

CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DE LA PESTE ET AUTRES YERSINIOSES

Bilan des activités 2011 - 2015

Responsables scientifiques

- **Elisabeth Carniel:** Directeur du CNR et du Centre OMS,
Chef d'Unité
- **Anne Sophie Le Guern:** Directeur adjoint du CNR
- **Cyril Savin:** Coordinateur du Réseau national de Surveillance des *Yersinia*

Téléphone: (33-1)-45-68-83-27

Fax: (33-1)-45-68-89-54

E-mail: cnr.yersinia@pasteur.fr

1 - Présentation des *Yersinia*

Le genre *Yersinia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et est composé de 18 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 (notamment en Algérie, Afghanistan, Libye, Kirghizistan, Russie depuis le début du 21^{ème} siècle) font que la peste est classée parmi les maladies ré-émergentes.

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 alors 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, généralement 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 ou puces 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 par l'ingestion d'aliments contaminés, et plus rarement 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, Nouvelle Zélande 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 représente la troisième cause de diarrhées bactériennes en Europe. 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 au CNR des souches de *Yersinia* isolées n'est pas obligatoire.

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 15 autres espèces.

La pathogénicité pour l'homme d'une nouvelle espèce très récemment décrite: *Y. wautersii*, est probable, mais nécessite d'être confirmée.

Deux espèces sont des pathogènes animaux: *Y. ruckeri* pour les poissons et *Y. entomophaga* pour les insectes.

Aucune des autres espèces (*Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. aleksiciae*, *Y. similis*, *Y. massiliensis*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii*) n'est pathogène pour l'homme ou les animaux. 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.

Il en va de même des *Y. enterocolitica* du biotype 1A. Leur distinction des souches pathogènes est donc essentielle, mais n'est pas toujours aisée par les méthodes d'identification couramment utilisées et n'est le plus souvent pas faite.

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.

Le CNR est accrédité par le COFRAC selon les exigences de la norme EN15189 pour les techniques de caractérisation des souches de *Yersinia*.

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. Caractérisation phénotypique des souches

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 géosérotypage 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*

- Sensibilité aux antibiotiques

Un antibiogramme est réalisé pour chaque souche pathogène dans un but de surveillance de la résistance aux antibiotiques.

- 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 du genre et de l'espèce:

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.

- Détermination du biovar :

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

- Sensibilité aux antibiotiques

Un antibiogramme est réalisé pour chaque souche. La CMI est déterminée devant toute résistance inhabituelle à un antibiotique.

3.2. Caractérisation génotypique des souches

Une méthode de caractérisation génotypique des souches de *Yersinia* est en cours de développement au CNR à partir des données issues du séquençage à haut débit du génome complet des souches. Ces données sont soumises à une analyse par core-genome Multi Locus Sequence Typing (cg-MLST) qui repose sur la comparaison des profils alléliques de 500 gènes communs aux *Yersinia*. Cette méthode permet une assignation taxonomique (genre, espèce et sous-groupe) pour chaque souche de *Yersinia*.

Une fois validée, la caractérisation génomique devrait remplacer la caractérisation phénotypique actuellement pratiquée au CNR.

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 classiquement sur la comparaison des profils génomiques par PFGE (électrophorèse en champs pulsés) après digestion par une ou deux enzymes de restriction. D'autres techniques de typage sont également utilisées: la 2IS-RFLP et la MLST pour *Y. pseudotuberculosis* et la MLVA pour *Y. enterocolitica*.

Cependant, une fois validées, l'utilisation de cg-MLST spécifiques des espèces *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* pourrait permettre la détection de cas groupés avec une sensibilité bien supérieure aux techniques de typage classique.

Si une sensibilité encore supérieure est nécessaire, l'analyse des Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) qui repose sur la comparaison du polymorphisme des séquences nucléotidiques des souches pourra être utilisée.

b) *Y. pestis*

Le typage moléculaire est classiquement effectué à l'aide de trois techniques principales dont le choix dépend du niveau auquel les souches doivent être analysées (mondial, régional, local):

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

Grâce au développement du séquençage à haut débit, une alternative à ces techniques de typage moléculaire est l'analyse des SNPs. Cette technique améliore à la fois la distinction et le clustering des souches.

3.4. sérodiagnostic

a) Sérodiagnostic de peste par ELISA-F1

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

b) 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.

4 - Principales caractéristiques des souches reçues au CNR de 2011 à 2015

Les chiffres et pourcentages donnés ci-dessous correspondent au bilan de la période 2011 à 2015.

Un total de 3429 souches de *Yersinia* ont été caractérisées au CNR entre 2011-2015. Leur distribution par espèce est la suivante:

Espèce	Nombre	%
<i>Y. enterocolitica</i>	3152	91,9
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	83	2,4
<i>Y. frederiksenii</i>	72	2,1
<i>Y. kristensenii</i>	23	0,7
<i>Y. intermedia</i>	48	1,4
<i>Y. bercovieri</i>	24	0,7
<i>Y. mollaretii</i>	10	0,3
<i>Y. ruckeri</i>	7	0,2
<i>Y. rohdei</i>	6	0,17
<i>Y. entomophaga</i>	1	0,03
<i>Y. massiliensis</i>	3	0,1
Total	3429	100

Comme l'indique le tableau ci-dessus, l'espèce *Y. enterocolitica* est très largement prédominante.

Dans leur très grande majorité (3310 souches = 96,5%), ces souches 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 (Argentine, Bulgarie, Etats Unis, Côte d'Ivoire, Italie, Suède, Monaco, Luxembourg, Nouvelle-Zélande et Russie).

D'un point de vue de santé publique, il est primordial de différencier les souches entéropathogènes pour l'homme:

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

de celles qui ne le sont pas:

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

Ainsi, parmi les 3310 souches de *Yersinia* reçues de laboratoires français lors de la période 2011-2015, 2255 d'entre elles (68,1%) correspondaient à des souches pathogènes pour l'homme:

- 71 *Y. pseudotuberculosis*,
- 2184 *Y. enterocolitica* des biotypes pathogènes.

Ces souches pathogènes ont été principalement isolées de cas humains (99%) et secondairement d'animaux (1%), mais pas de l'environnement. Ceci confirme la rareté de la circulation des *Yersinia* pathogènes dans l'environnement, et reflète aussi la volonté du CNR de ne pas effectuer l'identification systématique des souches environnementales qui ne sont pratiquement jamais 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. A noter en particulier que les formes cliniques sans diarrhées ne sont pas rares. Ces formes digestives d'infections à *Y. enterocolitica* touchent surtout l'enfant de moins de 10 ans (49,5%).

Les formes extra digestives prédominent chez les sujets âgés et correspondent à des formes graves avec localisations profondes et/ou dissémination systémique. Ainsi 87,5% des sujets septicémiques avaient plus de 50 ans et 62,5% plus de 70 ans.

Un peu plus de 5% des souches de *Yersinia* pathogènes reçues au CNR ont été isolées lors de septicémies.

Les infections à *Y. enterocolitica* prédominent dans le sexe masculin (55,5% des cas).

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.

• 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	Nombre	%	Sérotypes	Nombre
2	299	13,8	O:9	266
			O:5-27	22
			O:5	10
			AAG	1
3	6	0,3	O:3	1
			O:5	2
			O:5,27	1
			O:9	1
4	1857	85,9	NAG	1
			O:3	1855
			O:3-10-15	1
Total	2163	100	O:10-16	1
				2163

AAG: Auto Agglutinable

NAG: Non Agglutinable

Cependant, les souches du biotype 2/O:9 semblent avoir une capacité de dissémination systémique plus élevée, puisque plus de 11% d'entre elles ont été à l'origine de formes septicémiques, contre seulement 3,8% des souches du biotype 4.

4.2. Infections à *Y. pseudotuberculosis* en France

• Manifestations clinique

La tendance observée au cours de la période 2011-2015 reflète celle des décennies antérieures, et montre que:

- Le sexe masculin est là encore plus souvent touché (59,4% 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 fréquentes (39% de l'ensemble des souches de *Y. pseudotuberculosis* isolées).

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 du sérotype I sont celles qui sont le plus fréquemment isolées (87%)

A l'inverse des infections à *Y. enterocolitica*, les cas de pseudotuberculose humaine ont tendance à être plus nombreux en hiver et au printemps.

4.3. Les autres *Yersinia*

Pendant la période 2011-2015, 1055 souches de *Yersinia* non pathogènes ont été envoyées au CNR par des laboratoires français:

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

Ces souches ont été principalement isolées de l'homme (selles). L'isolement d'une *Y. enterocolitica* des selles d'un patient présentant une symptomatologie digestive ne signifie pas que la souche isolée est responsable de ses signes cliniques. En effet, près d'un tiers des souches de *Y. enterocolitica* isolées de selles humaines sont non pathogènes. Comme très peu de LBM déterminent le biotype des souches, si ces souches ne sont pas envoyées au CNR pour caractérisation, un faux diagnostic positif est posé, pouvant aboutir à un traitement injustifié.

A défaut de biotyper les souches, certains laboratoires utilisent des antisérums commerciaux pour les sérotyper et en déduire leur caractère pathogène ou non. Le résultat peut être utile à titre indicatif, mais certainement pas confirmatoire. Dans certains cas, les souches présentent un sérotype absent des kits commerciaux, ou bien sont non agglutinables ou auto agglutinables. L'orientation vers une souche pathogène ou non pathogène devient alors impossible. Dans d'autres cas, une spécificité antigénique associée aux souches pathogènes est également portée par des souches non pathogènes, ce qui conduit à un faux diagnostic de souche pathogène. Entre 2011 et 2015, 37% des souches de *Y. enterocolitica* 1A n'auraient pas été identifiées comme non pathogènes ou auraient même été classées pathogènes en se basant sur la sérotypie, ce qui pourrait aboutir à la mise en place d'un traitement non justifié. La détermination du biotype joue un rôle majeur dans cette distinction.

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.

Pour *Y. enterocolitica*, il ressort que les antibiotiques pour lesquels la proportion de souches sensibles est la plus forte sont la ciprofloxacine (99,9%) 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.

Des souches multirésistantes aux antibiotiques existent mais sont rares pour *Y. pseudotuberculosis* et *Y. pestis*. Celles-ci sont par contre plus fréquentes dans l'espèce *Y. enterocolitica*.

5 - Réseau National de Surveillance des *Yersinia* entéropathogènes

Un Réseau National de Surveillance des *Yersinia* entéropathogènes (RNSY) a été mis en place en 2003 par le CNR des *Yersinia* à la demande de la DGS/InVS.

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.
- Mettre en place des enquêtes sur des aspects spécifiques de ces infections.

Le RNSY est actuellement composé de 104 LBM 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 LBM 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 2011 - 2015 ont été:

- **Fascicule N°16:**
Le typage moléculaire de *Yersinia enterocolitica* - 2011.
- **Fascicule N°17:**
Evaluation du milieu SSI Enteric Medium pour l'isolement des souches de *Yersinia* - 2013.
- **Fascicule N°18:**
Le complexe *Yersinia pseudotuberculosis* - 2014.
- **Fascicule N°19:**
Caractérisation génétique des populations du complexe *Yersinia pseudotuberculosis* - 2015.

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

6 - Autres travaux du CNR pendant la période 2011-2015

6.1. Amélioration du diagnostic des yersinioses

• Test d'un nouveau milieu pour améliorer l'isolement des *Yersinia* entéropathogènes

L'enquête récemment effectuée conjointement par le CNR et l'InVS a montré que, bien que la recherche de *Yersinia* dans les selles soit théoriquement obligatoire en France, un grand nombre de laboratoires de biologie médicale ne l'effectuent pas systématiquement. Une des raisons est la nécessité d'une procédure particulière aux *Yersinia*, comprenant l'utilisation d'un milieu semi sélectif spécifique (CIN) et des temps et températures d'incubation différents de ceux des autres entérobactéries. Bien que le milieu CIN ait l'avantage d'être disponible commercialement et d'éliminer une partie de la flore digestive, il présente plusieurs inconvénients. Le milieu SSI est un milieu commercial mis au point pour l'isolement de toutes les entérobactéries pathogènes. Nous avons donc voulu voir si ce milieu utilisé dans des conditions standard pour les autres entérobactéries pouvait également permettre un isolement efficace des *Yersinia* entéropathogènes. Nous avons observé que ce milieu avait un effet inhibiteur encore plus marqué que le CIN sur la croissance de *Y. pseudotuberculosis*. De plus, le milieu SSI a été beaucoup moins performant que le CIN pour l'identification de colonies de *Y. enterocolitica* au sein d'une selle. Nos résultats indiquent donc que malgré ses limitations, le milieu CIN reste pour l'instant le milieu le plus adapté pour l'isolement de *Y. enterocolitica*.

C. Savin, A. Leclercq, and E. Carniel. 2012. Evaluation of a single procedure allowing the isolation of enteropathogenic *Yersinia* along with other bacterial enteropathogens from human stools. *PLoS One*. 7:e41176.

• Développement d'un milieu plus performant pour les *Y. enterocolitica* pathogènes

Comme indiqué ci-dessus, aucun milieu sélectif pour les *Yersinia* n'est disponible. Le milieu semi sélectif CIN permet d'éliminer en partie la flore fécale contaminante, mais pas en totalité. Parmi les espèces bactériennes poussant sur CIN, certaines peuvent présenter une morphologie très similaire à celle de *Y. enterocolitica* (*Citrobacter freundii*, *C. braakii*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas hydrophila*, *Providencia rettgeri*, and *Morganella morganii*), ce qui peut amener à repiquer des colonies qui ne sont pas des *Yersinia*. En collaboration avec une équipe malaisienne, nous avons testé les performances d'un milieu CIN modifié pour permettre une meilleure distinction des colonies de *Y. enterocolitica* de celles des autres espèces bactériennes poussant sur CIN. Les résultats de cette étude ont montré que le milieu modifié permettait la même croissance et limite de détection que le milieu CIN, mais augmentait le taux d'identification correcte des colonies de *Yersinia* à partir de viandes de porc artificiellement et naturellement contaminées. Ce milieu modifié pourrait donc améliorer de façon significative le taux d'isolement des *Y. enterocolitica* à partir de matrices complexes. Pour l'instant, ce milieu modifié n'est pas disponible commercialement.

Tan L.K., Ooi P.T., Carniel E., Thong K.L. 2014. Evaluation of a modified Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin agar for isolation of *Yersinia* spp. *PLoS One*. 9:e106329.

• Test de diagnostic rapide des *Yersinia* entéropathogènes dans les selles

Face aux difficultés d'isolement d'une *Yersinia* entéropathogène à partir d'un milieu polycontaminé, un test de pré-criblage simple et rapide détectant directement la présence de *Yersinia* entéropathogènes dans les selles représenterait une avancée majeure. En collaboration avec le CEA, des anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement les *Y. enterocolitica* des biosérotypes 4/O:3 et 2/O:9 et les *Y. pseudotuberculosis* des sérotypes I et III ont été produits et utilisés pour des tests de "enzymes immunoassays" (EIA) et pour des bandelettes d'immunochromatographie. Des études de spécificité ont montré que ces tests étaient bien spécifiques des différents groupes de *Yersinia* choisis. Leur sensibilité est bonne (10⁵ à 10⁶ cfu/ml), même si elle ne permet pas de détecter les charges bactériennes modérées. Le résultat est obtenu en 45 min. Ces tests de diagnostic rapide pourraient donc être utilisés en première intention dans les laboratoires de biologie médicale, sans toutefois se substituer à l'isolement secondaire des souches.

Laporte J., Savin C., Lamourette P., Devilliers K., Volland H., Carniel E., Créminon C., and Simon S. 2015. Fast and sensitive detection of enteropathogenic *Yersinia* by immunoassays. *J. Clin. Microbiol.* 53:146-159.

- **Nouveau test de diagnostic rapide de la peste**

Le diagnostic de la peste a été grandement amélioré et facilité grâce au développement d'un test en bandelette qui est maintenant largement utilisé dans les centres de santé périphériques de différents pays où la peste est endémique. Ce test repose sur la détection de l'antigène F1. Cependant, des réactions croisées avec des antigènes d'autres microorganismes ne peuvent être exclues, des souches de *Y. pestis* naturellement dépourvues de cet antigène ont été décrites, et des mutants pathogènes ne produisant plus l'antigène F1 sont facilement générés. Enfin, cet antigène n'étant produit qu'à 37°C, les bandelettes F1 ne peuvent être utilisées pour rechercher la présence de *Y. pestis* dans des échantillons environnementaux ou chez les puces vectrices. En collaboration avec le CEA, nous avons développé un test détectant la protéine Pla de *Y. pestis* quelle que soit sa température de croissance. Des anticorps monoclonaux anti-Pla ont été produits et les meilleures combinaisons de couples d'anticorps ont été utilisées pour développer un test d'immunochromatographie en bandelettes. Ce test a permis de détecter toutes les souches de *Y. pestis* testées, aussi bien à 28°C qu'à 37°C, tout en restant négatif pour *Y. pseudotuberculosis*. Nous disposons donc d'un moyen de détection rapide et simple de *Y. pestis* à partir d'échantillons environnementaux. Ce test peut aussi être un complément très utile à la bandelette F1 pour la confirmation de cas humains de peste à partir d'échantillons biologiques.

S. Simon, C. Demeure, P. Lamourette, S. Filali, M. Plaisance, H. Boutal, M-C. Nevers, C. Créminon, H. Volland, and E. Carniel. 2013. Fast and simple detection of *Yersinia pestis* applicable to field investigation of plague foci. *PLoS One*. 8:e54947

- **Spectrométrie de masse pour l'identification de *Y. pestis* à partir d'une matrice complexe**

Afin de disposer d'un outil sensible et extrêmement spécifique de *Y. pestis* dans des produits complexes, une étude basée sur la détection de *Y. pestis* par spectrométrie de masse a été entreprise en collaboration avec le CEA. L'utilisation d'un spectromètre de masse classique de type MALDI-TOF ne permet pas de différencier de façon fiable des espèces proches comme *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis*. Notre étude a reposé sur la combinaison d'un enrichissement sélectif de l'échantillon par immunocapture à partir de matrices complexes et d'une technique sensible de spectrométrie de masse (triple quadropole en mode MRM). Plusieurs marqueurs protéiques de *Y. pestis* ont été ciblés (Pla, toxine murine, pesticide), rendant le résultat extrêmement spécifique. Une sensibilité de 2×10^4 cfu/ml à partir d'échantillons environnementaux contaminés (eau et lait) a été obtenue, ce qui rend cette technique aussi sensible que les tests en bandelettes, mais plus spécifique puisque plusieurs cibles protéiques sont visées.

J. Chenau, F. Fenaille, S. Simon, S. Filali, H. Volland, C. Junot, E. Carniel, and F. Becher. 2014. Detection of *Yersinia pestis* in environmental and food samples by intact cell immunocapture and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 86:6144-6152

6.2. Amélioration de l'identification - typage des *Yersinia*

- **Validation de la MLSA pour différencier *Y. kristensenii* de *Y. aleksiciae***

Lors de la description de l'espèce *Y. aleksiciae*, il avait été indiqué que cette espèce pouvait être différenciée biochimiquement de *Y. kristensenii* par son activité LDC. Dans la pratique, nous avons observé que le test LDC était négatif aussi bien en galerie API20E qu'en tube pour la souche de référence. Il avait également été publié qu'il existait un motif spécifique de l'ADN 16S qui distinguait les deux espèces. Cependant, notre étude de différentes souches des deux espèces a mis en évidence un grand polymorphisme de cette séquence qui ne permet pas d'attribuer un motif à une espèce de façon fiable. Il n'y a donc aucun moyen phénotypique ou génotypique de distinguer les deux espèces à partir des données publiées. Nous avons donc testé la technique de "Multi Locus Sequence Analysis" (MLSA: amplification et séquençage de 4 gènes de ménage) sur plusieurs souches des deux espèces et avons trouvé qu'elle les distinguait parfaitement. Le CNR applique désormais systématiquement la technique MLSA à toutes les souches de "*Y. kristensenii*" reçues.

- **Amélioration de la caractérisation des *Y. enterocolitica* pathogènes**

Actuellement, la caractérisation des souches de *Yersinia* envoyées au CNR repose sur les méthodes phénotypiques classiques: tests biochimiques, sérotypie et lysotypie. Ces techniques ont clairement fait leurs preuves et sont généralement très fiables, mais elles sont longues et coûteuses, elles nécessitent la préparation de nombreux réactifs (antisérums spécifiques, phages de lysogénie et d'eau d'égout), et la distinction entre deux espèces qui repose parfois sur un seul caractère biochimique peut être difficile, voire erronée. Nous avons de ce fait décidé de développer une méthode de caractérisation basée sur la disponibilité du génome complet des bactéries. *Y. enterocolitica* étant l'espèce pathogène la plus fréquemment responsable d'infections digestives en Europe, nous avons pris le parti de commencer par cette espèce. Le problème était qu'aucune séquence génomique complète de *Y. enterocolitica* 4:O3 n'était disponible comme génome de référence pour aligner les "reads" obtenus selon la technique NGS (Next generation sequencing). Le séquençage de novo (GS-FLX technologie titanium 454) d'une souche française du biosérotype 4/O:3 a donc été effectué. Cette séquence de référence nous a permis d'aligner ensuite les génomes d'autres souches de *Y. enterocolitica* de différents biosérotypes pour des études comparatives.

C. Savin, L. Frangeul, L. Ma, C. Bouchier, I. Moszer, and E. Carniel. 2013. Draft genome sequence of a clinical strain of *Yersinia enterocolitica* (IP10393) of bioserotype 4/O:3 from France. **Genome Announc.** 1:e00150-12

- **Schéma MLST pour le genre *Yersinia***

Le séquençage d'un grand nombre de génomes de *Yersinia* récemment effectué a donné accès à de grandes quantités d'informations génétiques qui peuvent être utilisées pour définir des signatures d'espèces. Une analyse de ces "big data" a été effectuée par plusieurs laboratoires européens (Angleterre, Allemagne, Belgique) incluant le CNR. Elle a permis d'identifier des signatures génétiques qui ont été utilisées pour développer une méthode de Multi Locus Sequence Typing (MLST). Cette méthode a permis de distinguer les différentes espèces de *Yersinia* et peut donc constituer une première approche moléculaire pour la différenciation des groupes et sous-groupes de *Yersinia*.

Hall M., Chattaway M.A., Reuter S., Savin C., Strauch E., Carniel E., Connor T., Van Damme I., Rajakaruna L., Rajendram D., Jenkins C., Thomson N.R., and McNally A. 2015. Use of whole genus genome sequence data to develop a Multi-Locus Sequencing Type tool that accurately speciates and sub-speciates within the *Yersinia* genus. **J. Clin. Microbiol.** 53:35-42

- **Nouvel outil de typage de *Y. pseudotuberculosis***

Nous avons mis au point puis évalué les performances de la technique d'IS fingerprinting (IS-RFLP), initialement développée pour *Y. pestis*, pour le typage de *Y. pseudotuberculosis*. Différents paramètres techniques ont d'abord été testés afin d'identifier les conditions optimales d'utilisation. Les performances de cet outil ont été comparées à celles du géosérotypage, ribotypage, PFGE et MLST. Les résultats obtenus indiquent que la 2IS-RFLP présente un excellent pouvoir de discrimination (Index = 0,998), tout en permettant une comparaison des souches plus solide et reproductible que la PFGE. Cette méthode permet également de définir de façon robuste des populations au sein de l'espèce *Y. pseudotuberculosis*. La technique 2IS-RFLP est maintenant en place au CNR et peut être utilisée chaque fois que nécessaire.

E. Voskresenskaya, C. Savin, A. Leclercq, G. Tseneva, and E. Carniel. 2014. Typing and clustering of *Yersinia pseudotuberculosis* by IS-RFLP. **J. Clin. Microbiol.** 52:1978-1989

- **Mise au point de la technique MLVA pour le typage moléculaire de *Y. enterocolitica***

Le principal outil de typage de *Y. enterocolitica* utilisé par le CNR était l'électrophorèse en champs pulsé (PFGE). Cette technique possède un pouvoir de discrimination limité. De plus, la complexité des profils obtenus rend la comparaison des souches qui ne sont pas analysées simultanément très difficile et ne permet pas de créer une base de données inter laboratoires fiable. Une technique de typage des souches de *Y. enterocolitica* par MLVA (Multi Locus Variable Analysis) a récemment été décrite. Le CNR a effectué un travail d'évaluation de cet outil à partir de différentes souches de sa collection. La technique MLVA est maintenant utilisable au CNR si besoin.

6.3. Amélioration de la définition du genre *Yersinia*

• Analyse du complexe *Y. pseudotuberculosis*

Un certain nombre de souches formant ou non des espèces distinctes (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. similis* et *Y. pekkannenii*) sont phénotypiquement proches et sont regroupées dans le "complexe *Y. pseudotuberculosis*". Un consortium d'équipes internationales (dont le CNR) a mis en commun ses ressources biologiques et techniques afin de mieux définir des sous-groupes au sein de ce complexe et d'établir leur proximité phylogénétique. L'analyse du polymorphisme de séquence de gènes de ménage (MLST) de plusieurs centaines de souches d'origines géographiques variées a permis de montrer que: (1) *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis* sont complètement indistinguables, (2) *Y. similis* appartient bien à ce complexe, (3) par contre *Y. pekkannenii* n'en fait pas partie, et (4) un groupe nouveau, encore non connu, se distingue des autres sous-groupes au sein de ce complexe et pourrait représenter une espèce nouvelle.

R. Laukkanen-Ninios, X. Didelot, K. A. Jolley, G. Morelli, V. Sangal, P. Kristo, C. Brehony, P. F. M. Imori, H. Fukushima, A. Siitonen, G. Tseneva, E. Voskressenskaya, J. P. Falcao, H. Korkeala, M. C. J. Maiden, C. Mazzoni, E. Carniel, M. Skurnik, and M. Achtman. 2011. Population structure of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex according to multilocus sequence typing. *Environm. Microbiol.* 13:3114–3127

• Description d'une nouvelle espèce de *Yersinia* potentiellement pathogène

Partant des résultats de l'analyse MLST du complexe *Y. pseudotuberculosis*, nous avons évalué la parenté phylogénétique des sous-groupes de ce complexe afin d'identifier des marqueurs phénotypiques fiables permettant de les distinguer. En effet, l'espèce *Y. similis* étant non pathogène, il est essentiel de disposer de caractères la différenciant de *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis*. Le quatrième groupe, composé principalement de souches isolées en Corée, n'avait jusqu'à présent jamais été caractérisé. Nous avons effectué une analyse génotypique et phénotypique approfondie des souches en combinant différentes techniques: "phenotypic microarrays" (Biolog), spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS et LTQ-Orbitrap), séquençage de l'ARN 16S, MLSA, recherche de marqueurs de virulence et "Pair wise Average Nucleotide Identity" (ANI) des génomes entiers. Ce travail a permis d'identifier des marqueurs phénotypiques et génotypiques distinguant chaque groupe. De plus, nous avons montré que le 4^{ème} groupe constituait une espèce à part entière que nous avons appelée *Yersinia Wautersii*. Cette nouvelle espèce a été officiellement validée par le comité du "International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology". Elle serait potentiellement pathogène pour l'homme et représenterait donc la quatrième espèce pathogène de *Yersinia*, et la première espèce pathogène décrite depuis plus de trois décennies. Le fait qu'au sein de cette espèce se trouvent une souche isolée en Suède et une autre en Allemagne signifie de plus que l'expansion géographique de ce groupe bactérien a potentiellement déjà commencé.

C. Savin, L. Martin, C. Bouchier, S. Filali, J. Chenau, Z. Zhou, F. Becher, H. Fukushima, N. R. Thomson, M. Achtman, H. C. Scholz, and E. Carniel. 2014. The *Yersinia pseudotuberculosis* complex: Characterization and delineation of a new species, *Yersinia wautersii*. *Int. J. Med. Microbiol.* 304:452-463.

• Analyse du polymorphisme de *Y. pseudotuberculosis*

L'analyse MLST de *Y. pseudotuberculosis* avait aussi montré que cette espèce était soumise à de fréquents phénomènes de recombinaison, à l'origine d'un certain degré de polymorphisme génétique. En étudiant les bases de ce polymorphisme nous avons mis en évidence l'existence d'un mécanisme qui permet le transfert horizontal de n'importe quel fragment d'ADN de grande taille d'une souche de *Y. pseudotuberculosis* donatrice vers une souche réceptrice. Ce transfert se produit dans des conditions comparables à celles que la bactérie peut rencontrer dans son environnement naturel et pourrait donc être à l'origine des recombinaisons observées. La recherche de l'élément génétique en cause parmi un panel de *Y. pseudotuberculosis* a montré qu'il s'agissait d'un phénomène restreint à certaines souches et non à l'espèce entière.

B. Lesic, M. Zouine, M. Ducos-Galand, C. Huon, M-L. Rosso, M-C. Prévost, D. Mazel, and E. Carniel. 2012. A Natural System of Chromosome Transfer in *Yersinia pseudotuberculosis*. *PLoS Genetics*. 8:e1002529

- **Recherche de marqueurs différenciant *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis***

Y. pseudotuberculosis et *Y. pestis* étant génétiquement mais aussi phénotypiquement très proches, la distinction entre ces deux espèces n'est pas toujours aisée. Des analyses génomiques comparatives antérieures faites dans le laboratoire ont identifié quelques éléments génétiques acquis ou perdus par le bacille de la peste lors de sa divergence de *Y. pseudotuberculosis*. Cependant, une différence de régulation de gènes communs aux deux espèces pourrait aussi les distinguer. L'analyse des transcriptomes de *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis* soumises à différentes conditions de croissance effectuée en collaboration avec l'équipe du Pr. Simonet a montré que l'expression des gènes différentiellement régulés entre les deux espèces était plus élevée chez *Y. pestis* et que parmi ceux-ci se trouvaient ceux codant trois facteurs majeurs de pathogénicité des *Yersinia*. La très haute pathogénicité de *Y. pestis* pourrait donc être liée en partie à un changement dans ses réseaux de régulation.

S. Chauvaux, M-A. Dillies, M. Marceau, M-L. Rosso, S. Rousseau, I. Moszer, M. Simonet, and E. Carniel. 2011. *In silico comparison of Yersinia pestis and Yersinia pseudotuberculosis transcriptomes reveals a higher expression level of crucial virulence determinants in the plague bacillus. Int. J. Med. Microbiol.* 301:105–116.

- **Identification de cibles moléculaires spécifiques d'espèces et de sous-groupes de *Yersinia***

Nous nous orientons résolument vers le développement de la caractérisation moléculaire des souches, qui sur le long terme pourrait remplacer avantageusement les caractérisations phénotypiques actuellement utilisées. Grâce à la constitution d'un consortium de laboratoires internationaux incluant le CNR, le séquençage à haut débit des génomes de plus de 200 souches isolées de régions géographiques variées et appartenant aux différentes espèces et sous-groupes de *Yersinia* a été effectué. Des analyses de génomique comparative à grande échelle ont permis de définir les différentes populations de *Yersinia*, et notamment de montrer que certaines souches regroupées actuellement dans la même espèce devaient en fait appartenir à des espèces différentes. Ce travail a également donné accès à un grand nombre de séquences génomiques qui pourront être utilisées pour le développement d'outils de caractérisation génétique des *Yersinia*.

S. Reuter, T. R. Connor, L. Barquist, D. Walker, T. Feltwell, S. R. Harris, M. Fookes, M. E. Hall, T. M. Fuchs, J. Corander, M. Dufour, T. Ringwood, C. Savin, C. Bouchier, L. Martin, M. Miettinen, M. Shubin, J. Riehm, R. Laukkanen-Ninios, L. M. Sihvonen, A. Siitonen, M. Skurnik, J. P. Falcão, H. Fukushima, H. C. Scholz, M. B. Prentice, B. W Wren, J. Parkhill, E. Carniel, M. Achtman, A. McNally, and N. R. Thomson. 2014. *Parallel independent evolution of pathogenicity within the genus Yersinia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111:6768-6773.

6.4. Investigation de formes cliniques inhabituelles

- **Bilan des chocs septiques transfusionnels à *Y. enterocolitica***

Les chocs septiques post-transfusionnels causés par des concentrés globulaires contaminés par des bactéries sont peu fréquents mais gravissimes. *Y. enterocolitica* est une des principales causes bactériennes de contamination de ces produits sanguins. Le CNR a décrit un cas mortel en France en 2005. Un autre cas a eu lieu en France en 2011. Afin de faire le point sur ces complications transfusionnelles et de tirer des informations pouvant être utiles à leur prévention, nous avons effectué une analyse extensive des données de la littérature internationale sur les chocs septiques à *Y. enterocolitica*. Le bilan de cette analyse, indique que lors de la transfusion des concentrés contaminés, les signes de choc septiques apparaissent très tôt, mais peuvent être précédés de symptômes atypiques tels que des diarrhées brutales et abondantes. Le taux de mortalité est élevé (54,5%). Malgré la rapidité d'évolution, une antibiothérapie adaptée et administrée précocement peut améliorer le pronostic vital. Une sensibilisation des cliniciens et des médecins travaillant dans les centres de transfusion sanguine au risque de choc post-transfusionnel à *Y. enterocolitica* peut donc aider à mettre en place le plus rapidement possible les mesures thérapeutiques appropriées.

F. Guinet, E. Carniel, and A. Leclercq. 2011. *Transfusion-transmitted Yersinia enterocolitica sepsis. Clin. Infect. Dis.* 53:583-591.

6.5. Analyses épidémiologiques

• Surveillance des cas groupés de yersinioses digestives dans la Creuse

Le CNR avait lancé une alerte auprès de l'InVS suite à un nombre anormalement élevé d'isollements de souches de *Y. enterocolitica* au cours de l'été-automne 2008 dans la Creuse. Les premières souches avaient été isolées par un même laboratoire (Aubusson), puis d'autres souches l'avaient été par un autre laboratoire à proximité (la Souterraine). L'investigation épidémiologique n'avait pas pu mettre en évidence d'exposition commune au risque. Depuis, le CNR a continué à recevoir régulièrement des souches de *Yersinia* de ces deux laboratoires. Le fait que ces isolats étaient de biosérotypes différents confirmait l'absence d'une source commune et unique de contamination. Ceci était aussi suggéré par l'analyse des profils d'électrophorèse en champs pulsés des isolats. Cette grande diversité des souches a ensuite été confirmée par analyse MLVA: presque toutes les souches avaient un profil qui leur était unique. Une analyse rétrospective et prospective des souches de *Y. enterocolitica* isolées dans la Creuse et sur le reste du territoire français a montré qu'il s'agissait d'un phénomène particulier à cette région.

Martin L., Cabanel N., Lesoille C., Ménard T., and Carniel E. 2015 Investigation of an unusual increase in human yersinioses in Creuse, France. *Int. J. Infect. Dis.* 34:e76-e78.

• Analyse de la résurgence de la peste dans les foyers méditerranéens

Une épidémie de peste s'est produite en 2003 au sud d'Oran après 50 ans de silence, et des cas sont à nouveau survenus en Algérie en 2008. Une épidémie s'est également déclarée en Libye en 2009 alors qu'aucun cas humain n'avait été rapporté dans ce pays depuis 25 ans. Ceci démontre la réactivation des foyers de peste dans des pays du pourtour du bassin méditerranéen. Les risques de réimportation de la peste en Europe doivent donc être pris très au sérieux. Pour l'Algérie et la Libye, il était essentiel de savoir si ces épidémies récentes étaient consécutives à l'importation de souches en provenance d'un foyer plus lointain, si elles résultaient de la réactivation de foyers autochtones anciens restés quiescents pendant des décennies, ou bien s'il s'agissait d'une extension du foyer algérien à la Libye au travers de leur frontière commune. A l'aide de différentes techniques de typage moléculaire appliquées aux souches isolées de l'épidémie algérienne de 2003 et libyenne de 2009, ainsi qu'à des souches de *Y. pestis* isolées dans les années 40 en Algérie (disponibles dans notre collection), nous avons montré que, bien que les deux foyers de peste se soient réactivés à peu de temps d'intervalle et qu'ils aient une frontière commune, il s'agit de deux phénomènes complètement indépendants. Ces deux épidémies résultent très probablement de la réactivation de foyers locaux quiescents plutôt que de l'importation de souches à partir de foyers distants. Il semble exister des facteurs environnementaux favorables à la résurgence actuelle de la peste dans cette partie du globe.

N. Cabanel, A. Leclercq, V. Chenal-Francisque, B. Annajar, M. Rajerison, S. Bekkhoucha, E. Bertherat, and E. Carniel. 2013. Plague Outbreak in Libya, 2009, Unrelated to Plague in Algeria. *Emerg. Infect. Dis.* 19:230-236.

• Surveillance des foyers de peste en Iran

L'Iran est un foyer ancestral de peste. De nombreuses épidémies ont été observées jusque dans les années 70, mais plus aucun cas humain n'a été rapporté depuis plusieurs décennies. Un foyer animal bien établi (mérions) avait pourtant été identifié et il paraissait peu probable que ce foyer ait maintenant complètement disparu. Un travail de ré-investigation des foyers connus de peste (Kurdistan) a été entrepris par l'Institut Pasteur de Téhéran, en collaboration avec le CNR. Des piégeages de rongeurs, collecte de puces et prélèvements de sang sur animaux sentinelles (chiens) ont été effectués. Cette étude a montré que les rongeurs réservoirs et les puces vectrices de la peste (*Xenopsylla*) étaient toujours présents en abondance dans cet ancien foyer. De plus, une sérologie positive a été détectée chez des rongeurs et des chiens lors de deux années consécutives, dans la même localité, suggérant une exposition récente de ces animaux au bacille de la peste. Il semble donc que toutes les conditions favorables à la survenue d'une épizootie, potentiellement suivie d'une épidémie, soient réunies au Kurdistan iranien.

Esamaeili S, Azadmanesh K, Naddaf SR, Rajerison M, Carniel E, and Mostafavi E. 2013. Serologic survey of plague in animals, Western Iran. *Emerg. Infect. Dis.* 19:1549-1551.

6.6. Vaccin contre la peste

• Evaluation de la dérive du vaccin EV76 contre la peste

L'un des tous premiers vaccins contre la peste à avoir été utilisé, et le seul encore en usage de nos jours dans certains pays, est la souche de *Y. pestis* atténuée EV76, développée à l'Institut Pasteur de Madagascar dans les années 40. Il est ensuite apparu que certaines versions de ce vaccin largement distribué étaient plus ou moins protectrices et induisaient des effets secondaires plus ou moins forts. L'analyse du génome de différents variants de EV76 provenant de différentes institutions dans le monde, effectuée en collaboration avec des équipes chinoises et russes, a mis en évidence une dérive génétique facilitée par des recombinaisons intra génomiques et une accumulation de mutations sous forme de petites délétions (indels) et de mutations ponctuelles (SNP). Ces travaux ont permis de retracer la circulation des souches vaccinales et de mieux comprendre comment le vaccin vivant atténué EV76 a dérivé. Ils confirment que l'utilisation d'une souche de *Y. pestis* vivante comme vaccin contre la peste est à proscrire du fait de l'instabilité génomique de cette espèce.

Cui Y., Yang X., Xiao X., Anisimov A.P., Li D., Yan Y., Zhou D., Rajerison M., Carniel E., Achtman M., Yang R., and Song Y. 2014. Genetic variations of live attenuated plague vaccine strains (*Yersinia pestis* EV76 lineage) during laboratory passages in different countries. *Infect. Genet. Evol.* 26C:172-179.

• Développement d'un nouveau vaccin contre la peste

Du fait de la virulence résiduelle du vaccin EV76, de l'instabilité génomique de *Y. pestis* et de sa très grande proximité génétique avec *Y. pseudotuberculosis*, nous avons opté pour l'utilisation de cette dernière espèce comme vaccin vivant oral contre la peste. Pour cela, nous avons construit une souche de *Y. pseudotuberculosis* chez laquelle des gènes clés de la virulence ont été inactivés par délétion (impossibilité de réversion). Nous avons ensuite cloné l'opéron codant la fraction F1, hautement immunogène, de *Y. pestis*, et l'avons introduit dans le chromosome de la souche vaccinale de *Y. pseudotuberculosis*. L'absence de pathogénicité de ce nouveau vaccin et sa capacité à induire une bonne réponse humorale et cellulaire contre *Y. pestis* ont été démontrées. Ce vaccin administré par voie orale en une seule dose a conféré une protection complète des souris vaccinées contre la peste pulmonaire et bubonique.

Derbise, A. Cerdà Marín, P. Ave, T. Blisnick, M. Huerre, E. Carniel, and C. E. Demeure. 2012. An encapsulated *Yersinia pseudotuberculosis* is a highly efficient vaccine against pneumonic plague. *Plos Neglect. Trop. Dis.* 6:e1528

A. Derbise, Y. Hanada, M. Khalifé, E. Carniel, and C. E. Demeure. 2015. Complete protection against pneumonic and bubonic plague after a single oral vaccination. *PLoS Neglect. Trop. Dis.* 9:e0004162

6.7. Mécanisme infectieux induit par *Y. pestis*

• Développement d'un outil de suivi de l'infection

Afin de disposer d'une technique permettant de suivre l'effet d'un traitement ou d'un vaccin sur une infection à *Yersinia* nous avons testé la possibilité d'utiliser l'imagerie in vivo pour suivre la dissémination de l'infection en temps réel sur l'animal vivant. Pour cela, une souche de *Y. pestis* bioluminescente a été construite et a été utilisée pour valider la méthode. Nos résultats indiquent que cette technique permet de suivre la progression de la maladie et qu'il existe une corrélation statistiquement fiable entre le nombre de bactéries dans les organes et l'intensité du signal lumineux émis. Cet outil pourra donc servir à l'évaluation de candidats vaccins ou de molécules thérapeutiques.

T. Nham, S. Filali, C. Danne, A. Derbise, and E. Carniel. 2012. Imaging of Bubonic Plague Dynamics by In Vivo Tracking of Bioluminescent *Yersinia pestis*. *PLoS One.* 7:e34714.

• Recherche de nouvelles cibles thérapeutiques contre la peste

Les données historiques indiquent que lors des grandes pandémies de peste, des personnes infectées ont survécu à cette maladie alors qu'aucun traitement n'était disponible. Plusieurs facteurs peuvent expliquer leur survie, et notamment un déterminisme génétique de résistance naturelle. En collaboration avec plusieurs unités de l'Institut Pasteur, une analyse de l'impact

du fonds génétique sur la capacité d'un hôte à survivre à une infection par *Y. pestis* a été effectuée. Nous avons identifié une lignée de souris présentant un haut niveau de résistance à la peste. Deux régions, localisées sur deux chromosomes murins différents jouant un rôle important dans la résistance à la peste ont été identifiées. Au moins deux loci dans chacune de ces régions ont été identifiés, portant à au moins 4 le nombre de gènes de résistance, et démontrant que la capacité à survivre à la peste est plurifactorielle. In fine, l'identification de ces gènes pourrait permettre d'une part d'identifier des marqueurs prédictifs de l'évolution d'une infection pesteuse chez un malade, et d'autre part de développer des molécules thérapeutiques pouvant compenser les fonctions défectueuses chez les individus portant les allèles de sensibilité.

Le fait de disposer de souris résistantes ou sensibles a aussi permis d'étudier les différences de réponse mises en jeu. Nous avons observé des cinétiques de dissémination bactérienne et de réponse immunitaire innée différentes entre les deux lignées de souris. Les principales différences ont pu être associées à la réponse d'une sous population de macrophages et à sa capacité à induire ou non une inflammation. Cette population représente donc une cible de choix pour orienter la réponse de l'hôte vers une meilleure résistance à une infection par *Y. pestis*.

Au cours de son émergence à partir de *Y. pseudotuberculosis*, le bacille de la peste a acquis quelques facteurs génétiques spécifiques, et en particulier un plasmide pPla qui semble jouer un rôle important dans la pathogénicité de certaines souches de *Y. pestis*. La protéase Pla codée par ce plasmide pourrait donc représenter une cible thérapeutique de choix contre la peste. Afin de déterminer son rôle par rapport aux autres éléments génétiques acquis par *Y. pestis*, des souches de *Y. pestis* et de *Y. pseudotuberculosis* hébergeant ou non pPla ont été générées et utilisées dans le modèle murin de peste bubonique. Ce travail a montré que Pla participait à la multiplication bactérienne dans le ganglion drainant le site d'injection, mais n'était pas responsable des lésions destructrices observées dans ces organes. Pla peut donc représenter une cible thérapeutique intéressante. Cependant, son inhibition pourrait ne pas suffire à prévenir les lésions causées par le bacille de la peste et les facteurs responsables des lésions histologiques précoces vont donc devoir être identifiés pour servir de cibles bactériennes additionnelles.

C. Blanchet, J. Jaubert, E. Carniel, C. Fayolle, G. Milon, M. Szatanik, J-J. Panthier, and X. Montagutelli. 2011. *Mus spretus* SEG/Pas mice resist virulent *Yersinia pestis*, under multigenic control. **Genes Immun.** 12:23-30.

C. E. Demeure, Blanchet C., Fitting C., Fayolle C., Khun H., Szatanik M., Milon G., Panthier J-J., Jaubert J., Montagutelli X., Huerre M., Cavillon J-M., and Carniel E. 2012. Early systemic bacterial dissemination and a rapid innate immune response characterize genetic resistance to plague of SEG mice. **J. Infect. Dis.** 205:134-143

F. Guinet and E. Carniel. 2012. Impact on the Host of the *Yersinia pestis*-specific Virulence Set and the Contribution of the Pla Surface Protease. **Adv. Exp. Med. Biol.** 954:211-216

L. Chevallier, C. Blanchet, J. Jaubert, E. Pachulec, C. Demeure, E. Carniel, J-J. Panthier, and X. Montagutelli. 2013. Resistance to plague of *Mus spretus* SEG/Pas mice requires the combined action of at least four genetic factors. **Genes Immun.** 14:35-41

F. Guinet, P. Avé, S. Filali, C. Huon, C. Savin, M. Huerre, L. Fiette, and E. Carniel. 2015. Dissociation of Tissue Destruction and Bacterial Expansion during Bubonic Plague. **PLoS Pathog.** 11:e10005222.