



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

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 Log₁₀CFU/ml) and on ham (4.5 Log₁₀CFU/cm²) for 10-11 days. Their pathogenicity was assessed using *in vitro* assays on human intestinal *Caco-2* cells (10⁵ cells/ml of *Caco-2* cells for 10⁷ bacteria/ml). During the survival test at 4°C, an increase of 4 Log₁₀CFU/ml in BHI and of 1.5-2.0 Log₁₀CFU/cm² 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 Log₁₀ CFU/ml et pendant 10 jours sur des tranches de jambon achetées en grande surface avec un inoculum de 4,5 Log₁₀ CFU/cm². 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 $1/100^{\text{ème}}$ (10^5 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 Log₁₀ CFU/ml en BHI et de 1,5 à 2 Log₁₀ CFU/cm² 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).

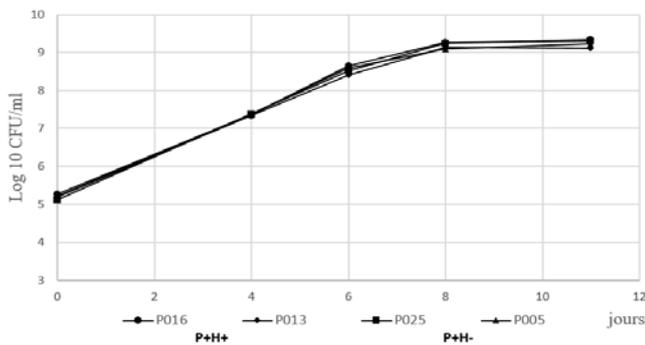


Figure 1 - Survie des souches porcines BT4 (souches codées P016 et P013 : P+H+ / souches codées P025 et P005 : P+H-) en milieu de culture BHI (Brain Heart Infusion) sur 11 jours à 4°C

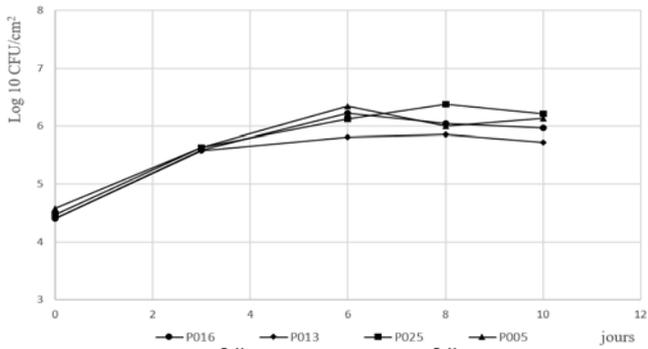


Figure 2 - Survie des souches porcines BT4 (souches P016 et P013 : P+H+ / souches P025 et P005 : P+H-) sur jambon sur 10 jours à 4°C

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).

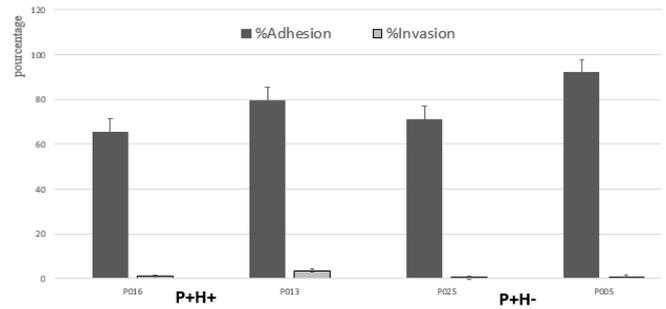


Figure 3 - Pourcentage d'adhésion et d'invasion sur *Caco-2* des quatre souches porcines BT4 (souches codées P016 et P013 : P+H+ / souches codées P025 et P005 : P+H-)

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 cm²). 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 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.
- 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.