



Centre National de Référence de la Peste et autres yersiniose

Bilan des activités 2017-2021

Directrice : Anne-Sophie Le Guern

Directeurs adjoints : Cyril Savin
Javier Pizarro-Cerda

Coordonnées

adresse : Institut Pasteur - 28 rue du Dr Roux – 75724 Paris Cedex

e-mail : cnr.Yersinia@pasteur.fr

téléphone : 01 45 68 83 27

Table des matières

1. Présentation des <i>Yersinia</i>	3
1.1 <i>Y. pestis</i> , l'agent de la peste	3
1.2 <i>Y. enterocolitica</i> et <i>Y. pseudotuberculosis</i> , deux espèces entéropathogènes	3
1.3 Les autres <i>Yersinia</i>	4
2. Missions et objectifs principaux du CNR	4
3. Capacités techniques	5
3.1 Techniques de diagnostic, identification et évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux	5
3.1.1 <i>Yersinia</i> entéropathogènes et apparentés	5
3.1.2 <i>Yersinia pestis</i>	5
3.2 Techniques de typage	6
3.2.1 <i>Yersinia</i> entéropathogènes et apparentés	6
3.2.2 <i>Yersinia pestis</i>	6
4. Activités d'expertise	7
4.1 Nombre de souches reçues	7
4.2 Évolution des techniques du CNR pendant la période 2017-2021	8
4.2.1 Identification et caractérisation génotypique des <i>Yersinia</i> par cgMLST	8
4.2.2 Typage des souches de <i>Yersinia</i> pathogènes par cgMLST	9
4.2.3 Diagnostic de la peste	10
5. Activités de surveillance	11
5.1 Infections à <i>Y. enterocolitica</i>	12
5.2 Infections à <i>Y. pseudotuberculosis</i>	13
5.3 Les autres <i>Yersinia</i>	14
5.4 Résistance aux antibiotiques	15
6. Réseau National de Surveillance des <i>Yersinia</i> entéropathogènes (RNSY)	15
7. Autres travaux du CNR pendant la période 2017-2021	16
7.1 Études de surveillance	16
7.2 Amélioration du diagnostic	18
7.3 Investigation de formes cliniques inhabituelles	20
7.4 Vaccin contre la peste	21

1. Présentation des *Yersinia*

Le genre *Yersinia* appartient à l'ordre des *Enterobacterales* et à la famille des *Yersiniaceae* et est composé de 26 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 depuis le début des années 90 par 28 pays. L'Afrique est le continent le plus touché, suivi par l'Asie puis par l'Amérique. Les foyers de peste humaine les plus importants se situent à Madagascar et en République Démocratique du Congo. Elle se manifeste le plus souvent sous forme de cas sporadiques ou de petites épidémies dans des villages ruraux de pays très pauvres. Cependant des épidémies meurtrières de peste pulmonaire surviennent encore comme en République Démocratique du Congo en 2005 et à Madagascar en 2017. La maladie ne se limite pas seulement aux pays en voie de développement mais touche aussi l'Ouest des Etats-Unis. Enfin, des cas de peste sont réapparus dans des régions indemnes depuis plusieurs décennies (comme en Algérie, Afghanistan, Libye, Kirgizstan et en Russie) faisant considérer la peste comme une maladie 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 une peste pulmonaire secondaire. Une transmission interhumaine de la peste est alors possible 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 3 jours. Les traitements antibiotiques doivent être administrés avant la phase d'état, 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 (dernier 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. D'autre part, *Y. pestis* fait partie de l'arsenal microbiologique potentiellement utilisable au cours de conflits armés ou à des fins bioterroristes et représente de ce fait une menace pour l'ensemble du globe.

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 animales sauvages (rongeurs, lièvres, oiseaux, etc.). L'environnement est contaminé par l'intermédiaire des déjections de ces animaux infectés ou porteurs.

La transmission à l'homme se fait par ingestion d'aliments contaminés, et plus rarement par contact direct avec un animal infecté. Une transmission interhumaine manuportée 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, Etats-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 en revanche souvent sévères et invasives chez les personnes de plus de 60 ans.

Y. enterocolitica représente la troisième cause de diarrhées bactériennes en Europe. L'incidence annuelle en France a été estimée à 42 cas/100 000 habitants en 2013. Elle doit probablement être supérieure maintenant, car le nombre de souches reçus au CNR pour caractérisation augmente de façon continue et régulière : augmentation de 239% entre 2013 et 2021.

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. alsatica*, *Y. artesianiana*, *Y. canariae*, *Y. hibernica*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. occitanica*, *Y. proxima*, *Y. thracica*, *Y. vastinensis*, *Y. ruckeri*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. aleksiciae*, *Y. similis*, *Y. massiliensis*, *Y. entomophaga*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii* et *Y. wautersii*.

La pathogénicité de *Y. wautersii* pour l'homme 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 ne sont pathogènes pour l'homme. Il en va de même des *Y. enterocolitica* des génotypes 1Aa et 1Ab. 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

Les missions du CNR comprennent :

- L'expertise sur les *Yersinia*, le diagnostic des yersinioses entériques et de la peste et la caractérisation des souches de *Yersinia* isolées en France avec notamment la détermination de leur caractère potentiellement pathogène et leur sensibilité aux antibiotiques.
- La surveillance épidémiologique des yersinioses et l'analyse des caractéristiques épidémiologiques et microbiologiques des infections à *Yersinia*.
- Le conseil aux cliniciens et aux acteurs de la santé publique, la formation, l'édition de guides et de revues sur les *Yersinia*, l'interaction avec des institutions et des correspondants étrangers, et la participation à des comités d'experts français et internationaux
- Le signalement de cas groupés, le déclenchement d'alertes, l'investigation de phénomènes anormaux.

3. Capacités techniques

3.1 Techniques de diagnostic, identification et évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

3.1.1 *Yersinia* entéropathogènes et apparentés

Diagnostic sur prélèvement :

- Recherche de *Yersinia* pathogènes dans des organes par PCR conventionnelle et PCR en temps réel ciblant des gènes situés sur le plasmide de virulence pYV (*yopM*, *virF*) et des gènes chromosomiques spécifiques des espèces *Y. enterocolitica* (*ystA*, *ail*) et *Y. pseudotuberculosis* (*invA*).

Caractérisation de souches :

- Caractérisation phénotypique de souches (technique accréditée ISO 15189) : confirmation de genre, d'espèce et de biotype par tests biochimiques : API20E, API50CH, lipase, pyrazinamidase.
- Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé et CMI par micro-dilution en milieu liquide.
- Caractérisation génotypique de souches (technique en cours d'accréditation) : identification de genre, espèce et sous-espèce par séquençage du génome complet suivi d'une cgMLST spécifique du genre *Yersinia*.
- Recherche de gènes de résistance aux antibiotiques et/ou de gènes de virulence spécifiques par séquençage du génome complet et analyse des données de séquence par le logiciel « Resfinder ».
- Recherche de gènes de virulence spécifiques par séquençage du génome complet et analyse des données de séquence avec un schéma cgMLST de ces gènes de virulence.

3.1.2 *Yersinia pestis*

Diagnostic sur prélèvement :

- Sérodiagnostic de peste par sérologie anti-antigène F1 de *Y. pestis* en ELISA.
- Recherche de l'antigène F1 par test bandelette rapide.
- Recherche de *Y. pestis* dans un échantillon biologique par PCR en temps réel, ciblant les gènes *pla* et *caf1*.
- Isolement de *Y. pestis* dans un échantillon biologique par culture microbiologique.

Diagnostic sur souches :

- Identification par PCR ciblant les gènes *pla*, *caf1* et *inv*.
- Test de lyse par un phage spécifique de *Y. pestis*.

Caractérisation de souches :

- Identification de genre, espèce et sous-espèce par séquençage complet suivi d'une cgMLST spécifique du genre *Yersinia*.
- Recherche de gènes de résistance aux antibiotiques par séquençage du génome complet et analyse des données de séquence par le logiciel « Resfinder ».
- Recherche de gènes de virulence spécifiques par séquençage du génome complet et analyse des données de séquence avec un schéma cgMLST de ces gènes de virulence.
- Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé et CMI par micro-dilution en milieu liquide.

3.2 Techniques de typage

3.2.1 *Yersinia* entéropathogènes et apparentés

Sérotypage des souches pathogènes et lysotypage des souches de *Y. enterocolitica* du biotype 4 (ces tests ne sont plus utilisés en routine, mais sont utilisables si besoin).

Génotypage par séquençage du génome complet suivi de :

- cgMLST spécifique de l'espèce *Y. enterocolitica* ou de l'espèce *Y. pseudotuberculosis* et comparaison des souches par évaluation de leur distance allélique.
- Comparaison de souches par analyse de SNP.

3.2.2 *Yersinia pestis*

Détermination du biovar par tests biochimiques.

Génotypage par séquençage du génome complet suivi de :

- cgMLST spécifique de l'espèce *Y. pseudotuberculosis* (*Y. pestis* est une sous-espèce de *Y. pseudotuberculosis*) et comparaison des souches par évaluation de leur distance allélique.
- Comparaison de souches par analyse de SNP.

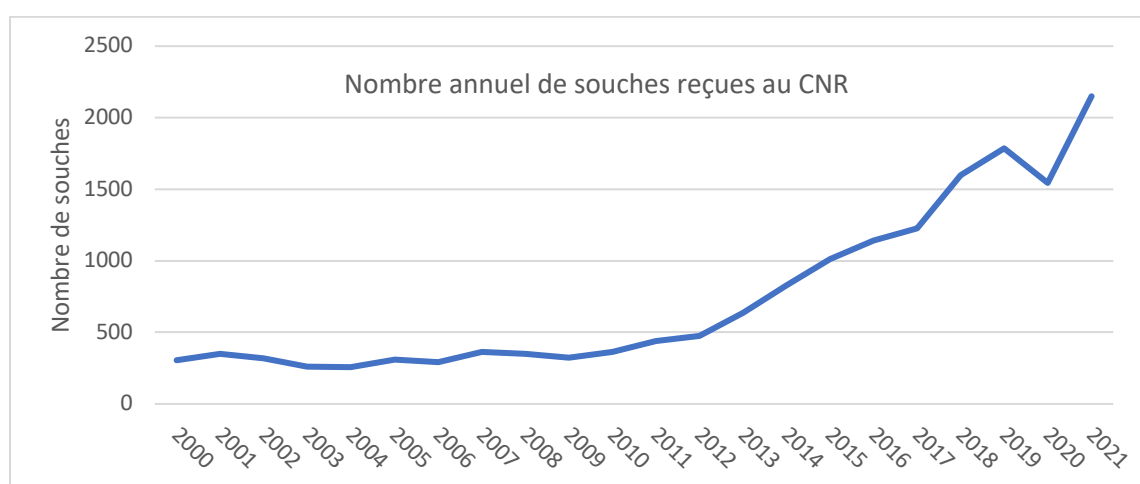
4. Activités d'expertise

4.1 Nombre de souches reçues

Au total, 8216 souches de *Yersinia* autres que *Y. pestis* ont été reçues au CNR entre 2017 et 2021 pour caractérisation.

Dans leur très grande majorité (8062 souches = 98,1%), 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, Belgique, Costa Rica, Italie, et Monaco).

Depuis 2009, le nombre de souches reçues au CNR ne cesse d'augmenter, sauf en 2020 où l'activité du CNR a été ralentie pendant la période de confinement entre les mois de mars et mai. L'augmentation est importante et régulière. Le nombre de souches reçues au CNR est passé de 321 en 2009 à 2093 en 2021.



Cette augmentation est la conjonction de plusieurs facteurs :

- Le CNR a rédigé des recommandations dans les référentiels de microbiologie préconisant la recherche systématique des *Yersinia* dans les selles (REMIC 2015 et 2018).
- Les LBM utilisent de plus en plus la spectrométrie de masse de MALDI-ToF pour l'identification des bactéries. Cette technique permettant d'analyser jusqu'à 96 colonies dans une même série, toutes les colonies suspectes sur les boîtes d'isolement peuvent être analysées, ce qui augmente significativement les chances d'identifier une *Yersinia*.
- Les LBM sont soumis à l'accréditation selon la norme ISO 1589. Ils doivent interpréter leurs résultats. Pour conclure sur la pathogénicité des *Yersinia* isolées, ils envoient leurs souches au CNR pour caractérisation.
- La forte augmentation des souches depuis 2017 peut être due à l'utilisation de plus en plus fréquente des PCR multiplex pour la détection des pathogènes gastro-intestinaux. Ces PCR sont très sensibles et alertent les biologistes sur la présence très probable d'une *Yersinia* dans les selles. Les biologistes les recherchent alors activement, faisant augmenter le taux d'isolement des souches de *Yersinia*.

4.2 Évolution des techniques du CNR pendant la période 2017-2021

4.2.1 Identification et caractérisation génotypique des *Yersinia* par cgMLST

Jusqu'en 2017, l'identification et la caractérisation des souches de *Yersinia* se faisait par une méthode phénotypique basée sur des tests biochimiques : API20E, API50, recherche des activités lipase et pyrazinamidase.

En 2017, le CNR a développé une méthode d'identification et de caractérisation des souches de *Yersinia*, basée sur l'analyse génomique des souches. Il s'agit d'une core genome Multi Locus Sequence Typing (cgMLST) avec un schéma de 500 gènes communs à toutes les espèces de *Yersinia*. Un profil allélique est attribué à chaque génome puis comparé à une base de données de profils alléliques correspondant à des génomes de référence. L'assignation taxonomique d'une souche correspond au génome de référence dont le profil allélique est le plus proche.

D'un point de vue scientifique, la caractérisation génomique des souches a plusieurs avantages par rapport à la caractérisation phénotypique :

- une identification précise des espèces de *Yersinia* ;
- la possibilité de définir des sous-groupes de façon plus fine ;
- l'attribution fiable d'une espèce et d'un sous-type aux souches phénotypiquement atypiques ;
- la possibilité de détecter des cas groupés avec une sensibilité bien supérieure aux techniques de typage classique, sans nécessité de délai supplémentaire ;
- la détection de l'expansion clonale d'une souche particulière ;
- la disponibilité d'une base de données extensive permettant de comparer toutes les souches entre elles.

Cette méthode permet une subdivision plus fine des espèces pathogènes *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* en sous-espèces (génotypes). Il existe une corrélation entre les espèces et sous-espèces obtenues par cgMLST et les espèces et biosérotypes obtenues par caractérisation phénotypique.

IDENTIFICATION GENOTYPIQUE		IDENTIFICATION PHENOTYPIQUE	
Espèce	Génotype	Espèce	Biosérotipe
<i>Y. enterocolitica</i>	1Aa	<i>Y. enterocolitica</i>	1A
	1Ab		
<i>Y. enterocolitica</i>	1B	<i>Y. enterocolitica</i>	1B
<i>Y. enterocolitica</i>	2/3-9a	<i>Y. enterocolitica</i>	2/O:9
	2/3-9b		
<i>Y. enterocolitica</i>	2/3-5a	<i>Y. enterocolitica</i>	2 ou 3/O:5,27
	2/3-5b		
<i>Y. enterocolitica</i>	3-3a	<i>Y. enterocolitica</i>	3/O:3
	3-3b		
	3-3c		
	3-3d		
<i>Y. enterocolitica</i>	4	<i>Y. enterocolitica</i>	4/O:3
<i>Y. enterocolitica</i>	5	<i>Y. enterocolitica</i>	5
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	1 à 154	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Sérotypes I à V

La validation de la méthode a été faite par comparaison des assignations taxonomiques de 1800 souches obtenues par caractérisation phénotypique et par caractérisation génotypique. La sensibilité et la spécificité étaient de 100% et la cgMLST a permis d'identifier de façon fiable 28 souches qui présentaient des anomalies phénotypiques.

La méthode est utilisée en routine au CNR depuis décembre 2017. Le développement et la validation de cette méthode ont fait l'objet d'une publication scientifique en 2019 (Savin et al, Microbial Genomics, 2019, DOI : [10.1099/mgen.0.000301](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000301)). Dans le but de fournir à la communauté scientifique un outil d'identification fiable des souches de *Yersinia*, une base de données des profils cgMLST associée à l'assignation taxonomique correspondante a été rendue publique (<https://bigsd.b.pasteur.fr/Yersinia>).

D'autre part, lors du développement de la méthode, une analyse phylogénétique portant sur les souches constituant la base de référence a mis en évidence 8 nouvelles espèces de *Yersinia*. Ces nouvelles espèces sont considérées comme non pathogènes, car dépourvues des facteurs de virulence classiques des *Yersinia* pathogènes. Elles correspondent en identification phénotypique à certaines souches de *Y. enterocolitica*, de *Y. frederiksenii* et de *Y. kristensenii*. Le CNR a décrit 6 de ces 8 nouvelles espèces (Le Guern et al, Int J Syst Evol Microbiol., 2020, DOI : [10.1099/ijsem.0.004417](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004417))

Avec ses 8 nouvelles espèces, le genre *Yersinia* comporte dorénavant 26 espèces.

ESPÈCES PATHOGÈNES POUR L'HOMME	ESPÈCES NON PATHOGÈNES	
	DÉCRITES AVANT 2019	DÉCRITES EN 2019-2020
<i>Y. pestis</i>	<i>Y. aldovae</i>	<i>Y. alsatica</i>
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. aleksiciae</i>	<i>Y. artesia</i>
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. bercovieri</i>	<i>Y. canariae</i>
	<i>Y. frederiksenii</i>	<i>Y. hibernica</i>
	<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. occitanica</i>
ESPECE POTENTIELLEMENT PATHOGENE POUR L'HOMME	<i>Y. kristensenii</i>	<i>Y. proxima</i>
<i>Y. wautersii</i>	<i>Y. massiliensis</i>	<i>Y. thracica</i>
ESPECE PATHOGENE POUR LES POISSONS	<i>Y. mollaretii</i>	<i>Y. vastinensis</i>
<i>Y. ruckeri</i>	<i>Y. nurmii</i>	
	<i>Y. pekkanenii</i>	
ESPECE PATHOGENE POUR LES INSECTES	<i>Y. rohdei</i>	
<i>Y. entomophaga</i>	<i>Y. similis</i>	

4.2.2 Typage des souches de *Yersinia* pathogènes par cgMLST

Jusqu'en 2017, le typage des souches de *Yersinia* se faisait par des méthodes phénotypiques (biotypage, sérotypage et lysotypage) et par des méthodes moléculaires (PFGE, MLVA, MLST, IS-RFLP). Les méthodes phénotypiques n'étaient pas assez discriminantes et les méthodes moléculaires étaient laborieuses, longues et ne permettaient pas de comparer les résultats obtenus dans des laboratoires différents.

En 2018, le CNR a développé des cgMLST spécifiques des espèces *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*. La cgMLST spécifique de *Y. enterocolitica* comporte 1727 gènes communs aux *Y. enterocolitica*. La cgMLST spécifique de *Y. pseudotuberculosis* comporte 1921 gènes communs aux *Y. pseudotuberculosis*.

Les profils alléliques des souches à étudier sont comparés et la distance génétique est exprimée en nombre d'allèles différents.

Pour la recherche des cas groupés, des seuils de nombre d'allèles différents en dessous desquels on considère que les souches sont très proches génétiquement ont été fixés grâce à une analyse rétrospective des souches reçues au CNR. Ce seuil a été fixé à 6 allèles différents pour les *Y. enterocolitica* pathogènes, à l'exception du génotype 2/3-9b où le seuil a été fixé à 4 allèles car ce sous-groupe est plus clonal. Ces seuils seront réévalués au fil du temps si nécessaire.

Quant à *Y. pseudotuberculosis*, à la suite de l'investigation moléculaire des souches impliquées dans une épidémie de pseudotuberculose en Corse en 2020, le seuil de proximité a été fixé à 6 différences alléliques.

Cette technique de typage par cgMLST spécifique d'espèce est utilisée en routine depuis 2018 pour la recherche systématique des cas groupés de *Y. enterocolitica* et de *Y. pseudotuberculosis* ainsi que pour les investigations d'épidémie signalées par les ARS ou SpF. Un article décrivant l'investigation par cgMLST d'une épidémie d'infections à *Y. pseudotuberculosis* en Corse en 2020 a été publié par le CNR en 2022 (Savin et al., Microbiol Spectr., 2022, [doi : 10.1128/spectrum.01145-22](https://doi.org/10.1128/spectrum.01145-22))

Le typage des souches de *Y. pestis* est réalisé par la cgMLST spécifique de *Y. pseudotuberculosis* car *Y. pestis* est une sous-espèce de *Y. pseudotuberculosis*.

4.2.3 Diagnostic de la peste

Jusqu'en 2017, le diagnostic de la peste sur échantillons biologiques se faisait par une combinaison de 3 méthodes :

- La détection de l'Ag F1 par un test de dépistage rapide (TDR) dont le résultat est obtenu en 15 minutes. C'est un test sensible et spécifique, mais peu adapté aux échantillons glaireux et épais qui ont du mal à migrer le long de la bandelette réactive.
- La détection d'ADN de *Y. pestis* par PCR conventionnelle ciblant les gènes *pla*, *caf1*, *inv* et *yopM*. Cette technique nécessite 3 étapes (extraction d'ADN, amplification d'ADN et électrophorèse en gel d'agarose) et le résultat est obtenu en environ 5 heures.
- L'isolement de *Y. pestis* par culture sur gélose CIN suivi de l'identification bactérienne. Cette méthode est longue car elle nécessite 4 à 5 jours.

Lors de l'épidémie de peste pulmonaire à Madagascar à l'automne 2017, le CNR a mis en place une PCR en temps réel (qPCR) qui permet d'obtenir un résultat en 3 heures à partir d'une expectoration ou d'un autre type d'échantillon. Elle est basée sur une publication de Riehm *et al.* (Molecular and Cellular Probes 25, 2011, 8-12). Elle consiste en une extraction d'ADN du prélèvement suivie d'une PCR duplex en temps réel avec des sondes d'hybridation portant un fluorophore. La PCR cible les gènes *caf1* et *pla* de *Y. pestis*. Cette qPCR, déjà publiée, a été validée au CNR sur un petit nombre d'échantillons contrôles positifs et négatifs et sera évaluée sur un nombre plus important d'échantillons de malades si une épidémie survient à nouveau.

À la suite de cette mise en place, les critères biologiques entrant dans la définition d'un cas de peste en France ont été revus et incluent dorénavant la PCR en temps réel ciblant les gènes *caf1* et *pla*, la confirmation par la PCR conventionnelle et l'isolement de *Y. pestis* par culture.

5. Activités de surveillance

Au total, 8216 souches de *Yersinia* ont été caractérisées au CNR sur la période 2017-2021. Leur distribution par espèce est la suivante :

Espèce	Nombre	%
<i>Y. enterocolitica</i>	7751	94,34
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	107	1,30
<i>Y. frederiksenii</i>	79	0,96
<i>Y. bercovieri</i>	76	0,92
<i>Y. proxima</i>	54	0,66
<i>Y. intermedia</i>	51	0,62
<i>Y. rohdei</i>	25	0,30
<i>Y. kristensenii</i>	17	0,20
<i>Y. alsatica</i>	18	0,22
<i>Y. mollaretii</i>	15	0,18
<i>Y. massiliensis</i>	8	0,10
<i>Y. aleksiciae</i>	5	0,07
<i>Y. artesianae</i>	4	0,05
<i>Y. vastinensis</i>	3	0,04
<i>Y. occitanica</i>	3	0,04
Total	8216	100

L'espèce *Y. enterocolitica* est très largement majoritaire.

Dans leur très grande majorité (8062 souches = 98,1%), 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, Belgique, Costa Rica, Italie, et Monaco).

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* et les *Y. enterocolitica* des génotypes 1B, 2/3-5a, 2/3-5b, 3/3a, 3/3b, 3/3c, 3/3d, 4 et 5.
- Les souches non pathogènes pour l'homme : les *Y. enterocolitica* des génotypes 1Aa et 1Ab et les autres espèces de *Yersinia*.

Ainsi, parmi les 8062 souches de *Yersinia* reçues de laboratoires français lors de la période 2017-2021, 5252 d'entre elles (65,1%) correspondaient à des souches pathogènes pour l'homme :

- 104 *Y. pseudotuberculosis*,
- 5148 *Y. enterocolitica* appartenant à des génotypes pathogènes.

Ces souches pathogènes ont été principalement isolées de cas humains (99,8%) et plus rarement d'animaux (0,2%), 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.

5.1 Infections à *Y. enterocolitica*

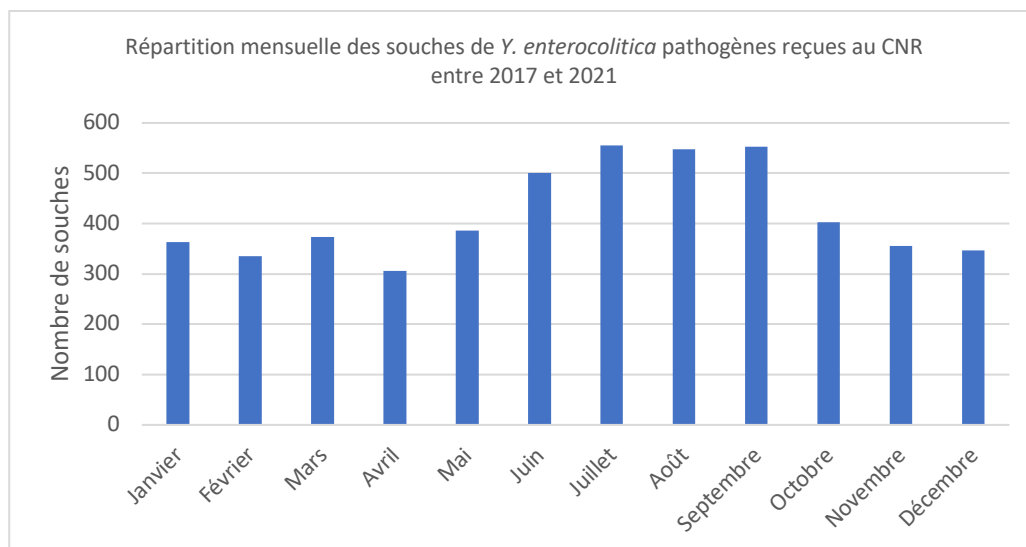
En pathologie humaine, le tableau clinique prédominant est celui d'une gastro-entérite avec classiquement la triade diarrhées-fièvre-douleurs abdominales. Il n'est cependant pas rare qu'un seul de ces trois symptômes soit observé.

Ces formes digestives d'infections à *Y. enterocolitica* touchent surtout l'enfant de moins de 10 ans (42,1%). Les formes extra digestives sont retrouvées surtout chez les sujets âgés et correspondent à des formes graves avec localisations profondes et/ou dissémination systémique. Ainsi 94,2% des sujets septicémiques avaient plus de 50 ans et 78,8% plus de 70 ans.

Il ressort de ceci que les sujets jeunes sont les plus souvent infectés et développent des formes 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 toujours dans le sexe masculin (56% des cas).

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



Comme le montre le tableau ci-dessous, les souches cliniques de *Y. enterocolitica* pathogènes isolées en France appartiennent à 8 génotypes, avec une très nette prédominance des souches du génotype 4, suivies par celles du génotype 2/3-9b.

Génotype	Nombre	%
4	4486	87,14
2/3-9b	544	10,57
2/3-5a	62	1,20
2/3-9a	35	0,68
3/3b	7	0,14
1B	6	0,12
3/3c	6	0,12
3/3d	2	0,04
Total	5148	100

Les souches des génotypes 2/3-9a, 2/3-5a et 2/3-9b semblent avoir une capacité de dissémination systémique plus élevée que les souches du génotype 4, puisque 8,8% (3/34) des souches de génotype 2/3-9a, 4,8% des souches du génotype 2/3-5a (3/62) et 4% des souches du génotype 2/3-9b (22/544) ont été à l'origine de formes septicémiques contre seulement 1,7% des souches du génotype 4.

5.2 Infections à *Y. pseudotuberculosis*

Les souches de *Y. pseudotuberculosis* isolées sur la période 2017-2021 appartiennent à 14 génotypes différents. Les souches des génotypes 10 (27,9%) et 15 (23,1%) sont les plus fréquemment isolées.

Génotype	Nombre	%
10	29	27,88
15	24	23,08
16	14	13,46
7	13	12,50
2	5	4,81
4	3	2,88
5	3	2,88
11	3	2,88
12	3	2,88
17	3	2,88
13	1	0,96
14	1	0,96
19	1	0,96
25	1	0,96
Total	104	100

Le nombre de souches isolées chez l'homme étant relativement faible (104 isolats), il est un peu risqué d'en tirer des conclusions générales. Cependant, la tendance observée au cours de la période 2017-2021 reflète celle des décennies antérieures et montre certaines similitudes et différences avec les infections à *Y. enterocolitica*.

Comme pour *Y. enterocolitica*, le sexe masculin est le plus souvent touché (63,6% des cas) et toutes les tranches d'âge sont affectées. Les formes digestives prédominent chez l'enfant de moins de 10 ans (où elles représentent 95,8% des cas) et les formes extra-digestives chez le sujet de plus de 60 ans (où elles représentent 67,6% des cas).

Cependant à l'inverse des infections à *Y. enterocolitica*, les cas de pseudotuberculose humaine ont tendance à être plus nombreux en hiver et au printemps et les formes graves avec localisations extra digestives sont fréquentes : 29,3% des souches de *Y. pseudotuberculosis* reçues au CNR étaient isolées du sang, de ganglions ou d'abcès profond.

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 par le 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.

5.3 Les autres *Yersinia*

2723 souches de *Yersinia* non pathogènes ont été envoyées au CNR par des laboratoires français :

- 2472 souches de *Y. enterocolitica* du génotype 1Aa et 40 souches du génotype 1Ab,
- 211 souches correspondant à d'autres espèces de *Yersinia*.

Ces souches ont été principalement (99%) isolées de selles humaines. 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 (32,7%) des souches de *Y. enterocolitica* isolées de selles humaines sont non pathogènes.

Comme très peu de LBM déterminent le caractère pathogène des souches, si ces souches ne sont pas envoyées au CNR pour caractérisation, un faux diagnostic positif peut être posé, pouvant aboutir à un traitement injustifié et un retard dans l'identification de la réelle étiologie des symptômes.

A défaut de déterminer le caractère pathogène des 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.

Le CNR joue un rôle majeur dans la distinction des souches pathogènes et non pathogènes de *Y. enterocolitica*.

5.4 Résistance aux antibiotiques

Une analyse systématique de la sensibilité aux antibiotiques des *Yersinia* pathogènes envoyées au CNR par les laboratoires français est effectuée depuis 2003.

La plupart des souches de *Y. enterocolitica* produisent une pénicillinase et une céphalosporinase inducible d'origine chromosomique qui les rendent résistantes aux bêta-lactamines et aux céphalosporines de 1^{ère} génération, et plus ou moins à celles de 2^{ème} génération. *Y. pseudotuberculosis* en revanche ne présente pas ces résistances.

Pour *Y. enterocolitica*, on observe des profils différents entre les génotypes :

Pour les souches de *Y. enterocolitica* du génotype 4, les antibiotiques pour lesquels la proportion de souches sensibles est la plus forte sont les céphalosporines de 2^{ème} et 3^{ème} génération (100%), les carbapénèmes (100%), les aminosides (100%), le cotrimoxazole (99,3%), la ciprofloxacine (99,6%). De plus, l'association amoxicilline + acide clavulanique est très peu efficace (> 92% de résistance).

Les souches de *Y. enterocolitica* des génotypes 2/3-5a, 2/3-9a, 2/3-9b, 3-3b, 3-3c et 3-3d diffèrent par leur résistance aux céphalosporines de 2^{ème} génération et par leur absence de résistance au cotrimoxazole.

Pour *Y. pseudotuberculosis*, toutes les souches ont été trouvées sensibles à tous les antibiotiques testés.

Des souches multirésistantes aux antibiotiques existent mais sont très rares pour *Y. pseudotuberculosis*. Celles-ci sont en revanche plus fréquentes dans l'espèce *Y. enterocolitica* : elles résultent de mutations chromosomiques pour l'acide nalidixique (8,7% des souches sont résistantes) et de l'acquisition de plasmides de résistance pour le cotrimoxazole (0,3% des souches) et la tétracycline (1,2% des souches).

6. Réseau National de Surveillance des *Yersinia* entéropathogènes (RNSY)

Le RNSY est actuellement composé de 104 LBM, de ville (44) et hospitaliers (60) répartis en France métropolitaine et dans les DOM-TOM (cf. distribution géographique des laboratoires du RNSY en Annexe 5). La combinaison des deux types de LBM permet d'avoir une meilleure représentativité des différentes formes d'infections (modérées ou sévères) et des classes d'âges touchées de la population française. Il s'agit d'un réseau de surveillance des yersiniose entériques humaines.

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

Cette épidémiologie-surveillance se base sur : la récolte des données sur les yersiniose et les facteurs de risque par les LBM membres, la transmission de ces données au CNR, le traitement des données par le CNR et enfin, la diffusion en retour des résultats aux LBM membres du RNSY.

Entre 2017 et 2021, 3040 souches ont été transmises par les LBM du RNSY. Cela représente 37,6% du total des souches reçues au CNR. Les souches venaient des laboratoires de ville pour 80% d'entre elles et des laboratoires hospitaliers pour 20%. Le nombre de souches envoyées par les LBM de ville du RNSY a augmenté significativement depuis 2017, de la même façon que le nombre total de souches reçues au CNR.

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

Les fascicules rédigés par le CNR chaque année sont disponibles sur le site internet du CNR : <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/centres-nationaux-referenc/cnr/peste-autres-yersiniose/fascicules>

2017 - Fascicule N°21 : Les yersiniose en France : Vue d'ensemble et potentielles sources d'infection.

2018 - Fascicule N°22 : Une nouvelle méthode d'identification/caractérisation des souches de *Yersinia*.

2019 - Fascicule N°23 : L'investigation épidémiologique de cas groupés dus aux *Yersinia* entéropathogènes.

2020 - Fascicule N°24 : Mise à jour de la taxonomie des *Yersinia* et description de 6 nouvelles espèces.

2021 - Fascicule N°25 : Bilan épidémiologique des yersiniose entériques en France de 2010 à 2020.

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

7. Autres travaux du CNR pendant la période 2017-2021

7.1 Études de surveillance

Isolément inhabituel d'une souche de *Y. enterocolitica* 1B en France

Au mois d'août 2017, une souche de *Y. enterocolitica* de biotype 1B a été caractérisée au CNR. Cette souche a été isolée des selles d'une patiente. La capacité de dissémination systémique plus élevée de ce biotype associé à un isolement rare en France nous a conduit à effectuer des tests supplémentaires (PCR sur les gènes de virulence) qui ont confirmé le biotype 1B.

Le génome de cette souche a été séquencé et sa comparaison, par analyse de SNP, avec 18 autres génomes publics de *Y. enterocolitica* 1B a été effectuée. Un cluster de 6 souches ayant une grande proximité génétique, dont la souche française isolée en août 2017, a été identifié. Ces souches ont été isolées aux Etats-Unis, en Allemagne et en France. Cette analyse montre qu'il y a une circulation de souches de *Y. enterocolitica* de biotype 1B entre l'Europe et l'Amérique du Nord. L'émergence et la stabilisation récente d'un clone en Europe montre qu'il faut mener une surveillance active de cette sous-espèce très pathogène de *Y. enterocolitica* car sa propagation pourrait représenter une menace pour la santé publique.

Savin C, Le Guern AS, Lefranc M, Bremont S, Carniel E, Pizarro-Cerda J (2018) Isolation of a *Yersinia enterocolitica* biotype 1B strain in France, and evaluation of its genetic relatedness to other European and North American biotype 1B strains. *Emerg Microbes Infect* 7: 121. [DOI: 10.1038/s41426-018-0123-0](https://doi.org/10.1038/s41426-018-0123-0)

Détection et virulence de souches de *Yersinia enterocolitica* isolées dans des réservoirs de lait en Italie du Nord

En 2016 et 2017, 509 échantillons de lait ont été collectés à partir de réservoir de lait de 315 fermes laitières dans la région de Parme en Italie. Cette étude, en collaboration avec le département des sciences vétérinaires de Parme (Italie), avait pour but d'évaluer le risque *Yersinia* chez les producteurs de lait. Des souches de *Y. enterocolitica* ont été isolées de 17 réservoirs de lait par culture microbiologique (3,1%). La prévalence estimée était donc de 3,91% en 2016 et 2,63% en 2017 sans différence significative entre les 2 années. 5 souches de *Y. enterocolitica* du biosérotype pathogène 2/O:5,27 et 12 souches du biotype non pathogène 1A ont été détectées. La recherche des gènes classiques de virulence a permis de montrer qu'ils étaient présents uniquement chez les souches du biosérotype 2/O:5,27. Le génome des souches du biosérotype 2/O:5,27 a été séquencé et leur comparaison a montré leur très grande proximité génétique suggérant une origine commune de contamination. Ces souches ont montré un profil unique de résistance aux antibiotiques (amoxicilline, céfoxitine, céfalexine et amoxicilline-acide clavulanique). Cette étude suggère que la consommation de lait cru ou non mal pasteurisé peut faire courir un risque sanitaire aux consommateurs.

Bonardi S, **Le Guern AS**, **Savin C**, Pupillo G, Bolzoni L, Cavalca M, Pongolini S (2018) Detection, virulence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* in bulk tank milk in Italy. *Int Dairy J* 84: 46-53

Prévalence des *Yersinia* chez les sangliers en Italie

Le porc étant reconnu comme un important réservoir de *Y. enterocolitica*, cette étude, en collaboration avec le département des sciences vétérinaire de Parme (Italie), avait pour but d'étudier la prévalence des *Yersinia* chez les sangliers sauvages en Italie. La recherche des *Yersinia* a été effectuée sur les ganglions mésentériques et les fèces de 305 sangliers sauvages. L'espèce *Y. bercovieri* a été la plus fréquemment isolée (35,4% des animaux). La détection de cette espèce a été significativement plus élevée durant la saison froide et chez les jeunes sangliers. Des souches de *Y. enterocolitica* 1A (non pathogènes) ont été isolées chez 8,2% des animaux. C'est aussi durant la saison froide que *Y. enterocolitica* a été le plus fréquemment isolée. Aucune souche de *Yersinia* pathogène n'a été isolée. Le sanglier sauvage ne semble donc pas jouer un rôle de réservoir des *Yersinia* entéropathogènes

Bonardi S, **Bremont S**, Vismarra A, Poli I, Diegoli G, Bolzoni L, Corradi M, Gilioli S, **Le Guern AS** (2020) Is *Yersinia bercovieri* Surpassing *Yersinia enterocolitica* in Wild Boars (*Sus scrofa*)? Ecohealth. Doi : [10.1007/s10393-020-01492-x](https://doi.org/10.1007/s10393-020-01492-x)

Première description d'une épidémie d'infections à *Y. pseudotuberculosis* en France

La plupart des infections à *Y. pseudotuberculosis* sont sporadiques, cependant des épidémies ont déjà été décrites dans divers pays du monde. Durant l'été 2020, nous avons identifié plusieurs souches de *Y. pseudotuberculosis* du génotype 16 isolées de patient en Corse. Cela nous a permis de rapporter pour la première fois une épidémie clonale d'infections à *Y. pseudotuberculosis* en France. Les investigations épidémiologiques menées à la demande de Santé publique France ont permis de mettre en évidence la consommation d'un lot de tomates comme source probable de contamination. L'utilisation de notre nouvelle méthode de typage moléculaire (cgMLST *Y. pseudotuberculosis* avec 1921 gènes) nous a permis d'identifier en temps réel que ces souches étaient génétiquement très proches. Cette méthode nous a aussi permis d'identifier rétrospectivement d'autres souches, appartenant au même cluster, isolées précédemment dans l'année. Cette méthode, utilisée en routine au CNR, ne nécessite aucune compétence en bio-informatique et montre un excellent pouvoir discriminant. Elle est aussi accessible à la communauté scientifique afin de pouvoir comparer les génomes de *Y. pseudotuberculosis* circulant dans divers pays.

Savin C, Le Guern AS, Chereau F, Guglielmini J, Heuze G, **Demeure C, Pizarro-Cerda J**. First Description of a *Yersinia pseudotuberculosis* Clonal Outbreak in France, Confirmed Using a New Core Genome Multilocus Sequence Typing Method. *Microbiol Spectr.* 2022;10(4):e0114522. Epub 2022/07/22. doi: [10.1128/spectrum.01145-22](https://doi.org/10.1128/spectrum.01145-22). PubMed PMID: 35863020; PMCID: PMC9431522

Caractéristiques épidémiologiques de l'épidémie de peste urbaine à Madagascar en 2017

En 2017, une épidémie urbaine de peste pulmonaire d'une ampleur inhabituelle est survenue à Madagascar. L'étendue de cette épidémie nous a donné l'opportunité de mieux comprendre l'épidémiologie de la peste pulmonaire dans un contexte urbain. Les caractéristiques épidémiologiques de cette épidémie ont été évaluées en classant les cas comme suspects, probable et confirmés sur la base des résultats des différents tests de diagnostics. Les résultats ont montré que le taux de mortalité a été plus élevé chez les cas confirmés de peste pulmonaire et bubonique par rapport aux cas probables et suspects. La majorité des cas confirmés ou probable (84%) étaient concentrés dans la capitale, Antananarivo, et le plus grand port, Toamasina.

Finalement, cette épidémie de peste principalement urbaine a été caractérisée par un grand nombre de notifications de cas dans deux zones urbaines et un nombre inhabituellement élevé de formes pulmonaires. Les leçons ayant été tirées au sujet du diagnostic clinique et biologique, la définition de cas, la surveillance et la gestion logistique sont cruciales pour améliorer la réponse à de futures épidémies de peste.

Randremanana R, Andrianaivoarimanana V, Nikolay B, Ramasindrazana B, Paireau J, Ten Bosch QA, Rakotondramanga JM, Rahajandraibe S, Rahelinirina S, Rakotomanana F, Rakotoarimanana FM, Randriamampionona LB, Razafimbria V, De Dieu Randria MJ, Raberahona M, Mikaty G, **Le Guern AS**, Rakotonjanabelo LA, Ndiaye CF, Rasolofo V et al. (2019) Epidemiological characteristics of an urban plague epidemic in Madagascar, August-November 2017: an outbreak report. *Lancet Infect Dis* 19: 537-545. DOI: [10.1016/S1473-3099\(18\)30730-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30730-8)

L'épidémie de peste pulmonaire d'Antananarivo (Madagascar) en 2017 a révélé plusieurs introductions à partir de divers foyers endémiques ruraux

Notre collaboration avec l'unité peste de l'Institut Pasteur de Madagascar nous a permis d'importer les souches de *Y. pestis* isolées pendant l'épidémie de peste pulmonaire de 2017. La caractérisation génomique de ces souches en lien avec les données épidémiologiques associées ont permis de comprendre les origines de cette épidémie urbaine de peste pulmonaire. Cependant, seulement 8 souches ont été isolées des cas de peste pulmonaire. Alors, afin d'investiguer plus finement la 1^{ère} chaîne de transmission de cette épidémie, nous avons réalisé une caractérisation génétique des premiers prélèvements respiratoires positifs en PCR, dans lesquels nous avons recherché les SNPs caractéristiques de *Y. pestis*, en collaboration avec l'équipe de David Wagner de l'Institut Pathogène et Microbiote à l'université Northern Arizona.

Notre étude a montré que la peste a émergé indépendamment à partir de réservoirs locaux situés dans des zones endémiques au moins 20 fois entre août et novembre 2017. Des cas humains ont résulté de cinq de ces introductions dans des zones urbaines pendant l'épidémie.

Les analyses épidémiologiques et génétiques des 29 premiers cas ont confirmé que la chaîne de transmission a commencé à la fin août 2017 ; puis a diffusé vers les zones urbaines d'Antananarivo, Toamasina et Mahajanga et quelques autres zones de Madagascar ; puis a persisté dans Antananarivo jusqu'à la fin octobre 2017. Deux autres lignées de *Y. pestis* ont aussi causé une chaîne de transmission persistante dans Antananarivo.

Ces multiples émergences peuvent expliquer en partie pourquoi cette épidémie a été si difficile à contrôler et surtout elles montrent le besoin d'améliorer les capacités d'analyses génomiques, à Madagascar et ailleurs, pour identifier rapidement les multiples sources et adapter les mesures de contrôle.

7.2 Amélioration du diagnostic

Une nouvelle méthode de caractérisation des souches de *Yersinia*

Voir chapitre 4.2.1 Identification et caractérisation génotypique des *Yersinia* par cgMLST

Savin C, Criscuolo A, Guglielmini J, **Le Guern AS**, **Carniel E**, **Pizarro-Cerda J**, Brisse S (2019) Genus-wide *Yersinia* core-genome multilocus sequence typing for species identification and strain characterization. *Microb Genom.* [Doi :10.1099/mgen.0.000301](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000301)

Description de six nouvelles espèces de *Yersinia*

Lors du développement de notre nouvelle méthode de caractérisation génotypique basée sur une cgMLST, nous avons identifié 33 souches de *Yersinia* suspectées d'appartenir à 6 nouvelles espèces. Ces souches ont été caractérisées selon une approche taxonomique polyphasique incluant une analyse phylogénétique basée sur 500 core gènes, la détermination de l'« average nucleotide identity (ANI) » et du pourcentage de GC dans le génome ainsi que l'identification des caractères phénotypiques. L'analyse phylogénétique a confirmé que les 33 souches forment bien 6 clades démarquées des autres espèces de *Yersinia*. Les valeurs d'ANI entre

génomés de ces clades et leur plus proche parent étaient inférieurs à 94,7% alors qu'elles sont supérieures à 97,5% pour les génomes à l'intérieur de ces clades. Nous avons identifié des caractères biochimiques distinctifs pour 5 de ces 6 nouvelles espèces. Au total, ces données ont démontré que les 33 souches étudiées appartiennent à 6 nouvelles espèces du genre *Yersinia* que nous avons proposé de nommer *Yersinia artesianiana* sp. nov., *Yersinia proxima* sp. nov., *Yersinia alsatica* sp. nov., *Yersinia vastinensis* sp. nov., *Yersinia thracica* sp. nov., and *Yersinia occitanica* sp. nov. A ce jour, le genre *Yersinia* est donc composé de 26 espèces distinctes.

Le Guern AS, Savin C, Angermeier H, Bremont S, Clermont D, Muhle E, Orozova P, Najdenski H, Pizarro-Cerda J (2020) *Yersinia artesianiana* sp. nov., *Yersinia proxima* sp. nov., *Yersinia alsatica* sp. nov., *Yersinia vastinensis* sp. nov., *Yersinia thracica* sp. nov. and *Yersinia occitanica* sp. nov., isolated from humans and animals. Int J Syst Evol Microbiol. [Doi 10.1099/ijsem.0.004417](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004417)

Évaluation et optimisation des tests diagnostic pendant les épidémies : application à l'épidémie de peste à Madagascar en 2017

Le gold standard pour le diagnostic de la peste est depuis de nombreuses années l'isolement de la bactérie *Y. pestis* par culture microbienne à partir d'un prélèvement. Cependant, le taux de souches isolées durant une épidémie est très faible pour de multiples raisons : prise d'antibiotiques précoce, absence de laboratoire expert à proximité ou délai d'acheminement des prélèvements au laboratoire trop long. D'autres tests de diagnostic de la peste ont été développés ces dernières années : un TDR F1 en 2003, et des PCR ciblant les gènes *pla* et *caf1* plus récemment.

En collaboration avec l'équipe de Modélisation mathématique des maladies infectieuses de Simon Cauchemez, nous avons évalué les performances de ces tests qui ont été utilisés lors de l'épidémie de peste pulmonaire à Madagascar en 2017. Cette épidémie a été marquée par un grand nombre de sujets avec une majorité de formes pulmonaires et une forte concentration dans les zones urbaines. Les échantillons ont été analysés avec les trois tests de diagnostic (TDR, PCR et culture). Les méthodes de biologie moléculaire ont montré le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité alors que la spécificité du test de diagnostic rapide (TDR F1) était relativement basse. La comparaison avec des données de l'épidémie saisonnière de 2018 de moindre envergure a montré une meilleure performance des tests TDR F1 en 2018.

Cela montre que des facteurs liés à la réponse à une épidémie explosive de grande ampleur peuvent affecter la performance des tests de diagnostic. Nous avons développé un modèle statistique de classification par les classes latentes pour optimiser la classification des cas et estimer des tendances épidémiques. Cette approche permet de réduire les incertitudes dans le contexte d'autres épidémies où les tests de diagnostic sont imparfaits.

Ten Bosch Q, Andrianaivoarimanana V, Ramasindrazana B, Mikaty G, Rakotonanahary RJL, Nikolay B, Rahajandraibe S, Feher M, Grassin Q, Paireau J, Rahelinirina S, Randremanana R, Rakotoarimanana F, Melocco M, Rasolofo V, **Pizarro-Cerda J, Le Guern AS**, Bertherat E, Ratsitorahina M, Spiegel A, Baril L, Rajerison M, Cauchemez S. Analytical framework to evaluate and optimize the use of imperfect diagnostics to inform outbreak response: Application to the 2017 plague epidemic in Madagascar. PLoS Biol. 2022;20(8):e3001736. Epub 2022/08/16. [doi: 10.1371/journal.pbio.3001736](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001736). PubMed PMID: 35969599; PMCID: PMC9410560

7.3 Investigation de formes cliniques inhabituelles

Isolement de *Yersinia entomophaga* du tractus urinaire

En 2015, le CNR a identifié une souche de *Y. entomophaga* isolée d'un prélèvement urinaire d'un patient français ayant une sonde urinaire. Cette espèce est un pathogène d'insecte, décrite pour la première fois en 2011 en Nouvelle-Zélande, et aucun isolement de cette espèce n'a été rapporté depuis. Le prélèvement urinaire a aussi permis l'isolement d'une souche d'*Enterococcus faecalis*. Il a été montré qu'*E. faecalis* inhibe la réponse immunitaire innée et permet les infections du tractus urinaire associé à un cathéter. Notre hypothèse est qu'*E. faecalis* a favorisé la formation d'un biofilm ayant permis la croissance de *Y. entomophaga* dans l'urine.

Le génome de la souche de *Y. entomophaga* a été séquencé et son analyse a permis (i) de montrer la présence des gènes de virulence spécifiques à cette espèce (ii) d'identifier un plasmide de virulence porteur d'un gène de résistance aux quinolones (iii) de montrer par une analyse de SNP que cette souche est très éloignée de la souche de référence.

Nos résultats montrent que *Y. entomophaga* est capable d'acquérir des facteurs de virulence lorsqu'elle est en contact avec d'autres pathogènes et pourrait donc être plus pathogène pour les humains que ce qui avait été décrit. Même si la pathogénicité de cette espèce reste encore à élucider, notre étude démontre sa dissémination en Europe et sa capacité à se multiplier chez l'homme.

Le Guern AS, Savin C, Bremont S, Payro G, Bon D, Carniel E, Pizarro-Cerda J (2018) First isolation of *Yersinia entomophaga* in human urinary tract. *New Microbes New Infect* 26: 3-7. DOI: [10.1016/j.nmni.2018.08.002](https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.08.002)

Cas d'infection ostéo-articulaire dû à une souche de *Y. enterocolitica* 1B

En 2019, le CHU de Lille a isolé une souche de *Y. enterocolitica* à partir d'un lavage d'une plaque fémorale d'ostéosynthèse chez une patiente de 87 ans hospitalisée pour un écoulement cicatriciel au niveau de la plaque. Le CNR a identifié une *Y. enterocolitica* du génotype 1B. Les souches de ce génotype sont très pathogènes car elles possèdent un îlot de haute pathogénicité leur permettant de capturer le fer nécessaire à leur survie dans l'organisme hôte. Les infections à *Y. enterocolitica* du génotype 1B sont très rares en France et en Europe.

L'analyse du génome in silico a permis de confirmer la présence de l'îlot de haute pathogénicité caractéristique des souches du génotype 1B. Nous avons évalué la proximité génétique de cette souche avec d'autres souches du même génotype, isolées dans le monde, et avons montré que la souche isolée à Lille en 2019 n'a que 2 SNPs de différence avec une souche isolée aux États-Unis il y a plus de 40 ans, suggérant que les 2 souches sont identiques.

Les investigations cliniques ont montré que la patiente avait une diverticulose, ce qui a pu favoriser une bactériémie avec une possible dissémination systémique et une localisation secondaire sur la plaque d'ostéosynthèse. La similarité avec la souche américaine n'a pas été élucidée.

Wallet F, **Le Guern AS**, Penven M, Senneville E, **Savin C**, Loiez C (2020) *Yersinia enterocolitica* biotype 1B case report: an unusual pathogen in an osteoarticular infection on device. *BMC Infect Dis* 20: 498. DOI: [10.1186/s12879-020-05204-2](https://doi.org/10.1186/s12879-020-05204-2)

7.4 Vaccin contre la peste

Démonstration de la voie sous-cutanée comme une voie d'administration d'un vaccin contre la peste

Même si le vaccin vivant atténué d'une souche de *Y. pseudotuberculosis* produisant la capsule F1 a montré une bonne protection contre la peste bubonique et pulmonaire avec une seule dose de vaccination orale, la vaccination orale peut échouer chez les humains exposés à de fréquentes infections intestinales. Nous avons évalué l'efficacité de la voie d'injection sous-cutanée de ce vaccin chez la souris pour induire une immunité protectrice tout en réduisant la dissémination de cette souche dans l'environnement. L'injection de ce vaccin par la voie sous-cutanée a montré la production d'anticorps ainsi qu'une protection de 100% contre la peste bubonique et 80% contre la peste pulmonaire. Après injection, les souches atténuées ont rapidement migré vers les ganglions drainant le site d'injection et la rate (mais pas les fèces) avant d'être éliminées. La voie d'injection sous-cutanée représente donc une bonne alternative quand la dissémination de ce vaccin dans l'environnement et la sensibilité de l'intestin humain représentent des limitations.

Derbise A, Guillas C, Gerke C, Carniel E, Pizarro-Cerda J, Demeure CE (2020) Subcutaneous vaccination with a live attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* plague vaccine. *Vaccine* 38: 1888-1892. DOI: [10.1016/j.vaccine.2020.01.014](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.01.014)

Corrélat de protection immunitaires contre la peste bubonique après administration d'un vaccin vivant atténué (Article #46)

Le vaccin vivant, produisant la capsule F1, a montré une protection efficace contre la peste bubonique et pulmonaire chez la souris. Cependant l'efficacité de ce vaccin ne pourra pas être évaluée chez l'humain au cours d'essais cliniques. Des corrélats de protection sont donc nécessaires pour établir un lien entre la réponse immunitaire des animaux protégés et celle des humains vaccinés.

Nous avons établi que les réponses humorales et cellulaires induites par le vaccin confèrent indépendamment une protection contre la peste bubonique chez la souris. L'évaluation de la réponse cellulaire a montré que la production d'IFN γ n'est pas pleinement satisfaisante comme corrélat de protection. En revanche, nous avons montré que la présence d'anticorps dirigés contre la capsule F1 était le meilleur corrélat de protection dans les deux lignées de souris testées.

Cela montre que les anticorps anti-F1 jouent un rôle majeur dans la protection. La mesure de leur titre étant facile, ils seront utiles pour évaluer la réponse immunitaire dans les tests chez d'autres espèces animales et les essais cliniques à venir.

Demeure CE, Derbise A, Guillas C, Gerke C, Cauchemez S, Carniel E, Pizarro-Cerda J (2019) Humoral and cellular immune correlates of protection against bubonic plague by a live *Yersinia pseudotuberculosis* vaccine. *Vaccine* 37: 123-129. DOI: [10.1016/j.vaccine.2018.11.022](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.11.022)