

CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DE LA PESTE ET AUTRES YERSINIOSE

Bilan des activités 2006 - 2010

Responsables scientifiques

- Elisabeth Carniel : Directeur du CNR et du Centre OMS,
Chef d'Unité
Téléphone: (33-1)-45-68-83-26
Fax: (33-1)-45-68-89-54
E-mail: elisabeth.carniel@pasteur.fr
- Anne Sophie Le Guern : Directeur adjoint du CNR,
Téléphone: (33-1)-45-68-83-29
Fax: (33-1)-45-68-89-54
E-mail: anne-sophie.le-guern@pasteur.fr
- Cyril Savin : Coordinateur du Réseau national de Surveillance des *Yersinia*,
Ingénieur épidémiologiste
Téléphone: (33-1)-40-61-37-67
Fax: (33-1)-45-68-89-54
E-mail: cyril.savin@pasteur.fr

1 - Présentation des *Yersinia*

Le genre *Yersinia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et est composé de 17 espèces. Seules trois d'entre elles sont pathogènes pour l'homme : *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*. Ces espèces pathogènes peuvent cependant être différenciées en deux groupes radicalement distincts du point de vue de leur répartition géographique, cycle épidémiologique, manifestations cliniques et gravité de l'infection : *Y. pestis* d'une part, et *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* d'autre part.

1.1 *Y. pestis*, l'agent de la peste

Malgré des progrès considérables obtenus au 20^{ème} siècle dans la prévention et le traitement de cette maladie, la peste n'a pu être éradiquée. Plus de 50 000 cas humains de peste ont été déclarés à l'Organisation Mondiale de la Santé depuis le début des années 90 par 26 pays. L'Afrique est le continent le plus touché, suivi par l'Asie puis par l'Amérique. La maladie ne se limite pas uniquement aux pays en voie de développement et touche notamment l'Ouest des États-Unis. L'augmentation récente et importante du nombre de cas humains, l'extension des foyers existants, et la réapparition de la peste dans des régions indemnes depuis plusieurs décennies (comme très récemment en Algérie et en Libye) font que cette maladie est considérée comme ré-émergente.

La peste est une zoonose, transmise de rongeur à rongeur par piqûre de puce. L'homme se contamine le plus souvent après piqûre par une puce de rongeur infecté et développe alors une peste bubonique. En absence de traitement, l'issue est mortelle dans 40 à 70% des cas, le plus souvent en moins d'une semaine. Il arrive parfois que le bacille pesteux envahisse les voies aériennes supérieures, causant alors une pneumopathie. La transmission inter-humaine de la peste peut ensuite se produire par voie aérienne directe, à partir des aérosols émis lors de la toux. L'évolution naturelle de la peste pulmonaire se fait systématiquement vers la mort, en moins de trois jours. Les traitements antibiotiques, pour être actifs, doivent être administrés pratiquement avant la phase d'état de la maladie, c'est-à-dire avant même que le diagnostic clinique et biologique ne soit porté.

Il n'existe plus de foyer naturel de peste en France (derniers cas à Paris en 1920 et en Corse en 1945). Cependant, la possibilité de cas importés par l'intermédiaire de rongeurs infectés ou de sujets en phase d'incubation provenant d'une zone d'endémie est toujours envisageable et doit être immédiatement contrôlée. Outre le problème de santé publique que pose la peste dans différents pays et le risque de cas importés en France, cette maladie représente aussi une menace pour l'ensemble du globe car son agent causal fait partie de l'arsenal microbiologique potentiellement utilisable au cours de conflits armés ou à des fins bioterroristes.

Face à ces menaces potentielles naturelles ou intentionnelles, il est essentiel de diagnostiquer la maladie le plus rapidement possible, de disposer de traitements efficaces pour les personnes infectées et de moyens prophylactiques adaptés pour les populations exposées.

1.2 *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*, deux espèces entéropathogènes

Les infections à *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* sont fréquentes dans tous les pays tempérés et froids et notamment en France. En Europe, les réservoirs sont en premier lieu le porc, mais aussi les bovins, ovins et caprins, ainsi que de nombreuses espèces sauvages (rongeurs, lièvres, oiseaux, etc.). L'environnement est contaminé par l'intermédiaire des déjections de ces animaux infectés.

La transmission à l'homme se fait soit indirectement par l'ingestion d'aliments contaminés, soit par contact direct avec un animal infecté. Une transmission inter-humaine manu portée peut ensuite avoir lieu. La maladie survient généralement sous forme de cas sporadiques ou de petites épidémies familiales. Les épidémies d'une certaine ampleur, rares en France, sont observées en Europe du Nord, Russie, États Unis ou Japon.

Y. pseudotuberculosis est typiquement responsable d'une adénite mésentérique se traduisant cliniquement par un syndrome pseudo appendiculaire. De nos jours, la pseudotuberculose est peu fréquente en France, mais revêt le plus souvent des formes sévères et généralisées.

Y. enterocolitica est l'espèce pathogène la plus fréquemment isolée en France. Elle provoque une entérite aiguë s'accompagnant de fièvre, diarrhées et douleurs abdominales, qui touche surtout les jeunes enfants. L'infection est le plus souvent modérée et spontanément résolutive, bien que des cas d'infections de longue durée avec altération importante de l'état général soient parfois observés. Ces infections sont par contre souvent sévères et invasives chez les personnes de plus de 60 ans.

Y. enterocolitica serait la troisième cause de diarrhées bactériennes dans la plupart des pays européens dont la France. Il est cependant difficile d'en estimer l'incidence réelle pour plusieurs raisons :

- Ces bactéries poussent difficilement et lentement sur les milieux usuels et sont facilement masquées par les autres germes présents dans un échantillon polymicrobien.
- Le milieu sélectif pour les *Yersinia* (Milieu CIN) est onéreux et n'est pas utilisé par tous les laboratoires.
- Ce milieu sélectif peut aussi inhiber la croissance de certaines souches de *Yersinia*, en particulier dans l'espèce *Y. pseudotuberculosis*.
- L'envoi des souches isolées au CNR n'est pas obligatoire.

Les souches reçues au CNR ne sont donc qu'un très faible reflet de la morbidité due à cette infection.

Hormis les infections digestives classiques, les *Yersinia* entéropathogènes peuvent poser des problèmes liés aux complications secondaires (polyarthrites réactionnelles et érythème noueux), à la gravité des cas survenant sur terrains fragilisés (thalassémie, immunodépression, cirrhose hépatique), à l'existence de formes pseudo tumorales, et à la survenue de cas de chocs septiques post-transfusionnels secondaires à une multiplication de *Y. enterocolitica* dans les concentrés globulaires.

1.3 Les autres *Yersinia*

Le genre *Yersinia* comprend par ailleurs les espèces *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. ruckeri*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. aleksiciae*, *Y. similis*, *Y. massiliensis*, et trois nouvelles espèces très récemment décrites : *Y. entomophaga*, *Y. nurmii* et *Y. pekkanenii*.

Deux d'entre elles sont pathogènes pour certains animaux : *Y. ruckeri* est un pathogène des poissons et *Y. entomophaga* des insectes.

Aucune de ces espèces n'est pathogène pour l'homme. Il en va de même des *Y. enterocolitica* du biotype 1A. Ces souches saprophytes, qui ne sont généralement qu'en simple transit dans le tube digestif, sont très fréquemment isolées d'aliments ou de selles humaines. Leur distinction des espèces pathogènes est donc essentielle, mais n'est pas toujours aisée par les méthodes d'identification couramment utilisées.

2 - Missions et objectifs principaux du CNR

L'activité du Centre National de Référence de la peste et autres yersiniose comprend entre autres, la caractérisation des souches reçues, le conseil aux cliniciens et acteurs de santé publique, l'envoi de documentation, l'enseignement, la surveillance épidémiologique, la participation à des enquêtes, le développement de nouveaux outils diagnostiques, et le maintien d'une expertise nationale sur la peste.

En plus de cette activité de référence proprement dite, notre centre a une activité de recherche portant sur l'étude des facteurs de pathogénicité des *Yersinia*, la caractérisation des mécanismes de résistance aux antibiotiques et de défenses immunitaires, et la génomique fonctionnelle comparative appliquée à ces espèces. L'ensemble de nos travaux sert au développement de nouvelles méthodes de diagnostic et de traçage épidémiologique, à la lutte contre certaines formes particulières de yersiniose, à l'amélioration de la taxonomie du genre *Yersinia*, au développement de vaccins, et d'un point de vue plus fondamental, à une meilleure connaissance des facteurs et des mécanismes responsables de la pathogénicité de ces bactéries.

3 - Techniques utilisées

3.1. Analyses bactériologiques

a) *Yersinia* entéropathogènes et espèces apparentées

Le CNR ne caractérise que les souches préalablement isolées par les laboratoires de bactériologie.

Cette caractérisation n'est systématique que pour les souches d'origines humaine et vétérinaire. Pour les souches d'origines alimentaire et environnementale, la décision de les analyser se fait au cas par cas, en fonction de leur intérêt en santé publique.

• Confirmation de genre et d'espèce

L'étude des caractères phénotypiques et biochimiques (galeries API 20E, API 50CH, lipase, pyrazinamidase,..) des souches envoyées au CNR permet de confirmer leur appartenance au genre *Yersinia* et de déterminer leur espèce.

• Biotypage

S'il s'agit de souches de *Y. enterocolitica* ou *Y. intermedia*, des tests biochimiques supplémentaires sont effectués pour déterminer leur biotype. Pour l'espèce *Y. enterocolitica*, le biotype est le meilleur marqueur du pouvoir pathogène des souches.

• Sérotypage

Toutes les *Yersinia* étudiées sont sérotypées grâce aux antisérums préparés par le CNR :

- 48 antisérums spécifiques des différentes espèces de *Yersinia*.
- 5 antisérums spécifiques de *Y. pseudotuberculosis*.

De plus, une technique de génosérotypage est utilisée pour *Y. pseudotuberculosis*.

• Lysotypage:

La lysotypie des *Y. enterocolitica* n'est pas systématique, elle est réservée :

- aux souches du biotype 4 (qui peuvent présenter des lysotypes particuliers en fonction de leur origine géographique),
- aux cas où des sérotypes inhabituels sont identifiés,
- à des études épidémiologiques approfondies.

Le CNR prépare et entretient des stocks de phages nécessaires :

- à la lysotypie de *Y. enterocolitica* :
 - 12 phages de lysogénie,
 - 16 phages d'eaux d'égouts.
- au diagnostic de *Y. pseudotuberculosis*

- Caractérisation plus approfondie de souches atypiques

Lorsque des souches ne répondent pas aux critères classiques d'identification, des analyses moléculaires sont effectuées :

- recherche de gènes de virulence par PCR,
- séquençage de l'ARN 16S,
- analyse MLSA.

b) *Y. pestis*

- Identification:

L'analyse bactériologique classique comprend :

- l'analyse des caractères cultureux,
- l'analyse des caractères biochimiques,
- la lyse par le phage pesteux.

En parallèle, un diagnostic rapide est effectué à l'aide d'un test en bandelette développé et validé par les Instituts Pasteur de Madagascar et de Paris. Une PCR est également possible à partir des échantillons biologiques, mais celle-ci est plus longue et moins sensible que les bandelettes.

- Caractérisation:

Une fois les souches identifiées, leur biovar est déterminé à l'aide de tests phénotypiques puis confirmé par analyse génétique.

3.2. Analyses sérologiques

a) Agglutination de sérums vis-à-vis de leur souche homologue

Elle est effectuée, soit lorsque la souche est d'un sérotype inhabituel, absent de la batterie d'antigènes utilisée pour le sérodiagnostic par agglutination, soit lorsque les résultats de ce sérodiagnostic sont ininterprétables.

b) Sérodiagnostic de peste par ELISA-F1

Ce sérodiagnostic utilise le protocole mis au point par les Instituts Pasteur de Madagascar et de Paris

c) Sérodiagnostic des infections à *Yersinia* entéropathogènes par ELISA

Le sérodiagnostic des yersinioses digestives par ELISA, qui avait été mis au point et validé par le CNR, n'est plus effectué par celui-ci.

3.3. Typage moléculaire

a) *Yersinia* entéropathogènes

Le typage moléculaire des *Yersinia* entéropathogènes est effectué lorsqu'il existe une notion de cas groupés ou que l'origine d'une contamination est recherchée.

Il repose essentiellement sur la comparaison des profils génomiques par électrophorèse en champs pulsé après digestion par une ou deux enzymes de restriction.

b) *Y. pestis*

Ce typage est effectué à l'aide de trois techniques principales :

- le ribotypage,
- la 3IS-RFLP,
- l'électrophorèse en champs pulsés.

4 - Principales caractéristiques des souches reçues au CNR de 2006 à 2010

Les chiffres et pourcentages donnés ci-dessous correspondent au bilan de la période 2006 à 2010.

Un total de 1941 souches de *Yersinia* ont été caractérisées au CNR de 2006 à 2010.

Espèce	Nombre	%
<i>Y. enterocolitica</i>	1730	89,1
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	63	3,2
<i>Y. frederiksenii</i>	30	1,5
<i>Y. kristensenii</i>	15	0,8
<i>Y. intermedia</i>	68	3,5
<i>Y. bercovieri</i>	23	1,2
<i>Y. mollaretii</i>	11	0,6
<i>Y. rohdei</i>	1	0,1
Total	1941	100

Parmi celles-ci, 1679 ont été isolées par des correspondants situés en France métropolitaine ou dans les départements d'Outre Mer.

Les autres souches provenaient de correspondants étrangers ayant fait appel à l'expertise du CNR (Algérie, Argentine, Bulgarie, Canada, Côte d'Ivoire, Italie, Maroc et Russie).

D'un point de vue de santé publique, il est primordial de connaître le pouvoir pathogène potentiel des souches isolées de prélèvements.

Les souches entéropathogènes pour l'homme sont :

- toutes celles appartenant à l'espèce *Y. pseudotuberculosis*,
- les *Y. enterocolitica* des biotypes 1B, 2, 3, 4 et 5.

Celles qui ne le sont pas sont :

- les *Y. enterocolitica* du biotype 1A,
- toutes les autres espèces de *Yersinia*.

Ainsi, parmi les 1679 souches de *Yersinia* reçues de laboratoires français de 2006 à 2010, 1056 (63%) correspondaient à des souches pathogènes pour l'homme:

- 62 *Y. pseudotuberculosis*,
- 994 *Y. enterocolitica* des biotypes pathogènes.

Ces souches pathogènes ont été isolées:

- de cas humains (96%)
- d'animaux (3%)
- d'aliments (1%)

Ceci reflète en partie la volonté du CNR de ne pas effectuer l'identification systématique des souches environnementales et alimentaires, souches qui sont pratiquement toujours non pathogènes pour l'homme.

4.1. Infections à *Y. enterocolitica* en France

• Manifestations clinique

En pathologie humaine, le tableau clinique prédominant est celui d'une infection du tractus intestinal avec classiquement la triade fièvre-douleurs abdominales-diarrhées. Il n'est cependant pas rare qu'un seul de ces trois symptômes soit observé.

- Formes digestives :

Elles touchent surtout l'enfant (65%) et sont peu fréquentes chez les sujets de plus de 60 ans (10%).

- Formes extra digestives :

Elles sont par contre très fréquentes dans cette seconde tranche d'âge (79% des infections à *Y. enterocolitica* chez les personnes de plus de 60 ans), et correspondent à des formes graves avec localisations profondes et/ou dissémination systémique.

Presque 10% des souches de *Yersinia* pathogènes reçues au CNR ont été isolées lors de septicémies.

Il ressort donc de ceci que les sujets jeunes sont les plus souvent infectés et développent des formes purement digestives et généralement peu sévères d'infections à *Y. enterocolitica*, tandis que les sujets âgés sont une population à fort risque de développer des infections graves.

Les infections à *Y. enterocolitica* prédominent dans le sexe masculin (57% des cas).

• Caractéristiques

Un léger pic d'infection survient au cours des mois chauds (juillet à octobre), et un léger creux pendant les mois froids, mais des cas sont observés toute l'année.

Comme le montre le tableau ci-dessous, les souches de *Y. enterocolitica* pathogènes isolées en France appartiennent à 3 biotypes, avec une très nette prédominance des souches du biosérotype 4/O:3, suivi par celles du biosérotype 2/O:9.

Biotype	Sérotype	Nombre	%
2	O:9	175	
	O:5,27	14	
	NAG	2	
	Total	191	19,2
3	O:3	9	
	O:5,27	11	
	NAG	1	
	Total	21	2,1
4	O:3	781	
	NAG	1	
	Total	782	78,7
TOTAL		994	100

NAG: Non Agglutinable

4.2. Infections à *Y. pseudotuberculosis* en France

• Manifestations clinique

La tendance observée au cours de la période 2006-2010 reflète celle des décennies antérieures, et montre que :

- Le sexe masculin est là encore plus souvent touché (64% des cas).
- De même, les formes digestives prédominent chez l'enfant et les formes extra-digestives chez le sujet de plus de 60 ans.
- A l'inverse des infections à *Y. enterocolitica*, la tranche d'âge la plus affectée (toutes formes cliniques confondues) est celle des plus de 60 ans.
- Dans les formes digestives, les diarrhées sont moins fréquentes que lors des infections à *Y. enterocolitica*, mais les douleurs abdominales sont en général plus marquées.
- Les formes graves avec localisations extra digestives sont extrêmement fréquentes (61% de l'ensemble des souches de *Y. pseudotuberculosis* isolées).

L'investigation épidémiologique effectuée lors de la bouffée épidémique de pseudotuberculoses survenue au cours de l'hiver 2004-2005 a montré que le taux de mortalité était extrêmement élevé chez ces patients (1/3 des cas).

Cette plus grande sévérité des infections à *Y. pseudotuberculosis* comparée à celles causées par *Y. enterocolitica* résulte sans nul doute d'une plus forte pathogénicité de cette espèce. Cependant, ce pourcentage de formes extra digestives est probablement aussi en partie artificiellement augmenté du fait qu'une partie de ces bactéries ne pousse pas sur le milieu classiquement utilisé pour les coprocultures (CIN). Le corollaire à cette observation est que l'incidence des infections à *Y. pseudotuberculosis* est fortement sous-estimée.

En tout cas, encore plus que pour les infections à *Y. enterocolitica*, la pseudotuberculose représente un réel danger pour les personnes de plus de 60 ans.

• Caractéristiques

Les souches se répartissent en 3 sérotypes principaux :

- sérotype I : 84%,
- sérotype II : 8%
- sérotype III : 5%

A l'inverse des infections à *Y. enterocolitica*, les cas de pseudotuberculose humaine ont tendance à prédominer en hiver (décembre à mars).

4.3. Les autres *Yersinia*

Pendant la période 2006-2010, 623 souches de *Yersinia* non pathogènes ont été envoyées au CNR par des laboratoires français :

- 492 souches de *Y. enterocolitica* du biotype 1A,
- 131 souches correspondant à d'autres espèces de *Yersinia*.

Ces souches ont été principalement isolées de l'homme (selles) et pouvaient donc à tort être considérées, avant leur caractérisation complète, comme la cause des symptômes observés. Il est donc capital de les différencier des souches pathogènes.

Cette différenciation n'est cependant pas aisée, voire impossible par les méthodes d'identification utilisées en routine dans les laboratoires.

4.4. Résistance aux antibiotiques

La plupart des souches de *Y. enterocolitica* produisent une pénicillinase et une céphalosporinase d'origine chromosomique qui les rendent résistantes aux bêta-lactamines et aux céphalosporines de première génération, et plus ou moins à celles de deuxième génération. *Y. pseudotuberculosis* par contre ne présente pas ces résistances.

L'analyse de la sensibilité des *Yersinia* pathogènes n'a pas mis en évidence de différences notables par rapport aux spectres attendus.

Pour *Y. enterocolitica*, il ressort que les antibiotiques pour lesquels la proportion de souches sensibles est la plus forte sont la ciprofloxacine (100%) et la ceftriaxone (100%). De plus, l'association amoxicilline + acide clavulanique est très peu efficace pour les souches des biotypes 2 et 3, tandis que la majorité de celles du biotype 4 ont un niveau de résistance intermédiaire.

5 - Réseau National de Surveillance des *Yersinia* entéropathogènes

A la demande de la DGS/InVS, un Réseau National de Surveillance des *Yersinia* entéropathogènes (RNSY) a été mis en place en 2003 par le CNR des *Yersinia*. Ce réseau est coordonné par l'ingénieur épidémiologiste du CNR.

Les missions du RNSY sont notamment de :

- Déterminer par extrapolation l'incidence annuelle des yersiniozes en France.
- Estimer les tendances temporelles et spatiales des infections.
- Lancer des alertes lors de cas groupés.
- Suivre la sensibilité aux antibiotiques des *Yersinia* entéropathogènes.
- Mettre en place des enquêtes sur des aspects spécifiques de ces infections.

Le RNSY est actuellement composé de 99 LAM de ville et hospitaliers répartis sur l'ensemble de la France métropolitaine et à la Réunion.

Ce réseau constitue un maillage national de relais techniques auprès du CNR et une source de données permettant l'épidémiologie-surveillance des yersiniozes en France.

Cette épidémiologie-surveillance se base sur :

- La récolte des données sur les yersiniozes et les facteurs de risque par les LAM membres.
- La transmission des données au CNR.
- Le traitement de ces données par le CNR.
- La diffusion en retour des résultats aux LAM membres du RNSY.

Le RNSY édite régulièrement des fascicules sur un aspect particulier des yersiniozes et envoie le document à tous les membres du réseau.

Les fascicules édités pendant la période 2006 - 2010 ont été :

- **Fascicule N°8 :**
"Les espèces dites apparentées de *Yersinia enterocolitica* - Partie 2: Particularités". 2006.
- **Fascicule N°9 :**
"Les septicémies à *Y. enterocolitica*". 2007.
- **Fascicule N°10 :**
"Les septicémies à *Y. pseudotuberculosis*". 2008.
- **Fascicule N°11 :**
"Bilan de l'épidémie de pseudotuberculose survenue au cours de l'hiver 2005". 2008.
- **Fascicule N°12 :**
"Bilan de l'enquête sur le diagnostic des infections à *Yersinia* entéropathogènes auprès d'un échantillon de laboratoires hospitaliers et privés d'analyses médicales". 2009.
- **Fascicule N°13 :**
"Les alternatives au diagnostic bactériologique des yersiniozes - Apports et limites des techniques sérologiques". 2009.
- **Fascicule N°14 :**
"Les alternatives au diagnostic bactériologique des yersiniozes - Apports et limites des techniques moléculaires". 2010.
- **Fascicule N°15 :**
"Le type moléculaire de *Yersinia pseudotuberculosis*". 2010.

Ils peuvent également être distribués aux correspondants qui en font la demande.

6 - Autres travaux du CNR pendant la période 2006-2010

6.1. Amélioration du diagnostic des yersiniose

- **Marqueurs génétiques caractérisant les souches de *Y. pseudotuberculosis* responsables de la Fièvre Scarlatiniforme d'Extrême Orient**

Une forme clinique particulière d'infection à *Y. pseudotuberculosis* a été observée dans la région de Vladivostok dans les années 60. Elle a été appelée "Fièvre Scarlatiniforme d'Extrême Orient" (FSEO) car certains des signes cliniques ressemblaient à ceux de la scarlatine. Les souches de *Y. pseudotuberculosis* responsables de cette maladie, initialement géographiquement très limitées, se sont maintenant étendues à d'autres parties de la Russie et notamment à la région de Saint Petersburg. Nous avons voulu identifier les déterminants spécifiques qui conféraient à ces souches des caractéristiques cliniques particulières. Pour cela, le génome d'une souche responsable de FSEO a été séquencé (en collaboration avec TIGR) et sa séquence a été comparée à celle d'une autre souche de *Y. pseudotuberculosis* responsable d'une forme classique de pseudotuberculose. Cette comparaison, puis le criblage d'un grand nombre de souches de *Y. pseudotuberculosis* responsables ou non de FSEO ont permis d'identifier deux régions chromosomiques et un plasmide potentiellement impliqués dans cette particularité clinique. Ces régions pourraient être utilisées pour identifier de telles souches si la maladie atteignait notre pays.

M. Eppinger, M.J. Rosovitz, W.W. Fricke, D.A. Rasko, G. Kokorina, C. Fayolle, L.E. Lindler, E. Carniel, J. Ravel. 2007. Genome Sequence of *Y. pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East Scarlet Like Fever: Linking Genomic Plasticity to Pathogenicity. *PLoS Genetics*. 3:e142.

- **Identification de régions chromosomiques utilisables pour différencier *Y. pestis* de *Y. pseudotuberculosis***

Y. pestis et *Y. pseudotuberculosis* sont deux espèces génétiquement quasi identiques car la première est un clone récemment émergé de la seconde. Les différences phénotypiques entre les deux sont limitées et il n'est pas rare que cela aboutisse à un diagnostic inapproprié. En collaboration avec le Lawrence Livermore National Laboratory (USA), nous avons précédemment séquencé le premier génome d'une souche de *Y. pseudotuberculosis*. Par une analyse de génomique comparative nous avons maintenant identifié des régions chromosomiques qui spécifient chacune des deux espèces. Nous disposons ainsi d'une batterie de marqueurs génétiques qui peuvent être utilisés pour distinguer *Y. pseudotuberculosis* de *Y. pestis* chaque fois que les caractères phénotypiques laissent subsister des doutes quant à la nature de la souche étudiée.

A. Derbise, V. Chenal-Francisque, F. Pouillot, C. Fayolle, M-C. Prévost, C. Médigue, B. J. Hinnebusch and E. Carniel. 2007. An horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague bacillus. *Molecular Microbiology*. 63:1145-1157.

F. Pouillot, C. Fayolle and E. Carniel. 2007. A putative DNA Adenine Methyltransferase is involved in *Yersinia pseudotuberculosis* pathogenicity. *Microbiology*. 153:2426-2434.

F. Pouillot, C. Fayolle and E. Carniel. 2008. Characterization of chromosomal regions conserved in *Yersinia pseudotuberculosis* and lost by *Yersinia pestis*. *Infection & Immunity*. 76:4592-4599.

A. Derbise, V. Chenal-Francisque, C. Huon, C. Fayolle, C.E. Demeure, B. Chane-Woon-Ming, C. Médigue, B.J. Hinnebusch and E. Carniel. 2010. Delineation and analysis of chromosomal regions specifying *Yersinia pestis*. *Infection & Immunity*. 78:3930-3941.

6.2. Amélioration du typage des *Yersinia*

- **Caractérisation de souches atypiques de *Yersinia***

Certaines souches de la collection du CNR ont des caractères intermédiaires entre *Y. frederiksenii* et *Y. intermedia* et posent des problèmes de classification. Ces souches se séparent en deux groupes distincts : variant 1 (rhamnose, α -méthyl D glucoside (α MG) et citrate de Simmons positives), et variant 2 (rhamnose et α MG positives, mais citrate de Simmons négative). Afin de leur attribuer une position correcte, leur caractérisation phénotypique et génétique poussée a été effectuée. La recherche des facteurs de virulence caractéristiques des *Yersinia* a confirmé que ces souches appartenaient à une espèce non pathogène. Des hybridations ADN-ADN ont ensuite montré que les deux types de variants

appartenait à l'espèce *Y. intermedia*. Cette espèce est constituée de 8 biotypes, mais les caractères phénotypiques des deux variants ne permettaient de les inclure dans aucun de ces biotypes. Nous avons donc établi un nouveau schéma biotypique de *Y. intermedia* enrichi de deux nouveaux biotypes (biotype 9 pour le variant 1, et biotype 10 pour le variant 2).

L. Martin, A. Leclercq, C. Savin and E. Carniel. 2009. Characterization of atypical isolates of *Yersinia intermedia* and definition of two new biotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 47:2377-2380.

- **Mise au point d'un outil de traçage des souches de *Y. pestis***

Face à toute apparition de cas de peste dans des zones non endémiques telles que la France, il est essentiel de pouvoir déterminer l'origine des souches. En effet, s'il s'agit de la ré-émergence d'un foyer local resté quiescent pendant de nombreuses années, de l'importation de souches à partir d'un foyer à distance, ou bien d'une utilisation bioterroriste, les mesures de lutte et de prévention qui seront mises en place ne seront pas les mêmes. *Y. pestis* est une espèce très clonale car ce pathogène a émergé récemment et n'a encore accumulé que peu de mutations. Par contre, son émergence s'est accompagnée d'une explosion de séquences d'insertion (IS) appartenant majoritairement à trois groupes : IS100, IS285 et IS1541. Ces IS génèrent une plasticité génomique et un polymorphisme des profils d'hybridation que nous avons mis à profit pour développer une méthode de traçage par IS-RFLP. Les profils d'hybridation des IS pris individuellement ou par paires n'ont pas permis de regrouper les souches en fonction de leur origine géographique. Par contre, un regroupement robuste des souches selon leur foyer originel a été obtenu en combinant les trois profils (3IS-RFLP). Ce regroupement par origine géographique a été observé même pour les souches du biovar Orientalis qui ne se sont répandues sur la planète que depuis à peine plus d'un siècle. Nous disposons donc à présent d'un outil puissant de traçage des souches de *Y. pestis*.

G. Torrea, V. Chenal-Francisque, A. Leclercq, and E. Carniel. 2006. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:2084-2092.

- **Carte d'identité de *Y. pestis***

Pour aller encore plus loin dans l'analyse de chaque isolat de *Y. pestis*, les génomes de 17 souches de *Y. pestis* ont été séquencés et comparés à ceux disponibles dans les bases de données. Ceci a permis à un consortium international dont le CNR fait partie, d'identifier 1364 polymorphismes nucléotidiques (SNPs). Ces SNPs ont ensuite été recherchés dans le génome de plus de 900 souches de *Y. pestis* isolées de foyers géographiques variés. Cette analyse a permis d'une part de retracer les routes d'expansion de la peste au cours des trois pandémies, et d'autre part de disposer d'un outil extrêmement fin pour identifier la provenance d'une souche.

G. Morelli, Y. Song, C.J. Mazzoni, M. Eppinger, P. Roumagnac, D.M. Wagner, M. Feldkamp, B. Kusecek, A.J. Vogler, Y. Li, Y. Cui, N.R. Thomson, T. Jombart, R. Leblois, P. Lichtner, L. Rahalison, J.M. Petersen, F. Balloux, P. Keim, T. Wirth, J. Ravel, R. Yang, E. Carniel and M. Achtman. 2010. Phylogenetic diversity and historical patterns of pandemic spread of *Yersinia pestis*. *Nature Genetics*. 42:1140-1143.

6.3. Investigations épidémiologiques

- **Bilan de l'épidémie de peste survenue à Oran en 2003**

Alors que la peste semblait avoir disparu d'Algérie depuis les années 50, elle est réapparue en juin 2003 dans la région d'Oran. Une mission d'investigation à laquelle nous avons participé, avait été dépêchée sur place. Une fois l'épidémie contrôlée, une analyse rétrospective de toutes les données cliniques, biologiques et épidémiologique a pu être faite. Cette analyse montre que le cas princeps est un garçon de 11 ans, mort quelques heures après son arrivée au CHU d'Oran. Peu après, son cousin a été hospitalisé pour un tableau septicémique avec syndrome méningé et insuffisance cardiaque majeure. D'autres personnes du même village ont été hospitalisées les jours suivants pour un syndrome infectieux sévère avec adénopathie. Le diagnostic de peste, initialement porté cliniquement, a rapidement été confirmé par le laboratoire du CHU à l'aide des bandelettes de diagnostic rapide, et secondairement par l'isolement du bacille. De nouveaux cas de peste bubonique se sont ensuite déclarés aux alentours du premier village, puis à distance de celui-ci. L'investigation épidémiologique

suggère l'existence d'un réservoir animal mais n'a pas pu conclure à l'origine importée ou autochtone (ré-émergence d'un foyer dormant) de l'épisode. Cette réapparition brutale et inattendue de la peste en Algérie après plus de 50 ans de silence démontre encore une fois que le danger ne se limite pas aux zones d'endémies connues. Le fait que cette épidémie soit survenue au niveau d'un port commercial très actif souligne de plus les risques d'importation de l'infection, non seulement par des malades en phase d'incubation, mais également par des réservoirs (rats) ou des vecteurs (puces) infectés.

*E. Bertherat, S. Bekhoucha, S. Chougrani, F. Razik, J.B. Duchemin, L. Houti, L. Deharib, C. Fayolle, B. Makrerougrass, R. Dali-Yahia, R. Bellal, L. Belhabri, A. Chaieb, E. Tikhomirov and E. Carniel. 2007. Plague Reappearance in Algeria after 50 years, 2003. **Emerging Infectious Diseases**. 13:1459-1462.*

- **Investigation de la bouffée épidémique de pseudotuberculose survenue en France en 2004-2005**

Suite à l'isolement au cours de la même semaine par le laboratoire du CHU de Dijon de trois souches de *Y. pseudotuberculosis* (provenant de deux enfants d'une même crèche et d'une patiente hospitalisée pour un myélome), une alerte a été lancée par le CNR auprès de l'InVS. Suite à ces trois cas princeps, d'autres cas provenant de différentes régions de France ont été notifiés. Le CNR a signalé cette brusque bouffée épidémique d'infections à *Y. pseudotuberculosis* à tous les membres du RNSY et leur a demandé de communiquer tout cas similaire dans leur région. L'investigation épidémiologique et bactériologique menée conjointement par l'InVS, le laboratoire du Pr. Simonet à Lille, et le CNR a permis de faire le bilan de cet épisode anormal. Au total, 27 cas ont été recensés. Ils sont survenus essentiellement chez des adultes (21 cas) avec un nombre élevé de sujets de plus de 60 ans (17 cas). Seulement 5 souches ont été isolées des selles des patients (correspondant aux sujets les plus jeunes), tandis que toutes les autres souches provenaient de localisations profondes (septicémie, abcès hépatique, abcès cérébral, anévrisme). Une affection fragilisante sous-jacente (néoplasie, diabète, cirrhose) a été presque systématiquement retrouvée. Dans ces formes avec localisation profonde, le taux de mortalité a été très élevé (1/3 des cas). Presque toutes les souches isolées étaient du sérotype I, le sérotype le plus fréquemment rencontré en France. L'enquête épidémiologique ainsi que les prélèvements bactériologiques effectués n'ont pas mis en évidence de source commune de contamination. L'analyse des souches par électrophorèse en champs pulsé a de plus montré que, hormis les deux souches isolées des deux enfants de la même crèche, toutes les autres souches avaient un profil différent, indiquant qu'il ne s'agissait pas de l'expansion brutale d'un clone épidémique, mais plutôt de l'apparition simultanée et indépendante de ces infections dans différentes régions de France. L'observation d'un phénomène similaire pour d'autres maladies infectieuses survenues en France à la même époque (tularémie, infection à virus Hanta) suggère très fortement que cette brusque bouffée d'infections à *Y. pseudotuberculosis* a été causée par une expansion inhabituelle de la population de rongeurs. Ces expansions se produisant de façon cyclique, des phénomènes similaires seront probablement à nouveau observés dans le futur.

*P. Vincent, A. Leclercq, L. Martin, the Yersinia Surveillance Network, J-M. Duez, M. Simonet, and E. Carniel. 2008. Sudden onset of pseudotuberculosis in humans, France, 2004–05. **Emerging Infectious Diseases**. 14:1119-1122.*

6.4. Description de formes cliniques rares ou atypiques

- **Description d'un cas d'anévrisme aortique abdominal causé par *Y. pseudotuberculosis***

Un anévrisme aortique abdominal de grande taille a été détecté à l'échographie chez un patient présentant des douleurs abdominales persistantes avec accès fébriles depuis trois semaines. L'intervention qui a été immédiatement pratiquée au CHU de Nancy a mis en évidence un anévrisme fissuré entouré de ganglions hypertrophiés. Une souche de *Y. pseudotuberculosis* de sérotype I a été isolée du tissu vasculaire réséqué. La présence dans les adénopathies adjacentes de *Y. pseudotuberculosis* de même sérotype a été établie par immunomarquage sur lame. Le contexte et l'histoire de la maladie indiquent qu'il s'agit probablement d'un anévrisme préexistant surinfecté par *Y. pseudotuberculosis* (et non d'un anévrisme causé par l'infection). Il n'est pas su si la bactérie a colonisé l'anévrisme par voie

hématogène ou par extension de contiguïté à partir des adénopathies de voisinage. Ce cas est le premier rapporté d'infection vasculaire à *Y. pseudotuberculosis*.

Hadou, T., M. Elfarra, C. Alauzet, F. Guinet, A. Lozniewski, and C. Lion. 2006. Abdominal aortic aneurysm infected by *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:3457-3458.

6.5. Résistance aux antibiotiques et mesures préventives

• Source du plasmide de multirésistance acquis par *Y. pestis*

Jusqu'à récemment, le bacille de la peste était considéré comme sensible à tous les antibiotiques actifs contre les bacilles à Gram-. En 1995, la première souche de *Y. pestis* multirésistante aux antibiotiques a été isolée chez un malade atteint de peste bubonique. Nous avons montré (Instituts Pasteur de Paris et de Madagascar) que cette multirésistance était conférée par un plasmide conjugatif qui pouvait être acquis par *Y. pestis* dans le tube digestif de son vecteur naturel, la puce. Ce qui restait à élucider était l'origine de ce plasmide de multirésistance. Son séquençage, effectué en collaboration avec le TIGR (USA), a montré qu'il était présent et très répandu chez diverses entérobactéries (*Salmonella enterica*, *Klebsiella*, *E. coli*) isolées de produits alimentaires carnés destinés à la consommation aux Etats Unis. Les risques que des souches de *Y. pestis* acquièrent à nouveau un plasmide de multirésistance aux antibiotiques est donc réel. Les antibiotiques représentant actuellement le seul moyen de traiter la peste, il est essentiel d'exercer une surveillance très active de la résistance aux antibiotiques dans les régions du monde où existent des foyers actifs de peste.

Welch, T. J., W. F. Fricke, P. F. McDermott, D. G. White, M.-L. Rosso, D. A. Rasko, M. K. Mammel, M. Eppinger, M. J. Rosovitz, D. Wagner, L. Rahalison, J. E. LeClerc, J. M. Hinshaw, L. E. Lindler, T. A. Cebula, E. Carniel, and J. Ravel. 2007. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS One*. 2:e309

• Vaccin contre la peste humaine

Du fait de la persistance et même de la ré-émergence de la peste dans le monde, de l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques, et du risque d'une utilisation malveillante de *Y. pestis*, nous nous sommes engagés dans une démarche de développement d'un vaccin contre cette maladie. Il existe un vaccin vivant atténué (souche EV76) qui n'est pratiquement plus utilisé dans le monde à cause de sa faible durée de protection et de la gravité des réactions secondaires observées. La vaccination à l'aide de bactéries tuées avait les mêmes inconvénients et a été complètement abandonnée. Aucun vaccin fiable, sans danger, et utilisable pour les populations exposées dans les zones d'endémie pesteuse n'est actuellement disponible. Nous avons choisi de nous écarter de l'approche utilisant des sous-unités protéiques recombinantes car ce type de vaccination nécessiterait plusieurs rappels, ne conférerait probablement qu'une immunité de courte durée, et deviendrait partiellement ou complètement inactif face à des bactéries génétiquement modifiées. Notre approche consiste à utiliser une souche vivante atténuée de *Y. pseudotuberculosis*, bactérie génétiquement (et donc antigéniquement) très proche du bacille de la peste. Une vaccination avec une bactérie vivante serait susceptible de conférer de longues durées de protection par une réponse immunitaire dirigée contre de nombreuses cibles antigéniques, et ne nécessiterait pas obligatoirement des injections itératives. Des bactéries vivantes atténuées sont de plus aisées à produire en quantité et à faible coût. Des études antérieures suggéraient que *Y. pseudotuberculosis* pouvaient effectivement protéger contre la peste, mais elles avaient été faites avec des bactéries pathogènes administrées à des doses sublétales. La première étape a été de sélectionner dans la collection du CNR des souches de *Y. pseudotuberculosis* de virulence atténuée. Des infections expérimentales de la souris par voie orale ont permis d'identifier une souche (IP32680) avirulente même à fortes doses. Cette bactérie colonise les organes profonds et y persiste sans toutefois causer de lésions sévères. L'infection par voie sous-cutanée avec une dose létale (150 fois la DL₅₀) de souris préalablement vaccinées par une injection *per os* de IP32680 a permis de protéger 75% des animaux, et cette protection a atteint 88% après deux injections vaccinales à un mois d'intervalle. Ce travail démontre donc la possibilité de vacciner contre la peste bubonique à l'aide d'une souche vivante avirulente de *Y. pseudotuberculosis* administrée par voie orale.

T. Blisnick, P. Ave, M. Huerre, E. Carniel and C.E. Demeure. 2008. Oral vaccination against bubonic plague using a live avirulent *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infection & Immunity*. 76:3808–3816.

- **Vaccin vétérinaire contre la pseudotuberculose animale**

Les infections à *Y. pseudotuberculosis* sont régulièrement responsables de la mort d'animaux dans les zoos français. Un vaccin constitué de différentes souches tuées (Pseudovac) produit par une institution hollandaise est utilisé pour protéger ces animaux. Cependant, son efficacité semblait assez limitée. Nous avons testé la performance de ce vaccin contre la pseudotuberculose animale et l'avons comparé à celle de la souche vivante atténuée de *Y. pseudotuberculosis* IP32680. Nous avons utilisé le cobaye comme modèle d'infection par voie orale parce que ces animaux sont extrêmement sensibles à la pseudotuberculose. Même chez cette espèce, la souche IP32680 est avirulente à fortes doses et ne provoque aucun symptôme clinique. Elle induit une bonne réponse anticorps contre les souches de tous les sérotypes testés. Après infection avec un inoculum élevé (2200 fois la DL_{50}) de la souche très virulente de *Y. pseudotuberculosis* IP32953, le protocole de vaccination actuellement utilisé dans les zoos (deux injections sous-cutanées du vaccin Pseudovac à un mois d'intervalle) ne confère pratiquement aucune protection. En revanche, une administration orale de la souche IP32980 protège la moitié des animaux contre la pseudotuberculose, et deux administrations en protègent 83%. La souche vivante atténuée de *Y. pseudotuberculosis* IP32980 pourrait donc être un vaccin beaucoup plus efficace que le vaccin actuel (Pseudovac) contre la pseudotuberculose animale dans les zoos et les élevages.

*B. Quintard, T. Petit, N. Ruvoen, E. Carniel, and C.E. Demeure. 2010. Efficacy of an oral live vaccine for veterinary use against pseudotuberculosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.** 33:e59–e65.*