

Bilan des activités 2012 du Centre Collaborateur de l'OMS de Référence et de Recherche pour les *Salmonella*

A) Localisation du Centre

Le Centre Collaborateur de l'OMS de Référence et de Recherche pour les *Salmonella* (CCOMS) est localisé à l'Institut Pasteur dans l'Unité des Bactéries Pathogènes Entériques dirigé par le Dr. François-Xavier Weill. Les responsables du CCOMS sont également responsables du Centre National Français de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*.

B) Composition du centre

Responsable : Dr. François-Xavier Weill, MD, PhD, HDR

Responsable adjoint : Dr. Simon Le Hello, PhcyD, MSc

Collaboratrice principale : Mme Sylvie Issenhuth-Jeanjean, technicienne supérieure

C) Activités de référence en 2012

- ◆ Expertise de 130 souches de *Salmonella* provenant de 12 laboratoires nationaux de référence (France, Allemagne, Belgique, Irlande, Suède, Danemark, Finlande, Etats-Unis d'Amérique, Canada, Luxembourg, Pays-Bas, Pologne)
- ◆ Identification de 9 nouveaux sérotypes et de 6 nouveaux variants de sérotypes connus. La confirmation se fait en collaboration avec deux autres laboratoires (National *Salmonella* Reference Laboratory, CDC, Atlanta, USA, Dr. Patricia Fields et Abteilung Mikrobiologischer Verbraucherschutz, Hygiene Institut Hamburg, Germany, Prof. Peter Roggentin)
- ◆ Expédition de 18 souches pour la production ou le contrôle d'antisérums pour le sérotypage vers le Canada, l'Irlande et la Pologne.

D) Activités de soutien au programme GFN de l'OMS

D)-1 Participation à l'organisation et ou à l'enseignement

Participation à des ateliers en 2011 et en 2013 mais pas en 2012.

D)-2 Participation au contrôle de qualité externe pour le sérotypage (EQAS)

Le CCOMS contrôle les souches de l'EQAS.

Le CCOMS sert de "jump station" pour l'envoi des colis vers l'Afrique francophone: en 2012, 141 souches expédiées vers 8 laboratoires de 8 pays.

E) Activités de recherche

E)-1 Multi Locus Sequence Typing

Le CCOMS continue son inventaire de la biodiversité des *Salmonella* par la technique moléculaire de multilocus sequence typing (MLST). Il s'agit de déterminer après amplification génomique, la séquence de 7 gènes conservés (dits « de ménage »). Cette méthode pouvant être une alternative future au sérotypage permet également de comprendre les relations phylogénétiques entre sérotypes. Les données issues du MLST sont basées sur des séquences et sont donc facilement échangeables entre laboratoires ayant accès à cette technologie de plus en plus utilisée. Cette méthodologie est également utilisée lors de résultats de sérotypage difficilement analysables ou non-discriminants (souches rough, immobiles ou monophasiques).

A l'heure actuelle, 2084 souches (appartenant aux sous-espèces *enterica* [n=1560], *salamae* [n=209], *arizonae* [n=46], *diarizonae* [n=162], *houtenae* [n=63] et *indica* [n=13] de l'espèce *enterica* et à l'espèce bongori [n=31]) appartenant à 633 sérotypes ont été analysées par MLST. Les résultats ont été transférés sur le site MLST *Salmonella* de l'Environmental Research Institute de Cork (groupe de Mark Achtman). L'ensemble des sérotypes de *Salmonella* sera analysé au cours des prochaines années. Un premier travail sur 4257 souches appartenant à 554 sérotypes a été publié en 2012 (Achtman et al. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. Plos Pathogens 2012)

E)-2 Séquençage des gènes codant les flagellines

Le sérotypage classique étant basé sur l'analyse antigénique des facteurs somatiques O et des facteurs flagellaires H, le CCOMS continue une analyse extensive des séquences des gènes (*fliC* et *fljB*) codant pour les antigènes H. A l'heure actuelle, 963 souches ont été analysées simultanément pour leur contenu allélique des gènes *fliC* et *fljB* et pour leur type MLST.

E)-3 Mise au point d'une technique de typage/sous-typage des *Salmonella* en une seule étape par analyse des polymorphismes des loci CRISPR

Nous avons identifié des séquences nucléotidiques courtes (taille moyenne de 32 nucléotides), nommées spacers, au sein des 2 régions CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) du génome de *Salmonella* et qui sont corrélées avec le sérotype de la souche. Quand plusieurs souches d'un même sérotype étaient étudiées, la composition en spacers pouvait varier entre les souches (perte de certains spacers, acquisition de nouveaux) et cette variabilité au sein d'un même sérotype était concordante avec les méthodes traditionnelles de sous-typage (électrophorèse en champ pulsé, lysotypie).

Jusqu'à ce jour, nous avons inventorié l'ensemble de ces spacers chez 1200 souches de plus de 300 sérotypes de *Salmonella* (dont les plus fréquents chez l'homme et dans l'industrie agroalimentaire). Plus de 7000 spacers différents ont été décrits. Un site web contenant la base de données a été créé en 2008 (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/crispr/CRISPRDB.html>). Un premier travail d'inventaire des loci CRISPR sur 783 souches appartenant à 130 sérotypes et d'analyse CRISPOL de 2200 souches de *Typhimurium* a été publié en 2012 (Fabre et al. CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections. Plos One 2012).

Nous sommes en cours de développement d'un test de typage/sous-typage pour toutes les salmonelles en moins de 48 heures basé sur le polymorphisme des régions CRISPR par une méthode de séquençage à haut-débit à l'aide d'appareils de paillasse.

En attendant, une première application sous forme d'un sous-typage à haut débit du sérotype *Typhimurium* (et de son variant monophasique) a été développée en utilisant la technique xMAP de Luminex. Cette méthode appelée CRISPOL permet de sous-typer 96 souches en une journée et avec une très grande facilité d'échange de résultats. A l'heure actuelle, plus de 700 types CRISPOL ont été définis après typage de plus de 10000

souches d'une collection mondiale (collaboration avec le Prof. Mark Achtman, Université de Cork et Université de Warwick).

E)-4 Participation à une étude de séquençage de génomes représentatifs des différentes populations de *S. enterica* sérotype Paratyphi A

Cette étude collaborative (Sanger Institute, Cork University, Institut Pasteur) a pour objectif de séquencer entièrement plus de 100 génomes de *S. enterica* sérotype Paratyphi A puis de définir un groupe de Single Nucleotide Polymorphisms permettant de réaliser une étude de génétique des populations sur une collection plus large de cette bactérie.

E)-5 Participation à une étude de séquençage de génomes représentatifs des différentes sous-espèces de *Salmonella*

Cette étude collaborative (Sanger Institute, Institut Pasteur) a pour objectif de séquencer entièrement 50 génomes de *Salmonella* appartenant à toutes les sous-espèces non-*enterica* puis de définir ces sous-espèces sur le plan génomique.

E)-6 Etude des mécanismes émergents de résistance aux antibiotiques

De nombreuses études d'analyse des populations bactériennes et de leurs mécanismes de résistance aux antibiotiques sont menées au CCOMS. Notre attention se porte principalement sur les *Salmonella* résistantes aux traitements de première intention (céphalosporines de 3^{ème} génération, carbapénèmes et quinolones).

E)-7 Principales publications scientifiques des responsables du CCOMS en 2012 sur les *Salmonella*

1. L Fabre, J Zhang, G Guigon, **S Le Hello**, V Guibert, M Accou-Demartin, S de Romans, C Lim, C Roux, L Diancourt, **S Issenhuth-Jeanjean**, M Achtman, S Brisse, C Sola, **FX Weill**. CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections. **PLoS ONE**. 2012. 7(5): e36995
2. M Achtman*, J Wain*, **FX Weill***, S Nair*, Z Zhou, V Sangal, MG Krauland, JL Hale, H Harbottle, A Uesbeck, G Dougan, LH Harrison, S Brisse, and the *S. enterica* MLST study group. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. **PLoS Pathogens**. 2012 8(6): e1002776 (*premiers auteurs).
3. **S Le Hello**, A Brisabois, M Accou-Demartin, A Josse, M Marault, S Francart, N Jourdan-Da Silva, **FX Weill**. Food-borne infections caused by a non-motile variant of *Salmonella* Typhimurium. **Emerging Infectious Diseases**. 2012 ; 18 : 132-134.
4. RS Hendriksen, **S Le Hello**, V Bortolaia, C Pulsrikarn, EM Nielsen, S Pornruangwong, P Chaichana, CA Svendsen, **FX Weill**, FM Aarestrup. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Stanley isolates ; a serovar endemic to Asia and associated with travel. **Journal of Clinical Microbiology**. 2012 ; 50 : 709-720.
5. **S Le Hello**, **FX Weill**, V Guibert, K Praud, A Cloeckert, B Doublet. Early multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky ST198 from Southeast Asia harbor *Salmonella* Genomic Island 1-J variants with a novel insertion sequence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2012 ; 56 :5096-6102.

6. J Haase, D Brown, **FX Weill**, H Mather, G Foster, S Brisse, J Wain, M Achtman. Population genetic structure of 4,12:a:- *Salmonella* from harbour porpoises. **Applied and Environmental Microbiology**. 2012 ; 78 : 8829–8833.
7. Z Boumart, SM Roche, F Lalande, I Virlogeux-Payant, C Hennequet-Antier, P Menanteau, I Gabriel, **FX Weill**, P Velge, M Chemaly. Heterogeneity of persistence of *Salmonella enterica* serotype Senftenberg strains could explain the emergence of this serotype in poultry flocks. **PLoS ONE**. 2012 ; 7(4): e35782.
8. ME Raguenaud, **S Le Hello**, S Salah, **FX Weill**, A Brisabois, G Delmas, P Germonneau. Epidemiological and microbiological investigation of a large outbreak of monophasic *Salmonella* Typhimurium 4,5,12:i:- in schools associated with imported beef in Poitiers, France, October 2010 **Eurosurveillance**. 2012. 17(40):pii=20289.
9. R Kermas, A Touati, L Brasme, E Le Magrex Debar, S Mehrane, **FX Weill**, C De Champs. Characterization of extended spectrum β -lactamases in isolates of *Salmonella enterica* Brunei and Heidelberg resistant to broad-spectrum cephalosporins at the Hussein Dey hospital in Algiers (Algeria). **Foodborne Pathogens and Disease**. 2012 ; 9 :803-808.