

## INTERET ET LIMITES DES TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES *SALMONELLA*\*

Anne Brisabois<sup>1</sup>

**RESUME :** L'importance des infections salmonelliques, associées aux conséquences économiques et en santé publique, a entraîné le développement de nombreuses méthodes phénotypiques, puis, plus récemment, moléculaires pour la caractérisation des *Salmonelles*. Cette caractérisation s'appuie en premier lieu sur la détermination du sérotype, méthode très couramment employée, permettant de suivre les tendances évolutives des sérotypes dans différentes filières en vue de l'épidémiosurveillance des *Salmonelles*. Les méthodes moléculaires sont des outils complémentaires d'investigation permettant de différencier des souches de même sérotype. Ces techniques, en général plus longues et fastidieuses à mettre en œuvre, sont plutôt réservées aux enquêtes épidémiologiques dans un écosystème donné ou lors d'investigations suite à une toxi-infection alimentaire ou à une épidémie de salmonellose. A côté du sérotypage universellement reconnu, le choix des méthodes moléculaires doit tenir compte du pouvoir discriminant pour un sérotype donné.

**SUMMARY :** The importance of the salmonellosis infections, associated to the economic and public health consequences implicated the development of numerous typing methods. These were phenotypic in first, then more recently molecular for the characterization of *Salmonella* isolates. This characterization is mainly based on the determination of the serotype, very usually used, allowing to follow trends of evolution of serotypes in various sectors with the aim of *Salmonella* monitoring. The molecular methods are additional tools of investigation allowing to differentiate strains belonging to the same serotype. These techniques, generally longer and laborious, are rather reserved for the epidemiological investigation inquiries in a given ecosystem or during food borne disease or *Salmonella* outbreak. Next to the serotyping universally recognized, the choice of the molecular methods should take into account the power of discrimination in a given serotype.



### I - INTRODUCTION

Les *Salmonella* sont responsables de zoonoses majeures correspondant à l'infection salmonellique ou salmonellose, dont les conséquences économiques en santé publique sont telles qu'il est apparu depuis longtemps indispensable d'exercer une surveillance épidémiologique aussi bien chez l'homme qu'en santé animale, dans les élevages, au cours de la production et de la transformation des matières premières d'origine animale et aussi dans l'environnement.

Le Centre national de référence des *Salmonella* et des *Shigella* de l'Institut Pasteur de Paris (CNRSS) centralise l'ensemble des souches et des informations concernant principalement les isolats humains, alors que le Centre de sérotypage des *Salmonella* de l'AFSSA LERHQA, restructuré en « réseau *Salmonella* », collecte pour sa part les souches et renseignements épidémiologiques des isolats provenant de toutes les autres origines. D'autres réseaux, plus spécialisés, collectent également des données par filière animale, d'origine aviaire ou bovine.

\* Texte de l'exposé présenté lors de la Journée AEEMA, 17 mai 2001

<sup>1</sup> AFSSA – LERHQA, Unité Epidémiologie Bactérienne, 39-41, rue de 11 novembre 1918, 94700 Maisons-Alfort, France

La collecte d'un très grand nombre d'isolats a donc nécessité depuis longtemps la mise au point et le développement de techniques pour leur caractérisation, permettant de les différencier au delà du genre et même des espèces et sous-espèces de *Salmonella*. Ceci s'est défini par l'apparition de marqueurs épidémiologiques permettant ainsi le repérage et le suivi des souches bactériennes au cours du temps. Les objectifs de la caractérisation bactérienne sont multiples et les techniques utilisées dépendent des objectifs à atteindre.

L'un des premiers objectifs a été d'enrichir les connaissances en matière de taxonomie bactérienne, de classer les souches à un niveau inférieur du genre, de l'espèce ou de la sous-espèce et de préciser les relations phylogéniques ainsi que le degré de parenté entre les souches.

Les autres objectifs de la caractérisation bactérienne sont en relation avec l'écologie et l'épidémiologie. Ainsi, le développement de techniques de typage a permis l'étude et la comparaison de souches issues de diverses origines autorisant une analyse descriptive, mais aussi dynamique à partir des informations données sur l'évolution spatio-temporelle du contaminant bactérien ; ceci peut notamment s'appliquer soit au niveau d'un site de production agro-alimentaire, soit dans un écosystème donné. Enfin, l'utilisation des marqueurs dans l'investigation épidémiologique des maladies infectieuses aussi bien en santé animale qu'en santé humaine est devenue indispensable, en particulier pour confirmer les cas épidémiques et les distinguer des cas sporadiques ainsi que pour confirmer l'hypothèse d'un vecteur de contamination.

## II - LES METHODES DE CARACTERISATION BACTERIENNE

D'une façon générale, la caractérisation bactérienne repose sur deux grandes catégories de méthodes : phénotypiques et moléculaires. Les méthodes phénotypiques se basent sur les caractères exprimés par les microorganismes et s'intéressent par conséquent aux phénomènes post-traductionnels alors que les méthodes moléculaires s'intéressent au contenu de la cellule bactérienne, que ce soit du matériel protéique ou du matériel génomique.

### 1. LES METHODES PHENOTYPIQUES POUR LA CARACTERISATION DES SALMONELLES

#### 1.1. LA BIOTYPAGE

Elle repose sur la mise en évidence des caractères biochimiques différentiels qui permettront de classer les souches selon leur activité métabolique par l'utilisation de sucre et/ou leur activité enzymatique. Ce marqueur est peu discriminant au-delà de l'espèce pour être utilisé seul, il peut cependant être utile comme système d'alerte ou de surveillance pour repérer une souche, lorsque ce caractère est inhabituel, cela peut être le cas des souches de Salmonelles présentant une fermentation du lactose, ou du saccharose ou bien ne produisant pas d'H<sub>2</sub>S, caractères inhabituels pour les Salmonelles. Plusieurs schémas de biotypage ont été proposés en particulier pour le sérotype Typhimurium [7, 9] mais sont peu utilisés en pratique, excepté pour le sérotype Paratyphi B qui se distingue en 2 biotypes « d-tartrate négatif » et « d-tartrate positif » dit biotype « Java » [2].

#### 1.2. LE SEROTYPAGE

C'est une méthode indispensable, devenue un outil majeur pour la caractérisation des Salmonelles. En effet, la technique a été particulièrement bien étudiée et approfondie pour les *Salmonella* et un schéma de sérotypage a été défini par Kauffmann et White, puis revu par Le Minor [16, 19]. Ce schéma tient compte de la structure antigénique des *Salmonella* : il repose principalement sur la présence et la mise en évidence de facteurs antigéniques reliés aux antigènes somatiques « O » de type polysaccharidique, et flagellaires « H » constitués de polymères de flagelline, et possédant le plus souvent deux spécificités antigéniques.

Le schéma de Kauffmann-White permet une classification des sérotypes selon leurs formules antigéniques. La classification se fait par groupe antigénique « O » : groupe O2, O4, O9... et au sein de chacun d'entre eux, selon les antigènes flagellaires de phase 1 et 2. Quatre vingt sept facteurs antigéniques « O » et 96 facteurs antigéniques « H » ont été répertoriés, mais seuls ceux ayant une importance pour le diagnostic sont notés dans le schéma de Kauffmann-White [23]. Depuis 1996, des noms, basés sur l'origine géographique de la première souche isolée, sont donnés uniquement aux sérotypes de la sous-espèce *enterica* et, lorsque la formule antigénique de la souche est incomplète, un nom de sérotype ne peut être attribué [24].

Quelques formules antigéniques fréquentes sont présentées dans le tableau I. A ce jour, environ 2 450 sérotypes sont répertoriés et de nouveaux sérotypes sont encore actuellement décrits et enregistrés auprès du Centre international de référence. Cependant, les fréquences d'isolement des sérotypes sont très variables : si certains sérotypes sont très souvent isolés, d'autres ne le sont qu'exceptionnellement. Par exemple, durant l'année 2000, le Centre de sérotypage des *Salmonelles* de l'AFSSA LERHQA a répertorié 20 249 souches d'origine non humaine se répartissant en 204 sérotypes de structure antigénique complète et 52 sérotypes de structure antigénique incomplète. Pour cette même année, les 25 premiers sérotypes correspondaient à 90% des souches enregistrées [5]. Les tableaux II et III présentent la liste des 10 premiers sérotypes identifiés durant l'année 2000 d'une part, chez l'homme [3, 12] et d'autre part, dans les autres secteurs (Santé et production animales, Hygiène des aliments et Ecosystème) [5].

Les tableaux II et III montrent la grande fréquence et l'ubiquité de certains sérotypes retrouvés aussi bien chez l'animal et dans des produits de transformation animale que chez l'homme et dans l'environnement naturel. C'est le cas notamment du sérotype Typhimurium, premier par ordre de fréquence d'isolement dans les deux secteurs importants « Santé et productions animales » et « Hygiène des aliments » et en deuxième position d'isolement dans l'écosystème naturel et chez l'homme juste après le sérotype Enteritidis, lui-même aussi fréquemment isolé en « Santé et productions animales » et en « Hygiène des aliments ». D'autres sérotypes se retrouvent fréquemment isolés dans au moins deux secteurs, mais avec une fréquence différente et des variations au cours du temps : Hadar, Virchow, Heidelberg, Infantis, Newport et Derby. Les réseaux de surveillance permettent spécifiquement de suivre l'évolution en fonction du sérotype et des secteurs d'isolement.

**TABLEAU I**  
**Formules antigéniques de sérotypes de *Salmonella* fréquemment identifiés**

Groupe	Sérotype	Ag O	Ag H <sub>1</sub>	Ag H <sub>2</sub>
B (O : 4)	Typhimurium	<u>1</u> ,4,[5],12	i	1,2
	Saintpaul	<u>1</u> ,4,[5],12	e,h	1,2
	Brandenburg	<u>1</u> ,4,[5],12, <u>27</u>	l,v	e,n,z <sub>15</sub>
	Derby	<u>1</u> ,4,[5],12	f,g	[1,2]
C1 (O : 6,7)	Infantis	6,7, <u>14</u>	r	1,5
C2 (O : 6,8)	Bovismorbificans	6,8, <u>20</u>	r, <sub>1</sub> [i]	1,5
	Hadar	6,8	z10	e,n,x
D (O : 9)	Enteritidis	<u>1</u> ,9,12	[f],g,m,[p]	-
	Dublin	<u>1</u> ,9,12[Vi]	g,p	-

**TABLEAU II**  
**Les dix premiers sérotypes isolés chez l'homme en 2000**  
 (données du Centre national de référence des *Salmonella* et des *Shigella*).

Sérotypes	N	(%)
Enteritidis	4656	36
Typhimurium	3800	29
Hadar	787	6
Virchow	321	3
Heidelberg	226	2
Infantis	209	2
Brandenburg	187	1
Derby	164	1
Typhi	152	1
Newport	137	1
<b>Total</b>	<b>10 639</b>	<b>82,6</b>

Tableau III

Les dix premiers sérotypes isolés de prélèvements d'origine non humaine en 2000 : Santé et production animales, Hygiène des aliments, Ecosystème.  
 (données du Centre de sérotypage de l'AFSSA-LERHQA).

Santé et production animales			Hygiène des aliments			Ecosystème		
Sérotype	N	%	Sérotype	N	%	Sérotype	N	%
Typhimurium	1811	12	Typhimurium	780	16	Montevideo	93	17
Hadar	1149	8	Derby	365	7	Typhimurium	52	9
Kottbus	1140	8	Hadar	247	5	Derby	36	6
Senftenberg	982	7	Newport	232	5	Enteritidis	34	6
Heidelberg	982	7	Virchow	222	5	Infantis	34	6
Enteritidis	952	6	Enteritidis	220	5	Panama	28	5
Indiana	947	6	Bredeney	201	4	Mbandaka	27	5
Virchow	867	6	Infantis	201	4	Anatum	21	4
Montevideo	564	4	Heidelberg	191	4	Brandenburg	21	4
Saintpaul	560	4	Anatum	168	3	Newport	21	4
<b>Total</b>	<b>9 954</b>	<b>67</b>	<b>Total</b>	<b>2 827</b>	<b>58</b>	<b>Total</b>	<b>367</b>	<b>66</b>

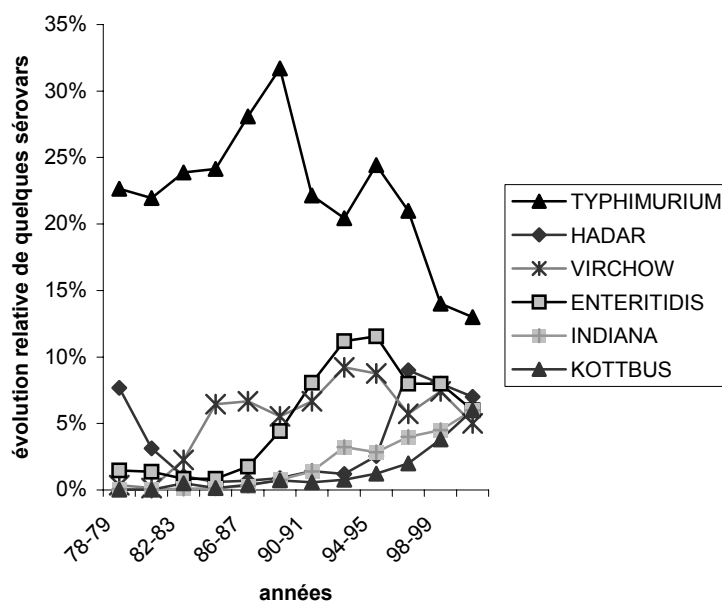
N = nombre de souches appartenant au sérotype.

% = pourcentage du sérotype par rapport au total de souches isolées dans le secteur donné.

C'est ainsi que le sérotype Typhimurium, bien qu'il soit le plus fréquemment isolé dans tous les secteurs, est en baisse relative constante depuis les années 1988-1989 et 1994-1995, au profit d'autres sérotypes en augmentation comme Hadar qui se stabilise depuis 1998, Virchow et à un moindre degré Enteritidis (figure 1). Certains sérotypes sont associés à une filière ou à un type de production donnée : c'est ainsi qu'on observe la prépondérance du sérotype Enteritidis dans

les œufs et les ovoproduits (38% des souches de ce sérotype parmi celles isolées en hygiène des aliments) et dans les viandes de volaille (36%), alors que Derby et Brandenburg semblent associés aux productions porcines, Montevideo aux productions bovines, Hadar, Heidelberg, Indiana, Kottbus, Newport et Saintpaul aux productions avicoles. Typhimurium reste pour sa part présent dans tous les types de filière de production [5].

FIGURE 1  
 Evolution des principaux sérovars depuis 1978



Comme il vient d'être montré, au delà de l'identification des *Salmonelles*, le sérotypage des *Salmonelles* est un outil indispensable pour suivre l'évolution et les tendances spatio-temporelles des souches isolées dans différents secteurs. Certains sérotypes étant fortement associés à une filière, il est même possible de déduire intuitivement l'origine d'une toxi-infection alimentaire en fonction du sérotype isolé chez les malades. Cependant, ceci doit être relativisé, surtout pour les sérotypes très fréquents comme Typhimurium qui peuvent être isolés de produits d'origine variée. Le sérotype pourra donc être un outil d'investigation épidémiologique d'autant plus efficace, qu'il sera rare ou associé de façon quasi-exclusive à une filière ou à un type de production. Dans le cas de sérotypes fréquemment isolés et répandus sur toutes les filières, d'autres méthodes de caractérisation devront compléter le sérotypage, comme la lysotypie et/ou les méthodes moléculaires.

### 1.3. LA LYSOTYPYPIE

Elle est basée sur l'étude de la sensibilité ou de la résistance d'une souche à une série de bactériophages sélectionnés. De nombreux systèmes de lysotypie ont été élaborés ; ils visaient à étudier de façon plus précise des souches appartenant à des sérotypes d'intérêt majeur soit par leur fréquence d'isolement (Typhimurium, Enteritidis), soit par leur pathogénicité (Typhi, Dublin). Le tableau IV résume les schémas de lysotypie les plus fréquemment employés. Le nombre de bactériophages utilisés ainsi que le nombre des lysotypes différents identifiés sont très variables d'un sérotype à l'autre. Avec 211 lysotypes différents, Typhimurium est très polymorphe [1, 6] alors que seulement 27 lysotypes différents ont pu être identifiés chez Enteritidis [30].

TABLEAU IV  
 Différents schémas de lysotypie chez *Salmonella*

Sérotype	Nom du schéma	Nombre de bactériophages	Nombre de lysotypes
Typhi	Craigie et Yen	1/87 variants	106
Paratyphi B (2 biotypes)	Félix et Callow	12	48
Typhimurium	Colindale	31	211
Enteritidis	Ward <i>et al.</i>	10	27
Dublin	Vieu <i>et al.</i>	14	85

### 1.4. L'ANTIBIOTYPYPIE

Elle est fréquemment réalisée, plus souvent dans un but de traitement thérapeutique qu'en épidémiologie ; cependant, aujourd'hui l'acquisition, chez *Salmonella*, de certains caractères de résistance donne la possibilité de suivre certains clones presque uniquement par leur phénotype de résistance aux antibiotiques. C'est le cas par exemple pour *S. Typhimurium*, du lysotype DT104 qui présente quasi-systématiquement une résistance associée à cinq antibiotiques : Ampicilline, Streptomycine, Chloramphénicol, Tétracycline et Sulfamides. Ce phénotype ASCTS<sub>u</sub> s'est très répandu, notamment dans les élevages bovins où en 1999, 80% des souches de sérotype Typhimurium présentaient cette multirésistance [18].

### 1.5. SYNTHÈSE DE L'UTILISATION DES MARQUEURS PHÉNOTYPIQUES

L'utilisation des marqueurs phénotypiques présente un intérêt majeur pour la caractérisation des *Salmonelles* par rapport à d'autres microorganismes où les méthodes moléculaires ont dû se développer plus rapidement devant le faible pouvoir discriminant des méthodes phénotypiques.

En ce qui concerne *Salmonella*, le sérotypage présente un pouvoir discriminant élevé puisqu'il existe plus de 2 400 sérotypes recensés. Les souches sont souvent

typables sauf celles dites « rough » ou auto-agglutinables qui représentent moins de 1% des souches isolées. La technique nécessite la possession de nombreux sérums dont certains ne sont détenus que par le Centre national de référence ; néanmoins, les sérotypes les plus fréquents peuvent être identifiés par la majorité des laboratoires d'analyse. La lysotypie, par contre, est réservée au Centre de référence car la mise en œuvre, la lecture et l'interprétation de la technique sont délicates et nécessitent l'entretien de bactériophages dont la stabilité peut varier au cours du temps. L'étude de marqueurs de résistance est un outil facile d'utilisation, disponible pour tous les laboratoires mais dont l'interprétation doit se faire avec prudence car un certain nombre de marqueurs peuvent être portés par des plasmides facilement transférables. De plus, le pouvoir discriminant dépend du nombre de molécules antibiotiques testées et n'est pas très élevé du fait qu'il existe peu de combinaison de phénotypes de résistance.

En conclusion, les marqueurs phénotypiques permettent d'obtenir une bonne caractérisation des *Salmonella* avec un niveau analytique définitif établi de façon standardisée relativement facile à déterminer et reconnu par divers systèmes ou schémas (lysotypie, sérotypie). Cependant, ces marqueurs dépendent de différents facteurs qui peuvent varier comme le milieu de culture, la température ou la pression de sélection

par un antibiotique dans le cas de l'étude de l'antibiotype. Ces marqueurs sont cependant très couramment utilisés dans le cas de la caractérisation des Salmonelles ; ils sont mêmes utilisés seuls dans le cadre de l'épidémiologie des Salmonelles et ont permis de construire d'importantes bases de données. Ces résultats phénotypiques de type définitifs sont internationalement reconnus et permettent une comparaison des souches entre les différents pays. De plus, ces mêmes marqueurs (en particulier le sérotypie et la lysotypie) peuvent être utilisés seuls lors d'investigation épidémiologique pour relier certaines souches, issues de prélèvements différents ; mais ce lien aura un poids d'autant plus fort que le sérotype de la souche est rare d'une façon générale ou isolé de façon peu fréquente dans le secteur d'enquête. Bien que ces marqueurs présentent l'avantage d'être parfaitement définis, ils ne permettent pas d'établir de relation ou de degré de proximité entre les souches ; ce qui peut parfois être fort utile lors d'investigations ou d'enquêtes épidémiologiques. Au contraire, les techniques moléculaires permettent ce type d'étude ; elles se sont donc largement développées ces dernières années et ont montré pleinement leur intérêt.

## 2. LES METHODES MOLECULAIRES POUR LA CARACTERISATION DES SALMONELLES

Les méthodes moléculaires peuvent se diviser en deux groupes, celles reposant sur la caractérisation de certaines protéines et celles basées sur la caractérisation du génome, que ce soit à partir de l'ADN plasmidique ou chromosomique.

### 2.1. CARACTERISATION DE PROTEINES : L'ANALYSE DES ISO-ENZYMES

Le principe de cette méthode repose sur la séparation de protéines cellulaires par électrophorèses en gel d'amidon ou d'acrylamide-agarose et leur mise en évidence par un substrat spécifique. La migration de la protéine dépend du poids moléculaire et de sa charge électrique et les variations de la migration seront donc directement liées à des modifications dans la structure de la protéine (substitution d'acides aminés), qui est elle-même le reflet de mutations d'ADN au niveau des gènes de structures de ces protéines. Les études ont porté essentiellement sur les enzymes iso-fonctionnels (ou iso-enzymes) pour lesquels une mutation n'altère pas la fonction enzymatique mais provoque une variation de migration électrophorétique. Cette méthode permet donc de détecter indirectement une mutation dans le gène de structure de l'enzyme qui n'altère pas sa fonction et, à partir des résultats obtenus sur différents enzymes iso-fonctionnels, il est possible de calculer des distances génétiques entre les souches [26]. On peut ainsi, pour une souche donnée, obtenir une combinaison de variants pour l'ensemble des enzymes étudiés, appelée « type électrophorétique ». Parmi ces enzymes, les estérases ont été

particulièrement étudiées pour les Salmonelles permettant de définir différents « zymotypes » ou profils électrophorétiques après migration des estérases [4].

### 2.2. LES MARQUEURS GENOTYPIQUES POUR LA CARACTERISATION DES SALMONELLES

Ces marqueurs sont basés sur l'analyse de l'ADN total, chromosomique ou plasmidique, et sont de plus en plus utilisés pour de nombreuses espèces bactériennes y compris *S. enterica* ; dans ce cadre précis ils ne s'appliqueront qu'après la détermination au minimum du sérotype de la souche à étudier.

#### □ Analyse des plasmides

La détermination du nombre et de la taille des plasmides nécessite d'extraire l'ADN plasmidique, de les séparer par électrophorèse en agarose et de les révéler après coloration au bromure d'éthidium (BET). Cette technique est relativement grossière pour caractériser les isolats, mais elle a permis de subdiviser des lysotypes chez Typhimurium et Enteritidis [28, 29]. Les plasmides hébergés par les salmonelles codent en particulier pour des propriétés de résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds ou pour des facteurs contribuant à la virulence de la souche. D'autres types d'analyses plus précises peuvent être réalisées comme la détermination du profil de restriction ; les méthodes employées sont alors très fortement identiques à celles utilisées pour l'ADN chromosomique et permettent d'obtenir un profil de restriction plasmidique. Cette analyse peut être intéressante pour la mise en évidence de gènes portés sur un plasmide et elle permet une comparaison des souches entre elles sur la base de leur profil plasmidique. Cependant, la stabilité des plasmides est variable et est en fonction de l'environnement ; il n'est pas rare de « perdre » les plasmides notamment au cours de la conservation des souches. Ceci explique que la caractérisation génotypique se soit intéressée de façon plus importante à l'étude de l'ADN chromosomique. Pour cela, de très nombreuses méthodes ont été développées et nous n'aborderons ici que les grands principes de ces méthodes et leur application à la caractérisation des Salmonelles. Les méthodes utilisent schématiquement deux types de technologie, l'amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction) et la restriction enzymatique, ces deux types pouvant parfois être combinés pour certaines caractérisations particulières.

#### □ Les techniques basées sur la PCR

Ces techniques permettent de réaliser une amplification génomique de certaines séquences d'ADN choisie de façon judicieuse en fonction du génome. Certaines amorces sont universelles et seront utilisées de façon constante quel que soit le genre bactérien auquel

appartient la souche. C'est ainsi qu'un élément répétitif hautement conservé appelé « Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus » (ERIC) a été décrit et utilisé de façon universelle car les positions des séquences « ERIC » sur le chromosome sont variables selon les espèces et les souches [14].

La technique RAPD pour « Random Amplification of Polymorphic DNA » est une méthode de typage très utilisée et nécessite une seule amorce choisie au hasard, formée d'environ une dizaine de nucléotides et s'hybridant à plusieurs endroits du génome. Les profils des produits amplifiés ainsi obtenus peuvent être caractéristiques de la souche et permettent une bonne discrimination au sein d'un sérotype donné [13], mais la reproductibilité et la répétabilité de la méthode sont passables ce qui ne permet pas de l'utiliser pour un suivi de souches à long terme. Les techniques PCR ont l'avantage d'être simples à mettre en œuvre et de permettre d'obtenir un résultat très rapidement. Après la phase d'extraction de l'ADN, la PCR est réalisée, suivie de l'électrophorèse des produits amplifiés et de la révélation de ces produits par coloration au BET ; l'ensemble de ces étapes est réalisable dans une journée.

#### □ Les techniques basées sur la restriction ou REA – « Restriction Enzyme Analysis »

Ces méthodes consistent à couper l'ADN extrait et purifié, avec une enzyme de restriction, permettant ainsi de produire un certain nombre de fragments d'ADN qui seront ensuite séparés par électrophorèse en gel d'agarose et révélés par coloration au BET. Cette méthodologie a engendré un grand nombre de techniques dont les deux plus importantes et les plus largement utilisées sont le ribotypage et l'électrophorèse en champ pulsé ou PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis).

Le ribotypage s'est développé suite à la REA qui donnait un nombre de fragments trop important pour que les profils soient facilement interprétables ; il consiste à transférer les fragments d'ADN ayant migré sur une membrane de nylon et à révéler seulement une partie de ces fragments à l'aide d'une sonde spécifique, une des sondes les plus couramment utilisées étant la sonde codant pour les ARN ribosomiaux 16S et 23S de *Escherichia coli* ; cette sonde est universelle et applicable à un grand nombre de genres bactériens, elle permet donc de révéler les profils de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomiaux ou « ribotypes ». Le ribotypage a été appliqué à différents sérotypes de *Salmonelles* et son pouvoir discriminant est très variable d'un sérotype à un autre ; dans certains cas, il n'est pas possible de relier le ribotype obtenu à un sérotype donné [25]. Néanmoins, cette méthode a fait ses preuves et est largement utilisée bien que sa mise en œuvre soit relativement longue et fastidieuse.

Pour pallier ces inconvénients, un système de ribotypage automatisé appelé « Riboprinter », a été développé par QUALICON ; il permet une bonne standardisation et une diminution très franche du temps de manipulation [22]. A partir de la technique décrite, correspondant à la restriction d'ADN suivie de l'hybridation par une sonde, de nombreuses autres méthodes ont été décrites en utilisant des sondes spécifiques d'une séquence donnée du génome. C'est ainsi que pour les salmonelles, des résultats intéressants ont été obtenus en utilisant des sondes correspondant aux séquences d'insertion IS 200, élément d'ADN mobile capable de s'insérer au niveau du génome et probablement spécifique de *Salmonella*. Des travaux de caractérisation avec cette technique dénommée « IS-typie » ont été réalisés pour les sérotypes Enteritidis, Heidelberg, Typhimurium, Paratyphi B, Dublin et pour d'autres sérotypes [20, 27].

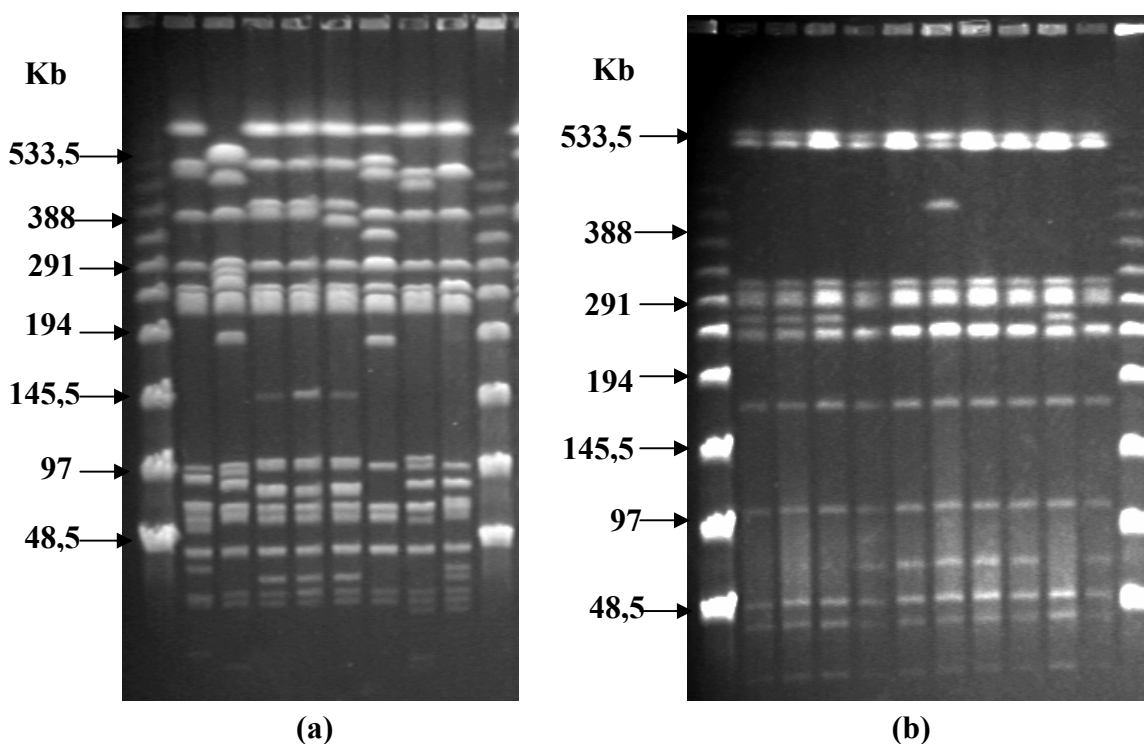
Plus récemment, la technique d'électrophorèse en champ pulsé a été développée ; elle utilise une endonucléase de restriction à faible fréquence de coupure permettant ainsi de produire un nombre de fragments directement exploitable pour l'interprétation des profils. Ces fragments d'ADN doivent alors migrer dans un champ électrique particulier permettant la migration de fragments de grosse taille par la technique d'électrophorèse dite CHEF (Clamped Homogenous Electric Field). La révélation des fragments se fait de façon classique avec le BET. Les enzymes de macro-restriction utilisées pour le PFGE des *Salmonella* sont XbaI, BlnI ou SpeI [21]. Cette technique a montré, de façon générale, un très bon pouvoir discriminant pour *Salmonella*, mais il existe des variations en fonction du sérotype étudié. C'est ainsi qu'il existe un bon polymorphisme par PFGE chez *S. Typhimurium* après digestion par XbaI alors que la même enzyme de restriction donne beaucoup moins de diversité chez *S. Enteritidis* (figure 2).

#### □ Techniques combinées

D'autres techniques utilisent à la fois l'amplification génique et la restriction du produit amplifié (PCR-RFLP). Dans le cas des *Salmonelles*, cette technique a été utilisée par exemple pour la caractérisation du gène de la flagelline, permettant ainsi une approche moléculaire d'identification des antigènes H dans le but de se substituer à la sérotypie ou de révéler une phase flagellaire antigéniquement non décelable. Les gènes de flagelline de certains sérotypes ont donc été amplifiés puis clivés par des endonucléases HhaI ou HphI. Des profils de restriction de gène de flagelline ont été obtenus pour les deux phases flagellaires, mais la diversité rencontrée dans ces profils ne correspondait pas de façon précise aux résultats de l'agglutination flagellaire [8].

FIGURE 2

Profil de restriction après digestion par *Xba*I de souches de *Salmonella* sérotype Typhimurium (a) et Enteritidis (b)



### 2.3. ANALYSE ET INTERPRÉTATION DES RESULTATS DE TYPAGE MOLECULAIRE

La caractérisation moléculaire permet d'obtenir soit des profils génomiques, résultats d'une migration électrophorétique de l'ADN, soit des fragments d'ADN correspondant à certaines séquences bien définies que l'on a souhaité révéler. En fonction de l'ampleur de l'étude et surtout du nombre d'isolats, l'analyse peut se faire soit visuellement, soit à l'aide d'un logiciel permettant la saisie de l'image et la normalisation des distances de migration en fonction des marqueurs de taille de façon à tenir compte des variations dues aux aléas de la migration. L'image est ainsi archivée et pourra être utilisée ultérieurement pour des comparaisons de profils. L'interprétation des profils ou des fragments obtenus se base sur les distances de migration ou sur le calcul des poids moléculaires de chacun des fragments. Le degré de parenté entre différentes souches se déduit alors de la comparaison des distances de migration des fragments du profil obtenu pour chacune des souches étudiées.

L'interprétation des résultats sera d'autant plus exacte que l'indice de discrimination de la méthode de typage utilisée sera élevé. Cet indice de discrimination correspond à la probabilité moyenne de classer en type distincts deux isolats échantillonnés au hasard dans l'espèce étudiée ; il dépend à la fois du nombre de

types de profil obtenu par la méthode et de la fréquence relative de chacun des types à l'intérieur d'un échantillon de souches bactériennes indépendantes [15].

Dans le cadre d'une étude de comparaison de méthodes de typage de *S. Dublin*, cet indice de discrimination avait été calculé pour chacune des méthodes testées et pour certaines d'entre-elles en combinaison. 32 souches, non reliées épidémiologiquement, avaient été étudiées par zymotypage, ribotypage, RAPD, REP-PCR et ERIC-PCR. Les résultats avaient montré que les méthodes les plus discriminantes étaient le ribotypage par deux enzymes de restriction *Eco*R1 et *Hind*III (ID = 0,470), le zymotypage (ID = 0,405) et la RAPD (ID = 0,387) et que la combinaison d'au moins deux méthodes de typage permettait d'augmenter de façon importante la valeur de cet indice : zymotypage et ribotypage (ID = 0,855), ribotypage et RAPD (ID = 0,760) [17]. Il est habituellement souhaitable de combiner deux, voire trois méthodes utilisant des marqueurs indépendants pour obtenir une corrélation fiable.

Le regroupement d'isolats ou les relations entre isolats reposent donc principalement sur la comparaison des profils obtenus. Cette comparaison utilise très fréquemment le coefficient de similitude de Dice qui analyse les profils deux à deux et qui correspond au

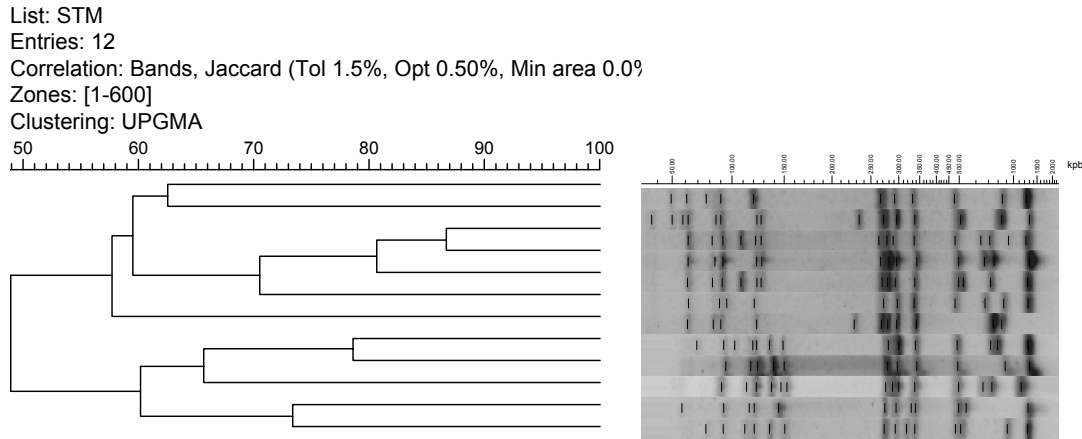


rapport du nombre de fragments communs multiplié par deux sur le nombre total de fragments observés dans les deux profils. Ce coefficient est calculé automatiquement avec certains logiciels (Molecular analyst Fingerprinter plus, BIORAD ou Gel Compar, Applied Maths). Après comparaison deux à deux de tous les profils, une matrice des similitudes peut être

alors obtenue permettant de construire une représentation graphique des distances entre les souches sous forme de dendrogramme ; celui-ci peut notamment être obtenu par la méthode de groupement par la distance moyenne ou UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) (Fig. 3).

FIGURE 3

**Dendrogramme obtenu par la méthode UPGMA présentant les distances génétiques de souches *S. Typhimurium***



**2.4. INTERET DES METHODES MOLECULAIRES POUR LA CARACTERISATION DES SALMONELLES ET APPLICATION**

Les méthodes de typage moléculaire apportent des informations complémentaires à celles obtenues par les caractères phénotypiques des *Salmonelles*, détermination du sérotype, et lysotype, en particulier . Certains caractères phénotypiques comme le sérotype doivent être connus avant de pratiquer une caractérisation plus fine puisque le pouvoir discriminant des méthodes de typage moléculaire dépend essentiellement du sérotype. La caractérisation moléculaire d'une population de souches de *Salmonella* isolées dans un secteur donné, industrie agroalimentaire, écosystème particulier ou élevage, apporte des informations descriptives sur la diversité génotypique du genre au sein de différents sérotypes ainsi que des données sur l'évolution au cours du temps des différents génotypes identifiés et donc sur la cinétique de ces génotypes permettant d'émettre des hypothèses sur la contamination et les flux de souches dans le secteur étudié. Cette caractérisation moléculaire est également très utile en épidémiologie, que ce soit en santé animale ou humaine, puisqu'elle permet de grouper les souches responsables de l'épidémie, toutes identiques de même génotype et d'éliminer celles responsables de cas sporadiques. De plus, elle renforce les hypothèses apportées par l'enquête épidémiologique sur la source de contamination ou le

véhicule responsable de l'épidémie et permet de suivre facilement la diffusion d'un clone au sein de l'animal en élevage, au niveau de la matière première à l'abattoir et dans la chaîne de transformation [10].

Cette épidémiologie dite « moléculaire » est complémentaire aux informations épidémiologiques. Les résultats de l'épidémiologie moléculaire concernant l'origine des isolats ne peuvent s'interpréter qu'en connaissance de l'ensemble des éléments de l'enquête épidémiologique ; ils permettent de confronter et de confirmer un lien épidémiologique entre différents isolats par la mise en évidence d'un lien génotypique des souches issues de ces isolats. Ce type d'enquête peut s'illustrer par deux exemples très simples qui ont nécessité la caractérisation moléculaire de souches de *S. Typhimurium*. Dans le premier exemple, des cas humains de salmonellose avaient été diagnostiqués dans le département des Alpes Maritimes ; le sérotypage des souches avait révélé qu'elles appartenaient toutes au sérotype *Typhimurium*. De façon concomitante, *S. Typhimurium* avait été isolée à partir de prélèvements de steaks hachés et de chipolatas dans le même département. L'analyse de l'ensemble des souches de sérotype *Typhimurium* par électrophorèse en champ pulsé après digestion par l'enzyme *XbaI* a montré que le profil (ou pulsotype) de l'isolat du cas humain était identique à ceux provenant des steaks hachés. L'analyse de ces résultats confrontée à l'enquête

épidémiologique permet d'émettre l'hypothèse d'une transmission possible de *S. Typhimurium* par les steaks hachés contaminés.

Le deuxième exemple concernait un élevage de chevreux dans lequel certains animaux présentaient des symptômes de salmonellose. L'analyse du foie d'un jeune chevreau avait révélé la présence de *S. Typhimurium*. Simultanément, une salmonellose avait été diagnostiquée chez une fillette fréquentant l'élevage et qui avait été en contact avec les chevreux malades. La détermination du sérotype de la souche isolée chez la fillette était également *S. Typhimurium*. Compte tenu de l'ubiquité de ce sérotype, l'analyse par électrophorèse en champ pulsé après digestion par *XbaI* a été réalisée et n'a montré aucune différence de profil entre les deux isolats (foie de chevreau et cas humain) permettant ainsi d'émettre l'hypothèse d'une transmission possible de l'animal à la fillette par contact direct.

Cette interprétation après l'analyse du typage moléculaire nécessite au préalable d'avoir déterminé quelques paramètres de la méthode de caractérisation moléculaire, notamment l'index de discrimination par l'analyse d'un certain nombre d'isolats du sérotype étudié de façon à vérifier que le pouvoir discriminant est suffisamment élevé. Les informations apportées par l'épidémiologie moléculaire seront d'autant plus puissantes que le pouvoir de discrimination de la méthode utilisée sera élevé.

### **3. CHOIX DES METHODES DE CARACTERISATION MOLECULAIRE**

Ce choix va dépendre essentiellement des objectifs à atteindre et du niveau de discrimination souhaité des souches. En règle générale, et cela s'applique en particulier aux *Salmonelles*, l'étude de la taxonomie ou de la diversité génétique des populations, permettant d'identifier une relation phylogénétique précise entre isolats, nécessite la mise en œuvre de méthodes capables d'analyser de multiples séquences et de

détecter des mutations ponctuelles, telles que l'analyse des iso-enzymes. Le ribotypage est aussi un outil intéressant pour la taxonomie bactérienne car il repose sur la mise en évidence de séquences stables codant pour les ARN ribosomiaux [11].

La caractérisation moléculaire dans le cadre d'investigation épidémiologique a pour objectif de connaître les relations génotypiques éventuelles entre différents isolats ; les méthodes employées seront différentes en fonction du nombre d'isolats à analyser et surtout aussi de la durée de la période d'étude. Si l'étude porte sur un nombre limité de souches qui peuvent être étudiées sur une courte période, ou mieux toutes en même temps, les méthodes utilisant la PCR comme la RAPD sont adaptées car elles offrent un bon pouvoir discriminant et sont rapides et simples à réaliser malgré leur faible reproductibilité. Cependant, les résultats obtenus par RAPD seront difficilement comparables aux résultats obtenus dans un autre laboratoire utilisant la même technique. Lorsqu'au contraire, l'étude porte sur un grand nombre de souches isolées sur une longue période (plusieurs mois ou plusieurs années), il est indispensable d'utiliser des techniques reproductibles et stables au cours du temps ; c'est le cas par exemple de la technique d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) qui, de plus, apporte un bon pouvoir discriminant mais qui est longue et fastidieuse à réaliser (trois à quatre jours). Le ribotypage peut aussi constituer une première approche pour le typage moléculaire, moins discriminant que la PFGE mais apportant des informations intéressantes pour la caractérisation et qui, combiné à la PFGE, permet d'obtenir un très bon pouvoir discriminant. Le ribotypage est également une technique longue et fastidieuse à réaliser (cinq jours), mais sa reproductibilité et sa répétabilité sont excellentes et c'est la seule technique qui a été automatisée avec le Riboprinter permettant ainsi de définir des « Ribogroupes » après seulement 8 heures d'analyse avec une bonne standardisation des résultats intégrés dans une base de données et comparables entre eux.

## **III - CONCLUSION**

Les *Salmonelles* bénéficient aujourd'hui d'une grande variété de marqueurs phénotypiques et génotypiques pour les caractériser. Malgré cette diversité, le sérotypage reste toujours la technique utilisée en première intention avant toute autre caractérisation et il permet une bonne discrimination avec plus de 2400 sérotypes répertoriés dans le monde ; cependant, 90% des souches isolées en France se regroupent dans les 25 premiers sérotypes. Le sérotypage est effectué en routine par de nombreux laboratoires et les centres de référence qui collectent des données de sérotypage ou

des souches à sérotyper accompagnées de leur origine d'isolement. L'ensemble de ces informations constitue des bases de données importantes pour l'épidémiologie et permet de connaître les variations spatio-temporelles de certains sérotypes ou leur association à une filière de production donnée. Le sérotypage constitue donc un référentiel indispensable ; cependant, cette technique n'est pas automatisée et il n'est pas possible d'établir de relation de parenté entre les différents sérotypes ; ceci ne permet donc pas la comparaison entre isolats. Pour pallier ces

inconvenients, des essais de substitution au sérotypage ont été entrepris notamment par la caractérisation des gènes de flagelline, mais la correspondance avec les sérotypes est encore difficile à établir. De même, il n'est pas possible d'établir de lien entre les ribotypes et les sérotypes puisque certains sérotypes peuvent se retrouver dispersés dans différents ribotypes et inversement, un même ribotype peut correspondre à différents sérotypes. Il semble donc que la technique de sérotypage, reconnue de façon universelle, bien standardisée et avec un référentiel commun, soit utilisée encore pendant de nombreuses années pour l'épidémiosurveillance car elle permet d'échanger des informations simples au niveau national et international.

Les méthodes moléculaires pour la caractérisation des *Salmonelles* n'ont d'intérêt que si elles apportent une différenciation des isolats appartenant à un même sérotype. Pour chacune des techniques employées, il est important de connaître le pouvoir discriminant pour un sérotype donné, car celui-ci peut varier d'un sérotype à un autre. Ces techniques permettent d'évaluer la relation génotypique des souches étudiées pour lesquelles un lien épidémiologique est suspecté lors d'investigation d'une toxi-infection alimentaire, par exemple. L'interprétation des résultats apportés par la caractérisation moléculaire, doit se faire avec prudence toujours en confrontation avec les données

épidémiologiques. Enfin, en dehors de quelques essais d'inter-comparaison entre laboratoires, ces techniques ne sont pas standardisées à l'heure actuelle et il n'existe pas de référentiel commun à tous les laboratoires, permettant d'échanger de façon facile et rapide les informations concernant ces profils. Chaque laboratoire mettant en œuvre ces techniques, dispose de sa propre base de données d'identification des profils, sans aucune harmonisation ; seul le Riboprinter apporte un référentiel commun pour les souches ayant déjà été caractérisées et des travaux en cours, utilisant l'automate et les enzymes de restriction PvuII et PstI, visent à établir une éventuelle correspondance avec les sérotypes.

En conclusion, les deux types de méthodes, phénotypique et moléculaire, sont complémentaires et sont employées pour des objectifs différents. L'épidémiosurveillance s'effectue actuellement sur plus de 20 000 isolats d'origine humaine et sur un même volume d'isolats d'origine non humaine et utilise exclusivement les méthodes phénotypiques dont le sérotypage en priorité ; les investigations et enquêtes épidémiologiques dont le but est de relier plusieurs isolats entre eux, ou d'en exclure certains, utiliseront des méthodes complémentaires de caractérisation moléculaire.

#### IV - BIBLIOGRAPHIE

1. Anderson E.S., Ward L.R., De Saxe M.J. et De Sa J.D.H. ~ Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg.*, 1977, **78**, 297-300.
2. Barker R.M., Kearney G.M., Nicholson P., Blair A.L., Porter R.C. et Crichton P.B. ~ Types of *Salmonella paratyphi* B and their phylogenetic significance. *J. Med. Microbiol.*, 1988, **26**, 285-293.
3. Bouvet P. ~ Bulletin trimestriel du Centre de Référence des *Salmonella* et *Shigella* : les points essentiels pour 2000, Centre National de Référence des *Salmonella* et *Shigella*, Institut Pasteur, Paris, France, 2001.
4. Brisabois A., Goulet Ph. ~ Isolation and characterization of carboxylesterase E3 from *Salmonella enterica*, *J. Appl. Bacteriol.*, 1993, **75**(2), 176-183.
5. Brisabois A., Frémy S., Gauchard F., Goncalves M., Lailler R., Moury F., Oudart C., Piquet C. et Pires Gomes C. ~ Inventaire des *Salmonella* année 2000, 122 pages, ed AFSSA, sous presse, 2001.
6. Callow B.R. ~ A new phage typing scheme for *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg.*, 1959, **57**, 346-359.
7. Cordano A.M., Richard C. et Vieu J.F. ~ Biotypes de *Salmonella typhimurium*. Enquête sur 513 souches isolées en France en 1969-1970. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 1971, **121**, 473-478.
8. Dauga C., Zabrovskaia A. et Grimont P.A.D. ~ Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**, 2835-2843.
9. Descamp P., Véron M., Le Minor L. et Bussière J. ~ Phénotypes et marqueurs épidémiologiques de *Salmonella typhimurium*. *Revue Epidémiologique et Santé Publique*, 1982, **30**, 423-435.
10. Giovannacci I., Queguiner et al. ~ Tracing of *Salmonella* spp. in two pork slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, **90**(1), 131-147.

11. Grimont F. et Grimont P.A.D. ~ Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur/ Microbiology*, 1986, **137B**, 165-175.
12. Grimont P.A.D., Bouvet P. ~ Inventaire 2000 Centre National de Référence des *Salmonella* et *Shigella*, souches de *Salmonella* et *Shigella* isolées en France, 65 pages, 2001.
13. Hilton A.C., Banks J.G. et Penn C.W. ~ Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella*: strain differentiation and characterization of amplified sequences. *J. Applied Bacteriol.*, 1996, **81**, 575-584.
14. Hulton C.S., Higgins C.F. et Sharp P.M. ~ ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.*, 1991, **5**, 825-834.
15. Hunter P.R. and Gaston M.A. ~ Numerical index of a discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, **26**, 2465-2466.
16. Kauffmann F. ~ Serological Diagnosis Species, Munksgaard, Copenhagen, 1972.
17. Kerouanton A., Brisabois A., Grout J. and Picard B. ~ Molecular epidemiological tools for *Salmonella* Dublin typing. FEMS, Microbiology letters, 1996, **14**, 25-29.
18. Lailler R., Grimont F., Jones Y., Sanders P., Brisabois A. ~ Subtyping of *Salmonella* Typhimurium by pulsed field gel electrophoresis and comparaison with phage types and resistance type. Pathologie Biologie, sous presse.
19. Le Minor L. et Popoff M.Y. ~ Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 146 pages, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Paris, 1987.
20. Millemann Y., Lesage M.C., Chaslus Dancla E. and Lafont J.P. ~ Value of plasmid profiling, ribotyping and detection of IS200 for tracing isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 173-179.
21. Murase T., Okitsu T. et al. ~ Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for *Salmonella* infections. *Microbio. Immunol.*, 1995, **39**(9), 673-676.
22. Oscar T.P. ~ Identification and characterization of *Salmonella* isolates by automated ribotyping. *J. Food. prot.*, 1998, **61**(5), 519-524.
23. Popoff M.Y., Bockemühl J. et Whorter-Murlin A. Mc. ~ Supplement 1990 (no. 34) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.*, 1991, **142**, 1029-1033.
24. Popoff M.Y. and Minor L. ~ Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*, 151 pages, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris. France, 1997.
25. Selander R.K., Beltran P., Smith N.H., Backer R.M., Crichton P.B., Old D., Musser J.M. et Whittam T.S. ~ Genetic population structure, clonal phylogeny, and pathogenicity of *Salmonella paratyphi* B. *Infect. Immun.*, 1990, **58**, 1891-1901.
26. Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N. et Whittam T.S. ~ Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, **51**, 873-884.
27. Stanley J., Jones C.S. and Threlfall E.J. ~ Evolutionary lines among *Salmonella enteritidis* phage types are identified by insertion sequence IS2000 distribution. FEMS Microbiol. Lett., 1991, **82**, 83-90.
28. Threlfall E.J., Rowe B. et Ward L.R. ~ Subdivision of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid profile typing. *Epidemiol. Infect.*, 1989, **102**, 459-465.
29. Threlfall E.J., Frost J.A., Ward L.R. et Rowe B. ~ Plasmid profil typing can be used to subdivide phage-type 19 of *Salmonella typhimurium* in outbreak investigations. *Epidemiol. Infect.*, 1990, **104**, 243-251.
30. Ward L.R., De Sa J.D.H. and Rowe B. ~ A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol. Infect.*, 1987, **99**, 291-294.

