



**RESEAU NATIONAL DE SURVEILLANCE
DES *YERSINIA* ENTEROPATHOGENES**

***CARACTERISATION GENETIQUE DES POPULATIONS
DU COMPLEXE *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS****

Fascicule N° 19 – Janvier 2015

Introduction

- Trois populations ont été identifiées (Laukkanen-Ninios et coll., 2011) dans le complexe *Y. pseudotuberculosis* :
 - l'espèce pathogène pour l'homme *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis*.
 - l'espèce non pathogène *Y. similis*.
 - la population appelée Groupe Coréen qui est une population potentiellement pathogène pour l'homme.

→ Ces 3 populations sont identifiables au moyen de caractères phénotypiques simples :

Test	<i>Y. pst^a</i>	<i>Y. sim^b</i>	GC ^c
D-Mélibiose	+	-	+
Pyrazinamidase	-	+	-
D-Raffinose	-	-	+

a : *Y. pseudotuberculosis* ; b : *Y. similis* ; c : Groupe Coréen.

- Les relations génétiques entre ces 3 populations n'étaient pas connues et il était possible que le Groupe Coréen représente une nouvelle espèce. Nous avons donc effectué une caractérisation génétique approfondie de ce groupe.
- Pour chacune des techniques utilisées, 40 souches ont été étudiées :
 - ✓ 16 *Y. pseudotuberculosis*.
 - ✓ 16 *Y. similis*.
 - ✓ 8 Groupe Coréen.

Séquençage de l'ADNr 16S

- Pour certains genres bactériens, l'amplification et le séquençage de la sous-

unité de l'ADNr 16S sont classiquement effectués pour identifier une espèce et évaluer les liens génétiques avec les espèces proches.

- Pour le genre *Yersinia*, Il est connu que la comparaison de séquences de l'ADNr 16S ne permet pas d'identifier les espèces mais il est possible de rechercher des signatures moléculaires spécifiques de chaque population :
 - ✓ L'étude du pourcentage d'identité entre les 40 souches des 3 populations montrent qu'elles sont très proches :

% Identité 16S	<i>Y. pst^a</i>	<i>Y. sim^b</i>	GC ^c
<i>Y. pst^a</i>	99,94%		
<i>Y. sim^b</i>	99,63%	99,99%	
GC ^c	99,75%	99,56%	99,74%

a : *Y. pseudotuberculosis* ; b : *Y. similis* ; c : Groupe Coréen.

→ Les séquences sont très conservées, même entre populations différentes.

→ Il n'est pas possible d'assigner une espèce à une souche du complexe *Y. pseudotuberculosis* sur la base du pourcentage d'identité de l'ADNr 16S.

✓ Toutefois, Sprague et coll. (2005), lors de la définition de l'espèce *Y. similis*, ont identifié une séquence spécifique de l'espèce *Y. similis* qui permet de la différencier de l'espèce *Y. pseudotuberculosis*.

```

Y. pst.  985-AGAATTGGCAGAGATGCTAA-1006
Y. sim.  985-AGCATTGGCAGAGATGCCTTA-1006
GC       985-AGRATTGGCAGAGATGCTRAA-1006
R : A ou G.
  
```

→ Toutes les souches de *Y. similis* ont la même séquence (« G » en position 988 et « CTT » en position 1003).

→ Toutes les souches de *Y. pseudotuberculosis* ont la même séquence (« A » en position 988 et « TAA » en position 1003).

→ Les souches du Groupe Coréen ont une certaine variabilité dans cette séquence (« R » en position 988 et « TRA » en position 1003).

→ Certaines souches du Groupe Coréen ont donc la même séquence que les souches de *Y. pseudotuberculosis* à ces positions.

✓ Cependant, nous avons identifié un polymorphisme au niveau d'un nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism ou « SNP ») spécifique de la population du Groupe Coréen.

<i>Y. pst.</i>	181-GGGACCTT A GGGCCTCACGC-200
<i>Y. sim.</i>	181-GGGACCTT A GGGCCTCACGC-200
GC	181-GGGACCTT C GGGCCTCACGC-200

→ En position 189, les souches de *Y. pseudotuberculosis* et de *Y. similis* ont un « A » alors que les souches du Groupe Coréen ont un « C ».

→ Basé sur la séquence de l'ADNr 16S, il est possible d'identifier les 3 populations dans le complexe *Y. pseudotuberculosis*.

MLSA

• Qu'est-ce que la technique MLSA ?

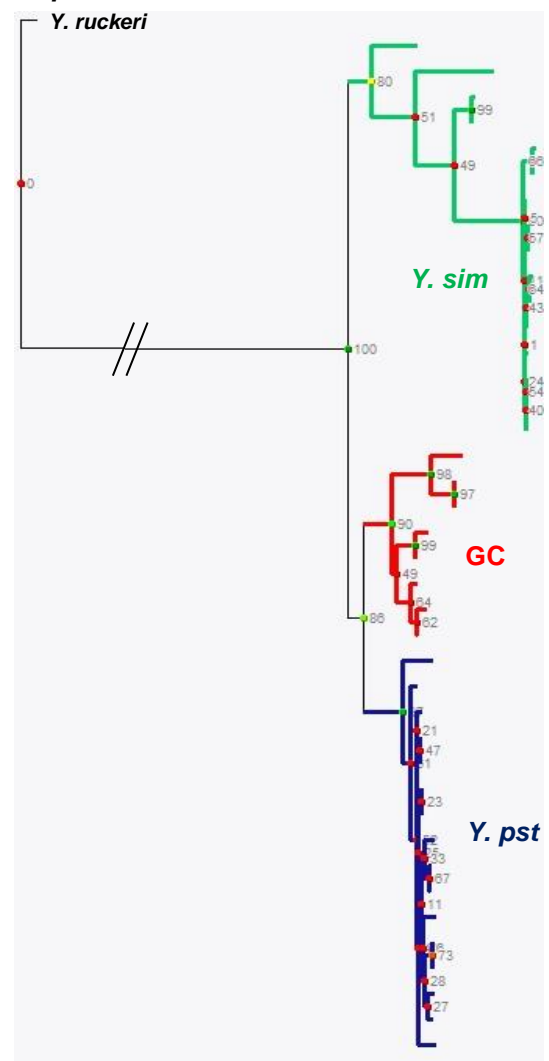
✓ Comme la MLST, elle consiste en l'amplification et le séquençage de gènes de ménage. : *glnA*, *gyrB*, *hsp60* et *recA* (Kotetishvili et coll., 2005).

✓ Pour chaque souche, les séquences des 4 gènes de ménage sont concaténées avant d'effectuer une analyse phylogénétique.

✓ La MLSA est souvent utilisée quand les liens phylogénétiques entre les populations ne sont pas connus.

✓ Cette technique a été appliquée aux 40 souches du complexe *Y. pseudotuberculosis* (Figure 1)

Figure 1 : Arbre phylogénétique obtenu par MLSA sur 40 souches du complexe *Y. pseudotuberculosis*.



Y. sim : *Y. similis* ; GC : Groupe Coréen ;
Y. pst : *Y. pseudotuberculosis*

→ L'arbre phylogénétique obtenu montre qu'il y a 3 branches, chacune correspondant à 1 population différente.

→ L'espèce *Y. similis* est plus distante des 2 autres populations.

Average Nucleotide Identity (ANI)

- Qu'est-ce que la technique de l'ANI ?
- ✓ C'est une technique qui permet d'évaluer finement les relations génétiques entre des souches.
- ✓ Elle est basée sur le séquençage du génome complet de chaque souche à étudier.
- ✓ Elle permet, en comparant les génomes 2 à 2, de mesurer un pourcentage d'identité génétique moyen entre les souches.
- ✓ Nous avons séquencé le génome de 5 souches de *Y. similis* et de 5 souches du Groupe Coréen. En comparant ces génomes avec ceux de 4 souches de *Y. pseudotuberculosis* présents dans les bases de données, nous avons pu calculer leurs ANI :

Calcul de l'ANI	<i>Y. pst</i> ^a	<i>Y. sim</i> ^b	GC ^c
<i>Y. pst</i> ^a	99,2%		
<i>Y. sim</i> ^b	94,6%	99,4%	
GC ^c	97,4%	94,7%	99%

- ✓ Au sein de chaque population, l'ANI moyen est $\geq 99\%$, confirmant la grande homogénéité de ces populations.
- ✓ Le Groupe Coréen est le plus hétérogène (ANI moyen = 99%).
- ✓ Les ANI calculés entre populations sont toujours plus faibles qu'au sein d'une même population.
- ➔ **Le calcul d'ANI confirme l'existence de 3 populations génétiques distinctes au sein**

du complexe *Y. pseudotuberculosis* et indique que le Groupe Coréen et *Y. pseudotuberculosis* sont plus proches l'un de l'autre que de *Y. similis*.

Conclusion

➔ L'étude du complexe *Y. pseudotuberculosis* avait déjà montré que les 3 populations étaient identifiables à partir de caractères phénotypiques (caractères métaboliques ou spectrométrie de masse).

➔ L'analyse génétique des souches de ce complexe confirme l'existence de 3 populations proches les unes des autres mais cependant distinctes.

➔ La distinction génétique du Groupe Coréen des autres populations ainsi que la présence de marqueurs phénotypiques spécifiques indiquent que le Groupe Coréen représente une nouvelle espèce à laquelle nous avons donné le nom de *Yersinia wautersii* (Savin et coll., 2014) – Description complète dans le tableau 1.

➔ La proximité génétique entre *Y. wautersii* et *Y. pseudotuberculosis* suggère que la première a émergé récemment de la seconde.

➔ Nous avons montré (fascicule 18) le caractère potentiellement pathogène pour l'homme de *Y. wautersii*. L'isolement de certaines de ces souches en Asie puis en Europe (Suède et Allemagne) suggère une expansion géographique de cette espèce d'intérêt clinique, avec la possibilité d'observer des cas humains dans un avenir proche en France.

Tableau 1 : description de l'espèce *Y. wautersii*

Nom	<i>Yersinia wautersii</i> (wau.ter.si'i, N.L. gen. masc. n. <i>wautersii</i>) Nom donné en l'honneur du Pr Georges Wauters, yersiniologue belge qui a grandement participé à la caractérisation du genre <i>Yersinia</i> , en particulier le schéma de biotypage de <i>Yersinia enterocolitica</i> .
Morphologie	Bacilles coccoïdes à Gram négatif De petites colonies apparaissent sur agar TSA après 24h de croissance à 28°C ou 37°C.
Caractères métaboliques positifs	β-galactosidase, uréase, glycérol, L-arabinose, D-xylose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-rhamnose, D-mannitol, N-acétylglucosamine, arbutine, esculine, D-maltose, D-trehalose, D-raffinose and D-arabitol.
Caractères métaboliques négatifs	Arginine décarboxylase, lysine décarboxylase, ornithine décarboxylase, tryptophane deaminase, production de H ₂ S, production d'indole, Voges-Proskauer, gélatinase, pyrazinamidase, érythritol, D-arabinose, L-xylose, méthyl-βD-xylopyranoside, L-sorbose, dulcitol, inositol, D-sorbitol, méthyl-βD-mannopyranoside, méthyl-βD-glucopyranoside et amygdaline.
Description de l'espèce	Basée sur 7 souches
Souche type	12-219N1 ^T (=CIP110607 ^T =DSM27350 ^T)
Pourcentage de GC	46,6%
Séquence de l'ADNr 16S	Numéro d'accèsion Genbank HG326166

Références

Oren, A., Garrity, G.M., 2014. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 64, 2184-2187.

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

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

Sprague, L.D., Scholz, H.C., Amann, S., Busse, H.J., Neubauer, H., 2008. *Yersinia similis* sp nov. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 58, 952-958.

Kotetishvili, M., Kreger, A., Wauters, G., Morris, J.G., Sulakvelidze, A., Stine, O.C., 2005. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2674-2684.



NOUVEAUX CORRESPONDANTS

Bienvenue aux laboratoires ayant rejoint le Réseau National de Surveillance des *Yersinia* (RNSY) entéropathogènes en 2014 :

DEPT(10) – LABORATOIRE DE LA GARE-SELARL – 51 rue Carnot – 10100 Romilly-sur-Seine.

DEPT(12) – LABORATOIRE LX BIO – 105-107 avenue de la gineste – 12000 Rodez.

DEPT(33) – LBM EXALAB – 75 rue de la morandière – 33185 Le Haillan.

DEPT(34) – LABOSUD OC BIOLOGIE – 335 rue Louis Lépine – 34000 Montpellier.

DEPT(62) – SELARL BIOPATH – Laboratoire de bactériologie – 360 boulevard du parc – 62231 Coquelles.

DEPT(64) – LBM BIOPYRENEES – 39 rue gachet – 64000 Pau.

DEPT(66) – MEDILAB66 – 14 avenue de la méditerranée – 66140 Canet en Roussillon.

DEPT(69) – DYOMEDEA – 52 avenue du point du jour – 69005 Lyon.

➔ A présent, le RNSY est constitué de 104 laboratoires : 60 laboratoires hospitaliers/cliniques et 44 laboratoires de ville.

NOUVEAU SITE WEB

Un nouveau site internet a été mis en place depuis décembre 2014 et est à votre disposition à l'adresse suivante :

<http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-referance/les-cnr/peste-et-autres-yersiniozes>

Nous espérons qu'il répondra à vos attentes. N'hésitez pas à nous faire un retour d'expérience.

DANS LE PROCHAIN FASCICULE,

« DIAGNOSTIC RAPIDE DES YERSINIA ENTEROPATHOGENES DANS LES SELLES »



CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DE LA PESTE ET AUTRES YERSINIOSES

INSTITUT PASTEUR

UNITE DES *YERSINIA*

28, RUE DU DOCTEUR ROUX

75724 PARIS CEDEX 15 (France)

☎ 01 40 61 37 67 📠 01 45 68 89 54

Site web : <http://www.pasteur.fr>

CONTACT: Cyril SAVIN. E-mail : cyril.savin@pasteur.fr