

# Une base de données moléculaires partagée au service de la surveillance de *Listeria monocytogenes* dans la chaîne alimentaire en France

Benjamin Felix (1) (benjamin.felix@anses.fr), Damien Michelon (1), Bertrand Lombard (1), David Albert (1), Léna Barre (1), Carole Feurer (2), Sophie Roussel (1)

(1) Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Unité *Salmonella-E. coli- Listeria* (SEL), Maisons-Alfort, France  
(2) Ifip, Institut du Porc, Maisons-Alfort, France

## Résumé

*Listeria monocytogenes* (*Lm*) est une bactérie ubiquitaire responsable d'une infection rare mais grave: la listériose. Transmise par la consommation d'aliments contaminés, la listériose s'avère mortelle dans 20 à 30 % des cas. Elle touche principalement les personnes immunitairement affaiblies. De ce fait, la surveillance des souches isolées de la chaîne alimentaire et de l'environnement de production est essentielle. Un dispositif efficace de surveillance sanitaire de la chaîne alimentaire nécessite la centralisation de données de qualité et la production d'informations utiles et accessibles. L'Anses, au titre de ses mandats de Laboratoire de référence national (LNR) et de l'Union européenne (LRUE) pour *Lm*, fournit un appui scientifique et technique en amont de cette collecte de données. Elle assure notamment l'harmonisation des méthodes de typage des souches isolées de la chaîne alimentaire, l'organisation de formations et d'essai inter-laboratoires d'aptitude pour les laboratoires des réseaux français et européen. En France, dans le cadre de l'unité mixte technologique (UMT) Armada, l'Anses et l'Institut du Porc (Ifip) ont travaillé depuis quatre ans au développement d'une base de données nationale pour la centralisation et le partage des données épidémiologiques et génétiques des souches détenues par les deux organismes. A terme, elle sera partagée avec quatre autres instituts techniques français ainsi que les laboratoires de l'Anses impliqués dans la surveillance de *Lm*. Cette base de données est interconnectée avec le système de base de données européen mis en place par le LRUE et l'Autorité européenne de sécurité des aliments et permet la remontée au niveau européen des données collectées au niveau national. La base de l'UMT Armada contient actuellement 1 200 souches typées par PFGE, partageant 256 profils combinés Apal/Ascl. Cet outil permet une surveillance plus fine des souches circulant en France dans les différentes filières alimentaires.

## Mots-clés

Base de données, PFGE, *Listeria monocytogenes*, surveillance moléculaire

## Abstract

### **A shared molecular database for the surveillance of *Listeria monocytogenes* in the food chain in France**

*Listeria monocytogenes* (*Lm*) is a ubiquitous bacterium responsible for a rare but serious infection: listeriosis. Transmitted through the consumption of contaminated food, listeriosis is fatal in 20% to 30% of cases. It mainly affects people with a weakened immune system. Therefore, the surveillance of strains isolated from the food chain and the environment is essential. An effective food chain surveillance system requires the centralisation of high-quality data and the production of useful and accessible information. ANSES, under its mandates as National Reference Laboratory (NRL) and European Union Reference Laboratory (EURL) for *Lm*, provides scientific and technical support prior to this data collection. In particular, it harmonises typing methods for strains isolated from the food chain, and organises training and inter-laboratory proficiency tests for laboratories in the French and European networks. In France, as part of the ARMADA Joint Technological Unit (UMT), ANSES and the French Pork and Pig Institute (IFIP) have been working for four years on the development of a national database for the centralisation and sharing of epidemiological and genetic data on the strains held by the two organisations. Over time, it will be shared with four other French technical institutes and the ANSES laboratories involved in *Lm* surveillance. This database is interconnected with the European database system developed by the EURL and the European Food Safety Authority, which makes it possible to report data collected nationwide at European level. The database of the ARMADA UMT currently contains 1,200 strains typed by PFGE, sharing 256 combined Apal/Ascl profiles. This tool is enhancing the surveillance of strains circulating in the various food sectors in France.

## Keywords

Database, PFGE, *Listeria monocytogenes*, Molecular surveillance

Dans cet article, est décrit le mode de fonctionnement et les fonctionnalités d'un outil de collecte de données de typage moléculaire, utilisé pour:

- améliorer nos connaissances de la structure des populations de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) circulant en France,
- la surveillance de cet agent pathogène au niveau national.

## Listeria et listériose, rappels

*Lm* est une bactérie de l'environnement responsable de la listériose. Cette infection se caractérise par: i) la gravité de la symptomatologie, ii) la létalité élevée de la maladie allant de 20 à 30 % des cas, et iii) l'atteinte prioritaire de sujets immunitairement déficients, des femmes enceintes et de leurs enfants (Tourdjman *et al.*, 2014). La listériose se contracte par consommation d'aliments contaminés. Les contaminations des aliments peuvent provenir de la matière première animale ou végétale, ou de l'environnement de transformation et de distribution des aliments (bactéries dites « résidentes »). *Lm* est

capable de persister dans les produits, tout au long de la chaîne alimentaire, de se multiplier aux températures de réfrigération, de résister aux procédures de nettoyage et de désinfection, et de contaminer les ateliers de transformation de produits alimentaires. Les principales filières alimentaires font l'objet d'une surveillance, en particulier la filière porc, touchée par plusieurs crises sanitaires liées à *Lm* (Giovannacci *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2007).

La réglementation française implique le retrait du marché des aliments contaminés par des concentrations supérieures à 100 ufc/g, ou des aliments contaminés par des teneurs inférieures mais permettant la croissance de *Listeria*, jusqu'à des valeurs supérieures à 100 ufc/g en fin de durée de vie. Le nombre élevé de cas sporadiques en France (Tourdjman *et al.* 2014) incite à approfondir les connaissances des souches circulantes et de leurs réservoirs.

L'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) reste jusqu'à présent la méthode de référence en France et à l'étranger pour la surveillance des souches cliniques et alimentaires de *Lm* (Tourdjman *et al.*, 2014). Les

méthodes fondées sur le séquençage du génome complet des souches (« whole genome sequencing » (WGS)) devraient, dans un très proche avenir, remplacer la PFGE. Toutefois le typage par WGS n'est pas encore utilisé en routine par l'ensemble des laboratoires impliqués dans la surveillance de cette bactérie.

L'espèce *Lm* est divisée en quatre lignées phylogénétiques, et se découpe en treize sérotypes distincts. Deux de ces lignées et quatre de ces sérotypes sont principalement associés à la listériose humaine: 4b, 1/2b (lignée I), 1/2a et 1/2c (lignée II). La diversité génétique de l'espèce a été ces dernières années largement étudiée, notamment par le groupe de recherche de l'Institut Pasteur (CNR et CC OMS pour *Listeria*) grâce à la technique MLST (Multi Locus Sequence Typing). (Ragon *et al.*, 2008). Elle permet de caractériser les souches en fonction de leur « séquence type » (ST) obtenu à partir du séquençage de sept gènes de ménage. Les ST peuvent être regroupés par complexe clonal (CC). Le CC est composé d'un groupe de STs ayant au moins six allèles en commun (Ragon *et al.*, 2008). Ces données de MLST sont devenues la base d'une nomenclature de référence française et internationale. Elles sont désormais indispensables pour analyser la structure des populations mais aussi pour échanger dans le cadre de la surveillance. Certains complexes clonaux (CC1, CC2, CC4 et CC6) sont fréquemment retrouvés dans les cas de listériose humaine en France et dans le monde (Ragon *et al.*, 2008; Chenal-Francisque *et al.*, 2011). Les souches de ces complexes clonaux ont récemment été reconnues comme hyper-virulentes, avec une capacité particulière à s'attaquer au cerveau et au fœtus, alors que d'autres souches de CCs telles que les CC9 et CC121 sont très peu ou pas du tout virulentes (Maury *et al.*, 2016).

Dans le cadre de leurs mandats, le laboratoire de référence de l'Union européenne (LRUE *Lm*)<sup>(1)</sup> et laboratoire national de référence (LNR)<sup>1</sup> pour *Lm* disposent d'une collection exceptionnelle de par sa taille (plus de 10000 souches dont 3000 ont été typées par PFGE) et de par la diversité des souches de terrain qu'elle contient (filière alimentaire variées, isolées sur plus de 20 ans). Ces souches ont été reçues dans le cadre d'autocontrôles, de plan de surveillance nationaux et européens (Roussel *et al.* 2012, Roussel *et al.* 2014), ou de projets de recherche menés en collaboration avec l'Inra, les centres techniques et les LNR européens. Une partie de la collection a été caractérisée au niveau génotypique, par sérotypage et par PFGE (Félix *et al.*, 2012a,b, 2013; Michelin *et al.*, 2014; Roussel *et al.*, 2014). Certaines souches ont également été caractérisées au niveau phénotypique (résistance aux antibiotiques, résistance des souches à survivre aux conditions extrêmes, capacité à former des biofilms, virulence).

L'information issue de ces collections a été structurée au sein de bases de données moléculaires partagées, en concertation avec l'ensemble des partenaires. En 2012, dans le cadre des activités du LRUE *Lm*, une base partagée avec les LNR européens, l'« EURL *Lm* DB », a été mise en place. Les différentes étapes de développement de cet outil, ainsi que son fonctionnement sont décrits en détails dans deux articles publiés en 2014 (Félix *et al.*, 2014 et 2015). Cette expertise a permis de mettre en place sur le même schéma, une base de données nationale lors d'un projet d'une durée de cinq ans mené en étroite collaboration avec l'Institut du porc (Ifip), dans le cadre d'une unité mixte technologique (UMT) Armada. Cette base est partagée entre les différents acteurs de l'UMT qui seront les utilisateurs de cet outil: les instituts techniques agro-industriels (ITAI) français (Ifip, Aériel, Actalia La Roche sur Foron et Adria Développement) et trois laboratoires de l'Anses (Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Laboratoire de sécurité des aliments, sites de Boulogne-sur-mer et de Maisons-Alfort). Cet outil a pour objectif de centraliser les principaux profils moléculaires de *Lm* circulant en France dans les différentes filières alimentaires.

Dans cet article, nous décrivons la base de données de l'UMT Armada, en particulier son fonctionnement et les données contenues. Enfin, nous illustrons les possibilités d'utilisation de cette base en donnant quelques exemples.

1. Activités scientifiques et techniques portées par l'équipe *Listeria* de l'unité SEL (*Salmonella-E. coli-Listeria*) du Laboratoire de sécurité des aliments (LSA), site de Maisons-Alfort, de l'Anses.

## Encadré.

### Objectifs

La base de l'UMT Armada permet aux instituts techniques agro-industriels (ITAI) et aux professionnels de l'agro-alimentaire de mettre en commun, avec l'Anses, les profils moléculaires de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) collectés au niveau national pour tracer et détecter les sources de contamination sur les chaînes de production. De ce point de vue, la base de données sera utilisée comme un outil d'aide pour la définition d'action de prévention des contaminations. Les profils soumis seront facilement partageables et validés en qualité du fait des critères de validation appliqués aux données soumises. Cela permettra la disponibilité immédiate des données de typages en cas de besoin.

### Obligation réglementaire

La soumission, dans la base de données de l'UMT Armada, des profils moléculaires des souches et des informations épidémiologiques associées se fait sur la base du volontariat. Le LNR soumet les profils moléculaires des souches issues des plans de contrôles et de surveillance réalisés par les administrations de contrôles comme décrit par Roussel *et al.* (2012). Les ITAI soumettent les profils des souches issues de leur collection, pour la plupart isolées lors d'études spécifiques.

### Protocole

La base de données de l'UMT Armada centralise les profils moléculaires de PFGE de souches de *Lm* et les informations épidémiologiques qui leurs sont associées. Elle permet aux utilisateurs d'avoir accès aux données tout en conservant anonyme l'appartenance des souches et leur origine géographique d'isolement comme décrit dans Félix *et al.* (2014; 2015; 2016). La consultation des données permet, par exemple, de comparer un profil moléculaire avec ceux de la base de données. La validation des données soumises est réalisée au niveau européen puis retransmise au niveau national via un système de synchronisation en cascade avec la base de l'UMT Armada et la base de données des ses utilisateurs.

La base de l'UMT Armada contient actuellement les données de typage des souches de l'Ifip et de l'Anses, et sera accessible aux laboratoires de l'Anses de Ploufragan-Plouzané, au Laboratoire de sécurité des aliments, site de Boulogne sur mer et de Maisons Alfort et quatre ITAI (Ifip, Aériel, Actalia La Roche sur Foron et ADRIA Développement)

### Définition du « cas »

La base de données rassemble les profils moléculaires et les informations épidémiologiques associées à des souches de *Lm* isolées de prélèvements animaux (portage asymptomatique ou cas de pathologie animale), d'aliments ou de l'environnement de production agro-alimentaire.

## Matériel et méthode

### Des méthodes de typage harmonisées entre les partenaires

Les activités menées par le LRUE ces dernières années ont largement contribué à renforcer les capacités de typage au sein du réseau de LNR, par le biais de formations régulières, de cours théoriques et pratiques, de rencontres annuelles et par des essais inter-laboratoires d'aptitude (EILA) (Félix *et al.*, 2012; Félix *et al.*, 2013). Cette expérience a contribué à la mise en place au niveau national, par le LNR français, de sessions de formation à la PFGE et à l'interprétation des profils, pour les différents partenaires de l'UMT Armada. De plus, les deux EILA organisés par l'Ifip, dans le cadre de l'UMT, ont permis de valider la compétence de typage des acteurs de l'UMT et d'améliorer la qualité des profils obtenus suite aux actions correctives mises en places.

### Une plateforme technique organisée et administrée par l'Anses

L'échange des données entre les différents utilisateurs se fait via un serveur web (BN Server Web Edition version 7 Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgique). Il permet la gestion simultanée de plusieurs réseaux de bases de données. Il gère actuellement l'EURL *Lm* DB et la base de l'UMT Armada.

L'Anses est administrateur de ces bases de données et est responsable de la validation des profils PFGE soumis dans l'EURL *Lm* DB. L'Anses

est également chargée de la conservation et de la pérennité des données soumises.

### **Qui peut soumettre des profils dans la base de données ?**

La soumission des profils moléculaires dans la base de l'UMT Armada s'effectue sur la base du volontariat. Les utilisateurs doivent avoir été au préalable: i) formés à la PFGE selon des protocoles standardisés (Roussel *et al.* 2014) et ii) évalués pour l'obtention de résultats satisfaisants lors de leur participation aux EILA que l'Ifip organise tous les deux ans. Par ailleurs, l'Ifip et l'Anses ont mis en place une charte d'utilisation de la base de données, dont les utilisateurs sont signataires. Cette charte décrit les conditions d'alimentation de la base de données par les utilisateurs et les conditions de mise à disposition des données de la base par l'Anses. La propriété et la confidentialité des données y sont également précisées.

Actuellement quatre ITAI (Ifip, Aerial, Actalia La Roche sur Foron et Adria Développement) et deux laboratoires Anses (Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Laboratoire de sécurité des aliments, sites de Boulogne sur mer et de Maisons-Alfort) peuvent utiliser la base de données de l'UMT Armada.

La base de données est suivie par un comité de pilotage composé par les membres fondateurs de l'UMT Armada (Anses, Ifip, Actalia La Roche sur Foron) et les administrateurs de la base de données.

### **Deux points clés : gestion des données sensibles et nomenclature**

Le numéro d'enregistrement de chaque souche est généré de façon aléatoire par le BN Server au moment de l'envoi des données (code d'identification unique constitué de 33 caractères alphabétiques) et sert d'identifiant dans la base de données. Les souches sont identifiées par deux autres champs: le premier contient l'identité de l'utilisateur, ayant envoyé les données, sous la forme d'un code numérique, le deuxième est le numéro de souche initialement attribué par l'utilisateur. Afin de garantir l'anonymat de l'utilisateur ayant fourni les données, les autres utilisateurs n'ont pas accès au code numérique qui permet son identification, ni au numéro de souche initial. De la même manière, les données géographiques peuvent être soumises mais ne sont pas visible aux autres utilisateurs. La nomenclature des pulsotypes est établie selon le format de pulsotype de PulseNet USA (Gerner-Smidt *et al.* 2006) identifié par l'étiquette « EU ». Par exemple, pour un profil *Ascl* « GX6A16.0001.EU », « GX6 » signifie *Lm*, « A16 » fait référence à l'enzyme de restriction *Ascl*, « 0001 » est le numéro du pulsotype et « EU » l'étiquette européenne. Chaque pulsotype est associé à des informations sur son occurrence dans l'ensemble de la base de données (ratio du nombre de souches appartenant au mêmes pulsotypes *Ascl* *Apal* sur la population totale de la base de données).

### **Une classification épidémiologique en accord avec l'Autorité européenne de sécurité des aliments (Efsa)**

Les données épidémiologiques associées sont enregistrées selon une classification détaillée (Figure 1), constituée de plusieurs champs consécutifs associés à des listes de choix prédéfinies dans le logiciel. La structure de cette classification épidémiologique repose sur l'ensemble de données requise par le système de déclaration épidémiologique de l'Efsa (EFSA, 2012). Cependant, pour simplifier l'utilisation, les données épidémiologiques contenues dans la base de données de l'UMT Armada ont été limitées à la classification des aliments généralement utilisée pour l'évaluation des risques liés à *Lm*.

Figure 1. Description standard des aliments utilisée dans la base de données de l'UMT Armada et correspondance automatique avec le schéma épidémiologique Foodex 2 (EFSA 2015).

Un système de conversion automatique des données épidémiologiques selon les descripteurs des échantillons utilisés au niveau européen par l'Efsa (Foodex2 (EFSA 2015) a été mis en place, en étroite collaboration avec l'Efsa. Ce système génère automatiquement un code et un descriptif standard à partir des descriptions de la base

de l'UMT Armada (par ex. A0EYM#F01.A057F Charcuterie meat products, SOURCE= Pig (live animals) correspond à ...). Ce système a été conçu pour pouvoir évoluer si de nouveaux termes sont ajoutés à la classification épidémiologique de la base de données de l'UMT Armada. Il anticipe la connexion de la base à la future base de données mise en place par l'Efsa et l'ECDC dont le pilote a été lancé en 2016 (Figure 1) (EFSA 2014).

### **Interconnexion des systèmes de base de données et validation des données de typage**

Les profils moléculaires des souches sont soumis par les membres de l'UMT Armada. Les profils sont ensuite envoyés vers une base de données européennes (EURL *Lm* DB jusqu'en 2017, puis sur la base de données Efsa par la suite (Encadré)). Ce système permet de regrouper les profils moléculaires disponibles au niveau national puis de les soumettre au niveau européen (Figure 2). La validation des profils de PFGE se fait au niveau européen, en commun avec les profils soumis par les autres LNR. Un système de synchronisation permet le retour des données de typage après validation (profils moléculaires modifiés, commentaires des évaluateurs et nomenclature). Toutes les modifications apportées par l'opérateur en charge de la validation et de l'intégration des profils dans la base de données sont tracées et peuvent être téléchargées par les utilisateurs pour ses propres profils. De ce fait, la base de l'UMT Armada télécharge régulièrement les données des profils validés qui ont été soumis à l'échelon européen. La synchronisation peut également se faire entre les profils présents dans la base des utilisateurs nationaux pour les profils soumis sur la base de données de l'UMT Armada (Figure 2).

### **Qu'est-ce qu'un curateur ?**

L'opérateur en charge de la validation de chaque nouveau profil moléculaire dans une base de données de typage est désigné par le terme « curateur » dérivé de l'anglais. Le curateur peut directement modifier les paramètres de traitement des images de gels ainsi que le marquage des bandes sur les profils. Chaque profil est analysé et identifié selon un protocole innovant d'interprétation des profils PFGE développé par le LRUE *Lm* (Felix *et al.* 2012), utilisé et valorisé par l'Efsa (Roussel *et al.* 2014). La curation se fait au moyen d'un système d'interprétation structuré en groupes d'identification. Les compétences techniques du curateur, en matière d'interprétation des gels PFGE, sont régulièrement mises à jour et vérifiées dans le cadre d'un processus d'évaluation interne qui détermine l'aptitude aux fonctions de curateur. Après traitement, le curateur note les profils comme suit: « confirmé » ou « non satisfaisant ». Dans le système actuel, l'interconnexion des bases de données permet une curation centralisée au niveau de l'EURL *Lm* DB, ce système sera transposé à la base de données Efsa en 2017.

### **La base de données, c'est aussi un outil consultable de façon illimitée**

Tous les profils PFGE disponibles dans la base de données de l'UMT Armada peuvent être comparés aux profils présents dans les bases de données des utilisateurs. Pour un profil PFGE donné, les utilisateurs ont accès aux informations suivantes: 1) sérotype, 2) matrice alimentaire, 3) date du prélèvement et 4) fréquence d'apparition du profil dans la base de l'UMT Armada.

La base de données contient également un sous ensemble de 167 souches qui ont été typées à la fois par PFGE et par Multi-Locus Sequence Typing (MLST). Les données de MLST sont disponibles dans deux champs dédiés correspondant au CC et au ST.

Dans un travail récemment publié par l'Anses et le DTU food (Henri *et al.* 2016), nous avons obtenu une bonne congruence (capacité d'une méthode à prédire le résultat d'une autre méthode), sur un panel de 396 souches entre les groupes PFGE à 80 % de similarité (groupe construit par la méthode construction de dendrogrammes UPGMA sur la base de la similarité moyenne des profils de restriction *Ascl* et *Apal*, coefficient de Dice, tolérance et optimisation fixées à 1 %) et les

STs. La base de données de l'UMT Armada contient un sous ensemble de 167 souches qui ont été typées à la fois par PFGE et par Multi-Locus Sequence Typing (MLST). Les données de MLST sont disponibles dans deux champs dédiés correspondant au CC et au ST.

Ce dictionnaire permet dorénavant aux utilisateurs d'avoir une indication du CC et du ST de certaines de leurs souches et ainsi de relier leurs résultats de PFGE à des données de MLST.

## Résultats

### Quelques chiffres clefs : contenu actuel de la base de données de l'UMT Armada

La base de données de l'UMT Armada rassemble les profils PFGE combinés de 1602 souches générés avec les enzymes de restriction *Ascl* et *Apal*. Parmi ces profils, 1136 ont été soumis au niveau européen. À ce niveau ils sont validés en qualité puis associés à un

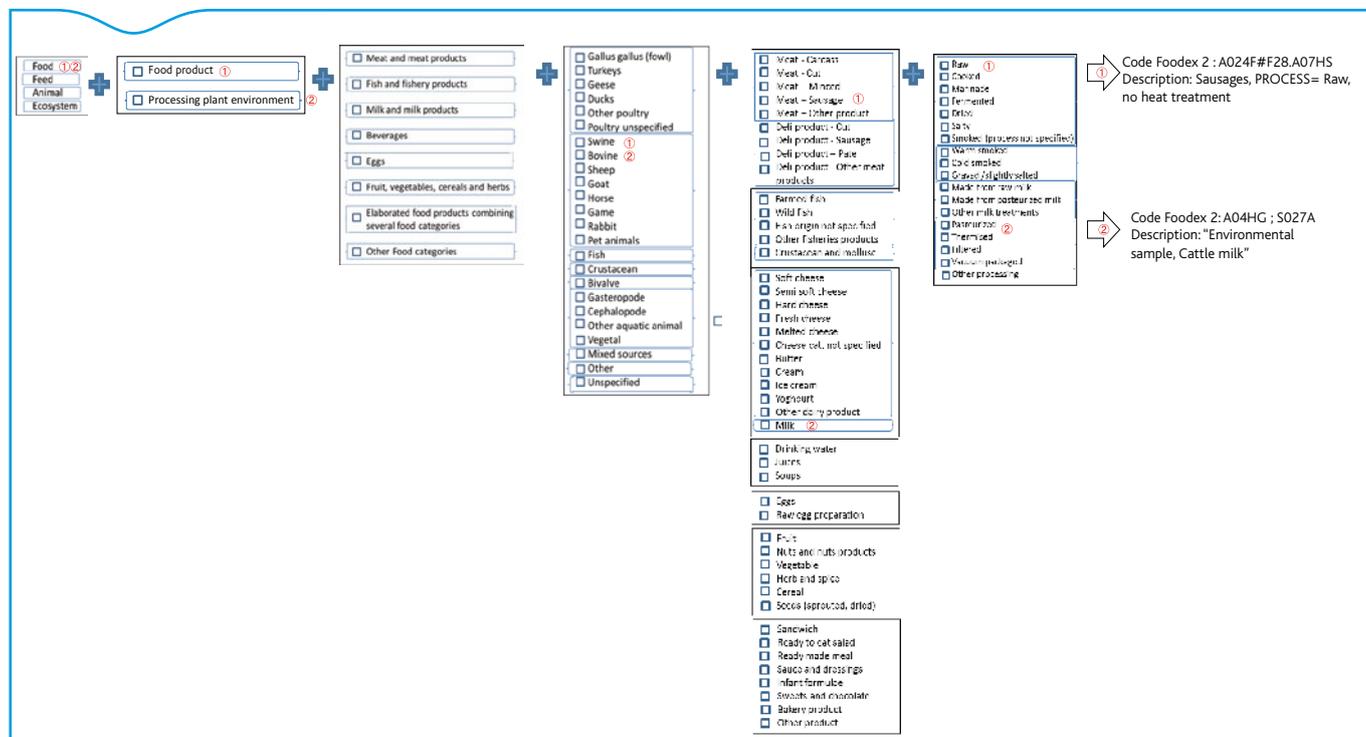


Figure 1. Description standard des aliments utilisée dans la base de données de l'UMT Armada et correspondance automatique avec le schéma épidémiologique Foodex 2 (Efsa 2015).

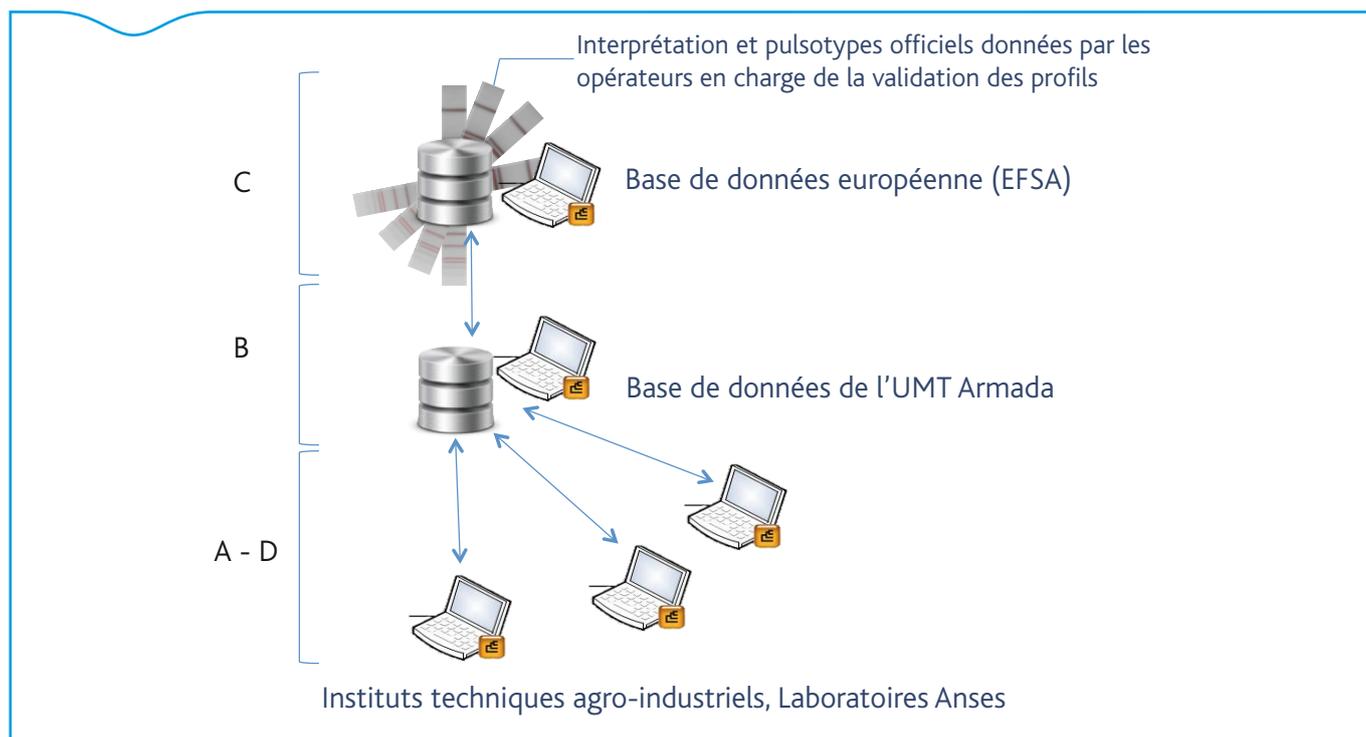


Figure 2. Flux des informations assurant (A) la soumission des profils moléculaires, (B) le partage des données entre les utilisateurs de la base de données de l'UMT Armada, (C) la curation des données au niveau Européen et (D) le retour des information de curation aux utilisateurs

numéro de pulsotype. Les autres profils sont en cours de validation. Parmi les profils déjà validés, les souches se répartissent par origine alimentaire: produits carnés (524 souches dont 241 isolées de produits à base de porc), produits laitiers (189 souches), produits de la pêche (179 souches), produits composés (produit élaboré combinant au moins deux produits d'origines alimentaires distinctes - 213 souches), végétaux (59 souches), prélèvements animaux et environnementaux non-alimentaires (45 souches).

Les profils validés rassemblent 93 profils soumis par l'IFIP, 1030 profils soumis par l'Anses et trois profils soumis par d'autres utilisateurs. Les profils de ces souches ont été subdivisés en groupes PFGE à 80 % de similarité. Les quatorze principaux groupes PFGE, représentent 86 % des profils soumis. Ils sont tous observés dans les quatre principales origines alimentaires. Ces groupes ont été associés à des complexes clonaux (Tableau 1).

## Discussions

### Exemple d'utilisation concrète de la base de l'UMT Armada

#### Comprendre la diversité des souches au sein d'une filière donnée.

L'UMT Armada a permis de renforcer les liens entre l'Ifip, le LSAL et le laboratoire Anses de Ploufragan-Plouzané. Ces trois entités ont récemment mis en commun leurs connaissances et leur savoir-faire afin de mieux apprécier la diversité des populations de souches de *Lm* isolées de la filière porc, de l'élevage au produit fini. Les données fournies par l'Anses de Ploufragan-Plouzané proviennent de deux études de terrains (Boscher *et al.* 2008, Kerouanton *et al.* 2011). Les données fournies par l'Ifip proviennent d'études spécifiques réalisées avec leurs partenaires professionnels. Les données fournies par le LSAL de Maisons-Alfort proviennent de plans de surveillance et de contrôle de la DGCCRF pour lesquels les souches ont été typées depuis 2005 au LNR, ainsi que des souches d'autocontrôles collectées entre 2003 et 2016. Grâce à la base de l'UMT Armada, il a été possible de rassembler, pour la première fois, les profils PFGE de plus de 900 souches circulant dans la filière porc, de l'élevage à la distribution. La mise en commun de ces souches issues de contexte d'isolement variés a permis d'étendre notre connaissance de la diversité génétique de *Lm* dans le temps et au niveau d'un nombre important de site de colonisation de cette bactérie dans la filière porc.

#### Exemple d'utilisation de la base de données de l'UMT Armada par les ITAI.

Pour un ITAI, la base de données de l'UMT Armada peut être utilisée au titre de la surveillance de *Lm* exercée par une entreprise cliente de l'institut. Cette surveillance peut s'exercer au sein de ses ateliers d'abattage, de découpe ou de fabrication de produits transformés. Cela permet à l'entreprise de caractériser la diversité des souches circulantes dans l'environnement de ses ateliers et de relier cette diversité à celle de souches isolées de matières premières ou de produits finis, afin de mieux tracer les origines de contamination des pièces de découpe/produits finis. L'utilisation de la base de données multi-filières permet à l'entreprise de visualiser la fréquence d'observation des profils PFGE de ses souches et de comparer cette fréquence à celle de sa filière d'activité mais aussi pour les autres filières alimentaires. Cela peut aussi lui permettre d'évaluer la dangerosité des souches qu'elle isole. L'hypervirulence de certains CC étant décrite, il est possible de prédire le CC à partir du profil PFGE et d'obtenir cette information.

La base de l'UMT Armada peut également être utilisée dans le cadre d'investigation d'incidents de contamination dans un site de production. Dans la mesure où l'entreprise exerce une surveillance de *Lm* dans ses ateliers au jour le jour, la mise en évidence d'un produit contaminé sur une ligne de production sera plus vite reliée à une origine de contamination (matériel, matières premières), en croisant les données de typage contenues dans la base. L'entreprise pourra alors maîtriser plus rapidement la dissémination de cette contamination et dans certains cas, pourra remonter au(x) fournisseur(s) de matières premières contaminées.

## Encadré. Le devenir l'EURL Lm DB

L'EURL *Lm* DB fait partie intégrante du dispositif de surveillance de *Listeria* au niveau national et européen. Elle est considérée aujourd'hui comme un outil de surveillance européen des clones circulants. Elle peut être sollicitée par les LNR européens pour orienter leurs investigations vers une filière alimentaire ou une catégorie de produit. Cependant elle n'a pas vocation à être utilisée en dehors d'un cas de suspicion d'épidémie internationale.

Le développement de cette base a permis au laboratoire et à l'Anses d'asseoir son expertise et de pouvoir se positionner auprès des acteurs clés impliqués dans la surveillance de *Lm* au niveau: i) européen, (ECDC, Efsa, SSI), ii) États-Unis (CDC) et iii) international (PulseNet international).

La base de données mise en place par l'Efsa et l'ECDC, actuellement en phase pilote, devrait être opérationnelle en 2017 (EFSA 2014). Elle contiendra tous les profils de souches alimentaires, animales et environnementales, ainsi que ceux des souches humaines de *Lm*, *Salmonella* et *VTEC*. Elle se substituera donc à l'EURL *Lm* DB pour la collecte des données de typage d'origine non humaine. Les utilisateurs de l'EURL *Lm* DB récupéreront les données relatives à leurs profils moléculaires par synchronisation. Ils installeront ensuite les fonctionnalités de la base de données EFSA-ECDC et soumettront les profils moléculaires de leurs souches. La base de données EFSA-ECDC a été développée pour conserver les mêmes fonctionnalités que l'EURL *Lm* DB, notamment en permettant la synchronisation des profils après curation. L'équipe de curation de l'EURL *Lm* DB fera partie intégrante du comité de pilotage de la base de données EFSA-ECDC et sera en charge de la curation des données relatives à *Lm* d'origine non humaine, dans ce nouveau dispositif.

Au niveau français, les autorités compétentes (DGAI, DGCCRF et DGS) doivent nommer le laboratoire responsable d'effectuer la soumission des données françaises de typage moléculaire dans la base de données EFSA-ECDC. Les LNR sont les laboratoires identifiés pour cette tâche. Une des perspectives possible est de permettre le regroupement et la soumission de toutes les données de typages nationales des utilisateurs de la base de l'UMT Armada.

**Tableau 1. Répartition des principaux groupes PFGE par rapport aux principales origines alimentaires des souches soumises sur la base de données de l'UMT Armada par l'Anses et l'Ifip**

Groupe PFGE*	Produits de la pêche	Produits laitiers	Produits composés	Produits carnés	Total	Complexes clonaux MLST deduis du PFGE
A	70	8	48	120	246	CC121
B	7	3	70	94	174	CC9
C	15	3	5	40	63	CC5
D	12	33	15	36	96	CC8
E	7	7	13	35	62	CC1
F	15	66	17	31	129	CC4
G	5	18	10	21	54	CC31
H	0	9	0	12	21	CC204
I	5	4	6	12	27	CC20
J	0	6	5	9	20	CC37
K	9	0	5	7	21	CC121
L	1	5	3	7	16	CC155
M	9	4	3	4	20	CC77 - CC54
N	11	2	8	4	25	CC14
<b>Total</b>	<b>166</b>	<b>168</b>	<b>208</b>	<b>432</b>	<b>974</b>	

\* groupe construit par UPGMA sur la base de la similarités moyenne des profils Ascl et Apal supérieure à 80 %, coefficient de Dice, tolérance et optimisation sont fixées à 1 %

Cette démarche peut également être utilisée pour évaluer l'efficacité des procédures de nettoyage et de désinfection des ateliers et des équipements sur les souches circulantes ou persistantes dans une entreprise.

## Perspectives

La surveillance de *Lm* exercée par les pouvoirs publics sur la chaîne alimentaire et dans la population française associe plusieurs acteurs dont les missions se complètent. L'utilisation de l'outil qu'est la base de l'UMT Armada par les acteurs pouvoirs publics ne pourra être faite que comme le prévoit l'article R201-11 du code rural. C'est-à-dire, lors d'une obligation de transmission d'échantillons ou de résultats d'analyse par les propriétaires et laboratoires d'analyses détenteurs de denrées alimentaires concernées par une enquête épidémiologique consécutive à une toxi-infection alimentaire. Il faudra par conséquent collaborer avec les producteurs et les ITAI qui leur sont associés pour avoir accès aux données soumises.

La base de l'UMT Armada a été conçue pour intégrer des types variés de données, notamment ceux issus des technologies de pointe telles que le séquençage de génome entier (WGS). Cette nouvelle technologie permet l'utilisation d'informations génétiques jusqu'alors inaccessibles. Elle augmente considérablement le pouvoir discriminant du typage. Elle permet également de s'affranchir d'artefacts génétiques inhérents aux méthodes basées sur l'analyse de profils moléculaires comme la PFGE. Le WGS promet donc une détection plus pertinente et plus poussée des épidémies. Plusieurs laboratoires européens et internationaux ont désormais recours aux techniques fondées sur le WGS pour le typage des souches cliniques et alimentaires. Les méthodologies utilisées diffèrent d'un laboratoire à l'autre (Moura *et al.* 2016; Hyden *et al.* 2016; Painset *et al.* 2016; Gerner-Smidt *et al.* 2016; Nielsen *et al.* 2016). Une limite actuelle du WGS est le traitement bio-informatique des données. Aux États-Unis où le typage WGS se généralise, les équipements informatiques possédant la puissance de calcul nécessaire à l'analyse des données WGS sont hébergés par le laboratoire responsable de la surveillance (Jackson *et al.* 2016; Allard *et al.* 2016). Cela permet une analyse harmonisée des données pour les laboratoires utilisateurs nationaux. En France, cette solution pourrait être proposée par l'Anses pour l'évolution de la base de données de l'UMT Armada.

## Conclusion

La base de données de l'UMT Armada a permis d'encourager l'utilisation du typage moléculaire de *Lm* dans le réseau français. Le projet de développement de cette base de données a été proposé comme un projet innovant créé par l'Anses en collaboration étroite avec les acteurs nationaux de la filière agro-alimentaire, en particulier l'Ifip. Ce projet a contribué à l'établissement de l'interconnexion entre la base de données de l'UMT Armada et la base de données en cours de développement par l'Efsa et l'ECDC.

Il a été convenu avec les utilisateurs de la base de données que la validation des profils soit faite au niveau européen, afin de permettre la remontée des données de typage dans le système européen de surveillance. Au niveau national, la base de données de l'UMT Armada ne pourra être sollicitée par l'administration que dans le cadre d'une demande officielle de transmission d'information par les producteurs comme précisé dans l'article R201-11 du code rural. Au-delà de l'harmonisation des méthodes de typage, l'utilisation conjointe d'un système de base de données permet de fédérer les acteurs de la surveillance de *Lm* au niveau national et européen.

## Références bibliographiques

Allard, M.W., Strain, E., Melka, D., Bunning, K., Musser, S.M., Brown, E.W., Timme, R. (2016). Practical value of Food Pathogen Traceability through building a Whole-Genome Sequencing Network and database. *J Clin Microbiol.* 54(8):1975-83.

EFSA (2015). The food classification and description system FoodEx2 (revision 2), supporting publication, ed. (EFSA).

EFSA (2014). Technical specifications for the pilot on the collection of data on molecular testing of food - borne pathogens from food, feed and animal samples, supporting publication, ed. (EFSA).

EFSA (2012). Manual for reporting of food-borne outbreaks in accordance with Directive 2003/99/EC from the year 2011, supporting publication, ed. (EFSA).

Félix, B., Brisabois, A., Dao, T.T., Lombard, B., Asséré, A., Roussel, S. (2012). The use of Pulsed Field Gel Electrophoresis in *Listeria monocytogenes* sub-typing: harmonization at the European Union level. In *Gel Electrophoresis: Principles and Basics*, INTECH, ed. (Rijeka, Croatia), 241-254.

Félix, B., Danan, C., Van Walle, I., Lailier, R., Texier, T., Lombard, B., Brisabois, A., Roussel, S. (2014). Building a molecular *Listeria monocytogenes* database to centralize and share PFGE typing data from food, environmental and animal strains throughout Europe. *J Microbiol Met* 104C, 1-8.

Felix, B., Roussel, S., Pot, B. (2015). Harmonization of PFGE profile analysis by using bioinformatics tools: example of the *Listeria monocytogenes* European Union Reference Laboratory network. *Methods Mol Biol* 1301, 9-28.

Félix, B., Michelon, D., Prenom, C., Robieu, E., Roussel, S., and Feurer, C. (2016). Une base de données de typage partagée pour la surveillance de *Listeria monocytogenes* Les Cahiers de l'IFIP 2, 1-6.

Gerner-Smidt, P., Hise, K., Kincaid, J., Hunter, S., Rolando, S., Hyytia-Trees, E., Ribot, E.M., and Swaminathan, B. (2006). PulseNet USA: a five-year update. *Foodborne Pathog Dis* 3, 9-19.

Gerner-Smidt, P. (2016). Whole genome sequencing-based surveillance of listeriosis in the United States. Paper presented at: ISOPOL XIX Problems of Listeriosis (Paris).

Hyden, P., Grim, C., Pietzka, A., Lennkh, A., Blaschitz, M., Indra, A., Sensen, C., Allerberger, F., Rattei, T., and Ruppitsch, W. (2016). Comparison of SNP based and cgMLST based typing of *Listeria monocytogenes* isolates from Seeliger's historical "Special *Listeria* Culture Collection". Paper presented at: ISOPOL XIX Problems of Listeriosis (Paris).

INVS Santé publique France, site web: <http://www.invs.sante.fr/fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Listeriose/Donnees-epidemiologiques>.

Jackson, B.R., Tarr, C., Strain, E., Jackson, K.A., Conrad, A., Carleton, H., Katz, L.S., Stroika, S., Gould, L.H., Mody, R.K., Silk B.J., Beal J., Chen Y., Timme R., Doyle M., Fields A., Wise M., Tillman G., Defibaugh-Chavez S., Kucerova Z., Sabol A., Roache K., Trees E., Simmons M., Wasilenko J., Kubota K., Pouseele H., Klimke W., Besser J., Brown E., Allard M., Gerner-Smidt P (2016). Implementation of Nationwide Real-time Whole-genome Sequencing to Enhance Listeriosis Outbreak Detection and Investigation. *Clin Infect Dis.* 63(3):380-6.

Michelon, D., FelixFélix, B., Vingadassalon, N., Mariet, J.F., Larsson, J.T., Moller-Nielsen, E., Roussel, S. 2015. PFGE standard operating procedures for *Listeria monocytogenes*: harmonizing the typing of food and clinical strains in Europe. *Foodborne Pathog Dis* 12, 244-252.

Moura, A., Leclercq, A., Bracq-Dieye, H., Thouvenot, P., Vales, G., Maury, M., De Valk, H., Criscuolo, A., Enouf, V., Brisse, S., et al. (2016). Genome-based surveillance of *Listeria monocytogenes* in France in 2015. Paper presented at: ISOPOL XIX Problems of Listeriosis (Paris).

Nielsen, E.M., Björkman, K., Sørensen, G., Jensen, A.K., Lassen, S.G., Müller, L., K. Kiil, K., Ethelberg, S., Baggesen, D.L. (2016). Whole-genome sequencing of *Listeria monocytogenes* enhances outbreak detection and linking to food sources. Paper presented at: ISOPOL XIX Problems of Listeriosis (Paris).

Painset, A., Swift, C., Amar, C., Grant, K., and Dallman, T.J. (2016). Whole Genome Sequencing for Routine Surveillance of *Listeria*. Paper presented at: ISOPOL XIX Problems of Listeriosis (Paris).

Roussel, S., Michelon, D., Lombard B., Lailier R. (2014). Molecular typing of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, feed and animals: state of play and standard operating procedures for pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing, profile interpretation and curation, supporting publication, ed. (EFSA).

Roussel, S., Leclercq, A., Santolini, J., Agbessi, A., Chenal-Francois, V., Lailier, R., Lecuit, M., Pihier, N., and Brisabois, A. (2012). Surveillance des *Listeria monocytogenes* dans les aliments. *Bull. Epid. Santé Anim. Alim.* 50, 51-56.

Roussel, S., Felix, B., Agbessi, A., Dao, T.T., Grout, J., Vingadassalon, N., Lombard, B., and Brisabois, A. (2014). Caractérisation moléculaire des souches de *Listeria monocytogenes* isolées en France, dans le cadre d'une enquête de prévalence communautaire ciblant certaines denrées alimentaires prêtes à être consommées. *Bull. Epid. Santé Anim. Alim.* 61, 5-8.

Tourdjman M., Laurent E., Leclercq A., 2014. Listeriose humaine: une zoonose d'origine alimentaire. *Rev Franc Lab*, 464, 37-44.