain etc.) are of crucial importance in the development of the acute clinical syndrome. Both chronic salmonellosis and a passive carrier state (in the caecum and/or internal organs) can nevertheless develop in the young guinea fowl with the risk of environmental contamination (via faecal excretion) and egg contamination during laying, leading to early deaths of keets as well as embryos. There is also a potential risk for humans who consume raw eggs, since those serotypes Farakan, Legon, Oakland have also been isolated from humans, albeit very rarely and /or several years ago (Le Minor et al. 1975; HPA-, 2004, 2006).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Republic of Benin and the Association of Universities of the Francophonie (AUF) for financial support of this study. We are also grateful to our Animal Husbandry Technicians, Aizoun Frédéric, Sethegbé Kesaje, and Sessou Philipps for their assistance while performing the trial.

REFERENCES

- Awotwi EK, Boohene YG (1992). Haematological studies on some poultry species in Ghana. *Bull. Anim. Prod. Afr.* 40: 65-71.
- Bauwens L, Vercammen F, Bertrand S, Collard JM, De Ceuster S (2006). Isolation of *Salmonella* from environmental samples collected in the reptile department of Antwerp Zoo using different selective methods. *J. Appl. Microbiol.* 101: 284-289.
- Bessin R, Belem AMG, Boussini H, Compaore Z, Kaboret Y, Dembele MA (1998). Causes of young guinea fowl mortality in Burkina Faso. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* 51: 87-93.

- Boko KC (2004). Contribution for local guinea fowl rural breeding improvement Borgou Department (North-Est Benin). Master of Sciences in Vegetable and Animal Management resources in Tropical Area, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium. pp. 17-40.
- Boko C K, Kpodekon MT, Duprez JN, Imberechts H, Taminiau B, Bertrand S, Mainil JG (2008). Comparison of *Salmonella* strains isolated from guinea fowl in the breeding of Borgou and Alibori Department, North-East Benin. 4th International French-speaking symposium of animal microbiology, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.
- Boko CK, Kpodekon MT, Farougou S, Dahouda M, Youssao AKI, Aplogan GL, Zanou J, Mainil JG (2011). Farmer perceptions and pathological constraints in helmeted guinea fowl farming in the Borgou Department in North-East Benin. Afr. J. Agric. Res. 6: 2348-2357.
- Boqvist S, Hansson I, Nord Bjerselius U, Hamilton C, Wahlström H, Noll B, Tysen E Engvall A (2003). *Salmonella* Isolated from animals and feed production in Sweden between 1993 and 1997. Acta Vet.Scand. 44:181-197.
- Bornert G (2000). Poultry without *Salmonellae*: myth or reality? Revue Méd.Vét. 151 : 1083-1094.
- Brackaert RDS, Gueye EF (1999). FAO's program for support to family poultry production. Proceedings of a Workshop: Poultry as a Tool in Poverty Eradication and Promotion of Gender Equality held at Tune Landboskole, Denmark. pp. 244-256.
- Christensen JP, Barrow PA, Olsen JE, Poulsen JSD, Bisgaard M (1996). Correlation between viable counts of *Salmonella* Gallinarum in spleen and liver and the development of anaemia in chickens as seen in experimental fowl typhoid. Avian Pathol. 25: 769-783
- Chrysostome C (1993). Problem and possibility in rural guinea fowl breeding. Rural poultry production in Africa. In: International workshop, Rabat (Morocco), 993,pp. 57-65.
- Dahouda M, Toleba SS, Youssao AKI, Banikogui S, Yacoubou S, Aboubakari JL, Hornick JL (2007). Guinea fowl rearing constraints and flock composition under traditional management in Borgou Department, Benin. Fam. Poult. 17: 3-14
- Desmidt M, Ducatelle R, Haesebrouck F (1997). Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* phage type four after experimental infection of young chickens. Vet. Microbiol. 56: 99-109.
- Euzeby JP (1997). *Salmonellae* and avian salmonellosis due to ubiquitous serovars. Revue Méd. vét. 148: 61-76.
- Galor (1990). Broiler breeding guinea fowl Program. Galorfrance, Paris. pp.14-21.
- Gassama-Sow A, Wane AA, Canu NA, Uzzau S, Aidara-Kane A, Rubino S (2006). Characterization of virulence factors in the newly described *Salmonella enterica* serotype Keurmassar emerging in Senegal (sub-Saharan Africa). Epidemiol. Infect. 134:741-743.
- Grimont PAD, Weill F-X (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th edition, World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur. Paris. pp. 6-14.
- Health Protection Agency, (2004, 2006). URL address: <http://www.hpa.org.uk/cdr/Weekly-Enteric-Infection-Reports-CDR-Wkly.16:10.htm>, consulted 2007/04/16.
- Kundu AK, Mohanty BP, Mishra SC, Misra MS (1993). Age related changes in the haematology of guinea fowls. Indian J. Poult. Sci. 28: 200-207.
- Le Coz Douin J (1992). Guinea fowl pathology. In: Guinea fowl breeding. Edition point vétérinaire, Maison Alfort. pp. 149 -187.
- Le Minor LS, Le Coueffic E, Le Priol A, Lefèvre M, Ducilassin M, Chippaux C, Boche R, Mered B, Saliou P, Darrigol J (1975). Fifteen new *Salmonella* serotypes of sub genus I isolated in Africa. Bull. Soc. pathol. Exot. pp. 547-555
- Ministère Agriculture Elevage Pêche (MAEP) (2005). Study of commercial poultry in Benin. Final Report. pp. 4-21.
- Millemann Y, Mouline C, Lafont JP, Chaslus-Dancla E (2005). Bacteraemia assays in chickens as a model for the evaluation of the virulence of salmonella enterica serovars Typhimurium and Enteritidis strains. Revue Méd. Vét. 156: 270-76.
- Moro Valiente C, Fravalo P, Amelot M, Claude C, Zenner L, Salvat G (2009). Colonization and organ invasion in chicks experimentally infected with *Dermatophytes gallinae* contaminated by *Salmonella* Enteritidis. Avian Pathol. 36: 307-311.
- Okamoto AS, Filho RLA, Rocha TS, Menconi A, Marietto-Gonçalves GA (2009). Relation between the *spvC* and *invA* virulence genes and resistance of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolated from avian material. Int. J. Poult. Sci. 8: 579-582.
- Poppe C (2000). *Salmonella* in domestic animals. In C. Wray and A. Wray. 2000. Cabi publishing. Diseases of Poultry 11th edn. Ames: Iowa State Press. pp. 107-300.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR (1999). Bacterial Cell Counting Techniques. In: Clinical Veterinary Microbiology, M Wolfe, England. pp.61-66.
- Shivaprasad HL, Barrow PA (2008). Pullorum disease and fowl typhoid. In: Diseases of Poultry, 12th ed. Saif, YM, Glisson JR, McDougald, LR, Nolan LK, Swayne DE Eds. Iowa State University press, Ames, IA, USA. pp. 620-630.
- Sonaiya EB, Swan SE (2004). Family poultry production. Food Agriculture Organization United Nations (FAO), Rome: 29-47.
- Statistical Analysis System (SAS) (1991). User's Guide (Resource Electronique), 4ème edn. S.A.S. Inst.Inc S.A.S/Stat: Cary, version 6. New York.
- Skyberg JA, Logue CM, Nolan LK (2006). Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. Avian Dis. 50: 77-81.
- Tindall BJ, Grimont PAD, Garrity GM, Euzéby JP (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 521-524
- Villate D (2001). Poultry diseases, 2nd Edition. France Agricole. Paris. pp. 226-377.

2.3. Etude 3 : Composition chimique et test d'efficacité *in vitro* des huiles essentielles extraites de feuilles fraîches du basilic commun (*Ocimum basilicum*) et du basilic tropical (*Ocimum gratissimum*) sur *Salmonella enterica* sérotype Oakland et *Salmonella enterica* sérotype Legon

Préambule

Les pratiques des connaissances locales sont de plus en plus considérées au sein même des sciences conventionnelles et du monde du développement international. Ces procédés sont en général le fruit de l'observation empirique et de l'expérience des gens du pays à travers les siècles. La valorisation des plantes médicinales est une préoccupation majeure de nombreux chercheurs et responsables des pays du Sud, car une grande partie de la population recourt largement à la médecine traditionnelle. Souvent, les gens n'ont pas d'autre choix compte tenu du prix élevé des médicaments et de l'impossibilité de consulter un médecin. Les éleveurs des pays du sud observent également cette pratique dans le traitement des maladies des animaux domestiques (Kasonia, Ansay, 1994; Mbarubukeye, 1994). Malheureusement, très peu de documents scientifiques sont disponibles sur l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement des maladies aviaires. Nous nous proposons d'étudier les compositions chimiques des extraits volatils d'*Ocimum gratissimum* et *Ocimum basilicum*, et d'évaluer leurs propriétés antibactériennes, car ces plantes sont utilisées de manière empirique et générale par certains éleveurs de pintades dans les traitements des problèmes cliniques dans leurs élevages.

2.3.1. Article 4 : Composition chimique et test d'efficacité *in vitro* des huiles essentielles extraites de feuilles fraîches du basilic commun (*Ocimum basilicum*) et du basilic tropical (*Ocimum gratissimum*) sur *Salmonella enterica* sérotype Oakland et *Salmonella enterica* sérotype Legon

Soumis pour publication au Journal de la Société Ouest Africaine de Chimie (SOACHIM)

K.C. BOKO¹, M.T. KPODEKON¹, J.G. MAINIL⁴ S. FAROUGOU¹, P. SESSOU², B. YEHOUENOU², J. GBENOU³, J-N. DUPREZ⁴, M. Bardiau⁴

¹Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, EPAC/UAC, 01 BP : 2009 Cotonou, Bénin

²Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie Appliquée, EPAC/UAC, 01 BP : 2009 Cotonou, Bénin

³Laboratoire de Pharmacognosie et de chimie des Huiles Essentielles FSS-FAST/UAC, ISBA Cotonou, Bénin

⁴Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège, Liège, Belgique

* adresse correspondant : cyrilleboko@yahoo.fr

Résumé : Dans le présent travail nous avons étudié les compositions chimiques et les activités antibactériennes des huiles essentielles extraites de feuilles fraîches d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* sur *Salmonella enterica* sérotype Oakland et *Salmonella enterica* sérotype Legon, deux bactéries impliquées dans la mortalité de pintades dans les élevages au Nord du Bénin. Extraites par hydrodistillation et analysées par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) et Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/SM), les composés majoritaires identifiés sont, pour *Ocimum basilicum*, l'estragole (31,3 %), le linalol (24,0 %), l'eugénol (21,7 %) et, pour *Ocimum gratissimum*, le thymol (43,4 %), le para-cymène (12,3 %) et le γ -terpinène (12,1 %).

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) déterminées pour les deux huiles varient respectivement de 8.10^{-3} mg/ml à 18.10^{-3} mg/ml et de 16.10^{-3} mg/ml à 144.10^{-3} mg/ml.

En conclusion, ceci montre que ces deux huiles possèdent de puissantes activités antibactériennes contre les deux sérotypes étudiés de *Salmonella enterica*.

Mots clés : *Ocimum basilicum*, *Ocimum gratissimum*, activités antibactériennes, *Salmonella* Legon, *Salmonella* Oakland, CMI, CMB.

Chemical composition and *in vitro* test of efficacy of essential oils extracted from fresh leaves of commun basilic (*Ocimum basilicum*) and of tropical basilic (*Ocimum gratissimum*) against *Salmonella enterica* serotype Oakland and *Salmonella enterica* serotype Legon

Summary: In the present study we have determined the chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils extracted from fresh leaves of *Ocimum basilicum* and *Ocimum gratissimum* against *Salmonella enterica* serotype Oakland et *Salmonella enterica* serotype Legon, two bacteria implicated in guinea fowl mortality in the North Benin breedings. Extracted by Hydrodistillation and analysed by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography quadruple Mass Spectrometry (GC/MS), the major components are for *Ocimum basilicum*, estragole (31.3 %), linalol (24.0 %) eugenol (21.7 %) and for *Ocimum gratissimum*, thymol (43.4 %), para-cymene (12.3 %) and γ -terpinene (12.1 %). The Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) and the Minimal Bactericide Concentrations (MBC) determined for these two essentials oils vary respectively from 8.10^{-3} mg/ml to 18.10^{-3} mg/ml and from 16.10^{-3} mg/ml to 144.10^{-3} mg/ml.

In conclusion, this results show that these oils possess strong antibacterial activities against the two serotypes of *Salmonella enterica*.

Key words: *Ocimum basilicum*, *Ocimum gratissimum*, antibacterial activities, *Salmonella* Legon, *Salmonella* Oakland, CMI, CMB,

1. Introduction

Les effets secondaires de plus en plus dangereux des molécules de synthèse ont conduit ces dernières années à l'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques [1,2,3,4]. Dans ce cadre, la pharmacologie africaine en général, et béninoise en particulier, s'intéressent aux différentes activités biologiques des extraits végétaux des plantes aromatiques [5]. La pharmacopée béninoise regorge de plusieurs plantes ayant des propriétés antimicrobiennes qui méritent d'être investiguées. Les plantes d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* poussent dans toutes les régions du pays et sont très largement utilisées par les populations locales, qui les mettent couramment en culture autour des habitations et les proposent sur les marchés locaux. En médecine traditionnelle humaine, les feuilles d'*Ocimum basilicum* sont utilisées pour traiter certaines affections telles que les indigestions, les nausées, les crampes abdominales, les gastroentérites, les migraines, les dépressions, la gonococcie, la dysenterie et les diarrhées chroniques [6]. Les feuilles d'*Ocimum gratissimum* sont utilisées dans le traitement des diarrhées et des infections du tractus respiratoire [7]. Les huiles essentielles des feuilles d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* ont quant à elles révélé des activités antibactériennes [8,9,10,11,12] qui pourraient être utiles en médecine vétérinaire.

Au Bénin, les extraits de plantes médicinales ont été testés en priorité sur les grands et petits ruminants au détriment de la volaille. Certains éleveurs utilisent de façon empirique des extraits de plantes pour guérir certaines maladies du bétail. Pourtant l'élevage de volaille est une filière agricole qui présente également des problèmes sanitaires. Ainsi deux sérotypes de *Salmonella enterica* ont été détectés et isolés chez des pintades de races locales élevées dans le département du Borgou au Nord-Est du Bénin et mortes suite aux signes cliniques comme la frilosité, la prostration, la diarrhée blanchâtre et la perte d'appétit [13]. La thérapie couramment appliquée par les éleveurs est un antibiotique de synthèse à base de fluméquine. Toutefois, les difficultés d'approvisionnement en fluméquine dans les zones reculées d'élevage conjuguées au faible pouvoir d'achat de médicaments par les éleveurs rendent difficile leur utilisation. La recherche d'une thérapeutique alternative s'impose donc pour remédier à cette pathologie dans les élevages de pintades. Cette étude se propose donc de vérifier les vertus thérapeutiques antisalmonelliques d'extraits de feuilles fraîches d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* de la flore béninoise en vue d'une éventuelle substitution de la fluméquine dans les élevages de volaille au Bénin. Ceci contribuerait à la valorisation,

au plan scientifique, de ces deux plantes médicinales utilisées par les aviculteurs béninois et permettrait de diminuer la prévalence de l'antibiorésistance bactérienne.

Les objectifs spécifiques de ce travail se résument à l'étude des compositions chimiques des extraits volatils des deux plantes précitées et à l'évaluation de leurs propriétés antibactériennes sur ces deux souches isolées de cas de salmonellose au Nord-Est du Bénin.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal étudié est constitué des feuilles fraîches d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* respectivement récoltées à Abomey-Calavi (6°26'56,20"N et 2°21'00,88"E) et à Dassa-Zoumé (7°46'15,58"N et 2°11'49,78"E). Ces deux localités bénéficient d'un climat subéquatorial caractérisé par une longue saison des pluies d'avril à juillet et une courte saison des pluies d'octobre à novembre. Le matériel végétal a été identifié à l'aide de l'herbier national de l'Université d'Abomey Calavi ^[14]. *Ocimum basilicum* a été identifié sous le n° AA 6372/HNB et l'*Ocimum gratissimum* sous le n° AA 6373/HNB.

2.1.2. Matériel bactériologique

Les tests microbiologiques ont été effectués au Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie Appliquée (LERCA) de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC) au Bénin. Les bactéries ont été isolées des élevages de pintade dans le département du Borgou au Nord-Est du Bénin. Ces bactéries ont été typées en Belgique au Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques (CERVA-CODA), section Bactériologie. Deux sérotypes ont été identifiés. Il s'agit de *Salmonella enterica* sérotype Legon et de *Salmonella enterica* sérotype Oakland. Ces souches ont ensuite été ramenées au Laboratoire de diagnostic vétérinaire de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC).

2.2. Méthodologie

2.2.1. Extraction des huiles essentielles

La technique d'extraction des huiles essentielles (HE) utilisée dans cette étude est l'hydrodistillation. Celle-ci a été réalisée à partir de 300g de feuilles fraîches à l'aide d'un extracteur de type cleverger pendant trois heures au Laboratoire de pharmacognosie et des huiles essentielles de Cotonou au Bénin. Les extraits volatils ont ensuite été séchés à l'aide de sulfate de sodium anhydre puis conservés dans des flacons teintés afin de limiter les effets éventuels de la lumière ^[15].

2.2.2. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles et contrôle de stérilité

Afin de déterminer leur composition chimique, les huiles essentielles extraites ont été analysées par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) à l'aide d'un appareil Deloi DI 200[®] muni d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne DB5 (L : 25 m, diamètre : 0,25 mm et Di : 0,25 µm). L'identification des composés chimiques a été réalisée par CPG couplée à la spectrométrie de masse (SM).

Afin de confirmer l'absence de microorganismes (moisissures et bactéries) dans les extraits, les huiles essentielles ont étéensemencées sur de la gélose de type Sabouraud et de type Muller Hinton Agar.

2.2.3 Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB) des huiles essentielles

Deux solutions mères des deux huiles essentielles ont été réalisées à partir de 2 ml de bouillon Mueller Hinton stérile, 40 µl d'huile essentielle et une goutte de Tween 80^[16].

La CMI a été déterminée comme précédemment décrite par Yehouénou et al. ^[17]. Brièvement, 100 µl de bouillon Mueller Hinton contenant du rouge de phénol à 0,02 g/l ont été distribués dans chaque puit d'une microplaque à 96 puits. Cent microlitres de la solution mère de l'extrait ont ensuite été ajoutés à chacun des puits de la première colonne (A, C, D, E, F, G, H) de la microplaque sauf celui de la seconde rangée (B). Des dilutions successives de raison 2, puit par puit, ont été réalisées jusqu'au 12^{ème} puits dans chaque rangée et les 100 µl du dernier puits ont été rejetés. Ensuite, 100 µl de bouillon Mueller Hinton ne contenant pas du rouge de phénol ont été ajoutés dans le premier puit de la seconde rangée et avant de procéder à des dilutions successives toujours de raison 2.

Tous les puits ont été ensemencés, sauf ceux de la première rangée, en y introduisant 100 µl de suspension bactérienne à 10⁶ Unité Formant Colonie (UFC)/ml, densité égale à l'échelle 2 de Mc Farland^[18]. A la place de la suspension bactérienne, ont été mis du bouillon Muller Hinton sans rouge de phénol dans les puits de la première rangée. La microplaque a enfin été recouverte avec du papier parafilm puis incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures. La première rangée représente le témoin négatif tandis que la seconde, le témoin positif.

A la lecture, l'obtention d'une couleur jaune indique une multiplication bactérienne. La persistance de la couleur rouge initiale signifie l'absence de croissance des germes. La CMI est la concentration la plus faible pour laquelle aucune croissance visible n'a été notée. Pour une meilleure évaluation de l'activité des extraits, nous avons effectué six essais pour chaque germe, la valeur de la CMI étant celle qui s'est répétée quatre fois sur les six tests.

La CMB a été déterminée successivement à la CMI. Brièvement, le contenu de chaque cupule, allant de la valeur de la CMI aux concentrations les plus élevées a été ensemencé par strie à la surface de gélose *Salmonella-Shigella* (SS) coulée en boîte de Pétri. Les cupules des rangées des témoins positif et négatif ont également été ensemencées sur la même gélose pour s'assurer de l'absence de croissance des bactéries dans les cupules de la rangée témoin négative et de présence de salmonelles dans les cupules de la rangée positive. Les boîtes de gélose ainsi ensemencées ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. A la lecture, la CMB est la plus faible concentration d'extrait pour laquelle il y a eu 0,01% de bactéries survivantes pour les cupules test.

2.2.4. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) Concentration Minimale Bactéricide (CMB) d'antibiotiques conventionnels

Une seule plaque a été utilisée pour tester quatre antibiotiques conventionnels (gentamicine, tétracycline, chloramphénicol, fluméquine). La méthode de dilution utilisant les microplaques à 96 puits a été utilisée^[17]. Dans une plaque de 96 puits, 100 µl d'eau distillée stérile ont été distribués dans les puits de la microplaque sauf ceux de la colonne 3. Ensuite, 100 µl de bouillon Muller Hinton stérile au rouge de phénol (0,02g/l) ont été distribués dans la colonne 2. Après, 100 µl d'antibiotique (256 µl/ml) ont été mis dans chacun des puits des 3^{ème} et 4^{ème} colonnes de la plaque. La gentamicine a été affectée aux lignes A et B, suivi de tétracycline dans les lignes C et D, le chloramphénicol dans les lignes E et F, et la fluméquine dans les lignes G et H. On a par la suite procédé à une dilution successive de raison 2 des puits du n°4 au n° 12 sur chaque ligne. Cent microlitres de bouillon Muller Hinton de la

souche Legon (10^6 UFC/ml, densité égale à l'échelle 2 de Mc Farland) ont été distribués dans les puits des lignes A, C, E, G sauf les puits de la colonne 2 et 100 μ l du bouillon de la souche Oakland (10^6 UFC/ml, densité égale à l'échelle 2 de Mc Farland) ^[18] ont été distribués dans les puits des lignes B, D, F, H sauf les puits de la colonne 2. La colonne 1 représente ici le témoin positif et la colonne 2, le témoin négatif. Enfin, la plaque a été recouverte d'un papier de parafilm puis incubée à 37° pendant 24h. La lecture a été faite de la même manière que celles de l'HE.

Pour une meilleure évaluation de l'activité des extraits, l'opération a été répétée six fois, la valeur de la CMI étant celle qui s'est répétée quatre fois sur les six tests.

La procédure de détermination de la CMB est la même que celle décrite dans la section 2.2.3.

2.2.5. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) du thymol

La CMI du thymol pur par rapport aux deux souches a été également testée. La procédure utilisée est la même que celle pour la détermination de la CMI des antibiotiques conventionnels (Section 2.2.4).

3. Résultats et discussion

3.1. Rendement et composition chimique des huiles essentielles

Le rendement d'extrait en huile essentielle des feuilles d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* est respectivement de 0,63 % et de 1,24 %. Les rendements des extraits d'huiles essentielles obtenus dans le cadre de cette étude sont supérieurs à ceux de Yayi ^[19] qui varient entre 0,1 % et 0,4 %. Un rendement de 0,60 % a été rapporté dans d'autres travaux sur *Ocimum gratissimum* au Cameroun ^[20].

Les analyses effectuées par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) et par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/SM) ont montré des compositions chimiques différentes selon les huiles essentielles extraites d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum* (tableaux I et II).

Les composés majoritaires de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* sont l'estragol (31,33 %), le linalol (24 %) et l'eugénol (21,67 %). Contrairement aux analyses CPG-MS de notre étude, Sajjadi a identifié une proportion davantage élevée de méthyl chavicol (52,4 %) suivi de linalol (20,1 %), d'épi- α -cadinol (5,9 %) et du trans- α -bergamotène (5,2 %) dans l'huile essentielle des feuilles violettes d'*Ocimum basilicum* poussant en Iran ^[21]. De plus, les

principaux constituants rapportés par cet auteur à partir de l'huile essentielle extraite des feuilles vertes d'*Ocimum basilicum* récoltées à Isfahan sont le méthyl chavicol (40,5 %), le géraniol (27,6 %), le néral (18,5 %) et l'oxyde de caryophyllène (5,4 %) ^[21]. Parmi les trois composés majoritaires obtenus avec les huiles d'*Ocimum basilicum* dans le cadre de cette étude, seul le linalol a été observé dans l'*Ocimum basilicum* variété pourpre ^[21] en Iran. Les trois composés d'*Ocimum basilicum* majoritaires dans la présente étude sont mentionnés dans les études réalisées par Yayi ^[19], mais seul le linalol présente une valeur comparable à celle trouvée dans le cadre du présent travail. Des travaux similaires ont été réalisés au Togo à partir des feuilles d'*Ocimum basilicum* récolté à Lomé, et ont permis d'obtenir 85,50 % d'estragol, 2,25 % de 1,8-cineole, 1,71 % de linalol, 1,63 % de E- α -bergamotène ^[22]. Les valeurs de la composition chimique des trois composés majoritaires dans notre étude sont largement différentes de celles rapportées par Koba et al. ^[22] au Togo. Au Mali, les compositions chimiques des composés majoritaires de cette même plante ont donné aussi des valeurs nettement différentes des nôtres : linalol (57 %), eugénol (19,2 %), α -cadinol (3,2 %), trans- α -bergamotène (2,7 %) ^[23].

En ce qui concerne l'huile d'*Ocimum gratissimum*, le thymol (43,45 %), le paracymène (12,26 %) et le γ -terpinène (12,11 %) sont majoritaires. Ces compositions chimiques et les valeurs de chacune d'elles sont dans les mêmes ordres de grandeur que celle de Yayi ^[19], à la différence que la teneur en thymol dans la présente étude est plus élevée. Dans une étude réalisée au Kenya avec l'huile essentielle des feuilles d'*Ocimum gratissimum*, les composés majoritaires sont constitués d'eugénol (68,8 %), du méthyl eugénol (13,21 %) et du cis-ocimène (7,47 %) ^[24]. D'autres travaux de recherche sur les huiles essentielles de cette plante ont révélé différentes proportions de composés chimiques à travers le monde. Au Cameroun, une étude indique le thymol (47,7 %) et le β -terpinène (14,3 %) comme composés majoritaires ^[25]. Sahouo Bedi et al. ^[26] ont également mis en évidence la prédominance du thymol (70,8 %) dans l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* de la Côte d'Ivoire. Dans ce même pays, une étude conduite par Oussou et al. ^[27] a permis d'obtenir dans l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum*, le thymol (34,6 %), le p-cimène (25,2 %), α -sélénène (6,8 %), le myrcène (5,4 %), le (E)- β -caryophyllène (4,9 %) et α -thujène (4,5 %). Comme chémotype au Brésil, Cavalcanti et al. ^[28] ont isolé dans l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* de l'eugénol (43,7 %), du 1-8 cinéole (32,7 %), du (Z)-Ocimène (6,2 %), et du trans-caryophyllène (4,1 %) ; alors qu'au Nigéria, Saliu et al. ^[29] ont mis en évidence l'eugénol (61,9 %) et le cis-ocimène (8,2 %) pour cette même plante.

Les variations observées au niveau de la composition chimique de chacune de ces deux huiles pourraient être liées à l'écologie, à la période au cours de laquelle les plantes ont été récoltées dans l'année et surtout à la structure pédologique sur laquelle les plantes ont poussé.

3.2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des deux huiles essentielles

Les deux huiles essentielles présentent une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches de *Salmonella* étudiées. Cette activité varie d'une souche à l'autre (tableau III).

Pour *Salmonella* Legon, les CMI sont de 36.10^{-3} mg/ml pour *Ocimum basilicum* et 8.10^{-3} mg/ml pour *Ocimum gratissimum* alors que, pour *Salmonella* Oakland, les CMI sont de 18.10^{-3} mg/ml pour *Ocimum basilicum* et de 16.10^{-3} mg/ml pour *Ocimum gratissimum*.

Selon Joubert *et al.* ^[30], le rapport CMB/CMI permet de déterminer le pouvoir antibiotique de l'huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur ou égal à 4, on dit que l'extrait est bactéricide et lorsqu'il est supérieur à 4, l'extrait est qualifié de bactériostatique. L'analyse du tableau III ci-dessus montre que les huiles essentielles étudiées sont bactéricides et que l'huile d'*Ocimum gratissimum* est plus active que celle d'*Ocimum basilicum*. Dans une étude réalisée au Burkina Faso qui consistait à déterminer les CMI de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* contre plusieurs bactéries, Bassolé *et al.* ^[23] ont déterminé une CMI de 5 mg/ml pour *S. enterica* CIP 105150 et *S. typhimurium* ATCC 13311, 8,3 mg/ml pour *Escherichia coli* CIP 105182 et 2,5 mg/ml pour *Staphylococcus aureus* ATCC 9144. Les plus grandes valeurs des CMI obtenues dans notre étude (36.10^{-3} mg/ml pour *Salmonella* Legon et 18.10^{-3} mg/ml pour *Salmonella* Oakland) sont largement inférieures à celles révélées pour les deux souches de *Salmonella* étudiées par Bassolé *et al.* ^[23]. Ceci suggère que notre huile d'*Ocimum basilicum* semble être plus active bien que nos sérotypes soient différents de ceux de Bassolé *et al.* ^[23]. Dans une étude au Pakistan, Shafique *et al.* ^[12] ont étudié l'activité antibiotique de l'huile d'*Ocimum basilicum* contre six souches bactériennes : *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*. Cette étude a révélé que l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* est active sur ces bactéries à Gram positif et à Gram négatif testées. Cette huile s'est révélée plus efficace que la streptomycine, un antibiotique conventionnel utilisée comme contrôle positif dans la même étude, selon ces mêmes auteurs.

La propriété antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* a été rapportée par Matasyoh *et al.* ^[24] qui ont réalisé une étude au Kenya sur une huile composée de 68,8 % d'eugénol. Cette étude a montré que l'HE d'*Ocimum gratissimum* est active sur

quelques bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*. Au Brésil, l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* contre une bactérie à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et des bactéries à Gram négatif (*Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Proteus mirabilis*), a également été testée par Nakamura *et al.* ^[9] Ces auteurs indiquent une CMI plus élevée pour *Staphylococcus aureus* de $0,75 \cdot 10^{-3}$ mg/ml, contre $3 \cdot 10^{-3}$ à $12 \cdot 10^{-3}$ mg/ml pour les autres bactéries (*Shigella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella* et Protéus). L'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* utilisée par Nakamura *et al.* ^[9] est plus active que celle obtenue dans le cadre de la présente étude. Ceci pourrait être lié au serotype de la bactérie et aux composés majoritaires des HE obtenus dans chaque cas. Selon Nakamura *et al.* ^[9], l'eugenol aurait joué un rôle important dans l'activité antibiotique de l'*Ocimum gratissimum*.

Cette forte activité antibactérienne de l'HE d'*Ocimum gratissimum* par rapport à *Ocimum basilicum* est probablement en rapport avec sa teneur élevée en thymol qui est un composé polyphénolique. L'importance du thymol dans l'activité antibactérienne de l'HE d'*Ocimum gratissimum* a été soulignée par Oussou *et al.* ^[27] qui ont testé quelques entérobactéries avec l'HE d'*Ocimum gratissimum* brute fractionnée. Ces auteurs ont constaté que la fraction étant constituée majoritairement de composés oxygénés, notamment le thymol, est plus active que les autres fractions. Les valeurs de la CMI du thymol pur contre les deux souches sont de $3 \cdot 10^{-3}$ mg/ml pour Legon et $1,5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml pour Oakland. Ceci témoigne de l'activité antibactérienne du thymol contre ces bactéries.

Les valeurs des CMI et CMB des antibiotiques conventionnels testés vis-à-vis des deux sérotypes de *Salmonella enterica* sont récapitulés dans le tableau III. Pour S. Legon, la CMI varie de $1 \cdot 10^{-3}$ mg/ml pour la tétracycline et la fluméquine à $16 \cdot 10^{-3}$ mg/ml avec la gentamicine, alors que, pour S. Oakland, elle varie de $0,5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml pour la tétracycline à $16 \cdot 10^{-3}$ mg/ml pour la gentamicine. La tétracycline et la fluméquine présentent des valeurs de CMI plus basse que celles de nos huiles essentielles. La valeur de la CMI obtenue pour le chloramphénicol est identique à celle trouvée pour *Ocimum gratissimum* par rapport à S. Legon, mais elle vaut la moitié de celle obtenue par rapport à S. Oakland. Ce qui suggère que le chloramphénicol a une activité similaire à celle d'*Ocimum gratissimum* vis-à-vis de S. Legon. Par ailleurs, la valeur de la CMI de la gentamicine est la même pour les deux sérotypes, mais elle est aussi égale à celle obtenue avec *Ocimum gratissimum* par rapport à S. Oakland. Ce qui suggère que la gentamicine a une activité similaire à celle d'*Ocimum gratissimum* vis-à-vis de S. Oakland.

4. Conclusion

Cette étude a montré l'importance de ces deux huiles essentielles du point de vue de leur activité antimicrobienne *in vitro* vis-à-vis de deux souches *Salmonella enterica* sérotypes Legon et Oakland isolés dans des élevages de pintade au Bénin. Ce qui confirme que ces plantes, déjà utilisées par les aviculteurs béninois, possèdent effectivement des propriétés antibiotiques, ce qui suggère que les huiles essentielles des deux plantes pourraient être utilisées dans les traitements des maladies causées par les sérotypes testés.

Les activités antibactériennes de ces deux extraits pourraient être évaluées sur d'autres sérotypes de salmonelles impliqués dans des cas de fièvre typhoïde chez l'homme. Au regard des performances antimicrobiennes de ces deux plantes, d'autres travaux de recherche seront envisagés (tests *in vivo*, isolement des principes actifs dans ces huiles essentielles, etc...).

Enfin, d'une manière générale les différents résultats obtenus constituent une première étape qui ouvre de nouvelles perspectives dans la recherche de solutions aux problèmes sanitaires de l'élevage traditionnel de la pintade au Bénin.

5. Références

- [1]. Adjanohoun E., Ahyi M.R.A., Akeassi L. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo. Agence de coopération culturelle et technique (A.C.C.T.), banque de données PHARMEL 2 (réf. HP 10), 1986, Paris.
- [2]. Adjanohoun E., Adjakidjè V., Ahyi M.R.A. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République populaire du Bénin. Agence de coopération culturelle et technique (A.C.C.T.), banque de données PHARMEL 2 (réf. HP 10), 1989, Paris.
- [3]. de Laroche-piquet E. La nature au service de la vie. Editions Akademos, 1999, Paris.
- [4]. M. ARBONNIER Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), 2002, Montpellier.
- [5]. Ayedoun M.A., Contribution à la connaissance chimique des huiles essentielles des plantes aromatiques du Bénin en vue de leur valorisation. Thèse de Doctorat, Université Nationale du Bénin, Cotonou. 1995. 284p.
- [6]. Chopra R.N., Nayar S.L., Chopra I.C.; Glossary of Indian Medicinal Plants (Including the Supplement). Council of Scientific and Industrial Research (1986) New Delhi.
- [7]. Onajobi F.D.; Smooth muscle contracting lipidsoluble principles in chromatographic fractions of *Ocimum gratissimum*; *J Ethnopharmacol* (1986) 18; 3-11.

- [8]. Begum J., Yusuf M., Chowdhury U., Wahab M.A.; Studies on essential oils for their antibacterial and antifungal properties. Part 1. Preliminary screening of 35 essential oils; *J. Sci. Ind. Res.*; (1993) 28; 25-34.
- [9]. Nakamura C.V., Nakamura T.U., Bando E., Melo A.F.N., Cortez D.A.G., Dias Filho B.P.; Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*; (1999) 94; 675-678.
- [10]. Ngassoum M.B., Essia-Ngang J.J., Tatsadjien L.N.J., Buchbauer G.; Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroun; *Fitoterapia*; (2003) 74; 284-7.
- [11]. Adebolu T.T., Oladimeji S.A.; Antimicrobial activity of leaf extracts of *Ocimum gratissimum* on selected diarrhoea causing bacteria in southwestern Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* (2005) 4 682-684.
- [12]. Shafique M., Khan S.J., Khan N.H.; Study of antioxidant and antimicrobial activity of sweet basil (*ocimum basilicum*) essential oil; *Pharmacologyonline*; (2011) 1; 105-111.
- [13]. Boko C. *E. coli* and *Salmonella* workshop. Thursday 7th June 2007, Utrech, Holland, <https://mail.ulg.ac.be/src/webmail.php>.
- [14]. Akoegninou A. Van der Burg W.J., Van der Maesen L.I.G. Flore Analytique du Bénin, backhuyes Publishers 2006, Cotonou et Wagenningen.
- [15]. Noudogbessi J.P. Etudes chimiques et activités biologiques d'extrait végétaux aromatiques d'origine Béninoise. Thèse de doctorat unique UAC et Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand ; 2009, 329p;
- [16]. Allegrini J, Simeon de Bouchberg M. Une technique d'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. *Prod Probl Pharm* ; (1972) 27 ; 891-897
- [17]. Yèhouenou B., Noudogbèssi J.P., Sessou P., Avlessi, F., Sohounhloué, D. Etude chimique et activités antimicrobiennes d'extraits volatils des feuilles et fruits de *Xylopia aethiopica* (DUNAL) A. Richard contre les pathogènes des denrées alimentaires ; *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.* ; (2010) 029; 19-27.
- [18]. Murray P.R., Baron E.J., Ptaller M.A., Tenover F.C., Yolke R.H. Manuel of clinical microbiology 6th Edit 1995, ASM, Washington.
- [19]. Yayi E. Contribution à l'étude des huiles essentielles de plantes aromatiques du Bénin : cas de l'*Ocimum basilicum*, *Ocimum canum* et *Ocimum gratissimum* dans la perspective de leur production. Thèse de doctorat en chimie organique des substances naturelles, Université Nationale du Bénin; 1998, 182p.

- [20]. Tchoumboungang F., Dongmo P.M.J., Sameza M.L., Mbanjo E.G.N., Fotso G.B.T., Zollo P.H.A., Menut C. ; Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun ; *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*; (2009) 13; 77-84.
- [21]. Sajjadi S. E. Analysis of the essential oils of two cultivated Basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. *DARU*, (2006) 14; 128-130.
- [22]. Koba K., Poutouli P.W., Raynaud C., Chaumont J-P. Sanda1 K.; Chemical composition and antimicrobial properties of different basil essential oils chemotypes from Togo; *Bangladesh J Pharmacol.*; (2009) 4; 1-8.
- [23]. Bassolé I.H.N., Lamien-Meda A., Bayala B., Tirogo S., Franz C., Novak J., Nebié R.C. Dicko M.H.; Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination; *Molecules*; (2010) 15; 7825-7839.
- [24]. Matasyoh L.G., Matasyoh J.C., Wachira F.N., Kinyua M.G., Thairu Muigai A.W., Mukiama Titus K.; Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya; *African J. Biotechnol.*; (2007) 6; 760-765.
- [25]. Tatsadjieu N.L., Etoa. F.-X., Mbofung C.M.F., Ngassoum M.B. Effect of *Plectranthus glandulosus* and *Ocimum gratissimum* Essential Oils on Growth of *Aspergillus flavus* and Aflatoxin B1 Production. *Tropicultura*; (2008) 26; 78-83.
- [26]. Sahouo G.B., Tonzibo Z.F., Boti B., Chopard C., Mahy J.P., N'guessan Y.T.; Anti-Inflammatory and analgesic activities: chemical constituents of essential oils of *ocimum gratissimum*, *eucalyptus citriodora* and *cymbopogon giganteus* inhibited lipooxygenase l-1 and cyclooxygenase of pghs; *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*; (2003) 17; 191-197.
- [27]. Oussou K. R., Yolou S. F., Tue Bi B., Kanko C., Boti J. B., Ahibo C., J. Casanova. Etude Chimique Bio-Guidée de l'huile Essentielle de *Ocimum Gratissimum* (Lamiaceae) *Eur. J. Sci. Res.* ; (2010) 40 ; 50-59.
- [28]. Cavalcanti E.S.B., de Morais S.M., Lima M.A.A, Santana E.W.P.; Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L.; *Mem Inst Oswaldo Cruz.*; (2004) 99; 541-544.
- [29]. Saliu B.K.1, Usman L.A., Sani, A., Muhammad N.O., Akolade J.O; Chemical composition and anti bacterial (oral isolates) activitiy of leaf essential oil of *ocimum gratissimum* l. grown in north central Nigeria. *Int. J. Current Res.*; (2011) 33; 022-028.
- [30]. Joubert T. L, Chambon P, Gattefosse M. ; Détermination du pouvoir bactériostatique et bactéricide des essences pures et mélanges ; *Bull. Tech. Gatte*; (1958) 56 ; 7-16.

La liste des Tableaux

Tableau I: Composition chimique de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum*

Composés identifiés	Taux (%)	IK (Index de Kovat)
delta-3-carène	0,30	998
α -terpinène	1,30	1001
Limonène	1,14	1013
1,8-cinéol	0,52	1014
trans oct-2-énol	1,42	1037
Linalol	24,00	1074
terpinèn-4-ol	4,24	1157
beta-terpinène	0,50	1195
Estragol	31,33	1225
eugénol	21,67	1325
Méthyleugénol	1,15	1362
trans alpha bergamotène	4,83	1428
alpha humulène	0,70	1454
germacrène D	0,81	1472
Bicyclogermacrène	0,84	1492
alpha murolène	0,49	1493
gamma cadinène	0,26	1495
gamma élémène	0,40	1501
Globulol	0,13	1520
Viridiflorol	1,76	1560
gamma eudesmol	0,80	1602
alpha cadinol	0,33	1621
Oxyde de manoyl	0,13	1630
méthyl linoléate	0,30	1642

Tableau II : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum*

Composés identifiés	Taux (%)	IK (Index de Kovat)
α -thujène	1,74	915
α -pinène	0,54	923
Camphène	0,07	943
β -pinène	0,25	962
Myrcène	2,69	972
α -phellandrène	0,25	996
delta-3-carène	0,16	998
α -terpinène	2,49	1001
Para-cymène	12,3	1012
Limonène	1,30	1013
1,8-cinéol	0,33	1014
(Z)-b-ocimène	0,17	1035
γ-terpinène	12,11	1051
Terpinolène	0,28	1078
para cyménène	1,88	1079
Linalol	0,61	1084
trans-p-2,8-menthadiène-1-ol	0,20	1086
terpinène-4-ol	2,02	1157
α -terpinéol	0,18	1197
Estragol	1,62	1225
Thymolmethylether	0,40	1265
Thymol	43,45	1267
Carvacrol	2,81	1274
beta caryophyllène	3,32	1418
trans alpha bergamotène	0,28	1428
alpha humulène	0,41	1454
germacrène D	0,17	1472
beta sélénène	2,83	1492
alpha sélénène	1,32	1502
gamma cadinène	0,22	1514

delta cadinène

0,33

1524

Tableau III: Résultat des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) des extraits d'*Ocimum basilicum*, d'*Ocimum gratissimum* et des antibiotiques conventionnels testés sur *Salmonella* Legon *Salmonella* Oakland

Huiles essentielles et antibiotiques conventionnels	CMI (mg/ml)		CMB (mg/ml)		CMB/CMI	
	S.	S.	S.	S.	S.	S.
	Legon	Oakland	Legon	Oakland	Legon	Oakland
<i>Ocimum basilicum</i>	36.10 ⁻³	18.10 ⁻³	144.10 ⁻³	72.10 ⁻³	4	4
<i>Ocimum gratissimum</i>	8.10 ⁻³	16.10 ⁻³	16.10 ⁻³	32.10 ⁻³	2	2
Gentamycine	16.10 ⁻³	16.10 ⁻³	16.10 ⁻³	32.10 ⁻³	1	2
Tétracycline	1.10 ⁻³	0,5.10 ⁻³	64.10 ⁻³	28.10 ⁻³	64	56
Chloramphénicol	8.10 ⁻³	8.10 ⁻³	128.10 ⁻³	128.10 ⁻³	16	16
Fluméquine	1.10 ⁻³	1.10 ⁻³	2.10 ⁻³	1.10 ⁻³	2	1
Thymol	3.10 ⁻³	1,5.10 ⁻³	nd	nd	-	-

nd = non déterminé

Troisième partie : Discussion générale et perspectives

3.1. Discussion générale

3.1.1 Contraintes sanitaires dans les élevages de pintade locale au Bénin

Les deux séries d'enquête menées ont permis de constater que le système d'élevage de la pintade au Bénin est un système extensif qui se perpétue depuis des décennies. Ce système est similaire à celui de la plupart des pays de l'Afrique au sud du Sahara (Bessin *et al.*, 1998; Maganga et Haule, 1998 ; Saina, 2005 ; Sanfo *et al.*, 2007; Moussa Mamadou *et al.*, 2010). Les taux de mortalité des pintadeaux dans les deux premiers mois de leur vie au cours de cette étude dépassent largement les 50 %, comme c'est le cas dans la plupart des élevages dans la sous-région de l'Afrique de l'Ouest.

L'élevage est intégré aux systèmes agro-pastoraux en tant qu'activité secondaire. En d'autres termes, certains éleveurs consacrent la majeure partie de leur temps à prendre soin des activités champêtres et accordent très peu d'attention au suivi des pintades. L'élevage est intimement lié à celui des autres espèces aviaires, la poule en particulier, qui joue le rôle de couveuse des œufs de pintade et de meneuse des pintadeaux jusqu'à l'âge de 2-3 mois au terme duquel ils peuvent se débrouiller seuls. Cet élevage est caractérisé par un habitat (poulailler), non spécifique à la pintade, mais destiné à toutes volailles de la basse cour sans distinction d'âge ni d'espèce. Ces poulaillers sont très peu aérés, mal entretenus, jamais nettoyés ou au plus, une fois l'an, alors qu'il s'y trouve les déjections animales sur lesquelles les pintadeaux passent la nuit, favorisant ainsi leur contamination. Cette pratique pose le problème de l'hygiène de l'habitat qui, de toute évidence contribue au développement des microbes et facilite ainsi, l'infection des oiseaux. Les eaux d'abreuvement dont disposent les pintades et l'alimentation non équilibrée servie à même le sol ; ne font que supporter cette hypothèse. Le surpeuplement des oiseaux (toutes espèces confondues) pourrait aussi être à l'origine d'un cannibalisme fatal pour les jeunes oiseaux. Les murs fissurés non crépis et le plancher non cimenté des poulaillers peuvent être facilement envahis par des ectoparasites, notamment les *Argas*. Or, *Argas* par exemple est un agent vecteur de la spirochétose (*Borrelia anserina*) qui pourrait intervenir dans la mortalité des pintadeaux. La présence d'*Argas* a été révélée dans les élevages de pintade en milieu rural au Bénin (Boko, 2004 ; Salifou *et al.* 2004), même si ce genre est apparu en faible proportion. En dehors d'*Argas*, il existe d'autres acariens (*Dermanyssus gallinae*, *Amblyomma variegatum*,...) et insectes (*Menopon gallinae*, *Goniodes gigas*...) qui pourraient contribuer à réduire la ration alimentaire quotidienne sous l'effet de l'irritation exercée sur les pintades (Salifou *et al.*, 2004 ; Salifou *et al.*, 2007 ; Horak et Williams, 1986 ; Okaeme, 1988). En outre, il a été démontré expérimentalement que *Dermanyssus gallinae*, ectoparasite hématophage, peut être vecteur de *Salmonella* Enteritidis par acquisition à travers son contact avec la cuticule de poules pondeuses ou lors de son repas sanguin. Cette observation suggère que cette espèce d'ectoparasite peut constituer un réservoir potentiel de *Salmonella* en milieu rural. Les fissures des murs des poulaillers constituent de plus une porte d'entrée à certains prédateurs en l'occurrence les musaraignes et les serpents qui tuent souvent les pintadeaux.

Il est donc clair qu'un habitat bien conçu et mieux entretenu permettrait de limiter ces pertes qui diminuent la productivité de la pintade.

Le fait que la ponte des pintades soit liée à la saison des pluies pose un problème supplémentaire pour l'élevage. En effet, l'éclosion des pintadeaux a lieu à la période la plus froide de l'année et le manque d'hygiène de l'habitat ainsi que l'absence de chauffage des pintadeaux par certains éleveurs contribue à leur fragilité et leur incapacité à résister efficacement aux intempéries et au microbisme ambiant généré par la circonstance. Les contacts fréquents entre les différents oiseaux de la basse-cour et la persistance de l'agent pathogène entraînent de nouvelles infections. L'évolution de la mortalité des pintadeaux a été révélée dans nos travaux (Boko *et al.*, 2011a). Le taux de mortalité constaté dans le département du Borgou est faible dans la période précédant le pic de la courbe de pluviométrie (Mars-Mai). Cette période correspond à la transition entre la fin de la saison sèche et le début de la saison des pluies. La situation apparaît la même entre la période de la fin de la saison des pluies et le début de la saison sèche. Ce qui suggère que les naissances aux pintadeaux sont plus importantes durant la période de Mars à Mai. Malgré les analyses bactériologiques (isolement de *Salmonella* et *E. coli*, en particulier) et parasitologiques (mise en évidence d'œuf de *Syngamus trachea* et d'*ascaris* sp, en particulier) et l'absence d'une analyse virologique, la mortalité des pintadeaux n'a cependant pu être attribuée de façon spécifique à un germe déterminé (Boko *et al.*, 2011a). Tout se passe comme si une synergie d'action existait entre bactérie-parasite et les facteurs environnementaux se soldant par des taux élevés de mortalités observés à travers les différentes communes du département. Cette hypothèse est corroborée par le fait que certains travaux réalisés dans un environnement amélioré par rapport à celui des éleveurs, dans lequel les pintadeaux ont bénéficié d'une prophylaxie, ont permis d'améliorer le taux de mortalité et la productivité. C'est le cas de Hien et collaborateurs (2002) qui a conduit au Burkina Faso une expérimentation en milieu contrôlé d'habitat, d'hygiène, d'alimentation et de température. Dans cette étude, deux lots de pintadeaux d'un jour ont été constitués. L'un des lots n'a reçu aucun traitement préventif alors que le second est vacciné contre la maladie de Newcastle et a reçu un traitement préventif anticoccidiose et antitrichomonose. Le taux de mortalité dans le groupe non vacciné a déjà été réduit de moitié et une différence supplémentaire du taux de ponte de l'ordre d'un tiers (1/3) du lot traité par rapport au lot non traité a été enregistrée. Cet essai révèle l'effet positif des mesures prophylactiques que les éleveurs pourraient obtenir dans les élevages de la pintade s'ils observaient les règles d'hygiène. Ces observations supportent notre conviction selon laquelle, en milieu traditionnel le non respect des règles d'hygiène par les éleveurs a un impact négatif sur la production de la pintade. En outre, des essais de déparasitage des pintades élevées en milieu rural au Vermifuge Polyvalent Volaille (Niclosamide 160 mg, chlorhydrate de levamisole 40mg, vitamine A, 40 UI) et au LEVALAP (chlorhydrate de levamisole 20%) depuis le jeune âge jusqu'au stade adulte améliorent sensiblement leur productivité (Dahouda *et al.*, 2008 ; Hien *et al.*, 2009).

Le poids des œufs de la pintade à la ponte est aussi un paramètre essentiel pour la survie et la croissance normale des pintadeaux ; ce que révèle une étude conduite par Sanfo et Collaborateurs (2007) au Burkina Faso. Des œufs d'un poids moyen de 25-30g et de 45-50g ont permis d'obtenir des pintadeaux d'un jour pesant respectivement en moyenne $19,6 \pm 1,6$ g et $30,6 \pm 1,3$ g. A deux mois d'âge ils pesaient respectivement $47,5 \pm 15,2$ g et $271,8 \pm 30,2$ g avec un taux de mortalité respectif de 46,4 % et de 5,7 %. Cet essai révèle par conséquent l'importance du tri des œufs avant qu'ils ne soient incubés. Ce réflexe n'est pas connu de tous les éleveurs. Ce qui explique en partie des mortalités embryonnaires enregistrées dans certains élevages.

Au total la technicité de l'élevage de la pintade n'est pas encore bien maîtrisée les éleveurs et l'origine multifactorielle des mortalités a été montrée. Même si l'application de déparasitant permet de soulager les pintades, il faut toutefois noter la persistance de la mortalité, ce qui amène à évaluer aussi la part des autres facteurs biologiques ci-dessus identifiés (Boko *et al.*, 2011a), en particulier les salmonelles qui est le sujet principal de ce doctorat.

3.1.2. Identification et rôle des salmonelles

La recherche effectuée sur l'isolement de *Salmonella* aussi bien à partir des pintadeaux morts que dans l'environnement de ces derniers a permis de constater une diversité de sérotypes, salmonelles confirmées dans l'ensemble des six communes concernées par l'étude. On note au cours de cette étude, l'absence d'isolement de *Salmonella* Gallinarum/Pullorum, qui est spécifique à la volaille. Mais un séro-diagnostic réalisée par Chrysostome (1993) il y a deux décennies avait révélé une séroprévalence de 22 % pour *Salmonella* Pullorum, ce qui témoigne de la présence de ce sérotype chez la pintade locale. Son absence dans cette étude suggère cependant que ce sérotype existerait en faible proportion dans les élevages et notre échantillonnage réalisé n'a pas permis d'en isoler. Par contre, les sérotypes isolés dans le cadre de cette étude sont tous des sérotypes exotiques parmi lesquels cinq (Farakan, Kingston, Legon, Oakland, Sangalkam) sont apparus plus fréquemment. L'isolement de ces sérotypes à la fois chez les pintadeaux et à partir des échantillons prélevés dans leur environnement (poules couveuses, pintades adultes) suggère que ces animaux constituent les sources potentielles de contamination les plus proches des pintadeaux. Un autre aspect qui ne doit pas être perdu de vue est la possible contamination croisée avec les autres animaux domestiques, par exemple les porcs des éleveurs de la même localité, ou avec la faune sauvage puisque les pintadeaux, lors de la divagation peuvent entrer en contact avec leurs matières fécales qui peuvent être aussi sources de contamination. Le technicien qui supervise les élevages dans une commune pourrait aussi éventuellement transporter les salmonelles lors de son passage d'un élevage à un autre. Cependant, il observe des mesures d'hygiène (désinfection des mains et des chaussures...) pour minimiser la contamination. Le fait qu'on ait obtenu plusieurs sérotypes par commune permet aussi de suggérer que le technicien n'était pas le principal voire pas du tout vecteur de contamination des pintadeaux. De plus, même si nous n'avons

pas analysé des matières fécales des porcs, les quelques échantillons humains examinés étaient négatifs pour ces sérotypes comme ceux des souris.

Les profils génétiques de ces cinq sérotypes après électrophorèse en champ pulsé permettent de dire qu'ils sont clonaux, à l'exception du sérotype Oakland qui présente deux profils différents quoique proches et différents. Cependant, lorsqu'on compare les biotypes des 27 souches du sérotype Oakland, une seule légère différence est observée au niveau de la fermentation de deux sucres (sorbitol et mélibiose) pour une seule souche.

La présence des îlots de pathogénicité révélée par l'étude 2 est un argument qui autorise à dire que ces sérotypes peuvent coloniser des organes internes et par conséquent, en association avec les parasites (*Ascaris-Syngamus*), toutes bactéries (*E.coli-Salmonella*) révélés par les analyses (Boko *et al.*, 2011a), être à l'origine des signes cliniques observés sur les pintadeaux dans les élevages.

Une étude a été réalisée par Eigaard et Collaborateurs (2006) afin de mesurer l'impact de l'interaction entre *Salmonella* Enteritidis et *Ascaridia gali* sur des poulets de deux mois et demi environ. Le nombre de poulets excréant *Salmonella* Enteritidis était significativement plus élevé ($p < 0,001$) dans le groupe des infectés à la fois par *Salmonella* Enteritidis et *Ascaridia gali*, comparé au groupe qui a été uniquement infecté par *Salmonella* Enteritidis. Tout s'est passé comme si la présence des œufs d'ascaris potentialise la colonisation des poulets par *Salmonella* Enteritidis. Cette expérience reflète la situation avec les pintadeaux malades chez les éleveurs de nos études, car les infestations des pintadeaux par, non seulement les œufs de ce parasite mais également ceux de *Syngamus*, *Capillaria* pourraient montrer des effets néfastes similaires non négligeables sur les animaux.

En outre, une preuve du rôle pathogène réel de ces sérotypes exotiques a été établie à travers l'inoculation des suspensions des cinq sérotypes, réalisée par voie orale sur des sujets de deux semaines d'âge (Boko *et al.*, 2011b). Bien que le score de morbidité varie d'un sérotype à un autre, cet essai a permis de constater que tous les sérotypes testés sont capables de produire une infection sur de jeunes sujets d'un mois d'âge. Quinze jours après inoculation, des souches de salmonelles ont été isolées sur dans les fèces des sujets inoculés à l'exception de ceux qui ont reçu la souche du sérotype Teshie. Ce fait suggérerait que les sérotypes Farakan, Kingston, Legon, Oakland développent un meilleur processus d'attachement aux cellules épithéliales de l'intestin des sujets infectés menant à une colonisation à plus long terme que le sérotype Teshie. Les sérotypes Farakan, Kingston, Legon apparaissent donc mieux adaptés à l'hôte que Teshie. La persistance de l'excrétion de ces souches pose aussi le problème de leur dispersion dans l'environnement, qui pourrait se produire par les éleveurs dans les conditions existantes d'élevage par les éleveurs.

D'un autre côté, la volaille et ses sous-produits sont habituellement incriminés dans les foyers de salmonellose humaine. *Salmonella* contamine souvent les carcasses à partir du tractus digestif, des matières fécales sur les plumes ou les pattes. Le déplumage, l'éviscération, et les opérations effectuées sur les abats sont des principaux points de dissémination de germes (Bryan et Doyle, 1995 ; Uyttendaele *et al.*, 1998). Ceci suggère quelques inquiétudes sur le plan de la santé publique, dans la

mesure où il existe des possibilités de contamination croisées dues aux manipulations effectuées lors du processus d'abattage.

En effet, la consommation de la viande de pintade a pris de l'ampleur dans la décennie précédente. La technique d'abattage et les manipulations des abats souffrent malheureusement d'un manque de respect strict des règles d'hygiène. Dans certains villages, des viscères sont abandonnés aux alentours des maisons et récupérés par des chiens errants qui les consomment ou les trainent sur une distance de quelques mètres, contribuant aussi à la pollution de l'environnement par les pathogènes éventuellement hébergés par ces intestins. D'un autre côté, des manipulations malsaines de la viande de pintade liées à une hygiène personnelle déficiente, suivies d'une mauvaise cuisson et la consommation de celle-ci peuvent être à l'origine d'une intoxication humaine par les sérotypes de salmonelles identifiés lors de cette étude. La pratique de « barbecue » qui rentre progressivement dans les habitudes alimentaires des populations tant des villes que des villages en est un exemple.

Par ailleurs, les sérotypes Farakan, Legon, Oakland et Sangalkam mis en évidence dans les fèces des pintades adultes dans les élevages pourrait représenter un risque potentiel d'infection humaine et de toxi-infections alimentaires, familiales ou collectives, à la suite de la consommation de viande, d'œufs et d'ovoproduits. *Salmonella* Farakan en effet a été isolé des humains à Bobo-Dioulasso, au Burkina Faso (Le Minor *et al.*, 1975). Dans les rapports hebdomadaires de l'Agence pour la Protection de la Santé et ceux des Centres pour le contrôle et la Prévention des maladies, des isoléments des sérotypes Kingston, Legon, Oakland et Sangalkam ont été enregistrés, même si c'est en faible proportion (0,01 %), et ils tendent à devenir récurrents (HPA-CDR, 2004, 2006 ; CDC, 2005). Dans le cadre de cette étude, nous n'avons pas trouvé de souche du sérotype Farakan à de procéder à une comparaison par rapport à nos souches lors du pulsotypage. Par contre, des souches des sérotypes Kingston, Legon et Oakland isolées des humains, disponibles dans la base de donnée du Centre de référence Salmonella-Shigella à Bruxelles ont été utilisées à cet effet. Ainsi, il a été remarqué que le profil des sérotypes Kingston et Legon est différent du profil de ces même sérotypes isolés dans le cadre de notre étude, mais celui du sérotype Oakland est identique au profil P1 de nos souches de sérotype Oakland. La fréquence d'isolement des autres sérotypes varie d'un continent à un autre, d'un pays à un autre et d'une année à une autre.

A l'heure actuelle cependant, aucun cas d'isolement humain des plus fréquents sérotypes isolés au cours de cette étude n'a encore été rapporté à notre connaissance au Bénin, mais compte tenu des facteurs de risque existants, des efforts de prévention doivent continuellement être rappelés et appliqués tant dans la cuisine familiale que dans le domaine de la restauration collective.

3.1.3. Traitement des infections bactériennes

Au Bénin, comme dans la plupart des pays de l'Afrique subsaharienne, l'élevage traditionnel du poulet et de la pintade se fait en total promiscuité et les animaux laissés en liberté dans les concessions

familiales se nourrissent de sous produits agricoles, des restes de cuisine, et d'insectes. L'absence de moyen financier limite le recours à la médecine vétérinaire moderne: coûts élevés des produits vétérinaires, conditionnement des médicaments pour des effectifs importants, inaccessibilité des produits, etc.

Pour faire face aux maladies, les éleveurs ont donc recours à leur savoir-faire traditionnel dont les pratiques sont basées sur l'utilisation des plantes médicinales. C'est ainsi que certaines plantes dont *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum* sont utilisées dans les traitements des pathologies infectieuses bactériennes gastro-intestinales dans les élevages de la pintade au Bénin. Les tests d'activités antibactériennes qui ont été réalisés sur les deux extraits de plantes utilisés ont montré que ces remèdes possédaient des propriétés antibiotiques et pourraient être utilisées dans les traitements des maladies causées par les deux sérotypes testés. Ceci ouvre ainsi des perspectives d'utilisation à des fins thérapeutiques. Ces extraits pourront être testés dans le model *in vivo* développé durant l'étude 2, bien que s'agisse d'un objectif à relativement long terme.

3.2. Conclusion générale et perspectives

Cette étude a permis de mettre en évidence les principales contraintes sanitaires et techniques dans l'élevage de la pintade locale dans le système d'élevage en liberté totale dans le département du Borgou au Bénin. Plusieurs facteurs (parasites, bactéries, le climat) sont à l'origine de ces mortalités. Malheureusement, la recherche des virus n'a pu être réalisée, faute de moyen. Sur la base des résultats des analyses de laboratoire réalisées, il est apparu que la salmonellose seule, n'est pas la cause majeure des mortalités des pintadeaux dans le département du Borgou au Bénin.

En dehors de *Salmonella* Gallinarum/Pullorum, hôte spécifique de la volaille, il existe d'autres sérotypes exotiques capables de provoquer une infection subclinique ou chronique des pintadeaux dans les élevages.

Pour espérer le succès économique dans cet élevage, les éleveurs doivent accorder une attention particulière aux paramètres tels que l'hygiène de l'habitat et son chauffage, l'hygiène de l'alimentation /abreuvement, le déparasitage raisonné des pintades (tableau 1), et solliciter l'intervention des laboratoires de diagnostic vétérinaire avant l'utilisation des antibiotiques. Aussi, du fait que l'itinéraire technique de l'élevage de la pintade n'est pas encore totalement bien maîtrisé, l'intervention des institutions étatiques est nécessaire pour donner des formations aux éleveurs dans le domaine de l'hygiène de l'habitat, de l'alimentation/abreuvement dans l'élevage de volaille et mettre à la disposition des éleveurs, un nombre suffisant d'agents d'encadrement pour couvrir les zones éloignées des services vétérinaires.

Eu égard à tout ce qui précède, nos futures recherches prendront en compte :

- la recherche des facteurs de virulence du germe *E. coli* avec un échantillonnage plus important pour mieux clarifier la part des coliformes dans les mortalités ;
- un modèle expérimental *in vivo* sur des pintadeaux d'un jour avec infection mixte *Salmonella* spp-*E. coli* pour mesurer l'impact de cette co-infection sur la production ;
- une étude virologique après autopsie des sujets morts dans les élevages ;
- l'isolement du virus de la maladie de Newcastle à partir des pintadeaux morts ;
- La réflexion sur la mise au point d'un auto-vaccin à partir des sérotypes les plus fréquents de salmonelles les plus fréquents.

Au regard des performances révélées par l'évaluation *in vitro* des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* et d'*Ocimum gratissimum*, d'autres axes de recherche peuvent prendre en compte la réalisation des tests *in vivo* et plus tard des essais sur l'isolement des principes actifs dans ces huiles dans la perspective de la mise au point d'une thérapeutique alternative adaptée au milieu réel grâce à un modèle d'infection expérimental développé au cours de nos travaux.

Tableau 1 : Quelques contraintes à lever et la conduite à tenir dans les élevages de pintade.

		Contraintes à lever	Conduite à tenir
Hygiène de l'environnement	• Poulailier • Conduite de l'élevage	- Absence de poussinières - Présence de poussinières non adaptées (absence de barrière sanitaire, absence de parcours, mauvaise aération) - Absence de nettoyage et désinfection - Absence de litière - Sol et mur fissurés - Sol et mur humides durant la saison des pluies - Absence de chauffage - Eclosion ayant lieu en saison des pluies - Démarrage et croissance - Bande multi-âge et multi-espèces - Utilisation des poules adultes comme éleveuses - Absence de chauffage (surtout la nuit)	- Présence de poussinières (faciles d'accès) avec parcours protégé par un grillage - Nettoyage une fois par mois (mur et sol faciles à nettoyer avec un désinfectant adapté) - Installation de paille comme litière. - Installation de caillebotis pour surélever - Encourager les éclosions entre octobre et mai - Séparation des pintadeaux de leur mère éleveuse. Densité souhaitée 12 à 15 pintadeaux /m² dans les trois premières semaines. - Chauffage des pintadeaux à l'aide des lampes tempêtes ou meilleure isolation de la poussinière à l'aide des pailles
Microclimat		- Froid et humidité pendant saison des pluies	- Climat sec et chaud en saison sèche
Prophylaxie		- Prophylaxie médicale inexistante ou insuffisante (vaccination, déparasitage, vitamines)	- Vaccination contre la maladie de Newcastle: vaccin souche Hitchner B1 (5 ^{ème} jour), souche Sota (25 ^{ème} jour), vaccin ITA NEW (0.50ml/tête à 3mois d'âge)

		- Méthode thérapeutique incomplète - Coûts élevés et non disponibilité des médicaments	- Traitement à l'aide du vermifuge adapté aux conditions internes spécifiques après des analyses parasitaires régulières, vitamines - Usage de la pharmacopée traditionnelle
Alimentation et abreuvement		- Aliment incomplet (maïs, sorgho, protéine animale) - Abreuvement insuffisant et eau non potable - Abreuvoirs sales et plus haut que le niveau de la hauteur de la tête des pintadeaux par moment	- Utilisation d'aliment poussin rationné à partir des feuilles de moringa oléifera, manioc.... - Abreuver les pintadeaux à l'aide de l'eau potable à volonté et à renouveler tous les jours. - Disposer les abreuvoirs autour de l'appareil de chauffage.
Œufs et couvaion		- Œufs mal conservés - Œufs souillés par les matières fécales et non nettoyés avant la mise en couvaion	- Utilisation des œufs récemment pondus (œuf de moins d'une semaine) - Conservation d'œufs dans un endroit frais et sec. - ôter les matières fécales de la coquille des œufs si celles-ci y sont collées avant de les incuber
Profil des éleveurs			
Formation		- Peu ou pas formés	Formation nécessaire
Disponibilité		- peu ou pas en saison des pluies	Disponible en saison sèche

Références générales

- BESSIN R., BELEM A.M.G., BOUESSINI H., COMPAORE Z., KABORET Y. Enquête sur les causes des mortalités des pintadeaux au Burkina Faso. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 1998, **51**, 87- 93.
- BOKO K.C. Contribution à l'amélioration de l'élevage villageois de la pintade locale dans le Département du Borgou, Nord-Est du Bénin (Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Spécialisés en Gestion des Ressources Animales et végétales en Milieux Tropicaux). Université de Liège : Liège, 2004, 40 p.
- BOKO C.K., KPODEKON M.T., FAROUGOU S., DAHOUDA M., YOUSAO A.K.I., APLOGAN G.L., ZANOU J., MAINIL J.G. Farmer perceptions and pathological constraints in helmeted guinea fowl farming in the Borgou Department in North-East Benin. *Afr. J. Agric. Res.*, 2011a, **6**, 2348-2357.
- BOKO K. C., KPODEKON T. M., FAROUGOU S., YOUSAO A. K. I., MAINIL J. G. *In vivo* assessment of the virulence of five *Salmonella enterica* serotypes isolated from helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*) in Benin. *Int. Res. J. Microbiol.*, 2011b, **2**, 356-364.
- BRYAN F.L., DOYLE M.P.: Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. *J. Food Prot.*, 1995, **58**, 326-344.
- CENTERS DISEASE CONTROL PREVENTION (CDC). (2005). *Salmonella* Annual Summary. [en ligne] Adresse URL : http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2005/SalmonellaTable3_2005.pdf. (consulté le 14 Novembre 2011).
- CHRYSTOSTOME C. Problem and possibility in rural guinea fowl breeding. Rural poultry production in Africa. In: International workshop, Rabat (Morocco), 7-11 May 1993, 1993, 57-65.
- CHRYSTOSTOME C, ALLARD P, DEMEY F, BELL JG, WERTHNER JP. Enquêtes sérologiques et parasitaires sur la pintade en élevage villageois au Bénin. Deuxièmes journées de la Recherche Avicole, Tours, 8-10 avril 1997, 1997, 73-76.
- DAHOUDA M., SENOU M., TOLEBA S. S., BOKO C. K., ADANDEDJAN J. C., HORNICK J. L. Comparaison des caractéristiques de production de la pintade locale (*Meleagris numida*) en station et dans le milieu villageois en zone soudanoguinéenne du Bénin. *Livest. Res. Rural Dev.*, 2008, **20**, 12.
- DHO-MOULIN M., FAIRBROTHER J.M. Avian Pathogenic Escherichia Coli (APEC). *Vet. Res.*, 1999, **30**, 299-316
- EIGAARD N. M., SCHOU T.W., PERMIN A., CHRISTENSEN J. P. EKSTROMC.T., AMBROSINI F., CIANCI D., BISGAARD M. Infection and excretion of *Salmonella* Enteritidis in two different chicken lines with concurrent *Ascaridia galli* infection. *Avian Pathol.*, 2006, **35**, 487-493.

- EUZEBY J.P. Les salmonelles et les salmonelloses aviaires dues aux sérovars ubiquistes. *Revue Méd. vét.*, 1997, **148**, 1, 61-76.
- Health Protection Agency-Communicable Disease Report (HPA-CDR) (2004, 2006). [en ligne] Adresse URL: <http://www.hpa.org.uk/cdr.Weekly-Enteric Infection Reports- Volume 16 No 10.htm> (consulté, le 16/04/08).
- HIEN O.C., BOLY H., BRILLARD J.P., DIARRA B., SAWADO L. Effets des mesures prophylactiques sur la productivité de la pintade locale (*Numida meleagris*) en zone subhumide du Burkina Faso. *Tropicultura*, 2002, **20**, 23-28.
- HIEN O.C., OUEDRAOGO C.L., DIARRA B. TRAORE B. Effets du parasitisme interne sur la productivité des pintades locales au Burkina Faso. *Tropicultura*, 2009, **27**, 3, 184-190.
- HORAK I.G., WILLIAMS E.J. Parasites of domestic and wild animals in south Africa. XVIII. The crowned guinea fowl (*Numida meleagris*), an important host of immature ixodid Ticks. Onderstepoort *J. vet. Res.*, 1986, **53**, 119-122.
- KARRAOUAN B., FASSOUANE A., EL OSSMANI H., COHEN N., CHARAFEDDINE O., BOUCHRIF B. Prévalence et gènes de virulence des *Salmonella* isolées des viandes hachées crues de dinde à Casablanca (Maroc) *Revue Méd. Vét.*, 2010, **161**, 127-132
- KASONIA K., ANSAY M. Métissage en santé animale de Madagascar à Haïti. Presses Universitaires de Namur/CTA/ACCT : Namur, Belgique, 1994, 396p.
- LE MINOR L.S., LE COUEFFIC E., LE PRIOL A., LEFEVRE M., DUCILASSIN M., CHIPPAUX C. BOCHE R., MERED B., SALIOU P., ET DARRIGOL J. Quinze nouveaux sérotypes de salmonella du sous-genre I isolées en Afrique. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 1975, 547-555.
- MBARUBUKEYE S. La recherche sur la médecine vétérinaire traditionnelle au Rwanda. In : Kasonia K., Ansay M. Métissage en santé animale de Madagascar à Haïti. Presses Universitaires de Namur/CTA/ACCT : Namur, Belgique, 1994, 253-266.
- MAEP (MINISTERE DE L'AGRICULTURE, DE L'ELEVAGE ET DE LA PECHE). Etude de la sous filière « aviculture moderne » au Bénin. Rapport final. Direction de la Programmation et de la Prospective : Cotonou, 2005, 86p.
- MAGANGA S.L.S, HAULE K.S. Domestication of guinea fowl : a case of Morogoro Municipal, Tanzanie. *Int. J. Nat. Conserv. Afr.*, 1998, **14**, 14-28.
- MOUSSA AMADOU B., IDI A. BENABDELJELIL K. Aviculture familiale rurale au Niger: alimentation et performances Zootechniques. *Fam. Poult. commun.*, 2010, **19**, 1-10.
- MOLBAK K., NEIMAN J. Risk factors for sporadic infection with *Salmonella* Enteritidis, Denmark, 1997-1999. *Am. J. Epidemiol.*, 2002, **156**, 654-661.
- MOLLA B., MESFIN A. A survey of *Salmonella* contamination in chicken carcass and giblets in Central Ethiopia. *Revue Méd. Vét.*, 2003, **154**, 267-270.

- OAKEME A.N. Ectoparasites of guinea fowl (*Numida meleagris galeata* Pallas) and local domestic chicken (*Gallus gallus*) in southern guinea savanna, Nigeria. *Vet. Res. Commun.*, 1988, **12**, 277-280.
- SAINA. H. Guinea fowl (*Numida meleagris*) production under smallholder farmer management in Guruve district, Zimbabwe (M.Phil. Thesis). University of Zimbabwe: Zimbabwe, 2005, 99p.
- SANFO R., BOLY H.H., SAWADOGO L., OGLE B. Poids de l'œuf de la pintade locale (*Numida meleagris*) dans la région centrale du Burkina Faso: rapports avec les variables de l'incubation artificielle et la production des pintadeaux. *Tropicultura*, 2007, **25**, 184-188.
- SALIFOU S., DOKO. S.Y., SALIFOU A.N., PANGUI L.J. Acariens et insectes parasites de la pintade domestique (*Numida meleagris galeata*) dans les régions de l'Alibori et du Borgou (Nord-Est du Bénin). *Rev. Afric. Sant. Prod. Anim.*, 2004, **2**, 43-46.
- SALIFOU S., LAFIA K.B., EMMANUEL-ALI N., OFFOUMON T., PANGUI L.J. Acariens et insectes parasites des oiseaux de la basse-cour dans le Nord-Ouest du Bénin et effet insecticide des huiles essentielles *Lantana camara* (Lamiolae, Verbanaceae). *Rev. Afric. Sant. Prod. Anim.*, 2007, **5**, 53-59.
- UYTTENDAELE M.R., DEBEVERE J.M., LIPS R.M., NEYTS K.D. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcass and their products in Belgium. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, **40**, 1-8.

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2011/0480/35

ISBN 978-2-87543-003-8

ISBN 978-2-87543-003-8



9 782875 430038