



Institut Pasteur



**ifip** —  
Institut du porc



**EVANHOTY** : Évaluation de l’implication des filières porcine et bovine dans les yersiniooses humaines en France et de l’évolution de *Yersinia enterocolitica* par l’utilisation de techniques moléculaires discriminantes.

## RAPPORT FINAL

31 mai 2024

<b>CNR (IP)</b> <i>de la peste et autres yersiniooses</i>	<b>Anne-Sophie Le Guern, Javier Pizarro-Cerda, Cyril Savin, Laura Guichard</b>	<b>IDELE</b>	<b>Clémence Bieche, Bertille Lamour, Thibaut Coadou, Valérie Hardit, Catherine Malayart</b>
<b>IFIP</b>	<b>Carole Feurer, Alain Le Roux, Théo Dejaigher</b>	<b>ANSES</b>	<b>Martine Denis, Emmanuelle Houard, Benoit Gassilloud, Amandine Wilhem, Christophe Soumet, Arnaud Bridier, Patricia Legrandois</b>

Financement



FranceAgriMer

ÉTABLISSEMENT NATIONAL  
DES PRODUITS DE L’AGRICULTURE ET DE LA MER

## I. INTRODUCTION : CONTEXTE et OBJECTIFS

Bien que la notification des cas de yersiniose humaine et de la présence de *Yersinia enterocolitica* dans les aliments et chez les animaux soit obligatoire dans la plupart des États membres de l'Union européenne, ce n'est pas le cas en France alors que cet agent *Y. enterocolitica* est **soumis à la directive 2003/99/CE** portant sur la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques et qu'il est le **troisième agent responsable de diarrhée humaine d'origine bactérienne en Europe** (EFSA et ECDC, 2022) après *Campylobacter* et *Salmonella*.

Dans ce contexte, la Direction Générale de la Santé et l'InVS (SPF) ont mis en place en 2003 un Réseau National de Surveillance des *Yersinia* (RNSY) qui est encadré par le Centre National de Référence (CNR) de la Peste et autres Yersiniose (Institut Pasteur). Maladie considérée comme émergente dans les années 1980-1990, l'augmentation des infections ces cinquante dernières années s'explique notamment par le développement de la réfrigération pour la conservation des aliments, la bactérie étant capable de se multiplier à 4°C. Entre 2011 et 2015, le CNR a reçu 2184 *Y. enterocolitica* pathogènes. Or en France, la yersiniose n'est pas une maladie à déclaration obligatoire. Ces chiffres donc ne donnent pas une réelle estimation du **nombre annuel de yersiniose d'origine alimentaire en France** qui a été évalué à **26 157 cas** soit un taux d'incidence annuel de **42 cas pour 100 000 habitants** (Van Cauteren 2016). De plus, depuis 2012, le nombre de souches pathogènes reçues par le CNR chaque année augmente de façon importante et régulière faisant notamment suspecter une augmentation de l'incidence des yersiniose en France.

*Y. enterocolitica* est subdivisée en 5 biotypes (BT) pathogènes, 1B, 2, 3, 4 et 5, alors que le biotype 1A est considéré comme non pathogène pour l'Homme et fréquemment retrouvé dans l'environnement. En France, parmi les biotypes de *Y. enterocolitica*, le BT4 est celui qui est le plus fréquemment isolé chez les cas humains (71,1 %), suivi par le BT2 (25,4 %) et le BT 3 (2 %) (Le Guern et al., 2016). Cette bactérie est responsable de gastro-entérites dans les pays tempérés et froids. Les symptômes cliniques sont principalement la diarrhée, la fièvre et les douleurs abdominales. Ils peuvent durer une à plusieurs semaines, mais cette maladie est généralement de courte durée. Des formes intestinales plus sévères imitant l'appendicite et des septicémies chez des patients déjà fragiles sont observées. Les cas de yersiniose rapportés concernent deux groupes d'âge ; les enfants jeunes qui développent principalement des symptômes intestinaux, et les personnes âgées, pour qui des infections sévères et des septicémies sont fréquentes (Savin et Carniel, 2008). Les facteurs de pathogénicité de la bactérie sont codés par des gènes localisés sur le chromosome et sur un plasmide (Bancerz-Kisiel et al., 2018).

*Y. enterocolitica* est une bactérie ubiquitaire qui peut être retrouvée dans de nombreux environnements tels que les boues, les sols contaminés, les eaux de surfaces. *Y. enterocolitica* a également de nombreux réservoirs animaux, qu'ils soient domestiques, de rente ou sauvages (Fredriksson-Ahomaa 2012; Sanno et al. 2018; Syczylo et al. 2018). Cette bactérie a été isolée par exemple chez les bovins, les ovins, les porcins, les sangliers, les lagomorphes, les caprins, les rongeurs, la volaille ou encore les chiens et les chats (Bucher et al. 2008; Wang et al. 2009; Bancerz-Kisiel et al. 2016; Le Guern et al. 2016).

Une analyse de l'origine des souches de *Y. enterocolitica* animales collectées par le CNR depuis plus de 50 ans (Le Guern et al. 2016) a mis en évidence que les souches de BT4 provenaient majoritairement de la filière porcine (87,9% des BT4). Quant aux souches de BT2, seules 3,5% venaient du porc alors que la majorité (54,7%) étaient isolées de la filière bovine (Fig.1) et en moindre importance des filières caprine et ovine. Une association significative entre le BT4 et le porc, et entre le BT2 et les bovins/ovins/caprins a alors été démontrée conduisant à considérer le porc comme la source principale des yersiniose humaines à BT4 et les bovins/ovins/caprins celle des yersiniose humaines à BT2 (Le Guern et al. 2016).

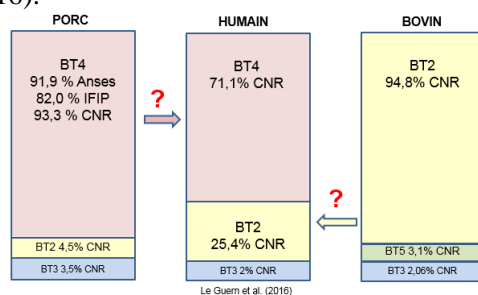


Figure 1 : distribution des biotypes de *Y. enterocolitica* au sein des populations porcine, bovine et humaine.

Concernant les réservoirs animaux, aucune donnée de prévalence de *Y. enterocolitica* dans les filières de rente n'était disponible en France avant 2009, et plus particulièrement en filière porcine, alors que cette production était identifiée dans d'autres pays comme un réservoir important de souches *Y. enterocolitica* pathogènes pour l'homme. Ce sont des travaux de l'IFIP et de l'Anses qui ont permis d'avoir les premières données de prévalence de ce pathogène dans

la filière porcine. Ainsi, **13,7% des porcs charcutiers et 74% des lots de porcs étaient positifs en *Y. enterocolitica* pathogènes pour l'Homme** (Feurer et al., 2012 ; Fondrevez et al., 2014). Ces travaux ont donc ainsi mis en évidence qu'il était très important de considérer ce risque pour l'homme. D'autant plus que le **porc est la première viande consommée en France** avec 32kg équivalent carcasse/habitant/an en 2018 (FranceAgrimer).

Sur la base des biotypes, il apparaît évident que la **filière porcine** est une **source importante** de *Y. enterocolitica* de **BT4** ; 91,9% des souches porcines ont ce biotype (Fondrevez et al., 2014) or ce biotype BT4 est également celui qui est **le plus isolé lors d'infections humaines** (71,1% des cas humains sont dûs au BT4). La filière porcine en France est donc une source avérée de souches susceptibles d'être pathogènes pour l'Homme. Sur les 821 souches de *Y. enterocolitica* isolées, **86,6% des souches portaient le plasmide de virulence pYV** ainsi que plusieurs gènes chromosomiques impliqués dans la pathogénicité des souches pour l'Homme (Fondrevez et al., 2011).

Le **BT2** concerne quant à lui **25,2% des cas humains** ; or ce biotype est peu retrouvé chez le porc, mais plus **particulièrement isolé des bovins/ovins/caprins** (Le Guern et al. 2016). Il y a peu de données de prévalence sur *Y. enterocolitica* en filière bovine et certaines données sont basées sur la séroprévalence. Ainsi, des anticorps anti-*Yersinia* ont été détectés sur 66% de bovins lors d'une étude en Allemagne (Bartling et al, 2004) et pour O:9 sur 26% de bovins en Belgique (Weynants et al, 1996). Deux études anglaises indiquent une prévalence en *Y. enterocolitica* de 6,3 et 4,5% sur matière fécale (McNally et al, 2004 ; Milnes et al, 2008), et une étude allemande donne une prévalence de 1,6% (Schmid et al, 2013). Cependant, même si cette production est identifiée comme une source de BT2, aucune donnée n'est disponible en France sur le portage de *Y. enterocolitica* pathogènes dans la filière bovine. Pour s'assurer que cette production est bien une source principale de *Y. enterocolitica* pathogènes pour l'Homme, il convient dans un premier temps **d'acquérir des données de prévalence** de *Y. enterocolitica* et de connaître la **distribution des biotypes** au sein de cette **filière bovine**. C'est primordial de pouvoir mieux évaluer ce risque pour l'homme ; d'autant que la consommation de **viande bovine** (veau inclus) représente 26,3% de la consommation totale de viandes, avec une consommation moyenne individuelle de 22,8kg en équivalent carcasse de viande bovine. Les **Français** sont les **plus gros consommateurs de viande bovine** de l'union européenne (FranceAgrimer).

Si sur la base des biotypes, il est admis que les sources probables des cas humains à BT4 et à BT2 sont respectivement le porc et le bovin, ce n'est pas suffisant pour confirmer et évaluer la réelle implication de ces deux filières dans les cas de yersiniose humaines. L'ANSES et l'IP ont de fait conduit plusieurs travaux en vue de caractériser plus finement les souches de *Y. enterocolitica* isolées du porc (Raymond et al., 2018) ou d'infections humaines (Iteaman et al., 1996 ; Martin et al., 2015, Saraka et al., 2017) avec des techniques reposant sur la digestion du génome ou l'amplification de séquences répétées ou le séquençage de gènes spécifiques (PFGE, ribotypage, REAP, MLST, MLVA).

Mais, certaines se sont avérées insuffisamment discriminantes ou lourdes à mettre en œuvre pour *Y. enterocolitica*. Il a été nécessaire d'envisager d'autres techniques. C'est pourquoi il convient de passer par une **caractérisation plus fine des souches**. L'évolution des techniques de séquençage permet dorénavant de séquencer facilement le génome complet des micro-organismes. La technique NGS (Next Generation Sequencing) est de plus en plus utilisée pour caractériser et comparer les pathogènes bactériens, et devient un outil très efficace pour identifier les sources à l'origine d'infections humaines dont *Y. enterocolitica* (Inns et al., 2018). Les techniques de typage moléculaire à partir des données issues du séquençage du génome complet (WGS) sont beaucoup plus fines et discriminantes car elles reposent sur l'analyse d'un grand nombre de séquences nucléotidiques. Le CNR de la peste et autres yersiniose à l'IP a développé une méthode d'identification et caractérisation des souches, basée sur l'analyse des données issues du séquençage du génome complet. C'est une core genome MLST (**cgMLST**) à **500 gènes spécifique du genre *Yersinia*** et elle est utilisée en routine au CNR depuis 2017 (Savin et al., 2019). Une autre cgMLST spécifique de l'espèce *Y. enterocolitica*, développée par le CNR Yersinia, repose sur l'analyse des séquences de **1727 gènes** présents chez toutes les *Y. enterocolitica* et permet d'effectuer le typage moléculaire des souches. Aujourd'hui, très peu d'études décrivent l'utilisation du WGS pour *Y. enterocolitica* alors que l'analyse des séquences des génomes est devenue un outil incontournable pour apprécier l'épidémiologie des bactéries zoonotiques, et ce, du réservoir, l'animal, à l'Homme. Le CNR de l'IP maîtrise le séquençage de *Y. enterocolitica* et l'analyse bioinformatique des séquences et participe à des investigations épidémiologiques (Saraka et al., 2017 ; Savin et al., 2018 ; Bonardi et al., 2018). Le CNR a récemment développé un système de détection des cas groupés de yersiniose entériques basé sur la clustérisation des souches et a validé les seuils de clustérisation lors d'investigations moléculaires de plusieurs épidémies (Le Guern et al., 2024). C'était une réelle opportunité de pouvoir appliquer cette méthodologie dans le cadre de ce projet pour répondre à la question que l'IFIP, l'IDELE, l'ANSES et l'IP se posent depuis longtemps, à savoir la réelle implication des filières porcines et bovines dans les yersiniose humaines.

Le séquençage du génome entier (WGS) des bactéries est donc une technique de référence pour le typage génétique des souches. Cependant le coût, la mise en œuvre et les compétences bio-informatiques que cet outil requiert, font que cet outil n'est pas accessible aux acteurs des filières animales (élevages, IAA) qui ont des préoccupations comme l'origine et le suivi de contaminations bactériennes. Aujourd'hui, plus que jamais, la mise en œuvre de méthodes de

typage bactérien alliant fiabilité et précision avec une performance rapide, économique et conviviale est hautement souhaitable, non seulement pour la microbiologie clinique mais également pour les acteurs des filières animales désireuses de détecter et de tracer les contaminations bactériennes au sein de leur structure. Le typage par **spectrométrie Infra-Rouge (IR)** est très prometteur pour l'analyse des épidémies et des contaminations dans les filières car c'est une technique rapide, fiable, peu chère et facile à mettre en œuvre. Plusieurs études ont démontré une bonne concordance de la spectrométrie IR avec les méthodes de typage antérieures, comme la PFGE, la MLST (Dinkelacker et al., 2018) et un meilleur pouvoir discriminant. Le typage bactérien par spectrométrie Infra-Rouge (IR) peut non seulement être utile pour le typage rapide et fiable des souches, mais aussi pour aider à comprendre la diversité, l'évolution et les facteurs d'adaptation des pathogènes.

La comparaison des génomes et des spectres IR sont donc des outils très discriminants pour typer les souches mais la présence de tel gène avec sa séquence et de tel pic sur le spectre IR n'est pas toujours suffisante pour apprécier les potentiels des souches bactériennes. En effet, pour que *Y. enterocolitica* aille infecter l'homme, il faut que celle-ci ait d'abord la **capacité de traverser l'ensemble de la chaîne alimentaire**, du réservoir (l'animal) jusqu'au consommateur, et puisse ensuite **rendre malade l'Homme** ayant ingéré *Y. enterocolitica*. La bactérie pour se maintenir au cours de ce parcours doit donc pouvoir **s'adapter aux différents environnements** (froid, biocide, surface inerte, surface viande). Elle peut pour cela mettre en place des systèmes biologiques lui permettant de réagir face aux stress infligés par ces environnements. Une fois ces barrières passées, elle doit ensuite pouvoir **exprimer sa virulence** pour induire les symptômes d'une yersiniose chez l'Homme afin que celle-ci soit diagnostiquée. C'est là aussi que le **séquençage complet du génome** des souches de *Y. enterocolitica* est très intéressant comme outil car il permet d'obtenir les séquences des gènes pouvant être impliqués dans ces processus d'adaptation ou de virulence. Ces séquences peuvent être alors utilisées comme marqueurs pour caractériser **dès l'élevage** le potentiel des souches excrétées par les porcs à pouvoir circuler et infecter l'homme et ainsi le risque sanitaire de l'élevage.

Ainsi, l'Anses a démontré dans le cadre d'une expérimentation animale que le BT4 avait le pouvoir colonisateur le plus élevé, suivi du BT3, alors que le BT2 et BT1A colonisaient peu ou pas le porc (Raymond, 2018). Cette étude a permis de comprendre pourquoi le BT4 était le biotype le plus prévalent en filière porcine. L'Anses s'est également intéressée à la survie de souches de *Y. enterocolitica* de différents biotypes sur du jambon en condition de réfrigération (Mendjel, 2016). Il a été démontré que *Y. enterocolitica* avait la capacité à se multiplier au froid ce qui confirme sa nature psychrotrophe et en fait un danger à surveiller plus particulièrement. En effet, en abattoir, le ressuage, la découpe et le stockage à basse température fournissent des conditions idéales pour la multiplication de *Y. enterocolitica*. Une autre étude de l'Anses a porté sur la détection des gènes de virulence génomiques et plasmidiques pour évaluer le potentiel pathogène des souches isolées chez le porc (Fondrevez, et al., 2011). Ainsi, il a été démontré que les souches de BT4 isolées du porc avaient la majorité des gènes impliqués dans la virulence et que même si certaines souches perdent leur plasmide au cours des repiquages, 88% des souches avaient conservé leur plasmide de virulence pYV. Des souches porcines ont également été testées *in vitro* sur des cellules intestinales humaines caco-2 (Esnault et al., 2015) permettant de démontrer que ces souches avaient aussi la capacité à adhérer à ces cellules et à les envahir, et donc à exprimer leur pathogénicité.

De son côté, l'IFIP s'est intéressé à la capacité d'adhésion de *Y. enterocolitica* sur surface inox et leur capacité à se maintenir à différentes températures rencontrées le long de la filière porcine. Les résultats ont montré que les souches testées étaient capables d'adhérer aux surfaces inox et croître à une température comprise entre -2°C et 0°C quel que soit leur biotype (Esnault et al., 2017).

Le CNR de l'IP a recherché les sources potentielles des yersinioses entériques humaines en France et a montré que le réservoir de souches pathogènes est essentiellement animal et que les biotypes de *Y. enterocolitica* sont spécifiques d'espèces animales : le BT4 est fortement associé au porc et le BT2 est associé aux bovins/ovins/caprins (Le Guern et al., 2016). D'autre part le CNR a mené des études de comparaison génétique de souches lors d'investigation épidémiologiques. La comparaison génétique de souches de *Y. enterocolitica* BT4 circulant en Côte d'Ivoire a montré que certaines de ces souches présentaient un haut niveau de mutations leur conférant la possibilité d'acquérir des avantages sélectifs pour augmenter leur pathogénicité (Saraka et al., 2017). L'analyse de SNPs de 19 souches de *Y. enterocolitica* BT1B isolées en France et dans le monde a permis d'évaluer la diversité génétique de ces souches et leur phylogénie (Savin et al., 2018). L'analyse de 5 souches de *Y. enterocolitica* BT2 isolées de lait cru dans des fermes en Italie du Nord a montré qu'il s'agissait de la même souche circulant entre les fermes (Bonardi et al., 2018).

Il est important que les **professionnels** impliqués dans ces deux filières puissent avoir des éléments concrets leur permettant d'évaluer efficacement le **danger *Y. enterocolitica* vis-à-vis de l'Homme**. Cela pourra les amener à reconsidérer les **mesures de maîtrise** en place dès l'élevage pour voir si elles sont **adaptées** pour contenir le danger *Y. enterocolitica* et à les faire **évoluer** si nécessaire. Par ailleurs, il est important que les acteurs des filières puissent envisager de suivre à moindre coût et rapidement les contaminations bactériennes en les orientant vers un outil pouvant répondre à leur attente.

Ce projet EVANHOTY proposait :

- 1) D'acquérir des données actualisées du portage de *Y. enterocolitica* pathogènes dans la filière porcine et pour la 1<sup>ère</sup> fois en filière bovine en France
- 2) De typer les souches de *Y. enterocolitica* pathogènes chez l'homme et l'animal par des méthodes très discriminantes basées sur les données (cgMLST, analyse de SNPs) issues du séquençage du génome complet et sur les données (spectres IR) issues du typage par spectrométrie infra-rouge.
- 3) D'évaluer précisément l'implication des filières porcines et bovines dans les cas de yersiniose humaines à BT4 et à BT2 en France en se basant sur la comparaison des génomes et des spectres IR, tout en considérant la performance des outils
- 4) D'analyser l'évolution des souches dans les réservoirs animaux sur une période d'au moins 10 ans. Est-ce que toutes les souches se maintiennent dans le temps? Est-ce que de nouveaux types apparaissent ?
- 5) De répondre sur la capacité des souches porcines et bovines à traverser la chaîne alimentaire et à infecter l'Homme. Est-ce que tous les génotypes présents dans les réservoirs animaux ou seulement une partie arrivent jusqu'à l'Homme ? Quels sont les éléments génétiques qui peuvent expliquer cette capacité à se maintenir au cours du processus et à infecter l'Homme?

Ce projet était également l'opportunité de générer une base de données sur *Y. enterocolitica* dans les filières porcine et bovine en France, avec des souches bien caractérisées, données qui peuvent être utiles pour de futures analyses épidémiologiques et moléculaires, à la fois à l'Anses, l'IFIP, l'IDELE et l'IP.

Ce projet s'est décliné en 4 actions (hors coordination et valorisation)

- mise à jour des données de prévalence et de biotypes en filière porcine et en filière bovine
- implications du porc et du bovin dans les yersiniose humaines à BT4 et BT2 et évolution à au moins 10 ans
- pouvoir discriminant du typage par spectrométrie IR et concordance avec la cgMLST
- caractérisation de marqueurs génétiques associés à la capacité de maintien des souches lors du processus d'abattage et à leur capacité à infecter l'homme.

## II. MISE A JOUR DES DONNEES DE PREVALENCE ET DE BIOTYPES EN FILIERE PORCINE ET EN FILIERE BOVINE

Cette action se proposait de réaliser une enquête terrain dans chaque filière afin de mettre à jour les données de prévalence de *Y. enterocolitica* dans les deux filières et d'acquérir des souches de *Y. enterocolitica* récentes. Les enquêtes impliquaient 6 sites industriels d'abattage (3 en filière porcine et 3 en filière bovine) et ont réalisées sur 14 mois premiers mois du projet.

C'est la matrice « matière fécale » qui a été choisie pour isoler ces souches. *Y. enterocolitica* est une bactérie qui a un tropisme amygdalien et digestif, et les enquêtes réalisées sur le porc par l'IFIP a démontré que le portage était plus élevé dans les matières fécales. Par ailleurs, il y a un risque de transferts de contaminations plus élevé sur les carcasses à partir du contenu digestif qu'à partir des amygdales, dans les procédés d'abattage utilisés en France. C'est sur la base de ces constats qu'il avait été décidé d'isoler *Y. enterocolitica* à partir de cette matrice pour les deux filières.

D'après la littérature, et nos données internes en porc, 300 prélèvements individuels en filière porcine et 420 prélèvements individuels en filière bovine devaient permettre d'isoler dans chacune des filières la cinquantaine de souches nécessaires à l'analyse génétique.

### A. Prélèvement et isolement de *Y. enterocolitica* pathogènes

#### 1. Prélèvements en abattoir de porc

Les prélèvements ont été réalisés dans trois abattoirs du grand Ouest de la France, qui représente plus de 75% de la production et l'abattage français. Du fait de la conduite très standardisée des animaux, et de la très forte prédominance de la production de porcs en bâtiment (98% des porcs sont élevés et engraisés en bâtiment contre 2% en plein air (données BD Porc)), l'échantillonnage s'est focalisé uniquement sur ceux-ci.

Les animaux prélevés proviennent d'élevage différents, choisis au hasard le jour de l'abattage. En revanche, bien que les animaux abattus provenant d'un même élevage soient contemporains et élevés dans des conditions similaires, 5 individus d'un même élevage ont été prélevés en même temps afin d'évaluer la variabilité individuelle intra-élevage, variabilité avérée pour d'autres pathogènes (Feurer et al. 2017 ; IFIP/AERIAL, 2014). Sur la base des résultats de prévalence intra (23%) et inter-lots (74,3%) identifiés par Fondrevez et al. en (2014), et des taux de portages fécaux (ref. IFIP), avec 60 lots prélevés, il avait été estimé l'obtention d'une trentaine de lots positifs pour la présence de *Y. enterocolitica* et une cinquantaine de souches isolées.



Figure 2 : incision du gros intestin

Lors de l'abattage, la ventrée de chaque porc a été mise de côté, et une incision du gros intestin a permis de récupérer 25g de fèces à partir desquels la recherche de *Y. enterocolitica* a été réalisée (fig.2) .

#### 2. Prélèvements en abattoir de bovins

Les prélèvements ont été réalisés dans 3 abattoirs répartis sur le territoire, dans les régions Normandie (N), Pays de la Loire (PDL) et Nouvelle Aquitaine (NA) ayant des approvisionnements locaux, afin d'être représentatif de bassins de production différents. Du fait des différentes typologies d'animaux produits et consommés, 4 catégories de gros bovins ont été prélevées : **vaches de type allaitant (VA)**, **vaches de type laitier (VL)**, **jeune bovin de type allaitant (JBA)**, **jeune bovin de type laitier (JBL)**.

Les 4 catégories d'animaux (VA, VL, JBA, JBL) ont été prélevées de sorte à être représentatif de la diversité de production des abattoirs dans lesquelles sont effectués les prélèvements.

Du fait de différences dans la conduite d'élevage liées à un accès à l'extérieur, et en particulier aux pâturages, et d'une influence possible sur le portage, la saisonnalité a été prise en compte et contrôlée, avec des prélèvements

répartis sur 2 périodes de l'année : janvier-février (hiver) pour des animaux ayant passé plusieurs semaines en bâtiments, et septembre-octobre (été) pour des animaux ayant passé plusieurs semaines à l'extérieur.

Les animaux ont donc été prélevés à l'abattoir en fonction de leur catégorie, mais provenant tous d'élevages différents ; ce qui correspond au schéma d'abattage classique, dans lequel il est très rare d'avoir plusieurs individus d'un même élevage abattus le même jour.

Les abattoirs ont été choisis afin de permettre de prélever sur une même journée d'abattage les 4 catégories d'animaux, et d'assurer une bonne représentativité par rapport à la répartition géographique de la production et de l'abattage des bovins.

Les prélèvements ont été réalisés sur fèces, afin d'estimer le portage fécal et de se rapprocher de la source principale de contamination des carcasses par les opérations d'abattage (contamination des cuirs, et du tube digestif). Au vu des données disponibles, une vingtaine d'animaux devraient être positifs en *Y. enterocolitica* et une cinquantaine de souches pourraient être isolées.

Au total, 420 prélèvements ont été prévus, avec 35 à 50 échantillons prélevés par journées de prélèvement réparties sur l'année et entre les abattoirs partenaires. Les informations sur les animaux prélevés comportent la catégorie, la race, l'âge à l'abattage, la région de naissance et la région du dernier détenteur.

Les échantillons ont été transportés par le personnel de l'Idèle directement au laboratoire de microbiologie de l'Idèle de Villers-Bocage en conditions de température maîtrisée (4°C).

### 3. Recherche et isolement de *Y. enterocolitica*

La recherche et l'isolement de *Y. enterocolitica* dans les fèces de porc et de bovin ont été réalisés selon la norme en vigueur NF EN ISO 10273:2017 à partir de 25 g selon le schéma suivant (fig.3). Les souches suspectées *Y. enterocolitica* ont été confirmées pour le genre *Yersinia* et l'espèce *enterocolitica* et biotypées par des tests biochimiques et moléculaires par l'IFIP. Les souches pathogènes confirmées ont été mises en collection et adressées au CNR (IP, Paris). Le sérotypage par le CNR devait être réalisé sur les BT2 pour différencier le sérotype O:9 des sérotypes O:5,27.

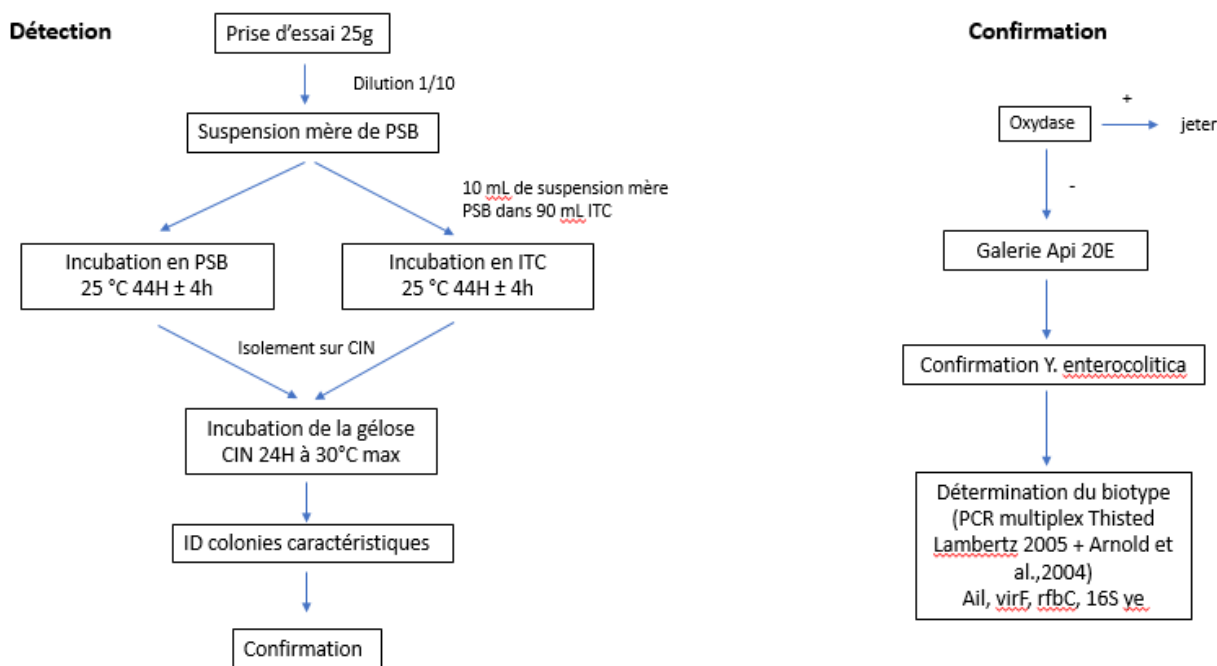


Figure 3 : protocole pour la recherche, l'isolement et la confirmation de *Y. enterocolitica* pathogène à partir de fèces.

## B. Résultats

Au total, 303 prélèvements de fèces de porc ont été réalisés, à raison de 4 à 8 lots de 4 à 5 porcs prélevés selon les dates de visite en abattoir (\*9): 59 lots de 5 porcs et 2 lots de 4 porcs.

Sur les 61 lots de porcs, 14 lots avaient au moins un porc positif pour *Y. enterocolitica*. Sur les 303 porcs prélevés, *Y. enterocolitica* a été isolée de 24 porcs. La prévalence inter-lots est de 22,9 % [14,2%-34,9%], et la prévalence individuelle est 7,9 % [5,4%-11,5%].

Un total de 47 souches a été isolé. Leur biotypage par multiplex PCR a confirmé le biotype 4/0:3 pour 33 souches, le biotype 2/O:9 ou 3/O:5,27 pour une souche et le biotype 1A pour 13 souches. Il en résulte une prévalence de *Y. enterocolitica* pathogènes inter-lots de 14,7 % <sub>IC95%</sub> [8,0%-25,7%], et une prévalence individuelle de *Y. enterocolitica* pathogènes de 4,9 % <sub>IC95%</sub> [3,0%-8,0%]. Les 37 souches de BT4 et BT2 ont été transmises au CNR.

Au total, 430 bovins ont été prélevés, dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : caractéristiques des 430 bovins prélevés

Abattoirs	Catégories bovines	Races	Âges à l'abattage (en mois)	Régions de naissance	Régions d'élevage
N : 39% PDL : 41% NA : 21%	Bœuf : 3% Génisse : 9% JB : 26% Taureau : 1% Vache : 59% Veau : 2%	Aubrac (M) : 0,3% Blonde d'Aquitaine (A) : 3,3% Charolaise (A) : 13,5% Croisées (M & L & A) : 8,3% Jersiaise (L) : 0,3% Limousine (A) : 23,1% Montbéliarde (M) : 1,5% Normande (M) : 13,3% Prim'Holstein (L) : 35,8% Rouge des Prés (A) : 0,8%	Moy = 54,8 mois Min = 4,4 mois Max = 218,7 mois	AURA : 1,5% Bretagne : 14,5% Centre Val de Loire : 2,3% Grand Est : 0,3% Hauts de France : 2,0% Normandie : 18,8% Nouvelle Aquitaine : 20,3% Occitanie : 0,3% Pays de la Loire : 40,1%	AURA : 1,3% Bretagne : 11,5% Centre Val de Loire : 1,8% Hauts de France : 1,8% Normandie : 19,3% Nouvelle Aquitaine : 22,1% Pays de la Loire : 42,4%

Aucune souche de *Y. enterocolitica* n'a été isolée des fèces de bovins. La prévalence individuelle des gros bovins prélevés à l'abattoir est donc de 0% <sub>IC95%</sub> [0-0,69]. De fait, il n'a pas été possible d'envoyer au CNR des souches de BT2 d'origine bovine en vue de les comparer aux souches humaines isolées la même année, et à plus de 10 ans. Un scénario a été proposé pour pallier l'absence de souches BT2 nouvellement isolées (voir III.1).

### III. IMPLICATIONS DU PORC ET DU BOVIN DANS LES YERSINIOSES HUMAINES à BT4 ET BT2 et EVOLUTION à AU MOINS 10 ANS (CNR-IP)

Cette action se proposait de comparer les génomes de souches de *Y. enterocolitica* de BT4 d'origine porcine et de BT2 d'origine bovine à ceux de souches isolées d'infections humaines en vue d'évaluer l'implication du porc et du bovin dans les yersiniooses humaines à BT4 et BT2, respectivement. Un panel de souches isolées dans le cadre des enquêtes terrains et d'infections humaines sur la même période (n=200 souches), et un panel de souches déjà présentes dans nos collections (animales et humaines) (n=200 souches) devaient être sélectionnées pour le séquençage de leur génome complet par NGS. Cette action devait également permettre d'évaluer l'évolution génétique à au moins 10 ans des souches animales et humaines.



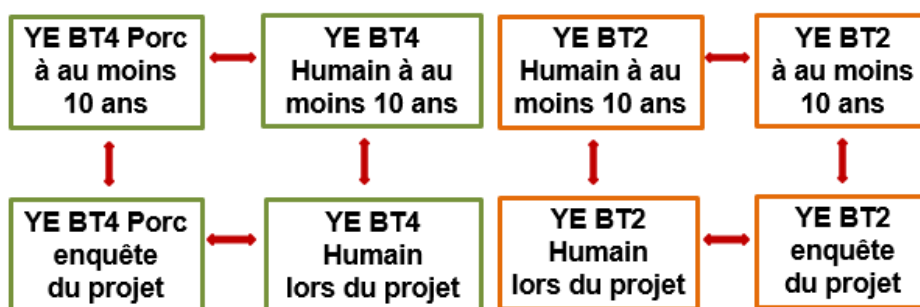


Figure 4 : intercomparaisons envisagées selon le biotype et les sources des souches

**A. Constitution du soucier à partir des souches isolées lors des enquêtes et de nos collections (Anses, IP, IFIP, IDELE)**

1. Pour les souches à plus de 10 ans.

Un total de 200 souches a été sélectionné pour être séquencé (**Collection C1**) (Tab.2). L'Anses a en collection un soucier conséquent de *Y. enterocolitica* de BT4 issu d'une enquête réalisée en 2010 dans 16 abattoirs du grand-Ouest, sur 3120 porcs et 96 lots. De même, l'IFIP a également en collection une soixantaine de souches de *Y. enterocolitica* issues de précédentes enquêtes réalisées entre 2009 et 2010 et isolées d'amygdales, de joues, de fèces et de carcasses de porc. Sur ces souciers ont été sélectionnées 50 souches porcines de BT4 de façon à obtenir un échantillon représentatif de la filière.

L'Institut Pasteur (IP) au travers du CNR de la peste et autres yersiniose (Unité de Recherche *Yersinia*) a en sa possession une collection de plus de 40 000 souches de *Yersinia* isolées de différentes sources (cas humains, environnement, animal et aliment). Sur ce soucier ont été sélectionnées 50 souches de BT2 d'origine bovine isolées entre 1994 et 2010 et 50 souches de BT4 isolées en 2010 de cas humains et 50 souches de BT2 isolées en 2009 et 2010 de cas humains. Les souches humaines ont été sélectionnées selon des critères géographiques (lieu d'isolement) et des critères liés aux patients (âge, sexe), de façon à obtenir un échantillon représentatif des souches reçues au CNR.

2. Pour les souches isolées durant le projet.

Les 200 souches *Y. enterocolitica* devaient provenir des enquêtes réalisées au cours de ce projet et des infections humaines sur la même période, à raison de 50 souches porcines BT4, 50 souches bovines BT2, 50 souches humaines BT4 et 50 souches humaines BT2 (**Collection C2**).

En raison de l'absence de BT2 lors de l'enquête en filière bovine et de l'isolement de 34 souches *Y. enterocolitica* pathogènes lors de l'enquête en filière porcine, il n'a pas été possible d'avoir la collection C2 comme initialement prévue.

Il a donc fallu revoir le scénario pour assurer le séquençage prévu sur 400 souches. Il a été décidé d'élargir le séquençage des BT2 à d'autres filières (**Collection C3**), le CNR ayant en collection des souches de BT2 isolées de chèvre, de mouton et de porcs, avec pour objectifs de regarder la diversité des BT2 dans les filières de rente (bovins, chèvre, moutons et porcs) et de comparer les génomes de ces souches aux génomes des souches humaines BT2.

Il a également été décidé d'élargir la collection C2 de souches humaines à l'ensemble des souches de génotype 4 (correspondant au BT4) et de génotype 2/3-9b (correspondant au biosérotype 2/O:9) reçues au CNR de janvier à octobre 2022 pour augmenter les chances de trouver des souches génétiquement proches entre les collections C1/C3 et la collection C2.

Au total 1663 souches ont été incluses au travers des collections C1, C2 et C3. La collection C2 contient des souches isolées en 2022, alors que les collections C1 et C3 contiennent des souches isolées entre 1993 et 2011.

Tableau 2 : répartition des 1663 souches pour les collection C1, C2 et C3

BT4	Collection C1	collection C2	collection C3
Humain	50 (IP)	1082 (IP)	
Porc	50 (Anses/IFIP)	33 (IFIP)	17 (IP)

BT2	Collection C1	collection C2	collection C3
Humain	50 (IP)	277 (IP)	
Bovin	50 (IP)	0 (Idèle)	
chèvre			37 (IP)
mouton			13 (IP)
porc			3 (IP) (IFIP)

## B. Méthodes

### 1. Séquençage du génome complet des souches *Y. enterocolitica* (IP)

Le séquençage du génome complet des souches a été réalisé en plusieurs étapes :

- L'extraction de l'ADN, réalisée au CNR à l'aide du kit Pure link Genomic DNA mini kit (Invitrogen)
- La préparation des banques génomiques à la plateforme génomique P2M de l'Institut Pasteur : Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT (Illumina).
- Le séquençage est réalisé par la plateforme P2M : Les banques sont déposées dans un séquenceur NextSeq500 (Illumina). Des fragments de 150 nucléotides paired-end sont obtenus.
- Le démultiplexage et le nettoyage des données de séquence est réalisé par un bio-informaticien de la P2M.
- Un assemblage de novo est réalisé à l'aide du pipeline bio-informatique fq2dna (<https://gitlab.pasteur.fr/GIPhy/fq2dna>).
- Les données sont stockées sur le serveur central de l'Institut Pasteur sur un espace dédié restreint au personnel du CNR.

### 2. Assignation taxonomique des souches de *Yersinia* (CNR-IP)

L'assignation taxonomique a été réalisée en 2 étapes :

- Les génomes ont été soumis à une core-genome Multi Locus Sequence Typing (cgMLST) spécifique du genre *Yersinia* avec un schéma de 500 gènes communs à toutes les espèces du genre *Yersinia* : 500-gene *Yersinia*-cgMLST. Elle est réalisée dans la base de données BIGSdb créée sur le cluster de calcul de l'Institut Pasteur (<https://bigsdb.pasteur.fr/yersinia/>).
- Les profils alléliques obtenus par la 500-gene *Yersinia*-cgMLST ont été comparés par le programme YCRON (développé à l'Institut Pasteur) à une base de données de référence répertoriant toutes les espèces et sous-espèces de *Yersinia*. Chaque profil allélique s'est vu attribué une espèce et une sous-espèce (génotype).

### 3. Typage des souches de *Y. enterocolitica* (CNR-IP)

Le typage des souches a été réalisé par une cgMLST spécifique de l'espèce *Y. enterocolitica* avec un schéma de 1727 gènes communs à toutes les souches de *Y. enterocolitica* : 1727-gene *Y. enterocolitica*-cgMLST. Les profils alléliques obtenus sont ensuite utilisés pour la comparaison des génomes.

### 4. Calcul de la proximité génétique des souches (CNR-IP)

Afin d'évaluer la proximité génétique des souches entre elles, nous avons utilisé un programme informatique développé à l'Institut Pasteur, qui compare les profils alléliques obtenus par la 1727-gene *Y. enterocolitica*-cgMLST et calcule le nombre d'allèles différents entre 2 profils (différence allélique ou distance allélique = AD). Pour la comparaison de plus de 2 souches, le programme établit une matrice distances entre les souches à étudier.

### 5. Clustérisation des souches (CNR-IP)

La clustérisation des souches a été effectuée sur l'application BIGSdb à partir des profils alléliques obtenus par la 1727-gene *Y. enterocolitica*-cgMLST. Les profils alléliques sont comparés à tous les profils alléliques de la base de données. Le programme calcule les distances alléliques (AD) entre les profils et groupe dans un même cluster les souches qui ont des  $AD \leq$  seuil donné. Les clusters sont identifiés par un numéro de cluster.

Les seuils définissant la proximité génétique entre les souches ont été fixés lors de précédentes investigations d'épidémies. Au sein des génotypes 4, 2/3-9a, 2/3-5a les souches avec une  $AD \leq 5$  sont considérées comme très proches. Quant aux souches de génotype 2/3-9b, plus clonales, elles sont considérées comme très proches si  $AD \leq 3$ . Les Minimum Spanning Tree représentant les clusters ont été obtenus avec l'application Grape Tree.

## C. Résultats

### 1. Assignment taxonomique des souches

Le génome des 1663 souches de *Y. enterocolitica* du soucier a été séquencé et caractérisé génotypiquement.

Collection	N souches	Biotype/Origine	Assignment génotypique			
			Ye 4	Ye 2/3-9b	Ye 2/3-5a	Ye 2/3-9a
C1/C3	67	Ye BT4 porcines	67			
	50	Ye BT4 humaines	50			
	50	Ye BT2 bovines		50		
	3	Ye BT2 porcines		1	2	
	13	Ye BT2 ovines		13		
	37	Ye BT2 caprines		37		
	50	Ye BT2 humaines		39		11
C2	33	Ye BT4 porcines	33			
	1082	Ye humaines	1082			
	1	Ye BT2 porcine				1
	277	Ye humaines		277		
<b>Total</b>	<b>1663</b>		<b>1232</b>	<b>417</b>	<b>2</b>	<b>12</b>

Les souches de génotype 4 correspondent, comme attendu, aux souches de BT4.

Les souches des génotypes 2/3-9b, 2/3-5a et 2/3-9a correspondent, comme attendu, aux souches de BT2.

Le génotype 2/3-5a n'a été retrouvé que chez 2 souches et uniquement porcines.

Le génotype 2/3-9a n'a pas été retrouvé parmi les souches bovines.

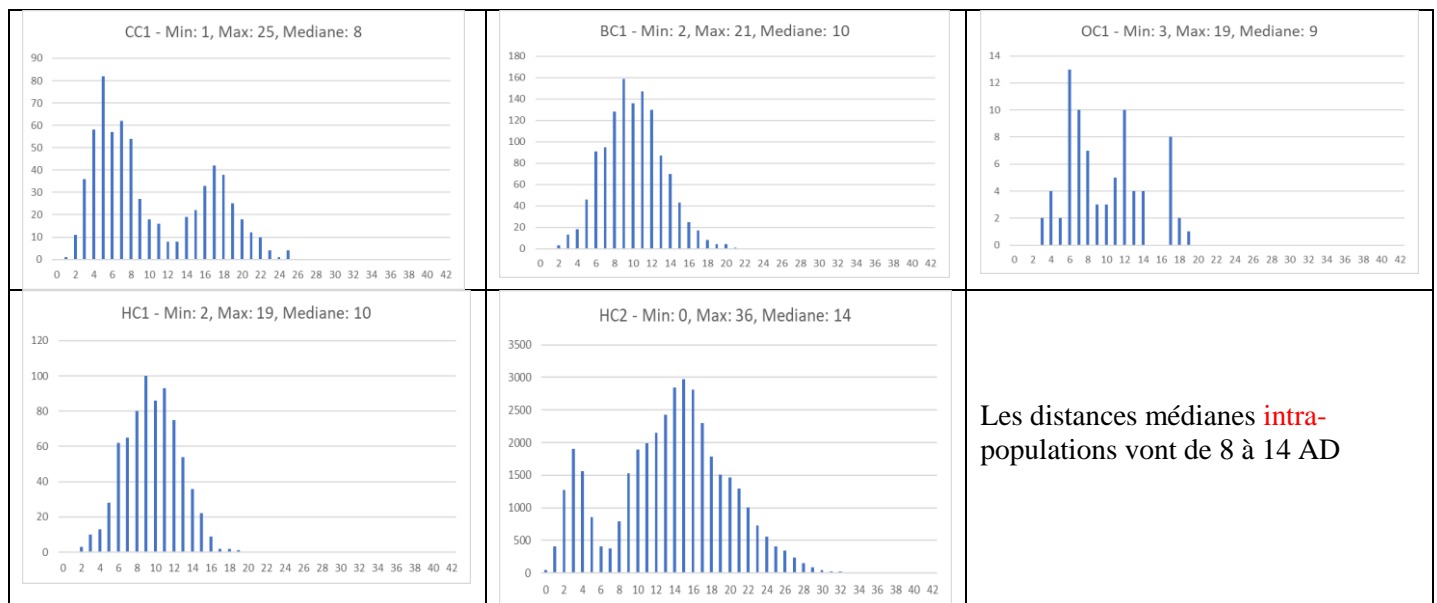
Conclusion : les souches de BT4 appartiennent toutes au génotype 4, alors que les souches de BT2 se regroupent en plusieurs génotypes dont le génotype 2/3-9b est le plus fréquent et présent parmi les souches humaines et animales.

### 2. Diversité génétique des souches en intra et inter populations

Les distances alléliques intra et inter populations ont été étudiées pour les souches des génotypes 4 et 2/3-9b.

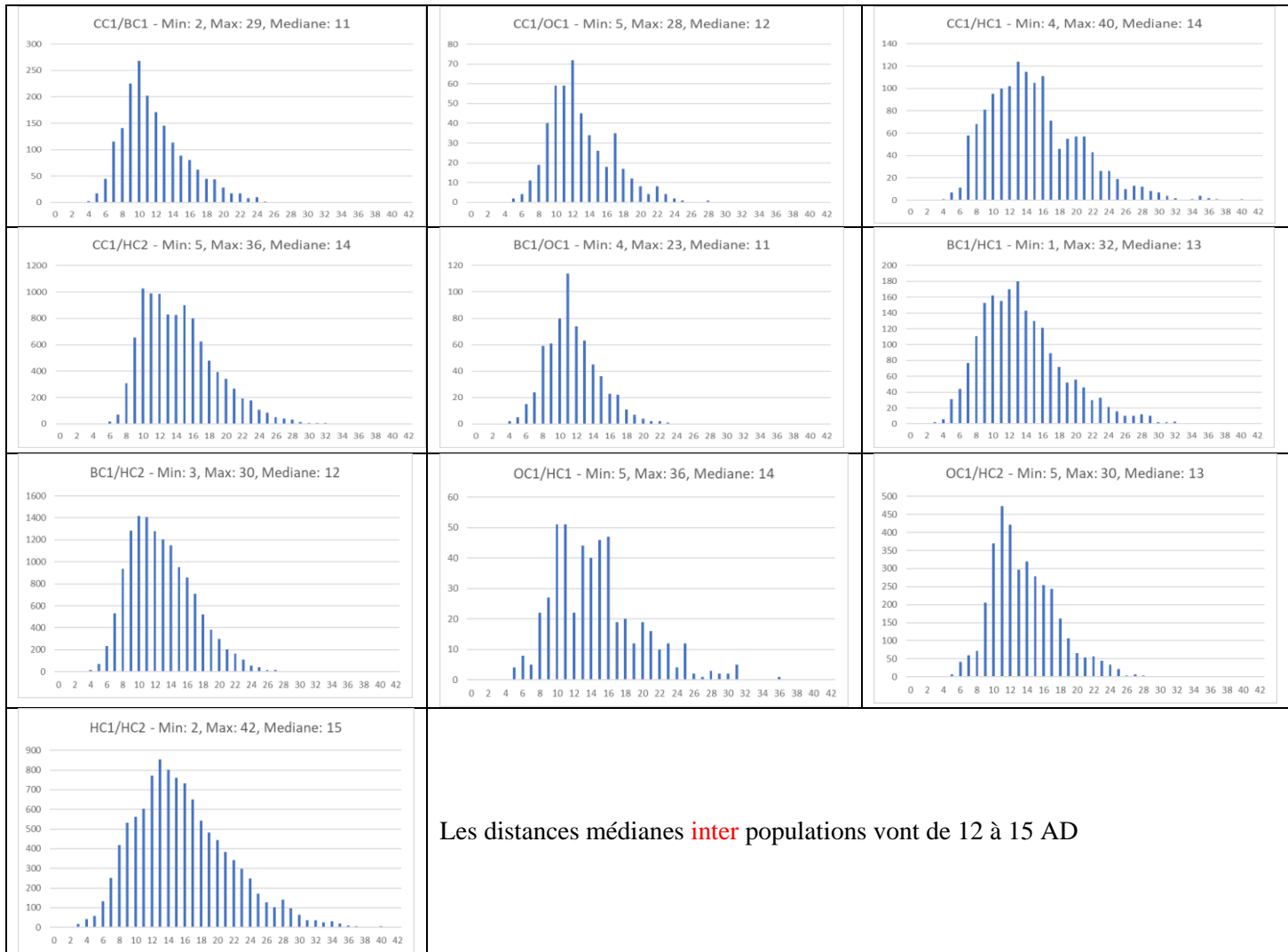
#### Génotype 2/3-9b :

#### Distances alléliques **intra**-populations



CC1 : souches caprines de la collection C3. BC1 : souches bovines de la collection C1. OC1 : souches ovines de la collection C3. HC1 : souches humaines de la collection C1. HC2 : souches humaines de la collection C2.

## Distances alléliques **inter**-populations

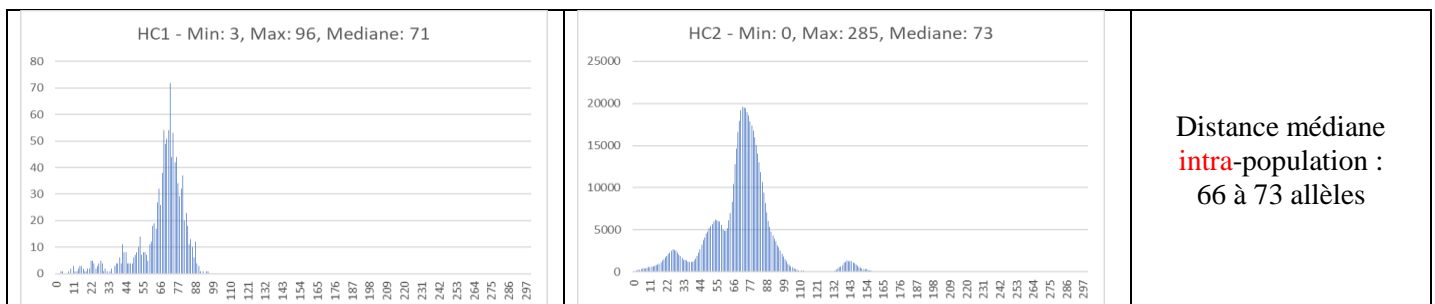


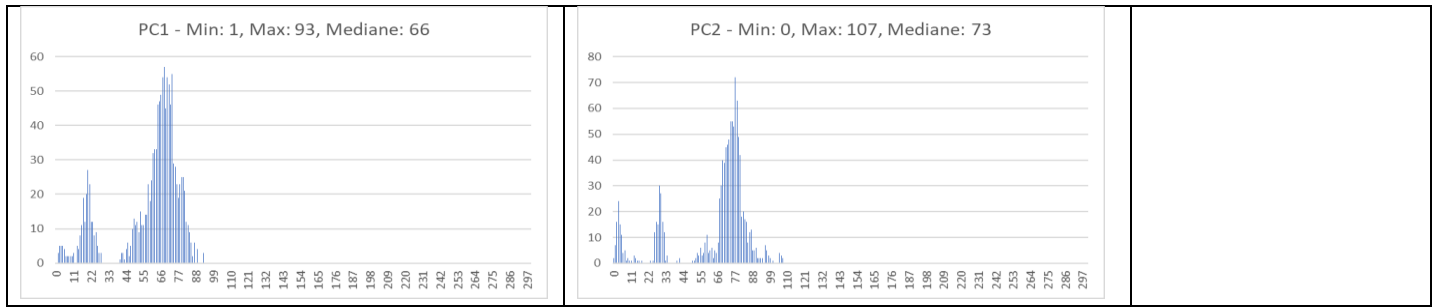
On observe une diversité similaire au sein de chaque population CC1, BC1, OC1, HC1 et HC2 : entre 8 et 14 AD. Quand on compare les populations 2 par 2 (CC1/BC1, CC1/OC1, CC1/HC1, CC1/HC2, BC1/OC1, BC1/HC1, BC1/HC2, OC1/HC1, OC1/HC2, HC1/HC2) on observe des diversités similaires à celles des populations individuelles : 12 à 15 AD

En **conclusion**, ceci montre que toutes ces souches de *Y. enterocolitica* de génotype 2/3-9b appartiennent à une même population qui circule entre animaux et humains.

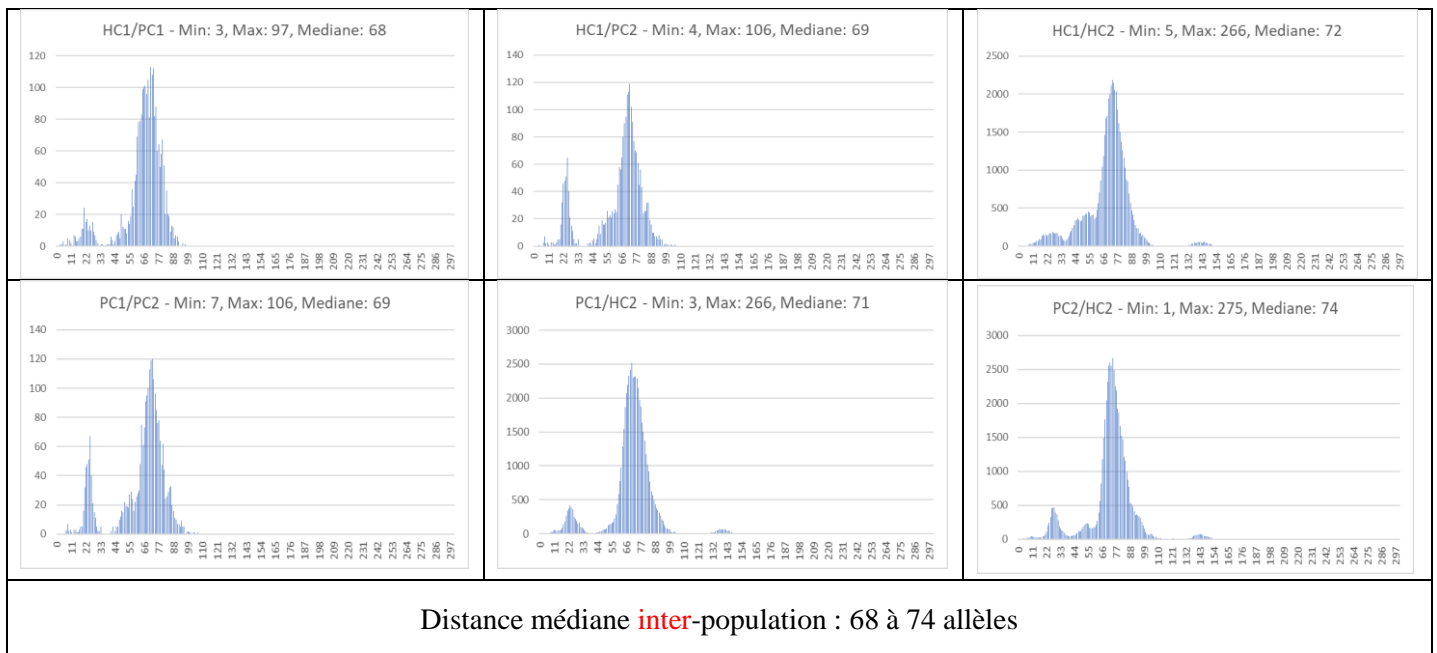
### Génotype 4 :

## Distances alléliques **intra**-populations





### Distances alléliques **inter**-populations



On observe une diversité similaire au sein de chaque population HC1, HC2, PC1 et PC2 : entre 66 et 73 AD. Quand on regroupe les populations 2 par 2 (HC1/PC1, HC1/PC2, HC1/HC2, PC1/PC2, PC1/HC2 et PC2/HC2) on observe des diversités similaires à celles des populations individuelles : 68 à 74 AD.

En **conclusion**, ceci montre que toutes ces souches de *Y. enterocolitica* de génotype 4 appartiennent à une même population qui circule entre les porcs et les humains.

### 3. Clustérisation génétique des souches

Même si les souches qui circulent entre les humains et les animaux appartiennent à la même population, nous avons voulu savoir si on pouvait observer des souches génétiquement très proches dans la population d'origine animale et dans la population d'origine humaine.

#### **Souches du génotype 2/3-5a :**

Les 2 souches *Y. enterocolitica* 2/3-5a sont toutes les deux d'origine porcine et n'ont pas pu être comparées à des souches humaines. Leur distance allélique est AD=1.

#### **Souches du génotype 2/3-9a :**

Parmi les souches de génotype 2/3-9a, il y a une seule souche porcine isolée en 2022 et 11 souches humaines isolées en 2010. Les distances alléliques entre la souche porcine et les souches humaine vont de 9 à 173. La souche porcine n'est pas génétiquement proche d'une souche humaine.

### Souches du génotype 2/3-9b :

Les 417 souches du génotype 2/3-9b ont été soumises au programme de clustérisation avec un seuil maximal de 3 différences alléliques.

26 clusters comprenant de 2 à 110 souches ont été identifiés.

5 clusters mixtes comprenant des souches des différentes collections ont été identifiés :

Type	Nombre de clusters	N° de cluster
<b>HC1/HC2</b>	2	383, 2955
<b>BC1/HC1/HC2</b>	2	5062, 5668
<b>BC1, CC3</b>	1	5840

*HC1 : souches humaines de la collection 1. HC2 : souches humaines de la collection 2.*

*BC1 : souches bovines de la collection . CC3 : souches caprines de la collection 3*

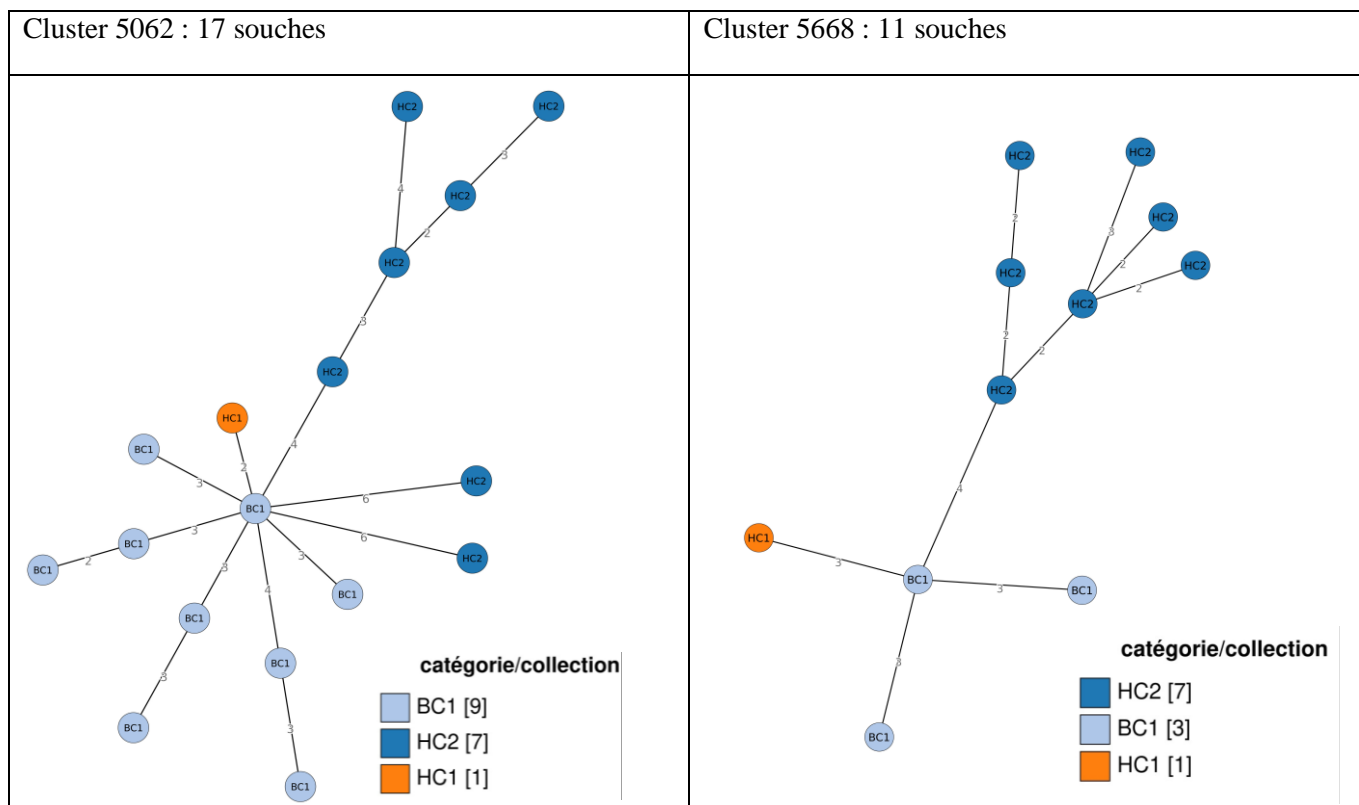
- Le cluster mixte 383 comprend 17 souches dans la base de données du CNR dont 2 souches de l'étude EVANHOTY : 1 HC1 et 1 HC2 avec une AD=5
- Le cluster mixte 2955 contient 110 souches de l'étude EVANHOTY : 1 HC1 et 109 HC2. La souche HC1 a 2 différences alléliques avec une souche HC2

La présence de souches dans un cluster mixte humain HC1/HC2 confirme la persistance de la source d'infection entre 2010 et 2022.

- Le cluster mixte 5840 contient 2 souches de l'étude EVANHOTY : 1 souche bovine isolée en janvier 2001 et 1 souche caprine isolée en novembre 2001, avec une AD=2

La présence de souches dans ce cluster mixte bovin /caprin démontre la circulation des souches entre les 2 réservoirs animaux.

- Les clusters mixtes BC1/HC1/HC2 n°5062 et 5668 comprennent des souches humaines et bovines



La présence de clusters comprenant des souches bovines isolées entre 1994 et 2011 et des souches humaines isolées en 2010 et 2022 démontre la circulation des souches entre les bovins et les humains et confirme la persistance de la source d'infection sur une longue période (28 ans).

#### Souches du génotype 4 :

Les 1232 souches du génotype 4 ont été soumises au programme de clustérisation avec un seuil maximal de 5 différences alléliques.

13 clusters mixtes ont été identifiés.

Type	Nombre de clusters	N° de cluster
<b>HC1/HC2</b>	5	38, 64, 265, 380, 814
<b>PC1/HC2</b>	2	272,1461
<b>HC1/HC2/PC1/PC2</b>	2	481,1292
<b>PC2/HC2</b>	3	497, 2959, 4958
<b>HC1/HC2/PC1</b>	1	792

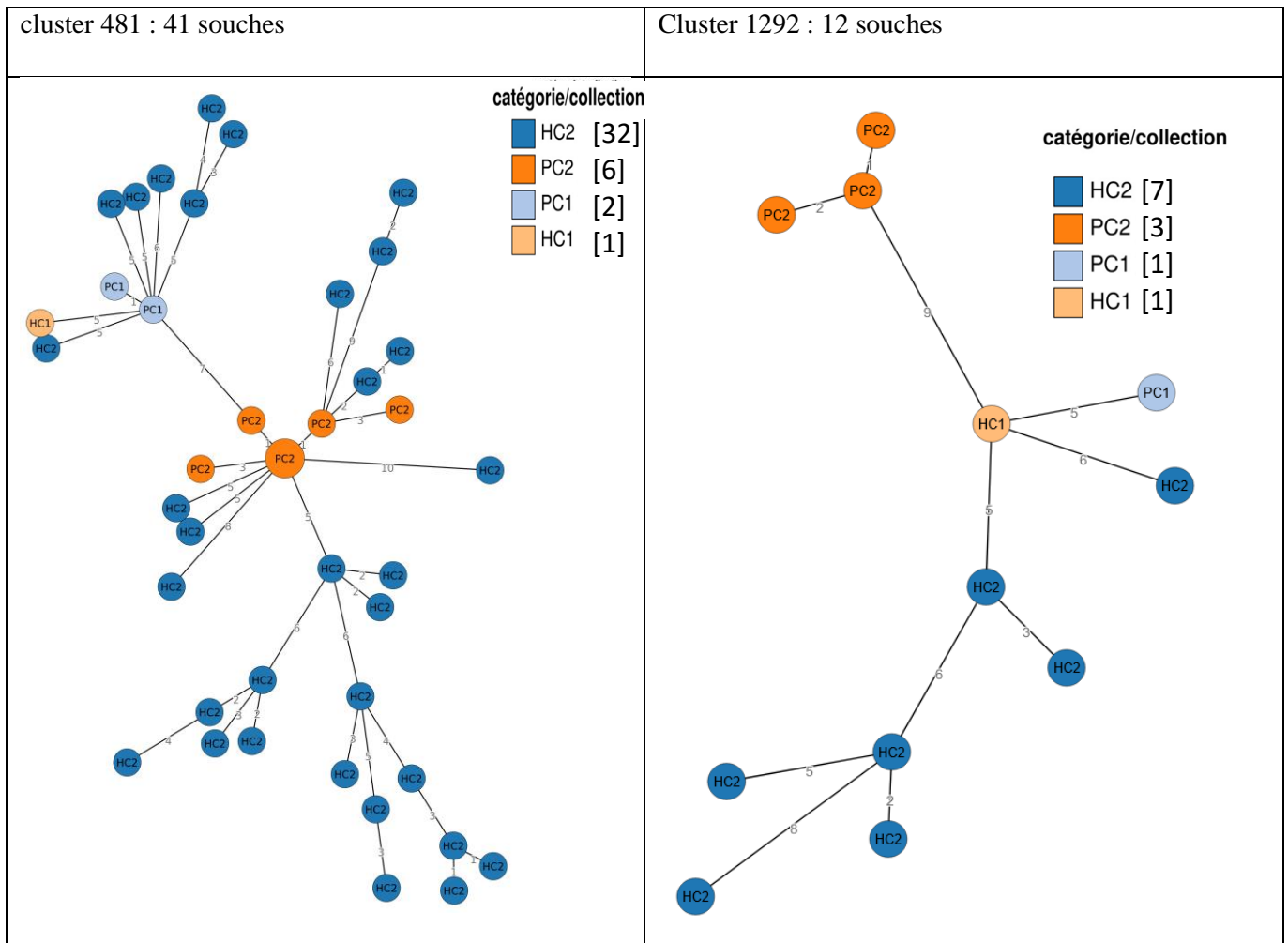
- Les 5 clusters mixtes HC1/HC2 ont une taille allant de 6 à 36 souches et contiennent chacun une souche de la collection HC1.

La présence de souches dans un cluster mixte humain HC1/HC2 confirme la persistance de la source d'infection entre 2010 et 2022.

- Les 3 clusters mixtes PC2/HC2 contiennent de 2 à 10 souches.

La présence de souches dans ces clusters démontre la circulation de ces souches entre le réservoir animal et l'homme en 2022.

- Les 2 clusters mixtes PC1/HC2 contiennent 4 et 6 souches  
La présence de souches dans ces 2 clusters démontre la circulation des souches entre le réservoir animal et l'homme et la persistance de ces souches sur une longue période d'au moins 10 ans.
- Le cluster mixte HC1/HC2/PC1 contient 12 souches.  
La présence de ce cluster montre la circulation des souches entre les porcs et l'homme et la persistance de la source d'infection sur une période d'au moins 10 ans.
- Les 2 clusters mixtes n° 481 et 1292 contiennent 41 et 12 souches



La présence de clusters comprenant des souches porcines isolées en 2010, 2011 et 2022 et des souches humaines isolées en 2010 et 2022 démontre la circulation des souches de *Y. enterocolitica* de génotype 4 entre le réservoir « porcs » et les humains et la persistance des souches dans le réservoir animal pendant une période d'au moins 10 ans.



#### IV. POUVOIR DISCRIMINANT DU TYPAGE PAR SPECTROMETRIE IR ET CONCORDANCE AVEC LA cgMLST (Anses, IP)

Cette action se proposait de typer les souches *Y. enterocolitica* par spectrométrie IR pour évaluer le pouvoir discriminant de cette technique et de mesurer la concordance de cette technique avec la cgMLST. L'autre finalité était aussi d'avoir des éléments permettant de proposer cette technique comme outil simple et peu coûteux pour tracer les *Y. enterocolitica* au sein des maillons des filières et identifier les épidémies en cas d'infections humaines.

##### A. Les souches

Cette analyse par IR a été réalisée sur les 200 souches de *Y. enterocolitica* (50 BT4 porc, 50 BT2 bovin, 50 BT4 humain, 50 BT2 humain) issues de la collection C1.

##### B. Typage par spectrométrie IR

###### 1. Préparation des souches et lecture

Les 200 souches ont été typées par spectrométrie IR selon la technologie de Bruker à raison de 5 réplicats par souche. Les bactéries seront préparées selon les recommandations de Bruker et les spectres obtenus par l'IR Biotyper. La préparation des souches bactériennes est conditionnée par l'utilisation des consommables commercialisés par la société Bruker :

- Un kit IR Biotyper contenant des tubes pourvus de barreau aimanté pour la préparation des échantillons et 2 tubes de standards Bruker Infrared Test Standards (IRT 1 et IRT 2)
- Des plaques à 96 positions en silicium réutilisable (Fig. 5)

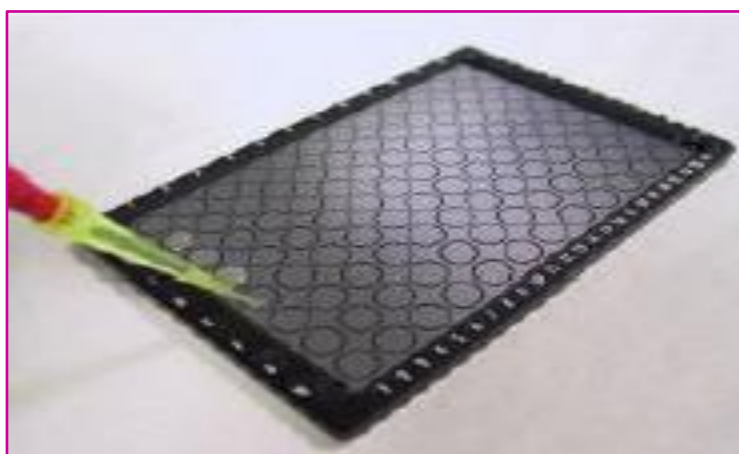
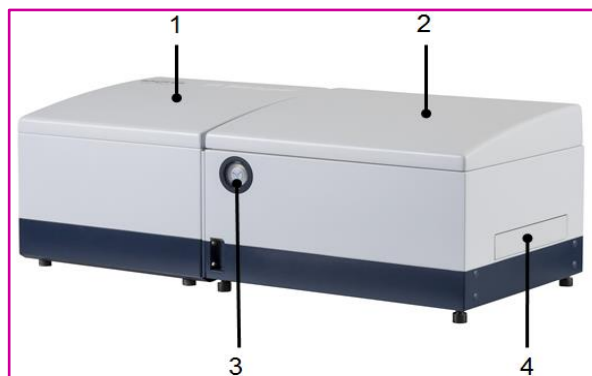


Figure 5 : Plaque de silicium pour le dépôt des échantillons (image Bruker)

Les IRTS sont des souches d'*Escherichia coli* lyophilisées à déposer sur chaque plaque en même temps que les échantillons à tester. Ces lyophilisats sont à resuspendre avec 90  $\mu$ L d'eau désionisée puis 90  $\mu$ L d'éthanol absolu. Deux dépôts de 12  $\mu$ L de chaque IRTS sont à réaliser sur la plaque. Une lecture validée de ces standards est nécessaire pour l'acquisition des spectres des échantillons.

Le fabricant préconise la préparation des suspensions bactériennes selon la procédure suivante:

- 50  $\mu$ L d'éthanol à 70 % (v/v) sont déposés dans un tube de 1,5 mL du kit afin d'inactiver les bactéries.
- 2 à 3 oëses de colonies prélevées de la gélose sont transférées dans le tube. Une attention particulière est portée sur le fait de ne pas transférer de gélose.
- Le tube est vortexé pour former une suspension homogène.
- 50  $\mu$ L d'eau ultra pure stérile sont ajoutés. Le tube est de nouveau vortexé.
- Dans notre situation où l'IR Biotyper est localisé à la plateforme Maldi-Tof de l'Anses de Nancy (Fig. 6), les tubes sont envoyés le jour même, à température ambiante.
- A réception des tubes, 5 dépôts (réplicats) de 15  $\mu$ L par souche sont réalisés sur les puits de la plaque de silicium. Les dépôts doivent être uniformes et homogènes afin d'avoir des résultats optimaux et recouvrir la position imprimée sur la plaque.
- La plaque est séchée sous PSM environ 30 minutes puis lue dans l'IR Bt.



- 1 : Compartiment du spectromètre IR
- 2 : Compartiment de la microplaque
- 3 : Cartouche de desséchant du compartiment des microplaques
- 4 : Port de chargement pour les microplaques

Figure 6 : Vue avant de l'IR Biotyper (image Bruker)

Après l'acquisition des spectres, l'IR Biotyper effectue des tests de qualité pour tous les dépôts (Tab 3) :

Tableau 3 : Valeurs des limites d'acceptation des tests de qualité de Bruker.

Paramètres	Limite inférieure	Limite supérieure
Intensité d'absorbance	0.4	2
Signal/Bruit (R <sub>2</sub> )	> 200	/
Signal/Bruit (R <sub>3</sub> )	> 40	/
Signal /Eau (R <sub>2</sub> )	> 100	/
Signal /Eau (R <sub>3</sub> )	> 20	/

## 2. Comparaison des spectres

Bien que le spectre IR tient compte de la composition globale de la bactérie, c'est la région du spectre centrée sur les polysaccharides qui est la zone d'intérêt pour le typage des souches. L'analyse informatique de cette région se fait de manière automatisée par le logiciel fourni avec l'IR Biotyper.

La méthode, par défaut, calculant les distances euclidiennes avec une liaison moyenne, Euclidean average linkage, a été utilisée pour analyser les spectres. Cette méthode recommandée par Bruker pour une première approche mesure la moyenne des distances entre les spectres.

Les résultats ont été exploités avec un dendrogramme qui offre une vue d'ensemble sous forme d'arborescence des relations spectrales. Le dendrogramme permet de visualiser le « clustering » des souches (Fig. 7). La longueur des branches est un indicateur de proximité des répliquats et/ou des souches : plus les branches sont longues et plus les répliquats et/ou les souches sont éloigné(e)s.

Le Cut Off Value (COV) est une valeur seuil de distance raisonnable pour décider quelles souches appartiennent au même groupe et considérer comme ne pouvant pas être distinguées. Le COV est fixé par défaut par le logiciel ou peut être modifié. Dans le cadre de ce projet, les résultats ont été analysés à la fois avec le COV fixé par défaut et ajusté

## 3. Analyses des données spectrales

Les données spectrales moyennées à partir des 5 répliquats pour chaque souche et dans la gamme de longueurs d'onde correspondant à la région des polysaccharides (1300-800 cm<sup>-1</sup> → 501 nombres d'onde = variable) ont été analysées statistiquement à l'aide de modèles d'analyse discriminante par les moindres carrés partiels (PLS-DA) avec le module ropls sous R. De même, une ACP (Analyse en Composantes Principales) a été réalisé sur les données IR.

## 4. Pouvoir discriminant et concordance

Le pouvoir discriminant des techniques Biotypage IR, cgMLST a été estimé par le calcul de l'indice de Simpson (ID) et la concordance entre les méthodes a été évaluée par la comparaison de la distribution des souches pour chaque méthode « comparing partitions » avec l'indice de Rand et de Wallace.

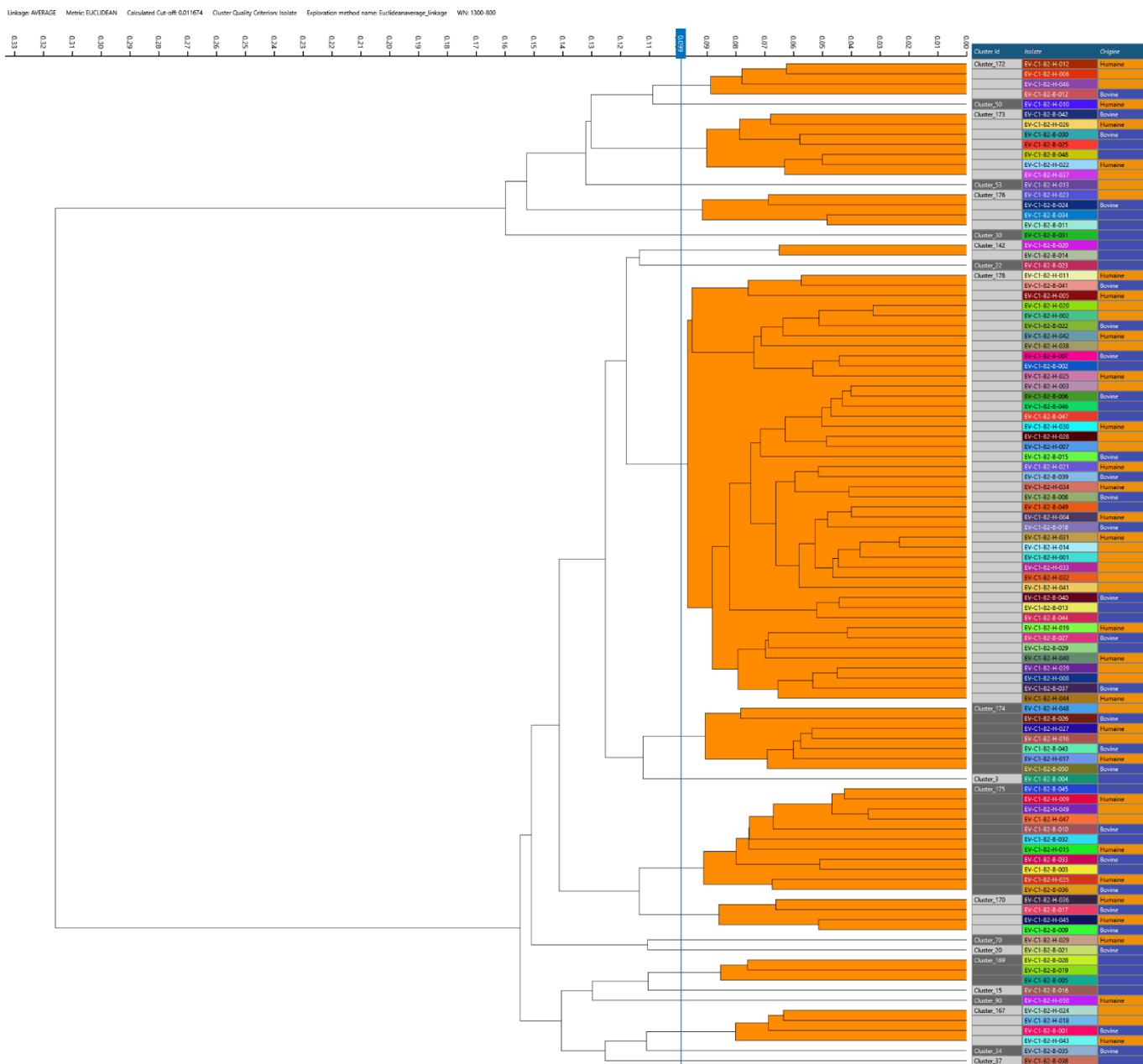


Fig. 7. Extrait du dendrogramme des souches de *Y. enterocolitica* BT2 obtenu avec la méthode Euclidean average linkage et un cut-off value (COV) de 0,099 sur la plage de 1300  $\text{cm}^{-1}$  à 800  $\text{cm}^{-1}$  (image Bruker). Les labels reprennent les diverses informations décrivant les souches. Les IR Clusters regroupent les souches selon leurs données spectrales dans la région des polysaccharides.

## C. Résultats

### 1. Analyse des dendrogrammes BT4

Bt4_0,133	Porc	Humain	Total	
Bt4_1	0	3	3	P-H+
Bt4_2	0	2	2	P-H+
Bt4_3	0	1	1	P-H+
Bt4_4	30	2	32	P+H+
Bt4_5	7	1	8	P+H+
Bt4_6	0	6	6	P-H+
Bt4_7	0	3	3	P-H+
Bt4_8	0	1	1	P-H+
Bt4_9	1	17	18	P+H+
Bt4_10	2	4	6	P+H+
Bt4_11	0	6	6	P-H+
Bt4_12	0	2	2	P-H+
Bt4_13	0	1	1	P-H+
Bt4_14	0	1	1	P-H+
Bt4_15	8	0	8	P+H-
Bt4_16	2	0	2	P+H-
Total	50	50	100	

La comparaison des spectres avec le **COV par défaut (0,133)** a généré 16 clusters (Tab 4) dont :

- 4 clusters dits mixtes, c'est-à-dire regroupant des souches humaines et des souches porcines,
- 10 clusters ne contenant que des souches humaines
- 2 clusters ne contenant que des souches porcines

La répartition des souches dans les clusters indiquerait que :

- ✓ 80% (40/50) souches BT4 porc sont capables de traverser la chaîne et d'infecter l'homme P+H+
- ✓ 48% (24/50) souches BT4 humaines sont d'origine porcine P+H+

Tab 4. Distribution des souches BT4 dans les clusters avec le COV par défaut à 0,133 selon leur origine

Bt4_0,084	Porc	Humain	Total	
Bt4_1	0	1	1	P-H+
Bt4_2	0	1	1	P-H+
Bt4_3	0	1	1	P-H+
Bt4_4	0	1	1	P-H+
Bt4_5	0	1	1	P-H+
Bt4_6	0	1	1	P-H+
Bt4_7	5	1	6	P+H+
Bt4_8	3	0	3	P+H-
Bt4_9	2	0	2	P+H-
Bt4_10	1	0	1	P+H-
Bt4_11	0	1	1	P-H+
Bt4_12	2	0	2	P+H-
Bt4_13	4	0	4	P+H-
Bt4_14	1	0	1	P+H-
Bt4_15	12	0	12	P+H-
Bt4_16	4	0	4	P+H-
Bt4_17	3	0	3	P+H-
Bt4_18	0	1	1	P-H+
Bt4_19	0	1	1	P-H+
Bt4_20	0	1	1	P-H+
Bt4_21	0	4	4	P-H+
Bt4_22	0	2	2	P-H+
Bt4_23	0	1	1	P-H+
Bt4_24	0	1	1	P-H+
Bt4_25	0	3	3	P-H+
Bt4_26	0	1	1	P-H+
Bt4_27	0	3	3	P-H+
Bt4_28	0	8	8	P-H+
Bt4_29	1	2	3	P+H+
Bt4_30	1	1	2	P+H+
Bt4_31	0	1	1	P-H+
Bt4_32	1	2	3	P+H+
Bt4_33	0	2	2	P-H+
Bt4_34	0	3	3	P-H+
Bt4_35	0	1	1	P-H+
Bt4_36	0	1	1	P-H+
Bt4_37	0	1	1	P-H+
Bt4_38	0	1	1	P-H+
Bt4_39	0	1	1	P-H+
Bt4_40	2	0	2	P+H-
Bt4_41	4	0	4	P+H-
Bt4_42	1	0	1	P+H-
Bt4_43	1	0	1	P+H-
Bt4_44	1	0	1	P+H-
Bt4_45	1	0	1	P+H-
Total	50	50	100	

La comparaison des spectres avec le **COV ajusté à 0,084** a généré 45 clusters (Tab 5) dont :

- 4 clusters dits mixtes, c'est-à-dire regroupant des souches humaines et des souches porcines,
- 26 clusters ne contenant que des souches humaines
- 15 clusters ne contenant que des souches porcines

La répartition des souches dans les clusters indiquerait que :

- ✓ 16% (8/50) souches BT4 porc sont capables de traverser la chaîne et d'infecter l'homme P+H+
- ✓ 3% (6/50) souches BT4 humaines sont d'origine porcine P+H+

Tab 5. Distribution des souches BT4 dans les clusters avec le COV ajusté à 0,084 selon leur origine

Avec le COV par défaut, les clusters mixtes IR contiennent plus de souches (n= 64) que les clusters mixtes de cgMLST (n=8).

Avec le COV ajusté, les clusters mixtes IR contiennent moins de souches (14 au total) mais des souches différentes que les clusters mixtes de cgMLST sauf pour deux souches.

## 2. Analyse des dendrogrammes BT2

Bt2_0,099	Bovin	Humain	Total	
Bt2_1	1	3	4	B+H+
Bt2_2	0	1	1	B-H+
Bt2_3	4	3	7	B+H+
Bt2_4	0	1	1	B-H+
Bt2_5	3	1	4	B+H+
Bt2_6	1	0	1	B+H-
Bt2_7	2	0	2	B+H-
Bt2_8	1	0	1	B+H-
Bt2_9	18	25	43	B+H+
Bt2_10	3	4	7	B+H+
Bt2_11	1	0	1	B+H-
Bt2_12	6	5	11	B+H+
Bt2_13	2	2	4	B+H+
Bt2_14	0	1	1	B-H+
Bt2_15	1	0	1	B+H-
Bt2_16	3	0	3	B+H-
Bt2_17	1	0	1	B+H-
Bt2_18	0	1	1	B-H+
Bt2_19	1	3	4	B+H+
Bt2_20	1	0	1	B+H-
Bt2_21	1	0	1	B+H-
Total	50	50	100	

La comparaison des spectres avec le **COV par défaut (0,099)** a généré 21 clusters (Tab 6) dont :

- 8 clusters dits mixtes, c'est-à-dire regroupant des souches humaines et des souches bovines,
- 4 clusters ne contenant que des souches humaines
- 9 clusters ne contenant que des souches bovines

La répartition des souches dans les clusters indiquerait que :

- ✓ 76% (38/50) souches BT2 bovines sont capables de traverser la chaîne et d'infecter l'homme B+H+
- ✓ 92% (46/50) souches BT2 humaines sont d'origine bovine B+H+

Tab 6. Distribution des souches BT2 dans les clusters avec le COV par défaut à 0,099 selon leur origine

Bt2_0,042	Bovin	Humain	Total	Classe
Bt2_1	0	1	1	B-H+
Bt2_2	0	1	1	B-H+
Bt2_3	0	1	1	B-H+
Bt2_4	1	0	1	B+H+
Bt2_5	0	1	1	B-H+
Bt2_6	1	0	1	B+H+
Bt2_7	0	1	1	B-H+
Bt2_8	1	0	1	B+H+
Bt2_9	1	0	1	B+H+
Bt2_10	1	0	1	B+H+
Bt2_11	0	1	1	B-H+
Bt2_12	0	1	1	B-H+
Bt2_13	0	1	1	B-H+
Bt2_14	0	1	1	B-H+
Bt2_15	1	0	1	B+H+
Bt2_16	1	0	1	B+H+
Bt2_17	1	0	1	B+H+
Bt2_18	1	0	1	B+H+
Bt2_19	1	0	1	B+H+
Bt2_20	1	0	1	B+H+
Bt2_21	1	0	1	B+H+
Bt2_22	0	1	1	B-H+
Bt2_23	1	0	1	B+H+
Bt2_24	0	1	1	B-H+
Bt2_25	0	2	2	B-H+
Bt2_26	1	0	1	B+H+
Bt2_27	0	1	1	B-H+
Bt2_28	0	1	1	B-H+
Bt2_29	1	0	1	B+H+
Bt2_30	1	0	1	B+H+
Bt2_31	0	1	1	B-H+
Bt2_32	1	1	2	B+H+
Bt2_33	1	0	1	B+H+
Bt2_34	1	0	1	B+H+
Bt2_35	0	1	1	B-H+
Bt2_36	0	1	1	B-H+
Bt2_37	0	1	1	B-H+
Bt2_38	1	0	1	B+H+
Bt2_39	0	1	1	B-H+
Bt2_40	1	0	1	B+H+
Bt2_41	1	1	2	B+H+
Bt2_42	1	1	2	B+H+
Bt2_43	1	0	1	B+H+
Bt2_44	0	3	3	B-H+
Bt2_45	0	1	1	B-H+
Bt2_46	0	1	1	B-H+
Bt2_47	0	1	1	B-H+

Bt2_48	1	0	1	B+H-
Bt2_49	1	0	1	B+H-
Bt2_50	1	0	1	B+H-
Bt2_51	1	1	2	B+H+
Bt2_52	1	0	1	B+H-
Bt2_53	0	1	1	B-H+
Bt2_54	0	1	1	B-H+
Bt2_55	0	1	1	B-H+
Bt2_56	1	0	1	B+H-
Bt2_57	0	1	1	B-H+
Bt2_58	0	1	1	B-H+
Bt2_59	1	0	1	B+H-
Bt2_60	0	1	1	B-H+
Bt2_61	0	1	1	B-H+
Bt2_62	1	0	1	B+H-
Bt2_63	0	1	1	B-H+
Bt2_64	1	0	1	B+H-
Bt2_65	1	0	1	B+H-
Bt2_66	1	0	1	B+H-
Bt2_67	0	1	1	B-H+
Bt2_68	0	2	2	B-H+
Bt2_69	1	0	1	B+H-
Bt2_70	1	0	1	B+H-
Bt2_71	0	1	1	B-H+
Bt2_72	1	0	1	B+H-
Bt2_73	1	0	1	B+H-
Bt2_74	0	1	1	B-H+
Bt2_75	1	0	1	B+H-
Bt2_76	0	1	1	B-H+
Bt2_77	1	0	1	B+H-
Bt2_78	0	1	1	B-H+
Bt2_79	1	0	1	B+H-
Bt2_80	0	1	1	B-H+
Bt2_81	1	0	1	B+H-
Bt2_82	1	0	1	B+H-
Bt2_83	1	0	1	B+H-
Bt2_84	1	0	1	B+H-
Bt2_85	1	0	1	B+H-
Bt2_86	0	1	1	B-H+
Bt2_87	0	1	1	B-H+
Bt2_88	0	1	1	B-H+
Bt2_89	1	0	1	B+H-
Bt2_90	0	1	1	B-H+
Bt2_91	1	0	1	B+H-
Bt2_92	1	0	1	B+H-
Total	50	50	100	

Tab 7. Distribution des souches BT2 dans les clusters avec le COV ajusté à 0,042 selon leur origine

La comparaison des spectres avec le **COV ajusté à 0,042** a généré 92 clusters (Tab 7) dont :

- 4 clusters dits mixtes, c'est-à-dire regroupant des souches humaines et des souches bovines,
- 42 clusters ne contenant que des souches humaines
- 46 clusters ne contenant que des souches bovines

La répartition des souches dans les clusters indiquerait que :

- ✓ 8% (4/50) souches BT2 bovine sont capables de traverser la chaîne et d'infecter l'homme B+H+
- ✓ 8% (4/50) souches BT2 humaines d'origine porcine B+H+

Avec le COV par défaut, les clusters mixtes IR contiennent plus de souches (n= 84) que les clusters mixtes de cgMLST (n=14).

Avec le COV ajusté, les clusters mixtes IR contiennent moins de souches (8 au total) mais des souches différentes que les clusters mixtes de cgMLST.

### 3. Analyses des données spectrales

Les données spectrales ont été considérées selon les modalités P+H- / P+H+ / P-H+, pour les BT4, et selon les modalités B+H- / B+H+ / B-H+, pour les BT2, définies par les clusters générés par la comparaison des génomes (cgMLST).

L'ACP (Analyse en Composantes Principales) sur les données IR des souches BT4 montre que les souches porcines et humaines sont séparées (fig.8). Pour les souches P+H+, ces souches lorsqu'elles étaient isolées chez le porc sont regroupées avec les autres souches porcines (P+H-), tandis que les souches isolées chez l'homme sont regroupées avec les autres souches humaines (P-H+). Les souches porcines semblent donc se différencier des souches humaines BT4.

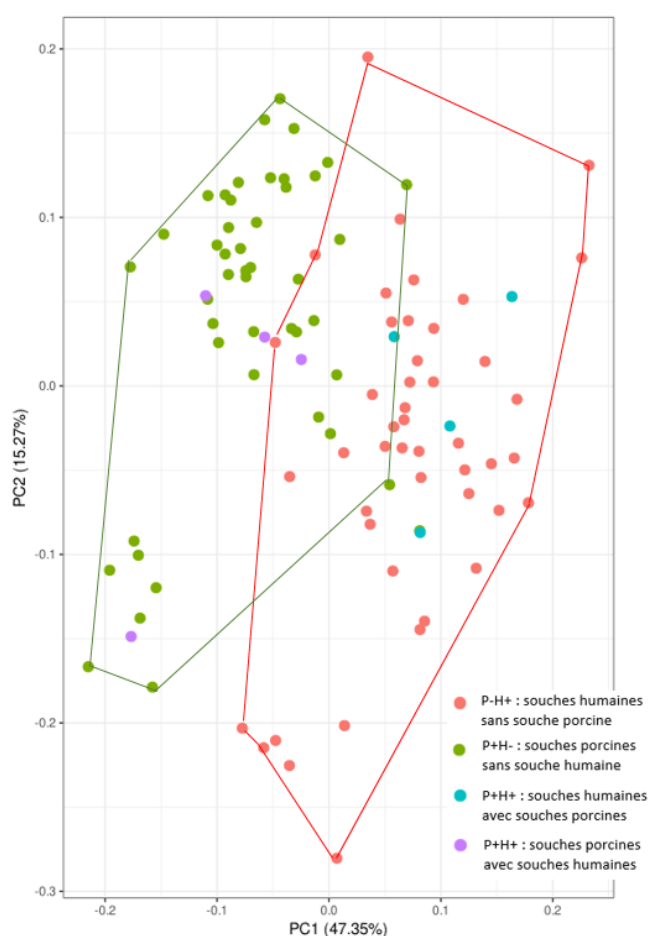


Fig. 8 : distribution des souches BT4 selon leur origine dans l'ACP

Cette séparation a été confirmée au travers des valeurs faibles obtenues par les modèles PLS-DA (tab 8).

Tab 8 : valeurs des modèles PLS-DA pour le BT4

Valeurs	3groupes	P+H-/P-H+	P-H+/P+H+	P+H-/P+H+
R2Y	0.413	0.712	0.265	0.258
Q2	0.363	0.672	-0.0954	0.049
pR2Y	0.002	0.002	0.106	0.06
pQ2	0.002	0.002	0.226	0.028

Pour les souches BT2, il n'est pas possible de séparer les 3 modalités B+H- / B+H+ / B-H+. Les trois groupes se surperposent dans l'analyse PLS-DA (fig 9). Le typage par IR ne permet pas dans ce cas de différencier les BT2 d'origine bovine des BT2 d'origine humaine.

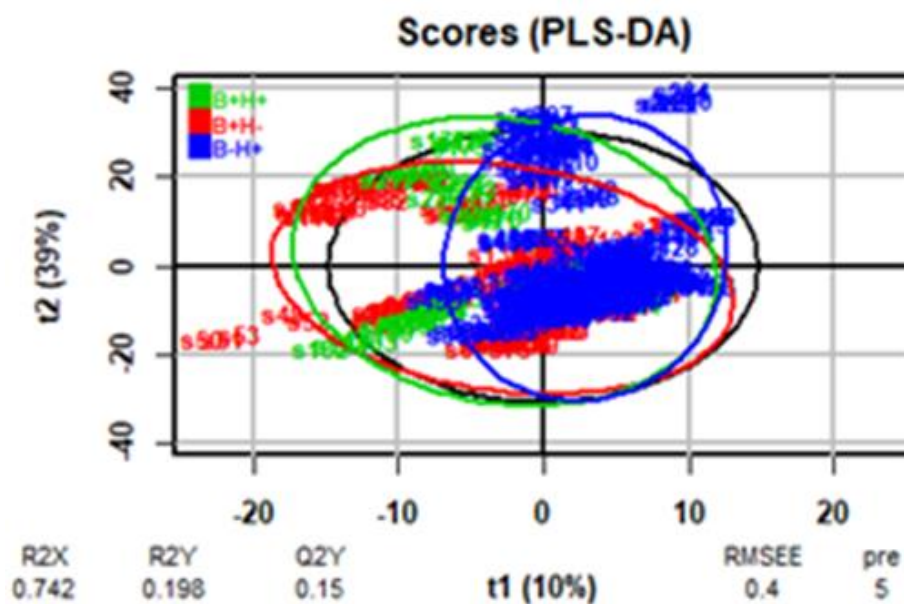


Fig. 9 : analyse PLS-DA sur les données spectrales des souches BT2

#### 4. Pouvoir discriminant et concordance de l'IR avec la cgMLST

Le pouvoir discriminant des méthodes a été évalué par le calcul de l'indice de Simpson ID. Plus cet indice est proche de 1, plus la technique est discriminante indiquant une diversité élevée au sein de la population des souches bactériennes étudiées.

L'ID est élevé pour la cgMLST, que ce soit pour les souches BT4 (79 clusters) ou les souches BT2 (82 clusters) indiquant que la diversité génétique des souches de *Y. enterocolitica* est importante (Tab 9). L'ID pour la méthode IR sur les souches BT4 est plus faible que celui de la cgMLST et significativement différent. L'ID pour la méthode IR sur les souches BT2 est similaire à celui de la cgMLST quand le COV est ajusté à 0,042 (92 clusters), et significativement différent quand le COV est par défaut à 0,099.

Tableau 9 : diversité des souches selon la méthode

BT4	méthodes	nombre de clusters	Indice de Simpson			
			ID	CI à 95%		
	Cluster cgMLST	79	0,994	0,989-0,998		
	Cluster IR cov 0,084 ajusté	45	0,968	0,954-0,982		
	Cluster IR cov 0,133 par défaut	16	0,857	0,799-0,894		
BT2	méthodes	nombre de clusters	Indice de Simpson			
			ID	CI à 95%		
			Cluster cgMLST	82	0,988	0,977-0,999
			Cluster IR cov 0,042 ajusté	92	0,998	0,996-1,000
Cluster IR cov 0,099 par défaut	21	0,782	0,717-0,868			

Nb : en rouge quand l'ID est significativement différent.

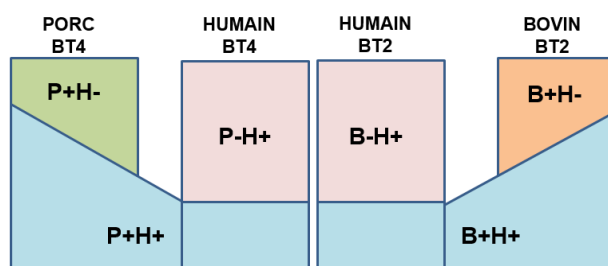
Bien que la diversité obtenue par la méthode IR peut se rapprocher de celle de la cgMLST, il ressort que la concordance entre ces deux méthodes est très faible. L'indice de Rand est de 0,010 pour le BT4, et de 0 pour le BT2. De même, l'indice de Wallace révèle que l'IR ne peut pas prédire les profils cgMLST et inversement.

Ceci indique que les deux méthodes ne peuvent pas se substituer l'une à l'autre et sont deux méthodes de typage complètement différentes.

## VI : CARACTERISATION DE MARQUEURS GENETIQUES ASSOCIES A LA CAPACITE DE MAINTIEN DES SOUCHES LORS DU PROCESS D'ABATTAGE ET A LEUR CAPACITE A INFECTER L'HOMME

L'analyse des génomes par cgMLST des *Y. enterocolitica* au sein des 2 filières animales et chez l'homme a permis d'identifier 6 populations distinctes :

- les souches de porcs qui arrivent (**P+H+**) ou non (**P+H-**) jusqu'à l'homme,
- les souches bovines qui arrivent (**B+H+**) ou non (**B+H-**) jusqu'à l'homme,
- et les souches humaines n'ayant aucun lien avec les deux filières (**P-H+** et **B-H+**).



Pour répondre sur la capacité de certaines souches porcines et bovines à traverser la chaîne alimentaire et à infecter l'Homme, et d'autres non, cette action se proposait au travers d'une analyse bioinformatique des séquences, complétée par des tests *in vitro*, d'identifier des marqueurs génétiques associés au maintien des souches lors du processus d'abattage et dans la pathogénicité pour l'homme.

Au travers de test *in vitro*, nous avons testé la capacité de 8 souches à adhérer, à survivre au froid, à résister aux biocides et à infecter l'homme pour voir si elles avaient des phénotypes différents en fonction de leur proximité génétique avec les souches humaines.

### A. Constitution des groupes de souches **P+H+**, **P+H-**, **B+H+** et **B+H-** (IP)

A partir de la comparaison des génomes par cgMLST, il a été possible de sélectionner les 8 souches en vue des tests *in vitro* (tableau 10). L'appartenance d'une souche porcine ou bovine dans un cluster cgMLST avec au moins une souche humaine est déterminée par la distance allélique (AD) ;  $\leq 5$  pour les souches de génotype 4, et  $\leq 3$  pour les souches de génotype 2/3-9b. Les souches sélectionnées ont toutes le plasmide de virulence pYV.

Tableau 10 : Caractéristiques des 8 souches sélectionnées pour les tests *in vitro*

Groupes	Souches	Génotype	Cluster mixte	pYV
<b>P+H+</b> souches porcines dans même cluster cgMLST que souches humaines	EV-C1-B4-P-016	4	481	Oui
	EV-C1-B4-P-013	4	792	Oui
<b>P+H-</b> souches porcines non clustérisées avec souches humaines	EV-C1-B4-P-005	4	/	Oui
	EV-C1-B4-P-025	4	/	Oui
<b>B+H+</b> souches bovines dans même cluster cgMLST que souches humaines	EV-C1-B2-B-017	2/3-9b	5062	Oui
	EV-C1-B2-B-045	2/3-9b	5062	Oui
<b>B+H-</b> souches bovines non clustérisées avec souches humaines	EV-C1-B2-B-030	2/3-9b	/	Oui
	EV-C1-B2-B-032	2/3-9b	/	Oui



## B. Méthodes

### 1. Suivi du maintien de *Y. enterocolitica* au froid

#### - En culture pure

Pour cet essai, les souches de *Y. enterocolitica* sont mises en culture dans 6 ml de BHI (Brain Heart Infusion, AES Laboratoire) à l'aide d'un inoculateur de 1 µl. Après 18h précises à 30°C, une série de dilution au 1/10<sup>ème</sup> est réalisée en BHI jusqu'à la 10<sup>-4</sup>. Plusieurs tubes de 2 ml de cette dilution 10<sup>-4</sup> sont placés à 4°C ± 2°C en chambre froide contrôlée.

A J0, J4, J6, et J11, un tube est prélevé en vue de réaliser le dénombrement de *Y. enterocolitica* ; c'est-à-dire les formes viables cultivables. Pour cela, une série de dilution au 1/10<sup>ème</sup> est réalisée dans du Tryptone Sel (TS), puis 100 µl des dilutions sont étalés sur PCA. Après incubation des géloses à 30°C pendant 24 heures, les colonies sont comptées à l'aide du compteur de colonies Scan 4000, Interscience, version 8.6.13.OV3.5. Les résultats sont ensuite exprimés en nombre d'UFC par ml. Cette expérience a été réalisée une fois avec dénombrement de 2 boîtes par dilution à chaque tube et jour.

#### - Sur la viande

Cet essai a été réalisé sur du jambon pour les 4 souches porcines et sur des tranches fines de steak pour les 4 souches bovines. Les tranches de jambon ont été achetées en barquette sous vide et les tranches de steak prises à la découpe chez le boucher. L'inoculum de *Y. enterocolitica* est issu de la dilution 10<sup>-2</sup> d'une culture de chaque souche réalisée en BHI pendant 18H à 30°C.

Pour une souche à tester, une tranche de jambon ou de steak est découpée le jour de l'inoculation (J0) sous hotte en plusieurs carrés de 25 cm<sup>2</sup> grâce à un emporte-pièce. Chaque carré est placé dans une boîte de pétri stérile. Puis 50 µl de l'inoculum ont été étalés sur chaque carré de 25 cm<sup>2</sup>. Il y a autant d'échantillons que de jours de suivi. Les boîtes sont ensuite placées à 4°C ± 2°C en chambre froide contrôlée pendant 10 jours.

Un dénombrement de *Y. enterocolitica* sur gélose CIN a été réalisé à J0 (jour inoculation), J1, J2, J3, J6, J8 et J10. Pour cela, le carré de viande est placé dans 20 ml de Tryptone Sel (TS) dans un sac stomafilter et broyé au smasher pendant 30 sec. Une série de dilution au 1/10<sup>ème</sup> est réalisée dans du TS, puis sont étalés 1 ml de l'échantillon sur 3 boîtes (CIN) et 100 µl de l'échantillon et des dilutions sur une boîte CIN.

Après incubation des géloses CIN à 30°C pendant 24 heures, les colonies sont comptées à l'aide du Scan 4000 (Interscience version 8.6.13.OV3.5). Les résultats sont ensuite exprimés en nombre d'UFC par cm<sup>2</sup>.

A chaque essai, un carré supplémentaire de viande a été utilisé comme témoin pour vérifier sur CIN l'absence de *Y. enterocolitica* sur la viande achetée avant inoculation. Cette expérience a été répétée 3 fois (répétitions R1, R2 et R3), et avec dénombrement de 2 boîtes par dilution à chaque tube et jour.

Le suivi a été réalisé sur 10 jours pour mimer un délai entre le moment où la viande (jambon ou steak) sort de l'usine et sa conservation dans un réfrigérateur chez un particulier tout en respectant la chaîne du froid.

Toutes les données obtenues dans les différents essais ont été analysées statistiquement avec le logiciel R version 4.1.2. La comparaison des moyennes a été faite avec le test de Kruskal-Wallis ; un résultat est considéré significativement différent si la p value est < à 0,05.

### 2. Capacité de mobilité des souches

La mobilité des souches a été mesurée par leur capacité à se mouvoir dans un milieu BHI semi-solide.

Pour ce faire, une série de dilution au 1/5<sup>ème</sup> a été réalisée à partir des cultures à 10<sup>6</sup> UFC/ml, et 20 µl de chaque dilution ont été déposés dans un puits de microplaque 12-puits remplis de BHI-semi-solide, à raison de 3 puits par dilution (figure 10).

Une série de plaques a été placée à 12°C (température d'activité en IAA) et l'autre série à 4°C (température de réfrigération). L'apparition d'halo de migration dans les puits est noté M tous les jours pendant 10 jours, la pousse uniquement au lieu de dépôt est notée D.

Chaque jour, il a été noté pour chaque puits soit l'absence de pousse (R), la présence de colonies au point de dépôt (D), ou la présence d'un halo de migration (M) afin de suivre l'évolution de cette mobilité au cours du temps.

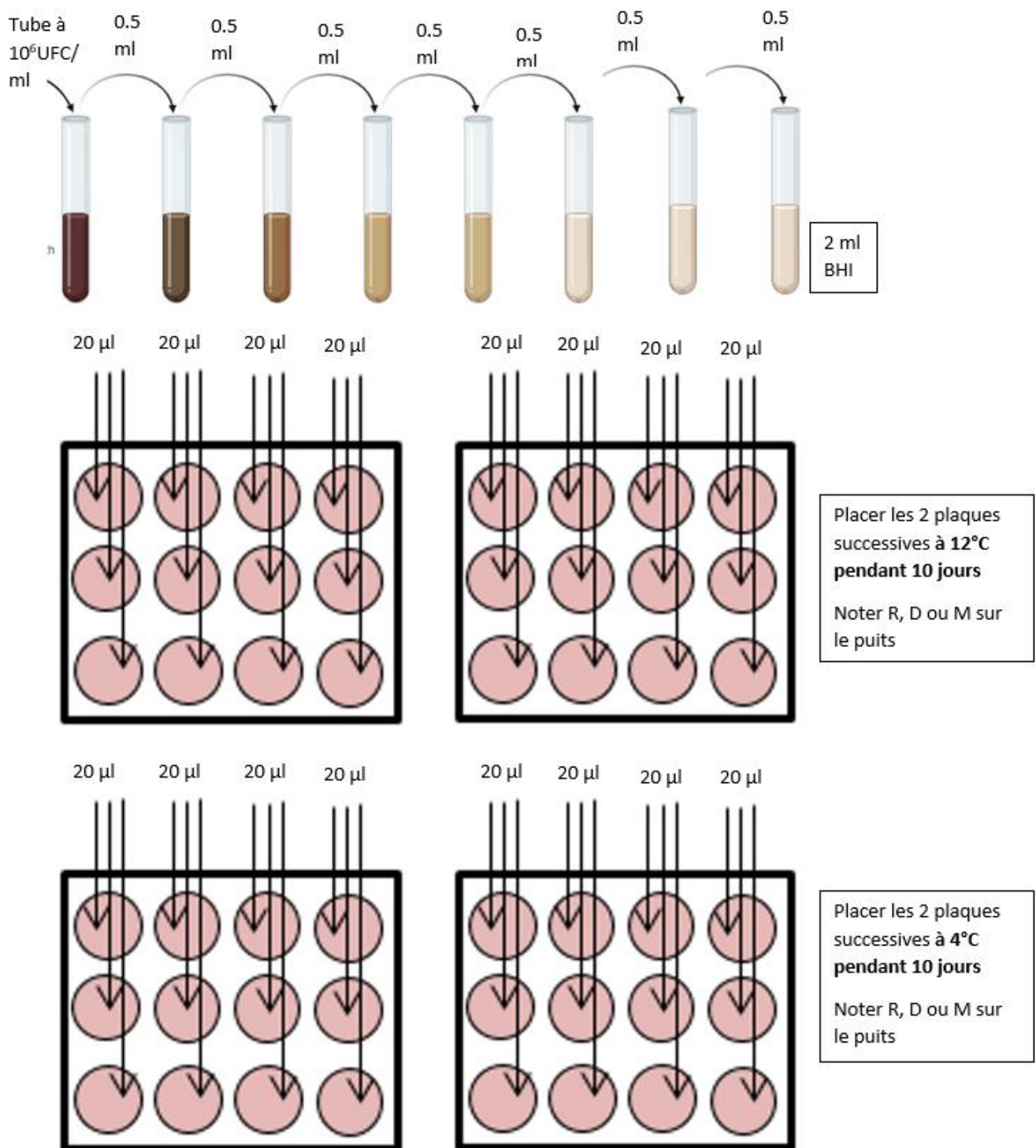


Figure 10 : mise en place de l'essai de mobilité

La mobilité d'une souche, pour une température, a été évaluée sur la base des sommes de tous les R, D et M issues des deux plaques et des 10 jours de suivis. Toutes les données obtenues dans les différents essais ont été analysées par Chi2 ; un résultat est considéré significativement différent si la p value est  $< 0,05$ .

### 3. Adhésion et de formation de biofilm sur plaque Inox

Le protocole appliqué est celui développé par l'IFIP dans le cadre du RMT CHLEAN, à l'exception de la température et de la durée de contact. Les coupons inox ont été mis en contact avec une culture de *Y. enterocolitica* à  $10^6$  UFC/ml, pendant 6 heures à  $12^\circ\text{C}$ , durée et température ambiante se rapprochant d'une activité quotidienne en abattoir et atelier de découpe. L'essai a été répété 3 fois.

La capacité d'adhésion des souches se traduit par le % de bactéries adhérentes, qui a été calculé en fonction de la surface du coupon d'inox: % de bactéries adhérentes =  $[x \text{ UFC adhérentes} / \text{coupon} \times 100] / y \text{ UFC inoculées} / \text{coupon}$ .

Toutes les données obtenues dans les différents essais ont été analysées statistiquement avec le logiciel R version 4.1.2. La comparaison des moyennes a été faite avec le test de Kruskal-Wallis ; un résultat est considéré significativement différent si la p value est  $< 0,05$ .

#### 4. Sensibilité aux biocides

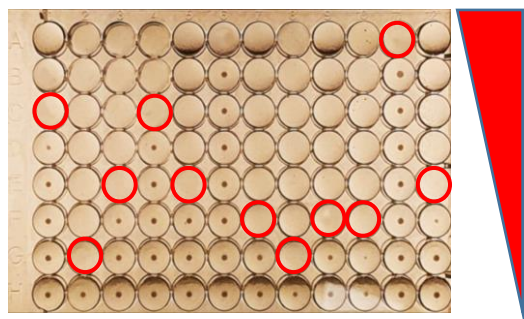
La sensibilité des 8 souches *Y. enterocolitica* a été évaluée par la détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) en microméthode vis-à-vis de 5 biocides. Les biocides sélectionnés sont des substances actives, qui appartiennent à différentes familles de composés chimiques et rentrent dans la composition de produits biocides commerciaux utilisés pour le nettoyage et désinfection en élevage. Il s'agit du Chlorure de benzalkonium (BC) et Chlorure de diméthyl didécyl ammonium (CDDA) de la famille des ammoniums quaternaires, N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine (AMPD) pour les amines, l'Acide Paracétique (AP) pour les peroxydes et l'Hypochlorite de Sodium (NaClO) pour les chlorés.

Les souches ont été ensemencées sur une gélose nutritive avec une oëse à partir du cryotube de conservation et incubées à 30°C pendant 18 h. Puis, trois à quatre colonies isolées ont été transférées dans 10 ml bouillon Trypticase Soja (BTS) puis incubées à 30°C pendant 18 h. Les suspensions bactériennes sont calibrées par densité optique dans du BTS à une concentration de  $10^5 \text{ UFC/ml}$ .

Les dilutions sérielles des biocides sont préparées extemporanément dans l'eau du réseau pour avoir des concentrations 10x suivantes :

- BC : 40 - 30 - 20 - 15 - 10 - 5  $\mu\text{g/ml}$
- CDDA : 20 - 10 - 5 - 2,5 - 1,25 et 0,625  $\mu\text{g/ml}$
- AMPD: 400 - 300 - 200 - 150 - 100 et 50  $\mu\text{g/ml}$
- AP : 10 000 – 5 000 – 2 500 – 1 250 – 625 – 312- 156 – 78 – 39 et 19  $\mu\text{g/ml}$
- NaOCl : 640 - 320 - 160 - 80 - 40 et 20  $\mu\text{g/ml}$

En absence de lignes directrices pour les biocides, la méthode de détermination de la CMI a été calquée sur celle déterminée pour les antibiotiques en suivant les recommandations du Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Les biocides (10x) sont déposés dans une microplaque 96 puits de la concentration la plus élevée (puits A) à la plus diluée (puits H) sur une colonne de 8 puits à raison de 20  $\mu\text{l}$  par puits. Les suspensions bactériennes calibrées à  $10^5 \text{ UFC/ml}$  sont déposées dans chacun des puits à raison de 180  $\mu\text{l}$  par puits (fig. 11). Des puits contrôles ne contenant pas de biocides sont réalisés pour vérifier la croissance de la souche de *Y. enterocolitica* testée. Deux essais à des jours différents avec 3 réplicats techniques par essai ont été réalisés et la médiane des valeurs de CMI a été enregistrée.



Après 48 h d'incubation à 30°C, la présence ou l'absence de trouble dans chaque puits est notée visuellement pour déterminer la valeur de CMI pour chacune des souches. La CMI correspond à la 1<sup>ère</sup> concentration pour laquelle aucune pousse bactérienne n'est notée. Les essais avec l'AMPD quant à eux ont été réalisés avec le lecteur de microplaques FluoStar (BMG labtec) car le mélange BTS – AMPD entraîne un trouble qui ne permet pas une détermination du résultat (positif ou négatif) par une lecture visuelle.

Fig. 11 : exemple de microplaque avec ou non un trouble dans les puits. Le rond rouge indique la concentration de biocide à partir de laquelle la souche est sensible et équivaut à la CMI.

## 5. Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène de *Y. enterocolitica* a été évalué *via* des tests d'adhésion-invasion réalisés sur des cellules intestinales humaines *Caco-2* (Human Colonic Carcinoma Cell Line). Le protocole suivi est celui mis en place dans l'unité par Esnault et al., (2015). La méthode est décrite en figure 12.

La mise en contact des bactéries avec les cellules *Caco-2* se fait avec une MOI de 1/100, c'est-à-dire  $2.10^7$  bactéries *Y. enterocolitica* pour  $2.10^5$  cellules *Caco-2*. Le pouvoir pathogène d'une souche est déterminé par le calcul de son pourcentage d'adhésion et de son pourcentage d'invasion. L'essai a été répété 3 fois pour chaque souche de *Y. enterocolitica*.

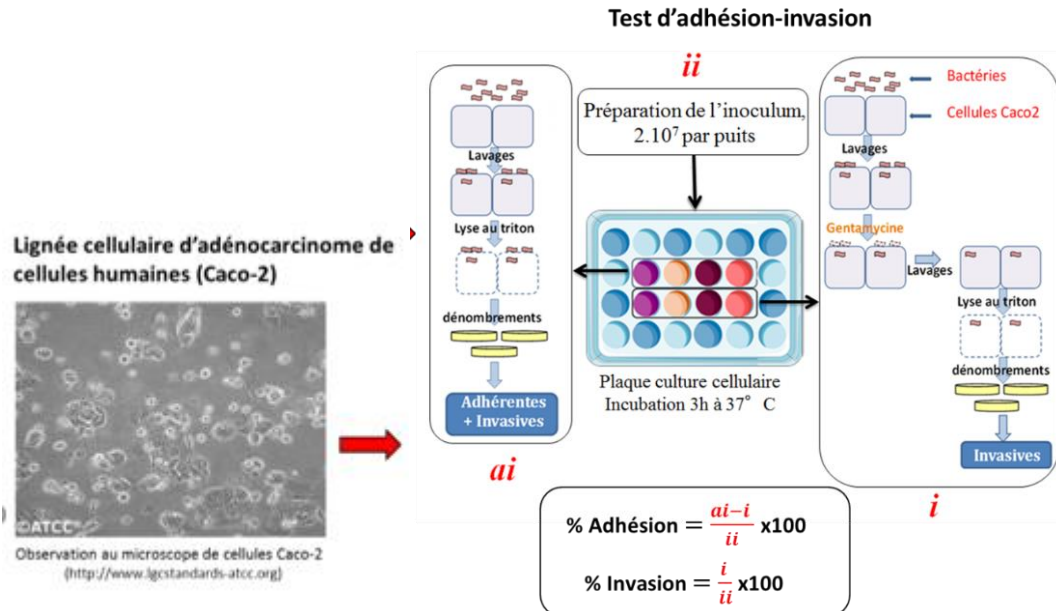


Figure 12 : protocole suivi pour l'adhésion et l'invasion de *Y. enterocolitica* sur cellules *Caco-2* (Schéma : M. Guyard)

Toutes les données obtenues dans les différents essais ont été analysées statistiquement avec le logiciel R version 4.1.2. La comparaison des moyennes a été faite avec le test de Kruskal-Wallis ; un résultat est considéré significativement différent si la p value est  $<$  à 0,05.

## C. Résultats

### 1. Maintien de *Y. enterocolitica* au froid en culture BHI

Les 8 souches de *Y. enterocolitica* mises en culture en BHI et conservées à 4°C pendant 11 jours ont révélé le même comportement (Figure 13).

Entre J0 et J11, une augmentation de +/- 4 log de la concentration des souches a été observée et un plateau est atteint à partir de J8. Une légère différence significative (p-value = 0,036) a été observée entre les biotypes BT4 (souches porcines) et BT2 (souches bovines), peut-être dû à une concentration initiale des souches porcines BT4 légèrement plus élevée ( $1,6. 10^5$  UFC/mL) comparée à la concentration des souches bovines BT2 ( $6,92.10^4$  UFC/mL) qui expliquerait également que l'amorce du plateau est déjà observée entre J6 et J8 pour les souches BT4.

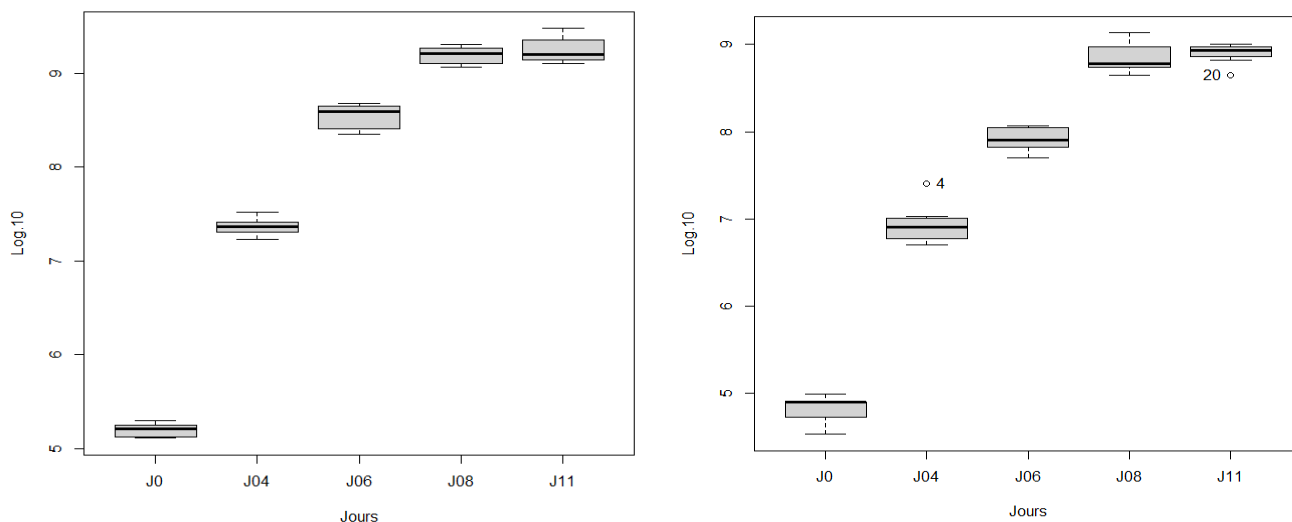
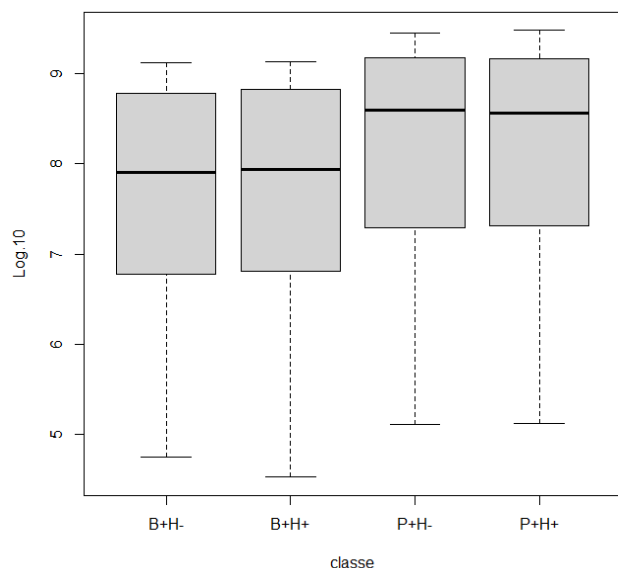


Figure 13. Survie des 4 souches porcines BT4 (à droite) et des 4 souches bovines BT2 (à gauche) en milieu BHI sur 11 jours à 4°C.



Les résultats cependant ne montrent pas de différence significative entre les souches P+H+ et P+H- (p-value = 0.956) ni entre les souches B+H+ et B+H- (p-value = 0.913) (Figure 14).

Figure 14 : distribution des souches P+H- et P+H+, et des souches B+H- et B+H+ selon leur courbe de survie en BHI à 4°C pendant 11 jours

## 2. Maintien de *Y. enterocolitica* au froid sur matrice viande

### - Maintien des souches porcines BT4 sur jambon à 4°C

Les souches porcines se multiplient de manière significative (p-value < 2.2e-16) sur le jambon de 1,5 à 2 log selon les souches entre J0 et J10 (Fig. 15).

Les 4 souches porcines se multiplient donc sur le jambon placé à 4°C. A partir de J6 et selon les souches, soit un plateau est atteint, soit une légère chute est observée.

Globalement, il n'y a pas de différence significative entre les 4 souches (p-value = 0.506).

Ainsi, il n'y a pas non plus de différence significative entre les souches porcines appartenant au même cluster cgMLST que les souches humaines (P+H+) et les souches porcines P+H- éloignées des souches humaines (p-value = 0.257) (Fig. 15)

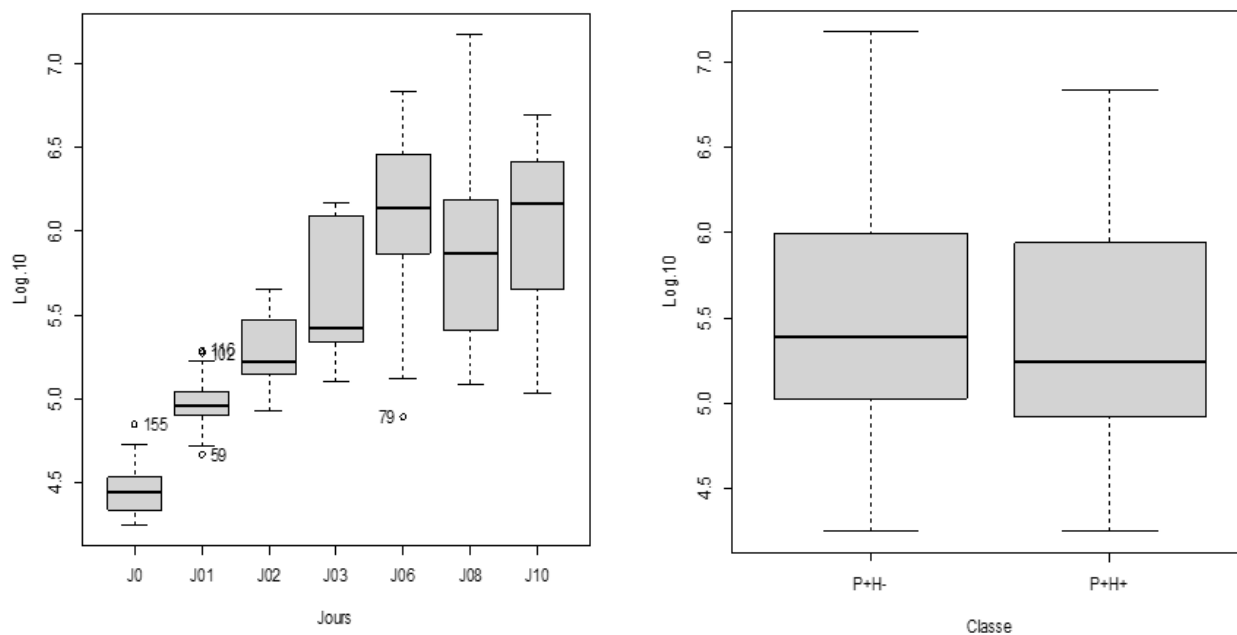


Figure 15 : Survie des 4 souches porcines BT4 sur le jambon à 4°C (à droite) et distribution des souches P+H- et P+H+ (à gauche)

- Maintien des souches bovines BT2 sur steak à 4°C

Les souches bovines se multiplient de manière significative ( $p$ -value <  $2.2e-16$ ) entre J0 et J10 à 4°C sur le steak (Fig. 16) avec une différence de 2,5 à 3 log selon les souches.

Dans l'ensemble, les souches bovines BT2 quant à elles continuent de croître sur le steak jusqu'à J10 sans atteindre de véritable plateau.

Globalement, il n'y a pas de différence significative entre les 4 souches bovines BT2 ( $p$ -value = 0.845). Ainsi, il n'y a pas non plus de différence entre les souches du groupe B+H- et celles du groupe B+H+ ( $P$ -value = 0.699) (Fig. 16).

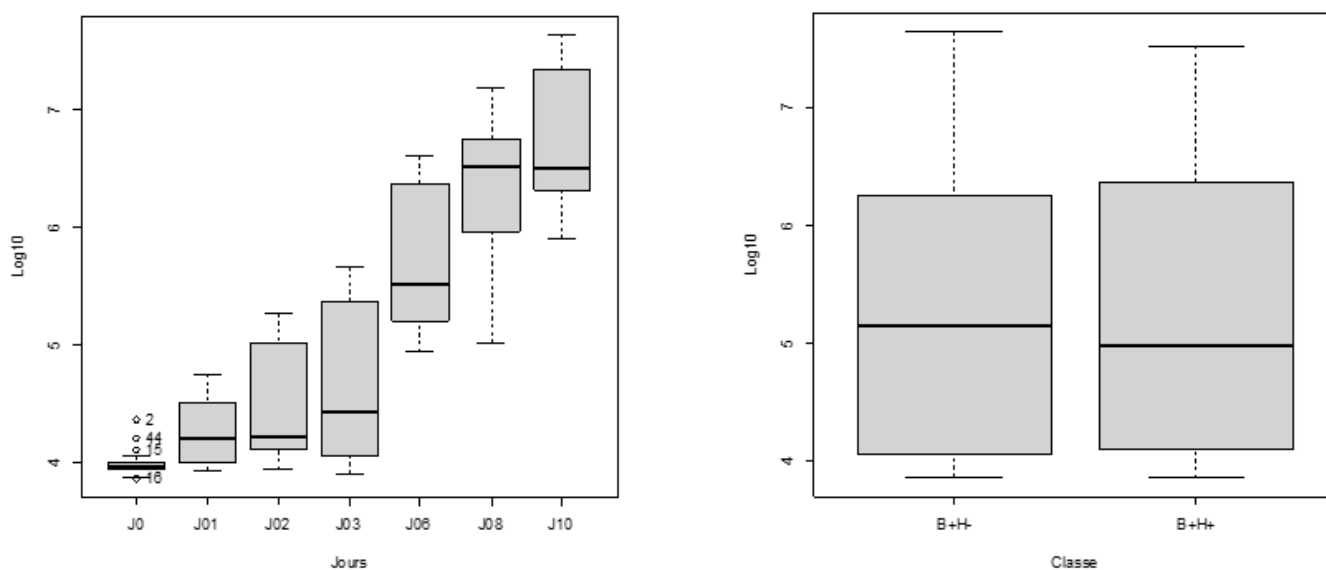


Figure 16 : Survie des 4 souches bovines BT2 sur le steak à 4°C (à droite) et distribution des souches B+H- et B+H+ (à gauche)

3. Capacité de mobilité des souches

Pour rappel, la capacité de mobilité d'une souche, pour une température, a été évaluée sur la base des sommes de tous les R (non poussé), D (pousse au dépôt) et M (halo de migration) issues des deux plaques et des 10 jours de suivi (Tab 11 et 12). L'évolution de la mobilité des souches est représentée sous forme d'histogramme sur les 10 jours de suivis (Fig.17 et 18).

Tab . 11 : nombre de D et de M à 4°C et à 12°C sur 10 jours pour les souches porcines

souche	4°C		12°C	
	D	M	D	M
P+H- (P005)	222	33	154	424
P+H- (P025)	229	42	145	402
P+H+ (P013)	156	0	143	374
P+H+ (P016)	253	2	450	113

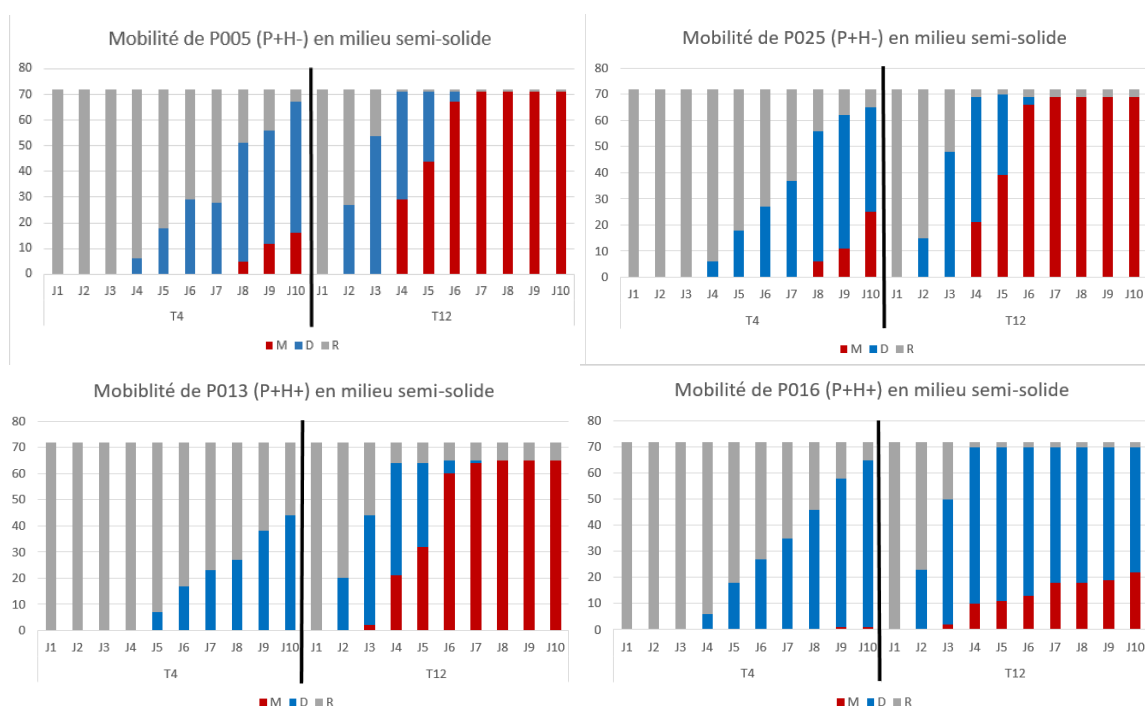


Fig. 17 : Evolution de la mobilité des souches **porcines** à 4 et 12°C sur 10 jours de suivi

A 4°C, il y a une différence significative entre les souches porcines P+H- et les souches porcines P+H+ (Chi2, p-value = 2,596E-14) (Tab.11).

A 4°C, ces dernières ne migrent pas dans le milieu semi-solide. A 12°C, une de ses souches P+H+ migre moins que les 3 autres souches (Fig 17)

Pour les souches bovines, il n'y a aucune différence significative entre les souches que ce soit à 4°C (Chi2, p = 0,124) ou à 12°C (Chi2, p = 0,0500) (Tab . 12).

Tab . 12 : nombre de D et de M à 4°C et à 12°C sur 10 jours pour les souches bovines

souche	4°C		12°C	
	D	M	D	M
B+H- (B030)	144	172	79	520
B+H- (B032)	150	121	74	450
B+H+ (B017)	159	151	59	517
B+H+ (B045)	136	129	52	493

Les souches bovines (BT2) ont significativement une plus grande capacité de mobilité que les souches (BT4), quelle que soit la température. Cette différence est plus marquée pour l'essai à 4°C (Fig. 18).

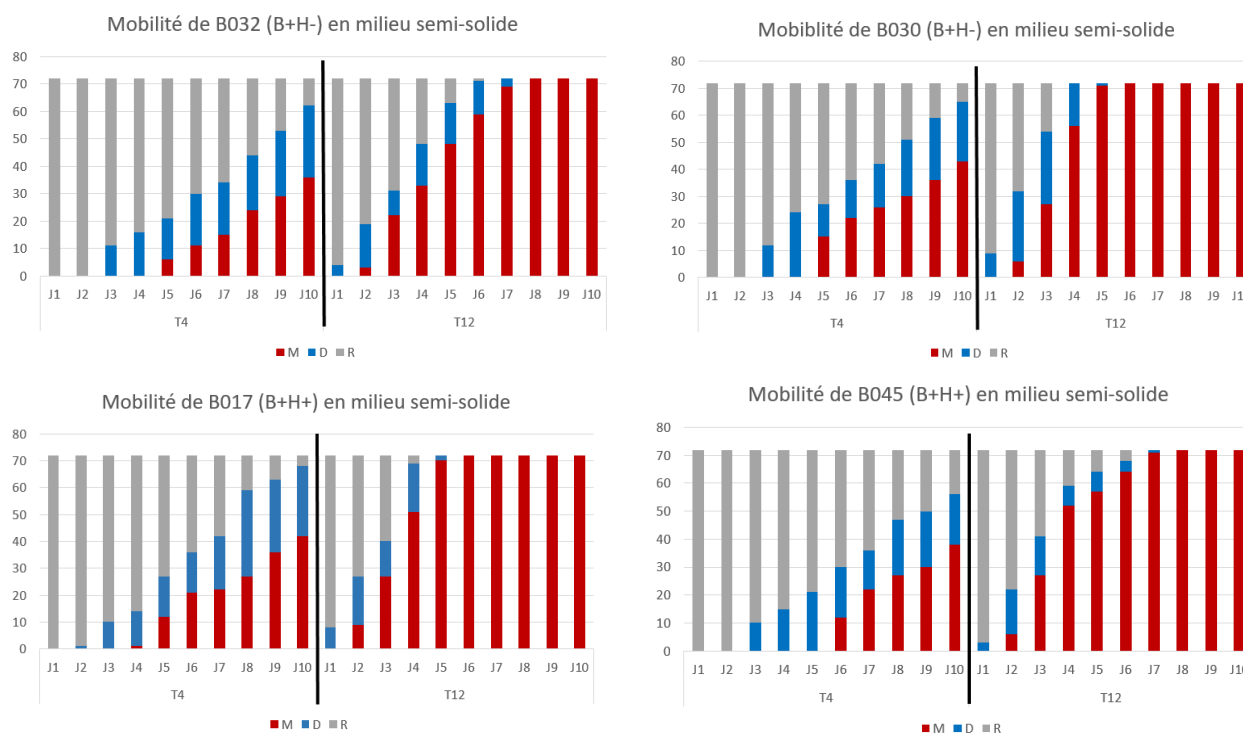
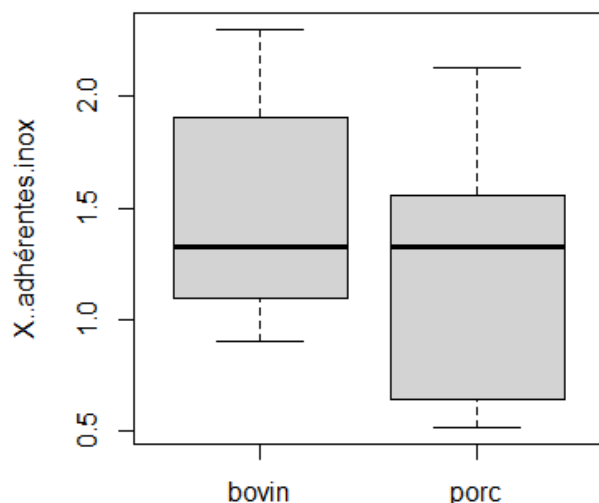


Fig. 18 : Evolution de la mobilité des souches **bovines** à 4 et 12°C sur 10 jours de suivi

#### 4. Capacité d'adhésion aux surfaces Inox

Dans nos conditions d'essai, mise en contact 6 heures à 12°C, l'ensemble des souches de *Y. enterocolitica* étaient capables d'adhérer aux surface inox, avec une capacité d'adhésion allant de 0,52% à 2,13% pour les souches porcines et de 0,90 à 2,30% pour les souches bovines (figure 19a.).



Même si les souches bovines adhèrent plus que les souches porcines, il n'y a pas de différence entre ces souches BT2 et ces souches BT4 (p-value = 0,3865)

Fig 19a : boîte de dispersion des % d'adhésion des souches bovines et des souches porcines



Il n'y a pas de différence significative pour la capacité d'adhésion au surface inox entre les souches P+H- et P+H+ (p-value = 0,423), et entre les souches B+H- et B+H+ (p-value = 0,200) (Fig. 19b).

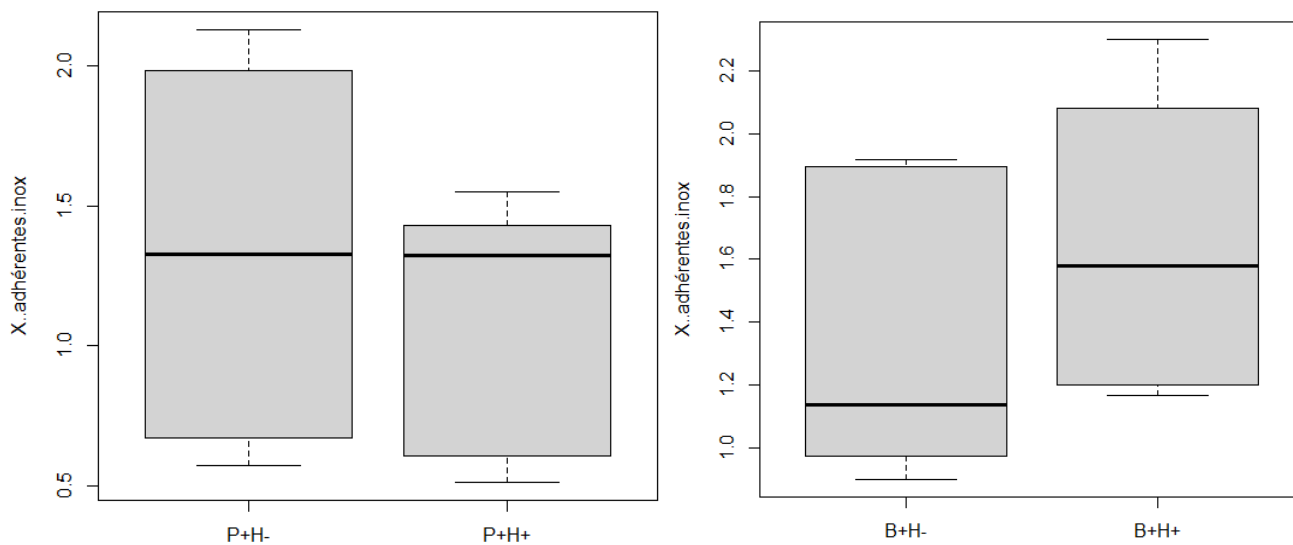


Fig. 19b : boîte de dispersion des % d'adhésion des souches bovines B+H+ et B+H- et des souches porcines P+H+ et P+H-.

### 5. Résistance aux biocides

Les médianes des valeurs de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) pour chaque biocide en fonction des souches P+H- et P+H+, et des souches B+H- et B+H+ sont représentées respectivement sous forme graphique en figure 21a et 21b, et précisées dans les tableaux joints.



21-A	BC	AMPD	AP	NaClo	CDDA
P+/H-	10	150	156	320	2,5
P+/H+	15	150	156	320	2,5
P+/H-	15	150	156	320	2,5
P+/H+	15	100	156	320	2,5

21-B	BC	AMPD	AP	NaClo	CDDA
B+/H-	15	100	156	320	2,5
B+/H-	15	100	156	320	2,5
B+/H+	15	100	156	320	2,5
B+/H+	15	100	156	320	2,5

Figure 21 : Médiane des CMI pour les souches P+H-, P+H+ (a), B+H- et B+H+ (b) pour les 5 biocides testés.

Il n'y a pas de différence des valeurs de CMI vis-à-vis de chacun des biocides testés entre les souches B+H- et B+H+, et peu de différence entre les souches P+H- et P+H+. En effet, une différence non significative ( $> 0,05$ ) est notée pour une des 2 souches P+H- qui présente une valeur de CMI de 10  $\mu\text{g BC/ml}$  contre 15  $\mu\text{g BC/ml}$  pour les 7 autres souches de *Y. enterocolitica* testées. Par ailleurs, des valeurs de CMI plus élevées sont observées pour le composé aminé (AMPD) de 150  $\mu\text{g/ml}$  pour les souches porcines (P) par rapport aux souches bovines (B).

## 6. Pouvoir pathogène

Les souches BT4 et BT2 présentent une hétérogénéité dans leur capacité d'adhésion. En effet, les souches porcines BT4 sont significativement plus adhérentes ( $p\text{-value} = 0,001$ ) aux cellules *Caco-2* que les souches bovines BT2 (Fig. 22 a). Cependant il n'y a pas de différence significative entre les deux biotypes ( $p\text{-value} = 0,599$ ) en ce qui concerne leur capacité d'invasion (Fig. 22 b).

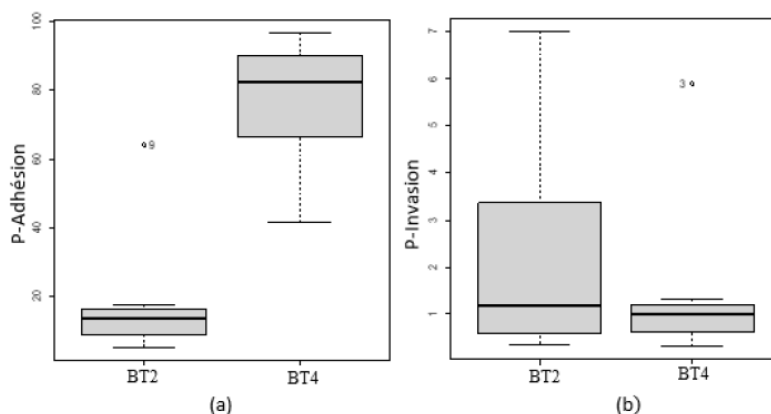


Figure 22 : (a) Pourcentage d'adhésion ( $p\text{-value} = 0,001$ ) et (b) d'invasion ( $p\text{-value} = 0,599$ ) des souches porcines BT4 et des souches bovines BT2 sur cellules *Caco-2*

Au sein du biotype 4, les souches porcines ont un pourcentage d'adhésion compris entre 65 et 90% et il n'y a pas de différence significative entre elles ( $p\text{-value} = 0,4753$ ) et un pourcentage d'invasion compris entre 0,55 et 3,60 % ( $p\text{-value} = 0,16$ ). Il n'y a pas de différence significative entre les souches **P+H+** et **P+H-**, que ce soit pour leur capacité à adhérer ou leur capacité à pénétrer les cellules *Caco-2* (test de Kruskal-Wallis,  $p = 0,772$  et  $p = 0,083$ , respectivement).

Le pourcentage d'adhésion des souches BT2 est entre 9 et 14% sauf chez l'une des souches du groupe B+H+ (B017) qui présente une capacité d'adhésion de 40% ; le pourcentage d'invasion quant à lui se situe entre 0,6 et 6,0%. Au sein de ce biotype 2, il n'y a pas de différence significative entre les souches **B+H+** et **B+H-**, que ce soit pour leur capacité à adhérer ou leur capacité à pénétrer les cellules *Caco-2* (test de Kruskal-Wallis,  $p = 0,386$  et  $p = 0,148$ , respectivement).

## 7. Caractérisation de marqueurs génétiques associés à la capacité de maintien des souches lors du processus d'abattage et à leur capacité à infecter l'homme

Les tests *in vitro* n'ont pas mis en évidence de différences significatives de phénotypes entre les souches **P+H+** et **P+H-** et les souches **B+H+** et **B+H-** pour :

- Leur maintien à 4°C en milieu BHI et sur viande,
- Leur capacité d'adhésion aux surfaces Inox à 12°C
- Leur résistance à 5 biocides
- Et leur pouvoir à infecter les cellules intestinales humaines *Caco-2*.

De fait, il est impossible de trouver des marqueurs génétiques pouvant être associés à des phénotypes différents.

Pour leur capacité à se mouvoir à 4°C et 12°C, il a été observé une différence significative entre les souches porcines P+H- et les souches porcines P+H+ lors du test de mobilité à 4°C. Les souches P+H+ ne migrent pas dans le milieu semi-solide.

D'un point de vue génétique, les souches P+H+ et P+H- sélectionnées ont des allèles différents pour trois gènes de la flagelline : *fliC*, *fliF* et *fliO*. Ces différences d'allèles pourraient être liées à la différence de phénotype entre ces souches. Cependant il s'agit de différences alléliques observées uniquement sur les souches sélectionnées pour les tests *in vitro*.

## V. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

La présence de gènes de résistance aux antibiotiques a été recherchée dans les génomes des souches de *Y. enterocolitica* de la collection C1. La recherche a été effectuée grâce à l'outil Resfinder 4.0 (Bortololaia et al., J Antimicrob Chemother, 2020).

Parmi les 239 souches étudiées, 99 sont du génotype 4 et 140 du génotype 2/3-9b.

Les gènes *blaA* et *blaB* ont été identifiés chez toutes les souches. Ce sont des gènes codant des beta-lactamases présent naturellement chez toutes les souches de *Y. enterocolitica*.

En plus de ces résistances naturelles, 23 souches ont été identifiées comme présentant des résistances inhabituelles aux antibiotiques.

Toutes les souches présentant des résistances inhabituelles aux antibiotiques sont du génotype 4. Cela concerne 15/49 souches de la collection HC1 et 8/50 souches de la collection PC1 :

Génotype 4							
Collection	Nb de souches	Gènes de résistance aux antibiotiques					
		<i>blaA</i>	<i>blaB</i>	<i>ant(3'')-Ia</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	<i>tetA</i>
HC1	49	49	49	15	10	14	3
PC1	50	50	50	8	-	4	4
Total	99	99	99	23	10	18	7

Génotype 2/3-9b							
Collection	Nb de souches	Gènes de résistance aux antibiotiques					
		<i>blaA</i>	<i>blaB</i>	<i>ant(3'')-Ia</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	<i>tetA</i>
BC1	50	50	50	-	-	-	-
CC1	37	37	37	-	-	-	-
HC1	39	39	39	-	-	-	-
OC1	13	13	13	-	-	-	-
PC1	1	1	1	-	-	-	-
Total	140	140	140	0	0	0	0

Les 23 souches présentent le gène *ant(3'')-Ia* associé à la résistance à la streptomycine. Parmi ces 23 souches, 10 d'entre elles présentent aussi le gène *catA1* (résistance au chloramphénicol), 18 le gène *sul1* (résistance aux sulfamides) et 7 le gène *tetA* (résistance à la tétracycline). Alors que 5 souches ne présentent que le seul gène *ant(3'')-Ia*, les 18 autres ont 2 ou 3 gènes de résistance inhabituelle aux antibiotiques.

Parmi les résistances prédites avec l'outil Resfinder4, seule la résistance à la tétracycline est évaluée par antibiogramme au CNR. Parmi les souches cliniques reçues au CNR en 2022, aucune souche de génotype 2/3-9b et seules 1% des souches de génotype 4 sont résistantes à la tétracycline. Le pourcentage de souches résistantes à la tétracycline reçues au CNR en 2022 est donc plus faible que dans la collection C1 de l'étude EVANHOTY.

Les résistances à la streptomycine et chloramphénicol ne sont pas testées au CNR car ces antibiotiques ne sont pas recommandés pour le traitement des yersiniooses entériques. Le traitement recommandé est le cotrimoxazole (association sulfamides/triméthoprime). Au CNR, toutes les souches pathogènes reçues en 2022 ont été identifiées comme sensibles à cette association. Ici, seul le gène *sul1* a été identifié parmi 18 souches. Sa seule présence ne suffit pas à rendre une souche résistante au cotrimoxazole.

La recherche de plasmide pouvant héberger ces gènes de résistance a été effectuée dans les 23 génomes grâce à l'outil mob-suite (Robertson et al., Microb Genom, 2018). Le plasmide de virulence, présent chez toutes les souches pathogènes, a été identifié chez 15/23 souches. Ce plasmide est facilement perdu pendant les subcultures au laboratoire, ce qui explique son absence chez 8 souches. En revanche, un plasmide de 23 kb portant 3 gènes de résistance aux antibiotiques (*ant(3'')-Ia*, *sul1* et *tetA*) a été identifié chez une souche. Ce plasmide a été identifié chez *E. coli* mais aussi chez *Shigella*, *Salmonella* ou encore *Klebsiella*, suggérant une circulation parmi les entérobactéries.

## VI. CONCLUSION GENERALE

Ce projet a permis de faire un état des lieux du portage de *Y. enterocolitica* par les porcs et les bovins, d'évaluer l'implication de ces deux filières dans les yersiniozes humaines ainsi que la capacité des souches à traverser la chaîne alimentaire.

Les deux enquêtes menées à l'abattoir ont permis d'actualiser les données de prévalence en filière porcine et de mettre à jour des données de prévalence pour la filière bovine, données non existantes en France pour cette filière.

Ainsi, pour la filière porcine, sur les 303 porcs prélevés, la prévalence inter-lots de *Y. enterocolitica* pathogènes s'élevait à 14,7 % [8,0%-25,7%], et la prévalence individuelle de *Y. enterocolitica* pathogènes à 4,9 % [3,0%-8,0%]. Même si cette prévalence au cours de ce projet est plus faible que celles préalablement observées dans deux précédentes enquêtes conduites par l'IFIP et l'Anses (Feurer et al., 2012 ; Fondrevez et al., 2014), cette enquête confirme que les porcs en France sont porteurs et excréteurs de *Y. enterocolitica* pathogène pour l'homme.

Pour la filière bovine, aucune souche de *Y. enterocolitica* pathogène ou non n'a été isolée, indiquant que sur l'échantillonnage de 430 bovins, la prévalence est de 0%. Il était attendu d'avoir des souches de BT2 car le CNR a dans sa collection des souches de BT2 isolées de bovins/ovins/caprins (Le Guern et al. 2016), et ce biotype est retrouvé dans 25,2% des cas humains en France. Deux études anglaises indiquent une prévalence en *Y. enterocolitica* de 6,3 et 4,5% sur matière fécale (McNally et al, 2004 ; Milnes et al, 2008), et une étude allemande donne une prévalence de 1,6% (Schmid et al, 2013). Des études basées sur la séroprévalence ont mis en évidence la détection d'anticorps anti-*Yersinia* sur 66% de bovins lors d'une étude en Allemagne (Bartling et al, 2004) et pour O:9 sur 26% de bovins en Belgique (Weynants et al, 1996). Ces études indiquent que la présence de la bactérie est faible dans les matrices fécales et ne traduit pas forcément le réel portage de bactérie par les bovins. Pour préciser notre étude, il serait intéressant 1) de tester des écouvillonnage d'amygdale de bovin comme prélèvement, car la bactérie a un tropisme amygdalien du moins chez le porc, et 2) de réaliser des sérologies pour la détection d'anticorps anti-*Yersinia* ce qui pourrait permettre de savoir si les bovins ont été en contact avec la bactérie sans pour autant l'excréter dans les fèces.

Le génotypage des souches de *Y. enterocolitica* BT4 et BT2, après séquençage et analyse cg-MLST des génomes, a classé les souches en 4 génotypes. Toutes les souches de BT4 sont de génotype 4 alors que les souches de BT2 sont majoritairement du génotype 2/3-9b (90,9 %), puis 2/3-9a (7,8 %) et 2/3-5a (1,3 %).

L'étude de la proximité génétique des souches par cgMLST *Y. enterocolitica* (1727 gènes) suivie du calcul des distances alléliques a montré pour les génotypes 4 et 2/3-9b que les souches d'origine humaine et animale font partie d'une même population qui circule entre les animaux et les humains.

L'implication du porc et des bovins dans les yersiniozes humaines a été confirmée par les analyses de clustérisation des souches avec un seuil  $\leq 5$  AD pour les souches de génotype 4 et  $\leq 3$  AD pour les souches de génotype 2/3-9b. Pour ces 2 génotypes, la présence de clusters mixtes composés de souches humaines et animales confirme que les souches responsables de yersiniozes humaines peuvent être très proches génétiquement de souches isolées chez les porcs ou chez les bovins. Ces résultats confirment bien l'implication des filières porcines et bovines dans les infections humaines.

Enfin, la comparaison des souches isolées en 2022 et il y a plus de 10 ans a montré la persistance de souches de génotype 4 responsables d'infections humaines dans leur réservoir porcin pendant 10 ans. La persistance des souches de génotype 2/3-9b dans le réservoir bovin n'a pas pu être démontrée car l'étude de prévalence chez les bovins n'a pas permis d'isoler de souches en 2022. Cependant la présence de 2 clusters mixtes (bovin/humain) a montré une persistance des sources d'infections humaines pendant au moins 28 ans.

Le typage des souches par l'IR biotyper a mis en évidence une grande diversité des profils IR entre les souches de BT4 et les souches de BT2, qu'elles soient d'origine animale et humaine. L'utilisation de cet outil pour évaluer l'implication des souches animales dans les infections humaines pose question, du fait que le choix du cut-off a une très grande influence sur la génération des clusters et le regroupement des souches au sein de ces clusters. Cet outil est à considérer comme un nouvel outil de typage simple et facile à mettre en place en terme technique mais en termes d'analyse des données, il nécessite une maîtrise du logiciel et d'avoir du recul pour l'interprétation des résultats.

De fait, il n'est pas standardisable a priori. Du moins, cela nécessitera la mise en place d'essai interlaboratoire pour évaluer la performance des labos à obtenir et analyser ce type de données.

Il convient de poursuivre nos investigations sur cet outil avant de le proposer aux acteurs des filières animales comme outil typage simple, facile et peu coûteux, pour tracer les bactéries au sein des différents maillons de la chaîne. Cela nécessitera d'avoir des suivis en élevages ou en IAA, et de tracer la circulation de *Y. enterocolitica* au sein de ces maillons avec l'IR biotyper, et de comparer les résultats avec ceux de la cgMLST, comme outil de référence.

Pour que les souches de *Y. enterocolitica* puissent infecter l'homme, elles doivent être en capacité de traverser toute la chaîne alimentaire, c'est-à-dire capable de résister à différents stress comme les biocides appliqués en élevage et en IAA, survivre aux températures de réfrigération (4°C) ou d'activité en IAA (12°C), se maintenir sur les aliments et être pathogène pour l'homme.

En effet, pour contrôler la contamination bactérienne dans les secteurs médical, vétérinaire, agro-alimentaire, industriel, domestique et en collectivité, des produits d'hygiène sont appliqués aux doses d'emploi en respectant les préconisations des fournisseurs pour éliminer ou détruire les bactéries indésirables. Cependant, ces bactéries présentes le plus souvent sous forme de communautés au sein d'une matrice extra-cellulaire tridimensionnelle, appelée biofilm, peuvent être exposées à des concentrations plus faibles de biocides que les doses d'emploi (Capita et al. 2019). Leur capacité d'adaptation à ce stress chimique au niveau des différents micro-environnements du biofilm peut avoir un impact sur la modification de leur sensibilité vis-à-vis de produits antimicrobiens (antibiotiques et biocides) (Molina-Gonzalez et al. 2014). C'est pourquoi, des tests ont été réalisés pour identifier d'éventuelles différences de sensibilité à des substances actives biocides largement rencontrées dans les produits commerciaux biocides. Cette sensibilité a été évaluée par la détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) selon une méthode de dilution en milieu liquide. Globalement, dans nos conditions expérimentales, nos résultats montrent aucune différence significative de sensibilité entre les souches de *Y. enterocolitica* bovines et porcines vis-à-vis des substances actives biocides testées, à l'exception de l'amine pour lesquelles les souches porcines sont moins sensibles. De même, il n'a pas été observée de différences entre les souches P+H+ et P+H- et les souches B+H+ et B+H-. Ces observations suggèrent que soit les souches n'ont pas été exposées au cours de leur existence à des biocides ou soit qu'elles ne présentent pas de capacité distinctive d'adaptation.

Il existe très peu de publications scientifiques sur la sensibilité de *Y. enterocolitica* vis-à-vis des biocides désinfectants. La valeur médiane de CMI pour le BC de 15 µg/ml (ou ppm) est comparable à celle trouvée (20µg/ml) dans les travaux de Capita et al (2019). Par contre, les valeurs de CMI pour les oxydants (2500 µg/ml NaClO et 1275 µg/ml AP) sont 10 fois plus fortes que celles enregistrées dans notre étude. Les protocoles des méthodes d'évaluation de la sensibilité étant quasi-identiques, ils ne peuvent expliquer les différences observées. Les produits oxydants étant sensibles à la dégradation, de mauvaises conditions de stockage (température trop élevée, à la lumière, à une concentration trop élevée) pourraient conduire à une diminution de la concentration active ce qui nécessiterait alors d'appliquer une concentration plus élevée pour être efficace.

Des valeurs de CMI plus faibles sont reportées dans d'autres études avec les composés d'Ammoniums Quaternaires (AQ représentés par le BC ou le CDDA) pour *Escherichia coli* (1.5 à 4 µg AQ/ml) (Soumet al. 2012, 2016) et *Salmonella* (4-8 µg BC/ml) (Soumet et al. 2016) mais aussi avec l'AP vis-à-vis d'autres espèces bactériennes comme *Listeria monocytogenes* (156 à 625 µg/ml) (Guérin et al. 2021). Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par le fait que toutes les espèces bactériennes n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis de ces biocides.

La nature psychrotrophe de *Y. enterocolitica* a été confirmée par nos tests de maintien à 4°C en milieu riche BHI et sur matrice viande. Toutes les souches ont montré leur capacité à survivre au froid mais également à se multiplier, indiquant que *Y. enterocolitica* continue à croître sur des matrices alimentaires en condition de réfrigération. Nos résultats confortent les résultats préalablement obtenus sur d'autres souches de *Y. enterocolitica* (Esnault et al., 2017). Aucune différence significative entre les souches porcines et bovines appartenant au même cluster cgMLST que les souches humaines (P+H+ et B+H+) et celles qui n'y appartiennent pas (P+H- et B+H-) n'a été observée. Cela permet de conclure que la capacité de survie des souches de *Y. enterocolitica* au froid n'est pas un caractère propre aux souches capables d'infecter l'Homme. Ce test a été réalisé avec un inoculum de 10<sup>4</sup> UFC/cm<sup>2</sup>. Dans l'étude de Van Damme *et al.* (2015), la concentration des *Y. enterocolitica* sur carcasses de porcs est très faible < à 20 UFC/100cm<sup>2</sup>, soit 0,2 UFC/cm<sup>2</sup>. Il est possible qu'à cette concentration sur notre jambon ou sur notre steak, nous n'aurions pas pu observer une telle croissance de *Y. enterocolitica* à 4°C sur cette matrice. Pour mesurer le risque pour le consommateur, il serait intéressant de se rapprocher des concentrations réelles pour voir si les bactéries sont toujours détectées après plusieurs jours à 4°C.

Néanmoins, le caractère psychrotrophe de *Y. enterocolitica* permet à la bactérie de se maintenir le long de la chaîne alimentaire et potentiellement d'atteindre l'Homme. Cela reste donc un problème en industrie agroalimentaire et chez les consommateurs où la réfrigération est un moyen de lutte contre les micro-organismes.

Le test d'adhésion sur inox à 12°C a démontré que les souches de *Y. enterocolitica* sont capables d'adhérer au surface inox, avec des pourcentages de bactéries adhérentes similaires à ce qui a déjà été observé pour cette bactérie pour l'inox (1,5%, Allan et al., 2004). Même si ce pourcentage d'adhésion sur inox est plus élevé chez les souches bovines,

il n'y a pas de différence entre les biotypes. De même, toutes les souches qu'elles soient ou non dans les mêmes clusters cgMLST que les souches humaines ont toutes la même capacité à adhérer au surface inox en conditions de température d'activité en IAA. Ainsi, il est indispensable que les procédures de nettoyage et de désinfection en élevage et en IAA soient efficaces pour décrocher les *Y. enterocolitica* ayant adhéré aux surfaces. Ioannidis et al., (2014) décrit le gène *waaE*, gène reconnu pour être impliqué dans la formation de biofilm chez *Y. enterocolitica*. Une recherche de la présence du gène *waaE* dans le génome des 8 souches sélectionnées pour le test d'adhésion a montré que celui-ci est absent de toutes les souches.

Au processus d'adhésion au surface s'ajoute la mobilité des bactéries qui de manière générale se fait au moyen des flagelles et qui est indispensable pour la formation de biofilm. La mobilité flagellaire est également impliquée dans le recrutement de bactéries planctoniques par le biofilm en développement et permet l'expansion du biofilm sur la surface colonisée (Houry, 2009). A 4°C, il y a une différence significative entre les souches porcines P+H- et les souches porcines P+H+ sélectionnées ; ces dernières proches génétiquement de souches humaines ne migrent pas dans le milieu semi-solide. Ce phénomène n'est pas observé à 12°C. Ceci sous-entend que ces souches capables d'infecter l'homme ne sont plus mobiles en condition de réfrigération. Nos tests montrent que ces souches P+H+ retrouvent leur mobilité à 12°C, favorisant le processus de formation de biofilm. Il a été observé une différence d'allèles pour 3 gènes de la flagelline (*fliC*, *fliF* et *fliO*) entre les souches P+H+ et P+H- sélectionnées, il serait intéressant de tester un plus grand nombre de souches porcines P+H- et P+H+ pour conforter ce résultat.

Houry (2009) explique que la mobilité flagellaire est également impliquée dans le pouvoir pathogène des bactéries et favorise l'adhésion des bactéries sur des cellules épithéliales de type HeLa. Or, il est reconnu que les *Y. enterocolitica* sont mobiles par des flagelles péritriches lorsque cette bactérie est cultivée en dessous de 30°C mais immobiles à 37°C. C'est cette température qui a été appliquée pour le test de virulence sur cellules *Caco-2*. Ceci indique que *Y. enterocolitica* met en place un panel de processus pour adhérer et infecter ces cellules.

Les tests de virulence sur cellules *Caco-2* confirment que les souches de biotype 4 ont une plus grande capacité d'adhésion que les souches de biotype 2 tel que préalablement observé (Esnault et al., 2015). Aucune différence significative n'a cependant été observée entre les souches P+H+ et P+H- et les souches B+H+ et B+H-, que ce soit pour le % d'adhésion et le % d'invasion.

Ceci sous-entend que toutes ces souches sont capables d'infecter l'homme, et que les souches P+H- et B+H- testées n'ont peut-être pas été impliquées dans des infections humaines à ce jour ou identifiées comme telles au regard du nombre de souches séquencées dans ce projet (100 BT4 humaines et 100 BT2 humaines) par rapport au nombre total de souches humaines reçues par le CNR par an.

La recherche de gènes de résistances aux antibiotiques par une méthode *in silico* avec l'outil Resfinder4 (Bortololaia et al., 2020) a permis de confirmer que les souches de *Y. enterocolitica* hébergent naturellement deux gènes codant des  $\beta$ -lactamases. Le gène *blaA* codant une pénicillinase exprimée constitutivement et le gène *blaB* codant une céphalosporinase dont l'expression inductible est associée à différents niveaux de résistance aux céphalosporines de première et deuxième génération (Singhal et al., 2020). A ces résistances naturelles se sont ajoutées chez 23 souches sur les 239 de la collection C1, des gènes de résistances à la streptomycine, sulfamides, chloramphénicol et tétracycline. Environ 10% des souches de cette collection, uniquement du génotype 4, présentent donc des résistances acquises aux antibiotiques à la fois chez des souches humaines et animales.

Parmi elles, l'outil mob-suite (Robertson et al., 2018) a permis d'identifier chez une seule souche, 1 plasmide de 23 kb comme le support de l'information génétique de ces résistances. Il est possible que ce plasmide ou d'autres soient présents parmi les 23 souches mais qu'ils n'ont pas été identifiés par l'outil mob-suite en raison de la fragmentation du génome avec la technologie Illumina. Un séquençage avec la technologie long-reads (Oxford Nanopore Technologies par exemple) permettrait d'identifier de manière plus sûre la présence de plasmides dans ces génomes ou alors l'intégration des gènes de résistance au chromosome (Sanderson et al., 2023).

La présence des gènes de résistance à la streptomycine, chloramphénicol et tétracycline ne représente pas un problème de santé publique car ces antibiotiques ne sont pas recommandés dans le traitement des yersiniose entériques. En revanche, même si le gène *sulI* (résistance aux sulfamides) a été identifié chez 18 souches, sa présence ne permet pas de conférer une résistance au cotrimoxazole (sulfamides-triméthoprime), le traitement recommandé pour les yersiniose entériques (Mohd-Zain et al., 2013).

Cela montre que les *Y. enterocolitica* peuvent acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques et qu'une résistance au cotrimoxazole pourrait émerger par l'acquisition d'un gène *dhfr* (résistance au triméthoprime) chez une souche ayant déjà acquis le gène *sulI*. Cela alerte aussi sur la possibilité des *Y. enterocolitica* d'héberger des plasmides de résistances aux antibiotiques et de les transmettre à d'autres bactéries à la faveur de leur passage dans l'intestin d'un animal ou d'un humain.

La surveillance de la résistance aux antibiotiques chez les souches de *Y. enterocolitica* isolées des humains et dans les filières animales est donc primordiale afin de surveiller une éventuelle émergence posant un problème de santé publique.

En conclusion, ce projet a démontré :

- Que la filière porcine est toujours un réservoir de *Y. enterocolitica* de BT4,
- Que la filière bovine ne semble pas porter la bactérie dans son tractus digestif ; la matrice fèces n'est peut-être pas la meilleure matrice pour détecter les souches de *Y. enterocolitica* de BT2 pour cette filière,
- Que la filière porcine et la filière bovine sont impliquées dans des cas d'infections humaines à biotype 4 et biotype 2, respectivement, au travers de la comparaison génétique des génomes,
- Que les souches de *Y. enterocolitica* ont la capacité à survivre et se maintenir le long de la chaîne alimentaire, et à infecter l'homme.
- Qu'une résistance inhabituelle de 10% des souches de la collection C1 aux antibiotiques (streptomycine, chloramphénicol, sulfamides et tétracycline) a été observée. Cette résistance ne concerne que les souches de génotype 4. La présence de ces gènes de résistance aux antibiotiques a été associée à l'acquisition d'un seul plasmide exogène pour une souche.

Ainsi, il est donc important de poursuivre la surveillance *Y. enterocolitica* à tous les maillons de la chaîne, de l'animal jusqu'à l'homme.

## VII. COORDINATION DU PROJET ET VALORISATION DES DONNEES

### A. Coordination :

Sur la durée du projet, il a été mis en place 5 réunions

- Le 05 octobre 2021 pour initier le projet, à l'Anses
- Le 21 novembre 2022, à l'IFIP
- Le 21 mars 2023, à l'Idèle,
- Le 21 novembre 2023, à l'IP
- Et le 26 mars 2024 pour la finalisation du projet, à l'IP

### B. Valorisation :

Une partie des résultats a été valorisée lors de congrès sous forme de communications affichées. Certaines ont permis de diffuser les résultats aux acteurs de la filière porcine (un poster aux JRP) et de la filière bovine (2 posters aux 3R) en France.

Denis M, Houard E., Larivière-Gauthier G., Wilhelm A., Gassilloud B., Feurer C., Pizarro-Cerda J., Savin C., Le Guern A-S (2023) Does infrared spectroscopy allow the identification of *Yersinia enterocolitica* BT4 strains of porcine origin responsible for human's infection? Safepork, 15-17 may, New Orleans, USA

Denis M., Houard E., Larivière-Gauthier G., Wilhelm A., Gassilloud B., Feurer C., Pizarro-Cerda J., Savin C., Le Guern A-S (2023) Identification par spectroscopie infrarouge des souches de *Yersinia enterocolitica* BT4 d'origine porcine responsables d'infections humaines. Microbes, 18<sup>ème</sup> congrès national de la SFM, 4-6 Octobre, Rennes, France

Denis M., Houard E., Ouedraogo A., Le Berre L., Feurer C., Pizarro-Cerda J., Savin C., Le Guern A-S (2024) Survie au froid et pathogénicité des souches de *Yersinia enterocolitica* BT4 isolées chez le porc et génétiquement proches ou non de souches isolées chez l'homme. Journées de la Recherche Porcine, 6-7 Février 2024, Saint-Malo, France

Denis M., Le Guern A-S, Houard E., Savin C., Ouedraogo A., Legrandois P., Le Berre L., Soumet C., Pizarro-Cerda J., Bièche C. (2024) Capacité des souches de *Yersinia enterocolitica* BT2 d'origine bovines à traverser la chaîne et à infecter l'homme. 3R-Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, 4 et 5 décembre 2024, Paris (résumé soumis pour un poster)

Bieche-Terrier C., Coadou T., Lamour B., Feurer C., Le Guern A.S., Denis M. (2024) Prévalence de *Yersinia enterocolitica* dans les fèces de bovins prélevés à l'abattoir. 3R-Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, 4 et 5 décembre 2024, Paris (résumé soumis pour un poster)

Les posters (résumé/texte/affiche) figurent en annexe.

Deux publications sont en cours de rédaction pour soumission à des revues scientifiques avec comité de lecture :

- Une intégrant les deux enquêtes terrains et comparaison des génomes
- Une intégrant les tests phénotypiques

### C. Partage des données

Les données portant sur les caractéristiques épidémiologiques, phénotypiques, d'Infra-Rouge et génétiques des 400 souches de *Y. enterocolitica* étudiées dans ce projet ont été intégrées dans une base de données commune accessible par tous les partenaires.

Les transferts de souches et de séquences entre les partenaires ont fait l'objet d'un accord de transfert (MTA).

### Remerciements :

L'Anses, le CNR, l'IFIP et l'Idèle, remercient FranceAgrimer pour le financement de ce projet.



## Références EVANHOTY :

---

- Alonso-Hernando, A., et al. (2009) . Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* 20(12), 1108–1111 (2009).
- Bucher, M., et al. (2008). 'Epidemiological data on pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Southern Germany during 2000-2006', *Foodborne Pathog Dis*, 5: 273-80.
- Bancerz-Kisiel, A., et al. (2016). Detection and characterisation of *Yersinia enterocolitica* strains in cold-stored carcasses of large game animals in Poland. *Vet J*, 208: 102-3.
- Bancerz-Kisiel, A., et al. (2018) The Most Important Virulence Markers of *Yersinia enterocolitica* and Their Role during Infection. *Genes-Basel*. 2018;**9**(5).
- Bartling, C., et al., (2004) The prevalence of *Yersinia*-specific antibodies in cattle in Bavaria]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2004 Nov-Dec;117(11-12):499-507.
- Bortolaia V, et al. (2020) ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 1;75(12):3491-3500. doi: 10.1093/jac/dkaa345.
- Bonardi, S. et al., (2018) Detection, virulence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* in bulk tank milk in Italy. *Int Dairy J*. 2018;84:46-53.
- Capita, R., et al., (2019). Effect of low doses of biocides on the antimicrobial resistance and the biofilms of *Cronobacter sakazakii* and *Yersinia enterocolitica*. *Sci Rep*, 9(1), 15905. doi:10.1038/s41598-019-51907-1
- Dinkelacker A., et al., (2018) Typing and Species Identification of Clinical *Klebsiella* Isolates by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. clin. Microbiol*. 25; 56(11). doi: 10.1128/JCM.00843-18
- EFSA, ECDC. (2022). 'The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2021. *EFSA Journal*.
- Esnault, E., et al. (2015) Porcine and human intestinal cells for profiling the capacity of colonization and infection of the foodborne pathogen *Yersinia enterocolitica*. *Proceeding Safepork*, Porto, Portugal, 7-10 September 2015, pp 99-102
- Esnault, E., et al. (2017). Diversité des souches de *Yersinia enterocolitica* présentes chez le porc et risques sanitaires associées. *Rapport d'étude FranceAgrimer*.
- Feurer C. et al. (2012) *Yersinia enterocolitica* : fréquence de contamination des amygdales, feces et carcasses de porc dans un abattoir breton. 14èmes Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes - 13 et 14 novembre 2012 - Caen
- Feurer, C., et a. (2017) Prévalence des *S. aureus* et *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) sur carcasse de porc dans 4 abattoirs-caractérisation des souches. *Rapport d'étude Inaporc*
- Fondrevez M., et al. (2011) Genetic characterization of *Yersinia enterocolitica* collected from tonsils of slaughtered pigs. *Safepork*, Maastricht, 19-22 June 2011
- Fondrevez M., et al. (2014) Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011. *International Journal of Food Microbiology*, 174:56-62
- Fredriksson-Ahomaa, M. et al. (2012). 'Isolation of enteropathogenic *Yersinia* from non-human sources', *Adv Exp Med Biol*, 954: 97-105.

Guérin, A. et al. (2021). "Exposure to Quaternary Ammonium Compounds Selects Resistance to Ciprofloxacin in *Listeria monocytogenes*." *Pathogens* 10(2): 220.

Houry A., (2009) Rôle des flagelles et de la mobilité dans la formation de biofilms par *Bacillus cereus*. Thèse d'université, Paris 11.

IFIP/AERIAL (2014). Etude de l'impact du procédé d'abattage sur la contamination des carcasses par *Yersinia enterocolitica*, Rapport d'étude FranceAgrimer 2012-0392.

Inns T., et al. (2018) First use of whole-genome sequencing to investigate a cluster of *Yersinia enterocolitica*, Liverpool, United Kingdom, 2017. *Journal of Medical Microbiology*, 67:1747-1752

Ioannidis A, Kyratsa A, Ioannidou V, Bersimis S, Chatzipanagiotou S. (2014) Detection of biofilm production of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from infected children and comparative antimicrobial susceptibility of biofilm versus planktonic forms. *Mol Diagn Ther*. 18(3):309-14.

Iteman I., et al. (1996). Comparison of three molecular methods for typing and subtyping pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *J Med Microbiol*. 1996 Jul;45(1):48-56.

Le Guern, A-S., et al. (2016). Yersiniosis in France: overview and potential sources of infection', *Int J Infect Dis*, 46: 1-7.

Le Guern A-S, et al. (2024) A novel cgMLST for genomic surveillance of *Yersinia enterocolitica* infections in France allowed the detection and investigation of outbreaks in 2017-2021. *Microbiol Spectr*. 23:e0050424. doi: 10.1128/spectrum.00504-24.

Martin, L., et al. (2015) Investigation of an unusual increase in human yersinioses in Creuse, France. *Int J Infect Dis*. 2015;34:76-8.

McNally, A., et al. (2004) Comparison of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999-2000. *Lett Appl Microbiol*. 2004;39(1):103-8.

Milnes AS, et al. (2008) Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. *Epidemiol Infect*. 2008 Jun;136(6):739-51.

Mendjel T., (2016) Etude de la propension de *Yersinia enterocolitica* à se maintenir sur la viande de porc au froid. Rapport de Stage de master 2, Université de Rennes 1.

Mohd-Zain Z, et al. (2013) Molecular insights of co-trimoxazole resistance genes in *Haemophilus influenzae* isolated in Malaysia. *Trop Biomed*. 30(4):584-90. PMID: 24522126.

Molina-González, et al. (2014) Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* 40, 329–334 (2014).

Raymond P. (2018) *Yersinia enterocolitica* : diversité génétique et pouvoir colonisateur chez le porc. Mémoire de Thèse, université Bretagne-Loire (Rennes)

Raymond P., et al., (2018) Diversity of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from pigs in one French slaughterhouse over two years. *Microbiology Open* DOI:10.1002/mbo3.751

Robertson J, Nash JHE (2018). MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microb Genom*. 4(8):e000206. doi: 10.1099/mgen.0.000206.

- Sanderson H, et al. (2023) Identification of plasmids in avian-associated *Escherichia coli* using nanopore and illumina sequencing. BMC Genomics. 21;24(1):698. doi: 10.1186/s12864-023-09784-6.
- Sanno, A., et al. (2018). 'The development of a screening protocol for *Salmonella* spp. and enteropathogenic *Yersinia* spp. in samples from wild boar (*Sus scrofa*) also generating MLVA-data for *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* ', J Microbiol Methods, 150: 32-38.
- Saraka, D., et al. (2017). *Yersinia enterocolitica*, a Neglected Cause of Human Enteric Infections in Cote d'Ivoire. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(1):e0005216.
- Savin, C., Carniel, E. (2008) Les diarrhées d'origine bactérienne : le cas de *Yersinia enterocolitica*. revue Francophone des laboratoires 400, 49-58.
- Savin et al., (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. Emerging Microbes and infections 7:121, DOI10.1038/s41426-018-0123-0
- Savin C., et al. (2019) Genus-wide *Yersinia* core-genome multilocus sequence typing for species identification and strain characterization. Microb Genom. 2019.
- Schmid A, et al., (2013) Occurrence of zoonotic clostridia and *Yersinia* in healthy cattle. J Food Prot. 2013 Oct;76(10):1697-703
- Singhal N, et al. (2020) Exploring the genetic determinants underlying the differential production of an inducible chromosomal cephalosporinase - BlaB in *Yersinia enterocolitica* biotypes 1A, 1B, 2 and 4. Sci Rep. 23;10(1):10167. doi: 10.1038/s41598-020-67174-4.
- Soumet C., at al.(2012). 'Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*.' Vet Microbiol 158(1-2): 147-152.
- Soumet C., et al. (2016). 'Reduced susceptibilities to biocides and resistance to antibiotics in food-associated bacteria following exposure to quaternary ammonium compounds.' J Appl Microbiol 121(5): 1275-1281.
- Syczyło K. , et al. (2018) The prevalence of *Yersinia enterocolitica* in game animals in Poland. PLoS One, 13(3):e0195136. doi: 10.1371
- Van Cauteren D., 2016. 'Estimation de la morbidité des infections d'origine alimentaire en France', Doctoral thesis in Public Health - Epidemiology, Paris-Saclay University.
- Wang, X., et al. (2009). Distribution of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 28: 1237-44.
- Weynants V, et al., (1996) Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. Vet Microbiol. 1996 Jan;48(1-2):101-12.
-

## ANNEXES

### Annexe 1 : Collection des souches

---

La collection de souches est décrite dans un base de données EVNAHOTY sous teams.  
Elle inclut le commémoratif de 337 souches, réparties selon le tableau ci-dessous.

Biotype	BT4		BT2	
	C1	C2	C1	C2
Collection				
<b>Porc</b>	50	33	/	4
<b>Bovin</b>	50	/	50	/
<b>Ovin</b>	/	/	/	13
<b>Caprin</b>	/	/	/	37
<b>Humain</b>	50	/	50	/

Denis M, Houard E., Larivière-Gauthier G., Wilhelm A., Gassilloud B., Feurer C., Pizarro-Cerda J., Savin C., Le Guern A-S (2023) Does infrared spectroscopy allow the identification of *Yersinia enterocolitica* BT4 strains of porcine origin responsible for human's infection? Safepork, 15-17 may, New-Orleans, USA

Does infrared spectroscopy allow the identification of *Yersinia enterocolitica* BT4 strains of porcine origin responsible for human's infection?

Martine DENIS<sup>1</sup>, Emmanuelle HOUARD<sup>1</sup>, Guillaume LARIVIÈRE-GAUTHIER<sup>2</sup>, Amandine WILHELM<sup>3</sup>, Benoit GASSILLOUD<sup>3</sup>, Carole FEURER<sup>4</sup>, Javier PIZARRO-CERDA<sup>5</sup>, Cyril SAVIN<sup>5</sup>, Anne-Sophie LE GUERN<sup>5</sup>

1. Anses, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Hygiene and Quality of Poultry and Pig Products Unit, Ploufragan, France.
2. Cnam, Chaire agroalimentaire, Ploufragan, France
3. Anses, Hydrology Laboratory, Water Microbiology Unit, Nancy, France
4. IFIP, The French Institute for the Pig and Pork Industry, 35650 Le Rheu, France.
5. Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR6047, *Yersinia* Research Unit, National Reference Laboratory 'Plague & Other Yersiniosis', WHO Collaborating Center for Plague FRA-140, Paris, France

### Background

In 2021, yersiniosis was still, the third most frequently reported human zoonosis in Europe, (EFSA and ECDC, 2021) with *Yersinia enterocolitica* being the most common *Yersinia* species reported in human cases. Pigs are frequently described as a source of human contamination by *Y. enterocolitica* through consumption of raw or undercooked meat or by direct contact with contaminated carcasses. Pigs carry *Y. enterocolitica* in their oral cavities, and they excrete this bacterium in their feces. A one-year French survey at slaughterhouses indicated that 13.7% of the pigs were found positive for pathogenic *Y. enterocolitica* and 74.3% of the pig batches contained at least one positive pig (Fondrevez et al., 2014). Biotype 4 (BT4) was the most prevalent biotype among the isolated strains (91.9% of the isolates). This BT4 is also the most common biotype found in human infections in France (79% according to the *Yersinia* French National Reference Laboratory).

Different molecular techniques exist to type bacterial strains and different studies identified FT-IR (Fourier-Transform infrared) spectroscopy as an alternative technique for bacterial typing. The objective of this project was to test the performance of FT-IR in the identification of BT4 pig strains responsible for human infections. This tool is easy to use and inexpensive compared to other typing techniques such as WGS (Whole Genome Sequencing), which also requires bioinformatic skills.

### Materials and methods

The 100 strains of *Yersinia enterocolitica* from biotype BT4 used in this study were part of 10-year-old collections. Among them, 50 were of porcine origin (Anses and IFIP's collections), and 50 of human cases (*Yersinia* National Reference Laboratory collection).

Genomic DNA was extracted from fresh colonies using the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit from Thermo Fisher Scientific and genomes were sequenced at the P2M sequencing platform (Institut Pasteur, Paris, France) using Illumina NextSeq technology. Genomes were assembled and isolates were characterized using the *Yersinia* spp. 500-gene cgMLST analysis as described by Savin et al. (2019). Another cgMLST, based on 1,727 genes and restricted to the *Y. enterocolitica* species, was used as a molecular typing tool. Strains with a maximum of five allelic differences were considered as belonging to the same cluster and therefore genetically closely related.

For IR analysis, the samples were prepared according to Bruker recommendations. All strains were typed with five replicates using IR Biotyper® system from Bruker Daltonics. The spectra data were recovered from the IR Biotyper software, in the wavelength range corresponding to lipids (3000-2800 cm<sup>-1</sup>), proteins (1800-1500 cm<sup>-1</sup>) and polysaccharides (1300-800 cm<sup>-1</sup>) regions. Thus, variables corresponding to numbers of waves were considered for statistical analyses, first by considering all the data and secondly, only the data from the polysaccharide region (Region of interest according to Bruker for typing). The average spectra values of the five replicates of each strain were used for comparison using Partial least square discriminant analysis (PLS-DA) models with the ropls package under R.

## Results

With cgMLST, 14 clusters were identified, 9 of which included only porcine strains, 2 included only human strains, and 3 included both human and porcine strains. Human (4) and porcine (4) strains that were in the same cluster were identified as P+H+. Other strains of porcine or human origin were identified as P+H- and P-H+, respectively.

On the basis of this classification obtained by cgMLST, a discriminant analysis by partial least squares PLS-DA was carried out on the spectral data in order to determine whether it was possible to differentiate the 3 groups P+H+, P+H- and P-H+.

On the PLS-DA graphs, whether for the entire spectrum or just the polysaccharide region, we detected a separation between the P-H+ and P+H- groups, but the P+H+ phenotype was mixed across the two other groups. The R2Y and Q2 values obtained for this model were low (less than 0.5) indicating that this model was not able to discriminate the strains. However, when we did a pairwise comparison, there was a good discrimination between the P+H- and P-H+ groups, with a model that allowed a good prediction.

Considered regions	Value	3 groups together	P+H-/P-H+	P-H+/P+H+	P+H-/P+H+
Entire spectrum	R2Y	0.452	0.769	0.487	0.498
	Q2	0.349	0.669	0.186	0.154
Polysaccharide region	R2Y	0.413	0.712	0.265	0.258
	Q2	0.363	0.672	-0.0954	0.049

Finally, looking at the origin of the strains, analyzes on the IR data showed that the porcine and human strains were clearly separated. Looking, specifically at the P+H+ strains, we observed that the porcine strains of these clusters were mostly with the other porcine strains and that human strains of these clusters were mostly with the other human strains

## Conclusion

The cgMLST revealed within our collection only four porcine strains involved in human yersiniosis over the same period. FT-IR did not allowed us to identify porcine and human strains grouped in the same cgMLST clusters. On the other hand, this approach showed that porcine strains differed from human strains. It would be interesting to identify the numbers of wave that differentiate these two populations (in progress). Finally, this tool, in the context of our study, did not fully satisfy our objective, which was to identify porcine strains involved in human toxi-infections.

In conclusion, the cgMLST and FT-IR results minimize the importance of the involvement of pigs in BT4 yersiniosis, in France.

## References

- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 20(12):7666, 273 pp
- Fondrevez M, Minvielle B, Labbé A, Houdayer C, Rose N, Esnault E, Denis M. (2014) Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France. *Int J Food Microbiol.* 17;174:56-62
- Savin C, Criscuolo A, Guglielmini J, Le Guern AS, Carniel E, Pizarro-Cerdá J, Brisse S. (2019) Genus-wide *Yersinia* core-genome multilocus sequence typing for species identification and strain characterization. *Microb Genom.* 5(10):e000301.

## Funding

This study is part of the EVANHOTY project funded by FranceAgrimer (Etablissement national des produits de l'agriculture et de la mer, France).

Keywords (3 words) : Infrared spectroscopy, cgMLST, *Yersinia enterocolitica* BT4

## Does infrared spectroscopy allow the identification of *Yersinia enterocolitica* BT4 strains of porcine origin responsible for human's infection?

M. DENIS<sup>1</sup>, E. HOUARD<sup>1</sup>, G. LARIVIÈRE-GAUTHIER<sup>2</sup>, A. WILHELM<sup>3</sup>, B. GASSILLOU<sup>3</sup>, C. FEURER<sup>4</sup>, J. PIZZARO-CERDA<sup>5</sup>, C. SAVIN<sup>5</sup>, A-S LE GUERN<sup>5</sup>

- 1. Anses, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Hygiene and Quality of Poultry and Pig Products Unit, Ploufragan, France.
- 2. Cnam, Chaire agroalimentaire, Ploufragan, France
- 3. Anses, Hydrology Laboratory, Water Microbiology Unit, Nancy, France
- 4. IFIP, The French Institute for the Pig and Pork Industry, 35650 Le Rheu, France.
- 5. Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR6047, Yersinia Research Unit, National Reference Laboratory 'Plague & Other Yersiniosis', WHO Collaborating Center for Plague FRA/140, Paris, France

### BACKGROUND & AIM

- In 2021, yersiniosis was still, the third most frequently reported human zoonosis in Europe, (EFSA and ECDC, 2021) with *Yersinia enterocolitica* being the most common *Yersinia* species reported in human cases.
- A one-year French survey at slaughterhouses indicated that 13.7% of the pigs were positive for pathogenic *Y. enterocolitica* (Fondrevez et al., 2014). Biotype 4 (BT4) was the most prevalent biotype among the isolated strains (91.9% of the isolates).
- This biotype is also the most common biotype found in human infections in France (79% according to the *Yersinia* French National Reference Laboratory).
- The objective of this project was to test the performance of FT-IR in the identification of BT4 porcine strains responsible for human infections. This tool is easy to use and inexpensive compared to other typing techniques such as Whole Genome Sequencing (WGS), which also requires bioinformatic skills.

### MATERIAL and METHODS

- 100 *Yersinia enterocolitica* BT4 strains : 50 of porcine origin (Anses and IFIP's collections), and 50 of human cases (*Yersinia* National Reference Laboratory collection), isolated over the same period.

#### Genome analysis :

- Genome sequencing using Illumina NextSeq technology.
- Molecular typing using cgMLST, based on 1,727 genes (Savin et al., 2019).
- Strains with a maximum of five allelic differences considered as belonging to the same cluster.

#### IR analysis :

- Strains typed using IR Biotyper® system from Bruker Daltonics (five replicates per strain).
- Spectra data recovered from the IR Biotyper software in the wavenumber range corresponding to polysaccharides (1300-800 cm<sup>-1</sup>) regions → 501 wavenumbers = 501 variables for statistical analyses
- Statistical analyses : average spectra values of the five replicates of each strain used for Principal Component analysis (PCA) and production of classification models using Partial least square discriminant analysis (PLS-DA) models with the ropls package under R.

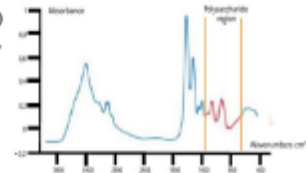


Fig. 1 : example of IR spectrum

### RESULTS

cgMLST revealed 14 clusters, 9 of which included only porcine strains, 2 included only human strains, and 3 included both human and porcine strains (Fig. 2). Human and porcine strains that were in the same cluster were identified as P+H+. Other strains of porcine or human origin were identified as P+H- and P-H+, respectively.

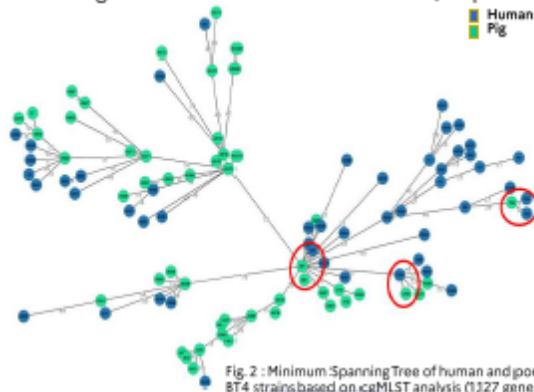


Fig. 2 : Minimum Spanning Tree of human and porcine BT4 strains based on cgMLST analysis (1,727 genes). In the red circles, 4 human strains and 4 porcine strains clustered together (P+H+)

Visualization of the IR data using PCA showed that the porcine and human strains were separated and could also be efficiently classified using PLS-DA models (fig.3). Looking specifically at the P+H+ strains, we observed on the PCA plot that these strains when there were isolated from pigs were clustered with the other porcine strains, while the strains isolated from human were clustered with the other human strains.

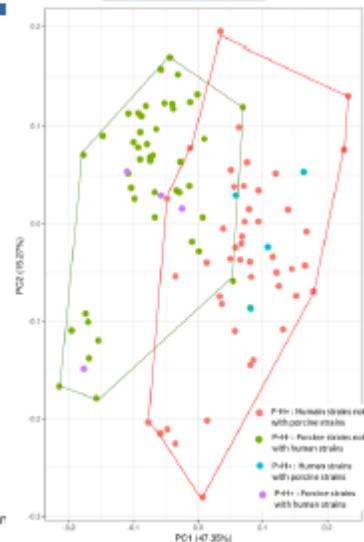


Fig. 3 : distribution of the strains in PCA according to their origin

### CONCLUSION

The cgMLST revealed within our collection only four porcine strains involved in human yersiniosis over the same period. FT-IR did not allow us to differentiate strains of porcine origin and human origin grouped in the same cgMLST clusters (P+H+) from the others (P+H- and P-H+). On the other hand, this approach showed that porcine strains differed from human strains. It would be interesting to identify the wavenumbers that differentiate these two populations (in progress).

In conclusion, the cgMLST and FT-IR results minimize the importance of the involvement of pigs in BT4 yersiniosis, in France.



#### References

- EFSA and ECDC (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. EFSA Journal, 20(12):7666, 273 pp
- Fondrevez M. et al. (2014) Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France. Int J Food Microbiol. 17:174-56-62
- Savin C. et al. (2019) Genus-wide *Yersinia* core genome multilocus sequence typing for species identification and strain characterization. Microb Genom. 5(10):e000301.



**Denis M., Houard E., Larivière-Gauthier G., Wilhelm A., Gassilloud B., Feurer C., Pizarro-Cerda J., Savin C., Le Guern A-S (2023) Identification par spectroscopie infrarouge des souches de *Yersinia enterocolitica* BT4 d'origine porcine responsables d'infections humaines. Microbes, 18<sup>ème</sup> congrès national de la SFM, 4-6 Octobre, Rennes, France**

Résumé

### **Introduction et objectifs**

Le porc est considéré comme un réservoir et une source de contamination par *Yersinia enterocolitica* chez l'Homme. En France, c'est principalement le biotype 4 (BT4) qui est retrouvé chez le porc (92% des souches (1)) et qui est majoritairement isolé dans les cas humains (66,8% des souches (2)). Ce projet se propose de tester la spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IR-TF) comme technique alternative pour le typage de *Y. enterocolitica* afin d'évaluer si des souches porcines BT4 peuvent être responsables d'infections humaines.

### **Matériels et méthodes**

100 souches de *Y. enterocolitica* BT4 isolées en 2010 ont été analysées : 50 d'origine porcine et 50 de cas humains. Les génomes ont été séquencés sur la plateforme de séquençage P2M (IP, Paris) en utilisant la technologie Illumina NextSeq puis analysés par core-genome-Multi-Locus-Sequence-Typing (cgMLST) selon un schéma avec 1 727 gènes communs à toutes les souches de *Y. enterocolitica*. Celles avec un maximum de cinq différences alléliques ont été regroupées dans un même cluster par l'application BIGSdb. Les souches ont été typées en utilisant le système IR Biotyper® de Bruker Daltonics à raison de 5 réplicats par souche. Les données spectrales dans la gamme de longueurs d'onde correspondant à la région des polysaccharides (1300-800 cm<sup>-1</sup>) ont été analysées statistiquement à l'aide de modèles d'analyse discriminante par les moindres carrés partiels (PLS-DA) avec le module ropls sous R.

### **Résultats, discussion et conclusion**

Le typage par cgMLST a permis d'identifier 3 clusters regroupant des souches porcines et humaines dans lesquels seules quatre souches porcines seraient impliquées dans des cas humains au cours de la période. La IR-TF ne nous a pas permis d'identifier les souches porcines et humaines regroupées dans les mêmes clusters par la cgMLST. En revanche, cette approche a montré que les souches porcines différaient des souches humaines. Cet outil n'a pas permis de répondre pleinement à notre objectif premier qui était d'identifier les souches porcines impliquées dans les toxico-infections humaines. En conclusion, les résultats cgMLST et IR-TF révèlent une grande diversité des souches BT4 qui minimise l'importance de l'implication du porc dans les yersiniose humaines BT4, en France.

*Mots clés* : *Yersinia enterocolitica*, cgMLST, IR-TF, BT4

### **Références**

1. Fondrevez M, Minvielle B, Labbé A, Houdayer C, Rose N, Esnault E, Denis M. (2014) Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France. Int J Food Microbiol. 17;174:56-62
2. Le Guern AS, Martin L, Savin C, Carniel E. (2016) Yersiniosis in France: overview and potential sources of infection. Int J Infect Dis.46:1-7



# Identification par spectroscopie infrarouge des souches de *Yersinia enterocolitica* BT4 d'origine porcine responsables d'infections humaines.

M. DENIS<sup>1</sup>, E. HOUARD<sup>1</sup>, G. LARIVIÈRE-GAUTHIER<sup>2</sup>, A. WILHELM<sup>3</sup>, B. GASSILLOU<sup>3</sup>, C. FEURER<sup>4</sup>, J. PIZZARO-CERDA<sup>5</sup>, C. SAVIN<sup>5</sup>, A-S. LE GUERN<sup>5</sup>

- 1. Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, Ploufragan, France.
- 2. Cnam, Chaire agroalimentaire, Ploufragan, France
- 3. Anses, Laboratoire d'Hydrologie, Unité Microbiologie de l'Eau, Nancy, France
- 4. IFIP, Institut du Porc, Le Rheu, France.
- 5. Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR6047, Unité de Recherche Yersinia, LNR Peste et autres yersiniose, Centre collaborateur de l'OMS pour la Peste, Paris, France

## INTRODUCTION

- En 2021, la yersiniose était toujours la troisième zoonose humaine la plus fréquemment signalée en Europe (EFSA et ECDC, 2022), avec *Yersinia enterocolitica* l'espèce la plus fréquemment signalée dans les cas humains.
- Une enquête sur un an dans les abattoirs français a indiqué que 13,7 % des porcs étaient positifs pour *Y. enterocolitica* pathogène (Fondrevéz et al., 2014). Pour cette enquête, 91,9% des souches isolées étaient de biotype 4 (BT4).
- Ce biotype est également le plus fréquemment isolé dans les infections humaines en France (79% selon le Laboratoire National de Référence de la Peste et des autres Yersiniose).
- Ce projet se propose de tester la spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IR-TF) comme technique alternative pour le typage de *Y. enterocolitica* afin d'évaluer si des souches porcines BT4 peuvent être responsables d'infections humaines. Cet outil est facile à utiliser et peu coûteux par rapport à d'autres techniques de typage tel que le séquençage du génome entier (WGS), qui nécessite également des compétences en bioinformatique.

## MATERIEL & METHODES

- 100 souches de *Yersinia enterocolitica* BT4 : 50 souches isolées de porc (collections Anses et IFIP), et 50 souches isolées de cas humains (collection du LNR), toutes isolées en 2010.
- Les génomes ont été séquencés sur la plateforme de séquençage P2M (IP, Paris) en utilisant la technologie Illumina NextSeq puis analysés par core-genome-Multi-Locus-Sequence-Typing (cgMLST) selon un schéma avec 1 727 gènes communs à toutes les souches de *Y. enterocolitica*. Celles avec un maximum de cinq différences alléliques ont été regroupées dans un même cluster par l'application BIGSdb.
- Les souches ont été typées en utilisant le système IR Biotyper® de Bruker Daltonics à raison de 5 réplicats par souche.
- Les données spectrales dans la gamme de longueurs d'onde correspondant à la région des polysaccharides (1300-800 cm<sup>-1</sup>) (= 500 nombres d'onde) ont été analysées statistiquement à l'aide de modèles d'analyse discriminante par les moindres carrés partiels (PLS-DA) avec le module ropls sous R.

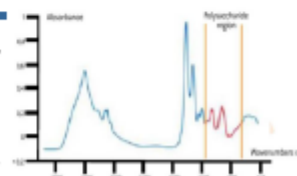


Fig. 1 : exemple de spectre IR

## RESULTATS

Le typage par cgMLST a révélé 14 clusters, 9 regroupant uniquement des souches porcines, 2 avec des souches humaines, et 3 avec des souches humaines et porcines (Fig. 2). Les souches humaines et porcines qui étaient dans les mêmes clusters ont été identifiées P+H+. Les autres souches porcines ou humaines ont été identifiées P+H- et PH+, respectivement.

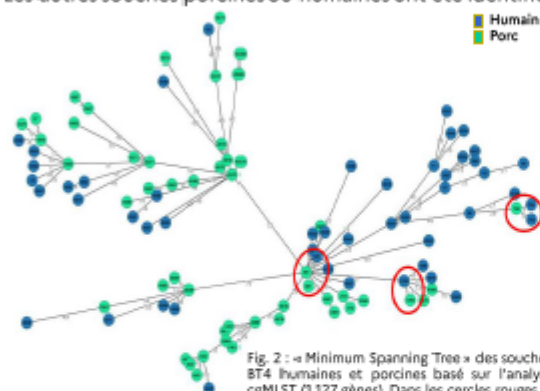


Fig. 2 : « Minimum Spanning Tree » des souches BT4 humaines et porcines basé sur l'analyse cgMLST (1 127 gènes). Dans les cercles rouges, 4 souches humaines et 4 souches porcines sont regroupées (P+H+).

L'ACP (Analyse en Composantes Principales) sur les données IR montre que les souches porcines et humaines sont séparées (fig.3). Cette séparation a été confirmée au travers des modèles PLS-DA.

Pour les souches P+H+, ces souches lorsqu'elles étaient isolées chez le porc sont regroupées avec les autres souches porcines (P+H-), tandis que les souches isolées chez l'homme sont regroupées avec les autres souches humaines (P-H+).

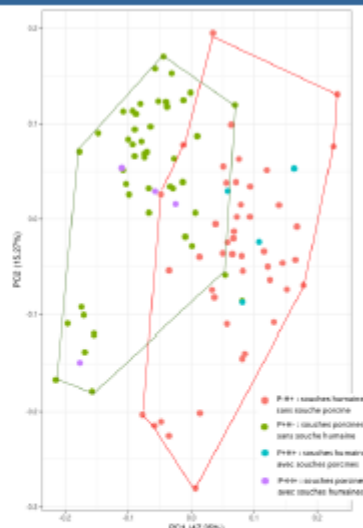


Fig. 3 : distribution des souches selon leur origine dans l'ACP

## CONCLUSION

Le typage par cgMLST a permis d'identifier 3 clusters regroupant des souches porcines et humaines dans lesquels seules quatre souches porcines seraient impliquées dans des cas humains au cours de la période. La IR-TF ne nous a pas permis d'identifier les souches porcines et humaines regroupées dans les mêmes clusters par la cgMLST. En revanche, cette approche a montré que les souches porcines différaient des souches humaines. Cet outil n'a pas permis de répondre pleinement à notre objectif premier qui était d'identifier les souches porcines impliquées dans les toxoinfections humaines. En conclusion, les résultats cgMLST et IR-TF révèlent une grande diversité des souches BT4 qui minimise l'importance de l'implication du porc dans les yersiniose humaines BT4, en France.

### References

- EFSA and ECDC (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. EFSA Journal, 20(12):7666, 273 pp (Fondrevéz M, et al. (2014) Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughteraged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France. Int J Food Microbiol. 17:174-56452  
Savin C, et al. (2019) Genuswide *Yersinia* core-genome multilocus sequence typing for species identification and strain characterization. Microb Genom. 5(10):e000301.

**Support financier:**  
**EVANHOTY**  
 projet financé par  
 FranceAgrimer



## Survie au froid et pathogénicité des souches de *Yersinia enterocolitica* BT4 isolées chez le porc et génétiquement proches ou non de souches isolées chez l'homme

Martine DENIS (1), Emmanuelle HOUARD (1), Adiel OUEDRAOGO (1), Léonie LE BERRE (1), Carole FEURER (2),  
Javier PIZARRO-CERDA (3), Cyril SAVIN (3), Anne-Sophie LE GUERN (3)

(1) Anses, 22440 Ploufragan, France

(2) IFIP-Institut du Porc, 35650 Le Rheu, France

(3) Institut Pasteur (IP) CNR de la peste et autres yersiniose, 75015 Paris, France

[martine.denis@anses.fr](mailto:martine.denis@anses.fr)

### Cold survival and pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* BT4 strains isolated from pigs and genetically close or not to strains isolated from human cases

The aim of this study was to test the cold survival and pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* BT4 strains isolated from pigs and genetically close or not to strains isolated from human cases, to assess their ability to pass through the food chain alive and infect humans. BT4 strains (n=50) of porcine origin (Anses and IFIP's collections) and BT4 strains of human cases (n=50, CNR's collection) isolated in 2010 in France were sequenced. cgMLST, based on 1727 genes, was used to compare strains. Porcine strains and human strains in clusters were considered to be genetically closely related. Four porcine strains were selected: two closely related to human strains (P+H+), and two not (allelic difference > 9) (P+H-). The survival of these strains at 4°C was tested in BHI culture medium (5 Log<sub>10</sub>CFU/ml) and on ham (4.5 Log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup>) for 10-11 days. Their pathogenicity was assessed using *in vitro* assays on human intestinal *Caco-2* cells (10<sup>8</sup> cells/ml of *Caco-2* cells for 10<sup>7</sup> bacteria/ml). During the survival test at 4°C, an increase of 4 Log<sub>10</sub>CFU/ml in BHI and of 1.5-2.0 Log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup> on ham was observed for all strains. The P+H+ and P+H- strains did not differ significantly for the tests in BHI or on ham (P-value > 0.05). Adhesion and invasion on *Caco-2* cells ranged from 65-90 % and 0.55-3.60 %, respectively. The P+H+ and P+H- strains did not differ significantly in pathogenicity. This study showed that the ability to survive and grow in cold conditions is not restricted to strains capable of infecting humans and that these strains had the same capacity to infect humans.

### INTRODUCTION

En 2021, la yersiniose était toujours la troisième zoonose humaine la plus fréquemment identifiée en Europe (EFSA et ECDC, 2022). Les porcs sont décrits comme une source de *Y. enterocolitica* pathogènes pour l'homme. Une enquête française menée sur 2010-2011 en abattoir a montré que 13,7 % des porcs et que 74,3 % des lots de porcs étaient positifs en *Y. enterocolitica* pathogènes (Fondrevéz et al., 2014). Au sein des 827 souches conservées lors de cette enquête, 91,9 % avaient le biotype BT4. Ce BT4 est le plus prévalent dans les cas de yersiniose humaine en France (66,8 %) (Le Guern et al., 2016). Pour que *Y. enterocolitica* puisse résister à la chaîne du froid et infecter l'homme, elle doit 1) survivre à la température de réfrigération, et 2) avoir les gènes pour exprimer sa pathogénicité. Le but de cette étude était de tester la survie au froid et la pathogénicité de quatre souches de *Y. enterocolitica* BT4 isolées de porcs et génétiquement proches ou non de souches isolées de cas humains.

### 1. MATERIEL ET METHODES

#### 1.1. Sélection des souches de *Y. enterocolitica* BT4

Cinquante souches d'origine porcine (collections de l'Anses et de l'IFIP) et 50 souches d'origine humaine (collection du Centre Nationale de Référence) isolées en 2010 en France ont été

séquencées par la plateforme de séquençage de l'Institut Pasteur. La cgMLST (core genome Multi Locus Sequence Typing) basée sur 1 727 gènes a été utilisée comme outil de typage moléculaire. Les souches porcines et humaines présentant un maximum de cinq différences alléliques ont été considérées comme génétiquement proches et forment un cluster. Parmi ces souches, quatre souches d'origine porcine ayant le plasmide de virulence pYV ont été sélectionnées : deux souches groupées chacune dans un cluster avec des souches humaines (identifiées P+H+), et deux souches génétiquement éloignées de souches humaines (différence allélique > 9) (identifiées P+H-).

#### 1.2. Survie des souches au froid

La survie des souches à 4°C a été testée pendant 11 jours dans un milieu de culture BHI (Brain Heart Infusion) avec un inoculum de 5 Log<sub>10</sub> CFU/ml et pendant 10 jours sur des tranches de jambon achetées en grande surface avec un inoculum de 4,5 Log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup>. Le test a été répété trois fois sur des jambons différents. Tous les deux ou trois jours, *Y. enterocolitica* a été dénombré sur la gélose PCA (Plate Count Agar) pour le test en BHI et sur la gélose sélective CIN (Cefsulodine, Irgasan, Novobiocine) pour le test sur le jambon.

#### 1.3. Pouvoir pathogène des souches sur cellules *Caco-2*

Le pouvoir pathogène des souches a été évalué *in vitro* sur les cellules intestinales humaines *Caco-2* avec une MOI

(Multiplicité de l'Infection) au  $1/100^{CFU/ml}$  ( $10^3$  cellules/ml de cellules *Caco-2* pour  $10^7$  bactéries/ml), et ce trois fois. Pour évaluer la pathogénicité des souches, les pourcentages de bactéries adhérentes et invasives sont pris en compte. Le protocole suivi est celui décrit par Esnault *et al.* (2015).

#### 1.4. Statistiques

Les trois répétitions, les quatre souches et les deux groupes P+H/ P+H- des essais ont été comparés sous R avec le test de Kruskal-Wallis.

## 2. RESULTATS

### 2.1. Survie des souches au froid

Lors du test de survie à 4°C, une augmentation de 4 Log<sub>10</sub> CFU/ml en BHI et de 1,5 à 2 Log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup> sur le jambon a été observée pour toutes les souches, avec un plateau atteint en 8 jours en BHI (Figure 1) et en 6 jours sur le jambon (Figure 2).

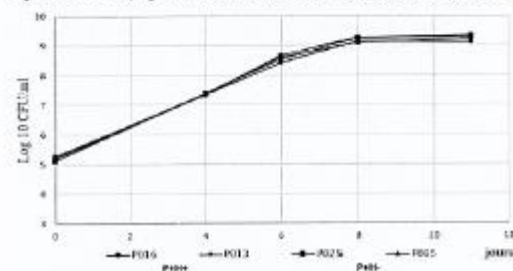


Figure 1 - Survie des souches porcines BT4 (souches codées P016 et P013 : P+H+ / souches codées P025 et P005 : P+H-) en milieu de culture BHI (Brain Heart Infusion) sur 11 jours à 4°C

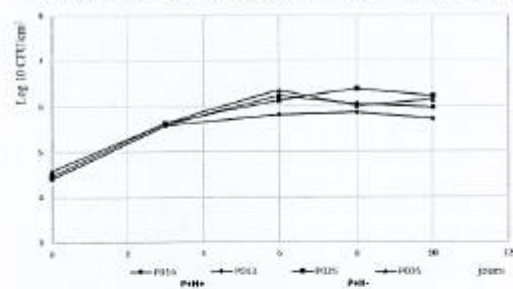


Figure 2 - Survie des souches porcines BT4 (souches P016 et P013 : P+H+ / souches P025 et P005 : P+H-) sur jambon sur 10 jours à 4°C

Il n'y a pas de différence significative entre les souches P+H+ et les souches P+H- ni pour l'essai en BHI ni pour l'essai sur jambon (test de Kruskal-Wallis,  $P = 0,956$  et  $P = 0,506$ , respectivement).

### 2.2. Pouvoir pathogène des souches sur cellules *Caco-2*

Les souches avaient un pourcentage d'adhésion aux cellules *Caco-2* compris entre 65 et 90 %, et un pourcentage d'invasion dans les cellules *Caco-2* compris entre 0,55 et 3,60 % (Figure 3).

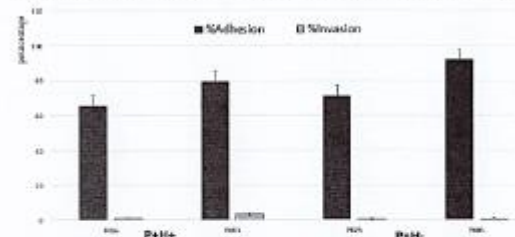


Figure 3 - Pourcentage d'adhésion et d'invasion sur *Caco-2* des quatre souches porcines BT4 (souches codées P016 et P013 : P+H+ / souches codées P025 et P005 : P+H-)

Il n'y a pas de différence significative entre les souches P+H+ et P+H-, que ce soit pour leur capacité à adhérer ou leur capacité à pénétrer les cellules *Caco-2* (test de Kruskal-Wallis,  $P = 0,772$  et  $P = 0,083$ , respectivement).

## 3. DISCUSSION

La nature psychrotrophe de *Y. enterocolitica* a été confirmée par nos tests à 4°C en BHI et sur jambon. La bactérie est capable de croître à des températures de réfrigération. Il serait nécessaire de se rapprocher des conditions réelles de contamination de la viande pour mieux évaluer le danger. Dans l'étude de Van Damme *et al.* (2015), la quantité de *Y. enterocolitica* sur les carcasses de porcs est très faible (< à 20 UFC/100 cm<sup>2</sup>). Aucune différence n'a été observée entre les souches porcines appartenant au même cluster cgMLST que les souches humaines (P+H+) et celles n'y appartenant pas (P+H-). La capacité des souches de *Y. enterocolitica* à survivre au froid n'est donc pas spécifique aux souches capables d'infecter l'homme. La nature psychrotrophe de *Y. enterocolitica* reste un problème dans l'industrie alimentaire et pour les consommateurs, où la réfrigération est un outil de prévention des pathogènes. Toutes les souches avaient la même capacité à infecter les cellules *Caco-2*, ce qui indique qu'elles ont toutes le même niveau de pathogénicité.

## CONCLUSION

Cette étude a montré que si certaines souches de *Y. enterocolitica* BT4 isolées chez le porc n'ont pas été identifiées comme génétiquement proches des souches humaines, elles sont néanmoins capables de survivre et se multiplier au froid et ont la capacité d'infecter l'homme.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- EFSA and ECDC, 2022. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. EFSA J., 20, e07666.
- Esnault E., Morin S., Bougeard S., Denis M., 2015. Porcine and human intestinal flora for profiling the capacity of colonization and infection of the foodborne pathogen *Yersinia enterocolitica*. Proceeding Safepork, Porto, Portugal, 7-10 September 2015, pp 99-102.
- Fondrevez M., Minvielle B., Labbé A., Houdayer C., Rose N., Esnault E., Denis M., 2014. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France. Int. J. Food Microbiol., 174, 56-62.
- Le Guern A.S., Martin L., Savin C., Carniel E., 2016. Yersiniosis in France: overview and potential sources of infection. Int. J. Infect. Dis., 46, 1-7.
- Van Damme I., Berkvens D., Vanantwerpen G., Baré J., Houf K., Wauters G., De Zutter L., 2015. Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with enteropathogenic *Yersinia* spp.: Distribution, quantification and identification of risk factors. Int. J. Food Microbiol., 204, 33-40.

# Survie au froid et pathogénicité de souches de *Yersinia enterocolitica* BT4 isolées chez le porc et génétiquement proches ou non de souches isolées chez l'Homme.

Martine DENIS <sup>(1)</sup>, Emmanuelle HOUARD <sup>(1)</sup>, Adiel OUEDRAOGO <sup>(1)</sup>, Léonie LE BERRE <sup>(1)</sup>, Carole FEURER <sup>(2)</sup>, Javier PIZARRO-CERDA <sup>(3)</sup>, Cyril SAVIN <sup>(3)</sup>, Anne-Sophie LE GUERN <sup>(3)</sup>

1. Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, Ploufragan, France.  
 2. IFIP, Institut du Porc, Le Rheu, France. 3. Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR6047, Unité de Recherche Yersinia, CNR Peste et autres yersiniose, Paris, France / martine.denis@anses.fr

## INTRODUCTION

- En 2021, la yersiniose entérique est la 3<sup>ème</sup> zoonose humaine la plus fréquemment identifiée en Europe (EFSA et ECDC, 2022).
- Les porcs sont décrits comme une source de *Y. enterocolitica* pathogènes pour l'Homme. Une enquête française menée sur un an (2010-2011) en abattoir a montré que 13,7% des porcs et que 74,3% des lots de porcs étaient positifs en *Y. enterocolitica* pathogènes (Fondrevez et al., 2014) et que 91,9 % des souches isolées avaient le biotype BT4.
- Ce BT4 est le plus prévalent dans les cas de yersiniose humaine en France (66,8%) (Le Guern et al., 2016).
- Pour que *Y. enterocolitica* puisse résister à la chaîne du froid et infecter l'homme, elle doit 1) survivre à la température de réfrigération, et 2) avoir les gènes pour exprimer sa pathogénicité.

## MATERIEL & METHODES

- 100 souches de *Yersinia enterocolitica* BT4 isolées en 2010 : 50 souches porcines et 50 souches humaines.

- Séquencage des génomes sur la plateforme de séquençage P2M (IP, Paris)
  - analyse par cgMLST selon un schéma avec 1 727 gènes
  - Clustering des souches ayant un maximum de 5 différences alléliques par l'application BIGSdb.

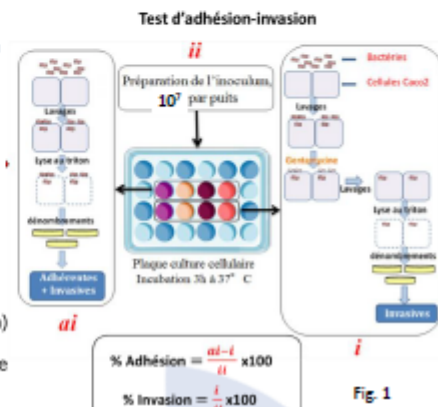
4 souches retenues pour les tests : 2 souches (P016 et P013) groupées chacune dans un cluster avec des souches humaines (identifiées P+H+), et 2 souches (P025 et P005) génétiquement éloignées de souches humaines (identifiées P+H-)



- Survie au froid à 4°C :
  - pendant 11 jours dans un milieu de culture BHI (Brain Heart Infusion) avec un inoculum de 5 Log<sub>10</sub> CFU/ml (3 répétitions),
  - pendant 10 jours sur des tranches de jambon achetées en grande surface avec un inoculum de 4,5 Log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup> (3 répétitions).

### Pouvoir pathogène :

- évalué *in vitro* sur cellules intestinales humaines Caco-2 avec une MOI\* au 1/100<sup>ème</sup> (10<sup>9</sup> cellules Caco-2 / ml pour 10<sup>7</sup> bactéries/ml) (3 répétitions) → calcul du % de bactéries adhérentes et % de bactéries invasives (figure 1 : test d'adhésion et d'invasion sur cellules Caco-2) \* multiplicity of infection



## RESULTATS

Une augmentation de 4 Log<sub>10</sub> CFU/ml en BHI et de 1,5 à 2 Log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup> sur le jambon a été observée pour toutes les souches, avec un plateau atteint en 8 jours en BHI (Figure 2a) et en 6 jours sur le jambon (Figure 2b).

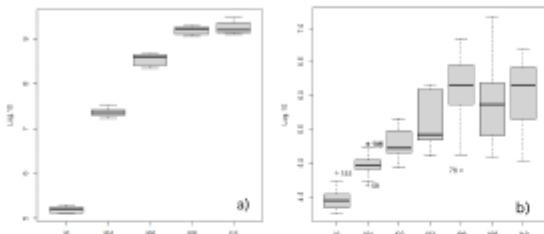


Figure 2 - Survie à 4°C des 4 souches porcines BT4 Souches P016 et P013 (P+H+) et P025 et P005 (P+H-) a) en milieu de culture BHI sur 11 jours b) sur jambon sur 10 jours

Les souches avaient un pourcentage d'adhésion aux cellules Caco-2 compris entre 65 et 90%, et un pourcentage d'invasion dans les cellules Caco-2 compris entre 0,55 et 3,60% (Figure 3).

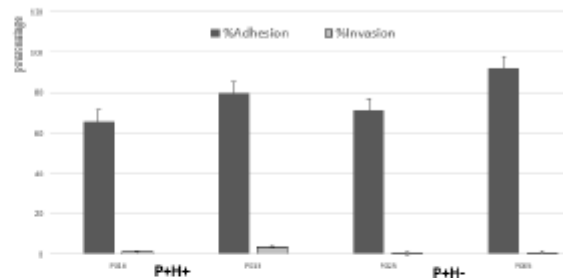


Figure 3 - Pourcentage d'adhésion et d'invasion sur Caco-2 des 4 souches porcines BT4 Souches P016 et P013 (P+H+) et P025 et P005 (P+H-)

Il n'y a pas de différence significative entre les souches P+H+ et les souches P+H- ni pour l'essai en BHI ni pour l'essai sur jambon (test de Kruskal-Wallis, P = 0,956 et P = 0,506, respectivement).

Il n'y a pas de différence significative entre les souches P+H+ et P+H-, que ce soit pour leur capacité à adhérer ou leur capacité à pénétrer les cellules Caco-2 (test de Kruskal-Wallis, P = 0,772 et P = 0,083, respectivement).

## DISCUSSION / CONCLUSION

La nature psychrotrophe de *Y. enterocolitica* a été confirmée par nos tests à 4°C en BHI et sur jambon. La bactérie est capable de croître à des températures de réfrigération. Aucune différence n'a été observée entre les souches porcines appartenant au même cluster cgMLST que les souches humaines (P+H+) et celles n'y appartenant pas (P+H-). La capacité des souches de *Y. enterocolitica* à survivre au froid n'est donc pas spécifique aux souches capables d'infecter l'Homme. La nature psychrotrophe de *Y. enterocolitica* reste un problème dans l'industrie alimentaire et pour les consommateurs, où la réfrigération est un outil de prévention des pathogènes. Toutes les souches avaient la même capacité à infecter les cellules Caco-2, ce qui indique qu'elles ont toutes le même niveau de pathogénicité. En conclusion, cette étude a montré que si des souches de *Y. enterocolitica* BT4 isolées chez le porc n'ont pas été identifiées comme génétiquement proches des souches humaines, elles sont néanmoins capables de survivre et de se multiplier au froid, et ont la capacité d'infecter l'Homme.

### References

EFSA and ECDC (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. EFSA Journal, 20(12):7666, 273 pp. / Fondrevez M. et al. (2014) Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France. Int J Food Microbiol. 17;174-56-62 / Savin C. et al. (2019) Genus-wide *Yersinia* core-genome multilocus sequence typing for species identification and strain characterization. Microb Genom. 5(10):e000301.

Support financier:  
 EVANHOTY  
 projet financé par  
 FranceAgrimer

### 3R-Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, 4 et 5 décembre 2024, Paris (résumé soumis pour un poster)

#### Capacité des souches de *Yersinia enterocolitica* BT2 d'origine bovine à traverser la chaîne alimentaire et à infecter l'homme

#### *Ability of Yersinia enterocolitica* BT2 strains of bovine origin to cross the food chain and infect humans

DENIS M. (1), LE GUERN A-S. (2), HOUARD E. (1), SAVIN C. (2), OUEDRAOGO A. (1), LE GRANDOIS P. (3), LE BERRE L. (1), SOUMET C. (3) PIZARRO-CERDA J. (2), BIECHE-TERRIER C. (4)

(1) ANSES, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, 22440 Ploufragan, France

(2) Institut Pasteur, CNR de la peste et autres yersiniose, 75724 Paris Cedex 15, France

(3) Anses, Unité Antibiotiques, biocides, résidus et résistance, 35306 Fougères, France.

(4) Idele, Service Qualité des Carcasses et des Viandes, 14310 Villers-Bocage, France

#### INTRODUCTION

L'objectif de cette étude était de tester la capacité de souches de Biotype 2 (BT2) de *Yersinia enterocolitica* isolées de bovins et génétiquement proches ou non de souches isolées de cas humains à traverser la chaîne alimentaire et à infecter l'homme, au travers de différents tests phénotypiques *in vitro*.

#### MATERIEL ET METHODES

Les génomes de 100 souches de *Y. enterocolitica* BT2 issues de la collection du Centre National de Référence(CNR) (50 d'origine bovine (B) et 50 d'origine humaine (H)) et isolées en 2010 en France, ont été séquencées. Les génomes de ces souches ont été comparés génétiquement par la cgMLST *Y. enterocolitica* avec 1727 gènes développée par le CNR. Les souches bovines et les souches humaines ayant une différence allélique  $\leq 3$  ont été considérées comme génétiquement proches. Quatre souches bovines ont ainsi été sélectionnées : deux avec une différence allélique  $\leq 3$  (B+H+), et deux avec une différence allélique  $> 3$  (B+H-).

Ces quatre souches ont été évaluées pour :

- 1) leur survie à 4°C en milieu de culture BHI et sur des steaks pendant 10-11 jours,
- 2) leur mobilité sur milieu semi-solide à 4 et 12°C pendant 10 jours,
- 3) leur adhésion au surface inox à 12°C,
- 4) leur résistance à 5 biocides,
- 5) et leur pathogénicité sur des cellules intestinales humaines *Caco-2*.

#### RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les 4 souches survivent et se multiplient à 4°C, avec une augmentation de 4 Log<sub>10</sub> UFC/ml en BHI et de 2,5 à 3 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> sur le steak (Figure 1).

L'apparition en continu d'un halo de migration sur 10 jours, à 4°C et à 12°C, montre qu'elles sont mobiles à ces deux températures, avec une mobilité plus importante à 12°C. Elles adhèrent à l'inox à 12°C avec une capacité d'adhésion de 0,9 à 2,3%. La nature psychrotrophe de *Y. enterocolitica* est donc confirmée par ces tests réalisés à 4°C et 12°C; elle est en effet capable de croître, de se mouvoir et d'adhérer à des températures de réfrigération ou d'activité en IAA.

Les 4 souches ont toutes la même sensibilité aux 5 biocides testés (Chlorure de benzalkonium (BC), Chlorure de diméthyl didécyl ammonium (CDDA), N-(3-aminopropyl)-N-dodécylpropane-1,3-diamine (AMPD), Acide Peracétique (AP) et Hypochlorite de Sodium (NaClO). Ainsi, ces souches ont la même capacité de survie aux biocides, quel que soit le biocide. Le pourcentage d'adhésion aux cellules *Caco-2* se situe entre 9 et 14% (sauf une souche, 40%) et le pourcentage d'invasion entre 0,8 et 6,0 %. Les souches ont le même potentiel infectieux.

Quelque soit le test, aucune différence significative n'a été observée entre les souches B+H+ et B+H-.

#### CONCLUSION

Cette étude a montré que les quatre souches de BT2 d'origine bovine, qu'elles soient proches ou non génétiquement des souches humaines, ont la même capacité à traverser la filière bovine, et à infecter l'homme.

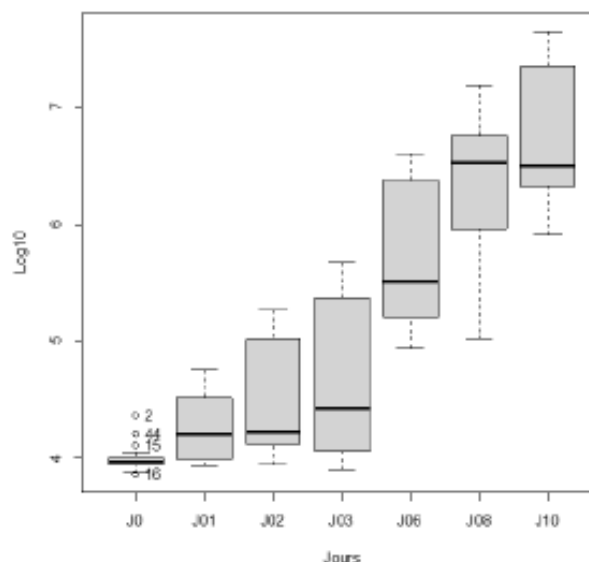


Figure 1 : survie des 4 souches sur steak à 4°C

Ces essais ont été réalisés dans le cadre du projet « EVANHOTY » Évaluation de l'implication des filières porcine et bovine dans les yersiniose humaines en France et de l'évolution de *Yersinia enterocolitica* par l'utilisation de techniques moléculaires discriminantes », financée par FranceAgriMer.

## **Prévalence de *Yersinia enterocolitica* dans les fèces de bovins prélevés à l'abattoir**

### ***Prevalence of Yersinia enterocolitica in the cattle faeces collected at slaughterhouse.***

BIECHE-TERRIER C. (1), COADOU T. (2), LAMOUR B. (2), FEURER C. (3), LE GUERN A.S. (4), DENIS M. (5)

(1) Idele, Service Qualité des Carcasses et des Viandes, F-14310 Villers-Bocage, France

(2) Idele, Laboratoire d'Analyse et de technologie des Produits, F-14310 Villers-Bocage, France

(3) IFIP-Institut du Porc, Pôle Viandes et Charcuteries, F- 35740 Pacé, France

(4) Institut Pasteur, CNR de la peste et des autres yersiniose, F- 75724 Paris Cedex 15, France

(5) ANSES, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, F-22440 Ploufragan, France

#### **INTRODUCTION**

*Yersinia enterocolitica* (Ye) est une bactérie pathogène zoonotique reconnue comme le troisième agent responsable de diarrhée humaine d'origine bactérienne en Europe (EFSA et ECDC, 2022), et pouvant faire partie de la flore digestive commensale des animaux de rente, notamment les porcs et les bovins. Dans le cadre du projet « EVANHOTY » Évaluation de l'implication des filières porcine et bovine dans les yersiniose humaines en France et de l'évolution de Ye par l'utilisation de techniques moléculaires discriminantes », une des premières étapes a consisté à évaluer la prévalence de ce pathogène dans les fèces des bovins à l'abattoir, étape la plus à risque de contamination des carcasses et donc des viandes.

#### **MATERIEL ET METHODES**

Des prélèvements de 25g de matières fécales par incision de l'ampoule rectale ont été réalisés sur 420 bovins au stade de l'éviscération blanche. Ces prélèvements ont été répartis sur 14 mois, entre 3 abattoirs répartis dans 3 bassins de production différents : Normandie, Pays de la Loire et Nouvelle Aquitaine. Les informations sur les animaux prélevés ont été enregistrées ; elles concernent la catégorie, la race, l'âge à l'abattage, la région de naissance et la région du dernier détenteur.

La recherche et l'isolement de Ye dans les fèces de bovin ont été réalisés selon la norme en vigueur NF EN ISO 10273:2017. Les souches suspectées Ye ont été soumises à des tests biochimiques et moléculaires pour confirmer le genre *Yersinia* et l'espèce *enterocolitica*, et pour le biotypage. Toutes les souches pathogènes confirmées devaient être adressées au CNR (Institut Pasteur, Paris).

#### **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

Sur les 420 prélèvements analysés, aucune souche de Ye n'a été isolée. La prévalence individuelle des gros bovins prélevés à l'abattoir est donc de 0% IC95%[0-0,69].

Ce résultat interpelle du fait que les bovins sont connus pour héberger Ye de façon commensale. Le CNR a notamment en collection plusieurs dizaines de souches Ye d'origine bovine isolées en élevages entre 1994 et 2010. Deux études anglaises indiquent une prévalence en Ye chez les bovins de 6,3 et 4,5% sur matière fécale (McNally et al, 2004 ; Milnes et al, 2008), et une étude allemande rapporte une prévalence de 1,6% (Schmid et al, 2013). Les auteurs s'interrogent donc sur deux aspects : 1) la possibilité d'un portage de Ye au niveau des amygdales des bovins, comme chez les porcs, et 2) la possibilité que les portages fécaux de Ye par les bovins ne soient pas asymptomatiques (cas rapportés par le CNR d'isolement de Ye issues d'animaux malades) ce qui exclurait donc ces animaux des filières viandes.

#### **CONCLUSION**

Cette étude n'a pas permis d'isoler de souche de Ye des fèces de bovins à l'abattoir, donnant donc une prévalence nulle pour ce pathogène au stade de l'abattoir en France.

*Cette étude a été réalisée grâce au financement de France AgriMer.*

EFSA, ECDC. 2022. EFSA Journal.

McNally A, Cheasty T, Fearnley C, Dalziel RW, Paiba GA, Manning G, Newell DG. 2004. Lett Appl Microbiol. 39(1):103-8.

Milnes AS, Stewart I, Clifton-Hadley FA, Davies RH, Newell DG, Sayers AR, Cheasty T, Cassar C, Ridley A, Cook AJ, Evans SJ, Teale CJ, Smith RP, McNally A, Toszeghy M, Futter R, Kay A, Paiba GA. 2008 Epidemiol Infect. 136(6):739-51.

Schmid A, Messelhäuser U, Hörmansdorfer S, Sauter-Louis C, Mansfeld R. 2013. J Food Prot.76(10):1697-703

Brève dans Anses Hebdo, publiée dans l'intranet Anses le 12 avril 2024

### Réunion de clôture du projet EVANHOTY portant sur *Yersinia enterocolitica* pathogène pour l'homme

La réunion de clôture du projet EVHANOTY a eu lieu ce mardi 26 mars dans les locaux de l'Institut Pasteur de Paris, où les partenaires du projet ont été accueillis par le CNR Peste et autres Yersiniose. Ce projet de 30 mois financé par FranceAgrimer, porté par le laboratoire de Ploufragan, et intitulé « Évaluation de l'implication des filières porcine et bovine dans les yersiniose humaines en France et de l'évolution de *Yersinia enterocolitica* par l'utilisation de techniques moléculaires discriminantes » a permis de conjuguer les compétences de l'Anses (unité HQPAP du laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité AB2R de laboratoire de Fougères et la PTF- Maldi-Tof du laboratoire de Nancy), des instituts techniques IFIP-Institut du Porc et IDELE-Institut de l'élevage, et du CNR. Ce projet a apporté des éléments de réponse quant i) à la diversité génétique des *Yersinia enterocolitica* d'origine animale et humaine *via* la méthode de typage par cgMLST-1727 gènes, développée par le CNR, ii) au portage de cette bactérie par les filières porcine et bovine au travers de deux enquêtes conduites à l'abattoir par l'IFIP et l'IDELE, iii) au phénotype des souches qui traversent la chaîne alimentaire (Anses), et iiiii) sur l'utilisation de la spectroscopie infra-rouge (IR Biotyper) pour le typage des souches (Anses). Deux publications sont en cours de rédaction.



\* \* \* \* \*  
\* \* \*  
\*