



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieure et la Recherche scientifique

Université des frères Mentouri Constantine

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة

Faculté des science de la nature et de la vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé:

---

# Etude et identification de *Yersinia enterocolitica*. Détermination des profils antibiotypiques et électrophorétiques de l'ADN total

---

Présenté par : BOUMESSRANE ROKIA

Le : 24/06/2018

RABHI SAIDA

Jury d'évaluation :

Présidente : Mme RIAH. N (MCB-UFM Constantine1)

Rapporteur : Mme BOUZERAIB. L (MAA-UFM Constantine1)

Examineur : Mr CHABBI.R (MAA-UFM Constantine1)

*Année universitaire  
2017-2018*

# *Remerciements*

*C'est grâce à Allah le miséricordieux que l'aube du savoir à évacuer l'obscurité de l'ignorance et le soleil de la science à éclairer notre chemin pour réaliser ce modeste travail.*

*Ce travail a été réalisé au sein de laboratoire de Zoologie de la faculté de science de la nature et de la vie université Mentouri Constantine 1.*

*Nous adressons notre remerciement à madame **BOUZERAIB LATIFA** l'encadreur de notre mémoire : pour l'effort fourni, pour ses aides et gentillesse, pour les conseils qu'elle prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi tout au long de la réalisation de ce travail, ainsi que pour sa bienveillance et ses qualités profondément humaines qui ont été remarquables.*

*Nos remerciements ne sont jamais assez pour vous Madame.*

*Nous remercions également :*

*Madame « **RIAH NACIRA** » pour l'honneur qu'elle nous a fait en présidant ce jury. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect.*

*Monsieur « **CHABBI RABAH** » d'avoir accepté d'apporter son jugement à ce travail.*

*Merci à tous nos collègues du laboratoire de Zoologie pour leur matériel et moral.*

*Nous remercions également **Mr BOUFRIOUA A** et à Mme **BOUZIDI N** qui nous ont beaucoup aidés.*

*Nous n'oublierons pas de remercier tous ceux et celles qui nous ont aidés d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.*

**MERCI à tous**

# Dédicaces

*Avant tout je tiens à remercier DIEU, le tout puissant de m'avoir donné suffisamment de courage et surtout de patience pour réaliser ce modeste travail.*

*« La réussite ne se trouve pas dans la meilleurs des places ; la plus haute ou la plus payante mais dans le maximum qu'on peut tirer de soi-même »*

**RENAURD TREMBLAY**

*Je dédié ce travail :*

*A ma chère mère **SOUAD** qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour ; son soutien ; tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils ; pour toute son assistance et sa présence dans ma vie ; reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il ; l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude. Nul mot ne parviendra jamais à exprimer l'amour que je te porte.*

*A mon cher père **MESSAOUD** signe de fierté et d'honneur, ce travail est le votre, Inchallah tu trouveras ici toute mon affection et ma gratitude profonde pour toutes ces années de sacrifice pour moi.*

*Puisse dieu, le très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire une sorte que jamais je ne vous déçoive.*

*A ma très chère grande mère **ZINEB** qui est toujours dans mon cours ; je dédié aujourd'hui ma réussite.*

*A ma très chère et meilleure sœur **SALEMA** et son mari **SALAH** merci énormément pour votre soutient plus que précieux.*

*A ma jolie nièce **MAISSEM**, que tu suis mes traces et tu fasses plus que moi. Je t'aime beaucoup.*

*A mon frère **NAOUFEL**, mon ange gardien ; que dieu te garde et te protège, que ton chemin soit plein succès.*

*A **HOCINE** pour tes précieux conseils, et ton soutien moral et ta gentillesse et ta patience sans égale, sans ton encouragement ce travail n'aurais jamais vu le jour.*

*A **ASSIA, KAOUTHER, RITADJ**, qu'elles ont été là quand j'avais besoin d'elles.*

*A tous mes collègues et mes amies : **HAYET, RAYENE, RAOUNEK, NARIMEN et SAIDA**, en témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédié ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

**Rokia. B**

# *Dédicaces*

*Grace Allah*

*Avec tout respect et amour je dédie ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur*

*Tendresse leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,*

*Pour toute leur assistance et leur présence dans ma vie.*

*Merci d'être toujours là pour moi.*

*Mes chers frères Mohamed Lamine, Housseem, Imed Dine, Anis,*

*Ma chère adorable sœur Amira*

*Merci pour être toujours présents à mes côtés.*

*Ma jolie nièce Assile*

*Mon cher neveu Mohamed Wassim*

*Mes belles amies Rokia, Hayat, Samah*

*En souvenir des plus beaux instants qu'on a passés ensemble*

*A tous mes collègues de promotion de Microbiologie Générale et  
biologies moléculaire des microorganismes et spécialement :*

*Rayane, Sara, Narimene, Raounek, Amira, Hala, Rayhana,*

*Merci à Allah, avec qui tout est possible.*

*Saida. R*

---

## Résumé

---

*Yersinia enterocolitica* est une entérobactérie qui fait partie des espèces entéropathogène. Dix souches de *Y.enterocolitica* ont été purifiées, entre la période de Mars-juin 2018.

Ce travail vise à caractériser dix souches de *Y.enterocolitica* sur le plan morphologique, physiologique et les tests biochimiques par des méthodes microbiologiques standardisées. Et de déterminer leur résistance vis-à-vis des antibiotiques différents par la méthode de l'antibiogramme standard préconisé par le CLSI. Puis une analyse moléculaire par la réalisation de profils électrophorétiques de l'ADN total des souches identifiées.

Les résultats montrent que les souches ont été bien cultivées sur le milieu GN ainsi que sur les milieux sélectifs DCL et Mac Conkey à 37°C et présentent les caractéristiques suivantes : petites bacilles à Gram négatif, oxydase<sup>-</sup>, catalase<sup>+</sup>, lactose<sup>-</sup>, glucose<sup>+</sup>, gaz<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>S<sup>-</sup>, uréase<sup>+</sup>, indole<sup>-</sup>, TDA<sup>-</sup>, réduisant les nitrates en nitrites, RM<sup>+</sup>, VP<sup>-</sup>.mannitol<sup>+</sup>, mobilité<sup>+</sup> à 25°C, ONPG<sup>+</sup>, ADH<sup>-</sup>, ODC<sup>+</sup> et n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone.

L'étude de la résistance des souches utilisées aux différents antibiotiques par la méthode classique montre que : les bacilles isolées sont marquées par une forte sensibilité vis-à-vis tous les antibiotiques sauf l'amoxicilline, l'amoxicilline + l'acide clavulanique et la cefazoline, qui ont présenté une résistance.

Les profils électrophorétiques de l'ADN total des souches identifiées ont été aussi obtenus.

Nos résultats ont permis de confirmer les données des recherches antérieures sur les caractères de *Yersinia enterocolitica*.

---

**Mots clés :** Entérobactéries, *Yersinia enterocolitica*, identification, résistance aux antibiotiques, profils électrophorétiques.

---

---

## Abstract

---

*Yersinia enterocolitica* is an enterobacteria that is part of the enteropathogenic species. Ten strains of *Y.enterocolitica* were identified between the period of March-June 2018.

This work aims to identify ten strains of *Y.enterocolitica* morphologically, physiologically and biochemical tests using standardized microbiological procedures. And to determine their resistance to different antibiotics by the standard antibiogram method recommended by CLSI. Then a molecular analysis by the realization of the electrophoretic patterns of total DNA of the identified strains were done.

The results show that both strains have well grown in the GN medium as well as on the DCL and Mac Conkey selective media at 37 ° C. and present the following characteristics: small Gram-negative bacilli, oxidase-, catalase +, lactose-, glucose +, gas -, H<sub>2</sub>S-, urease +, indole-, TDA-, reducing nitrates to nitrites, RM +, VP-.mannitol +, mobility + at 25 ° C, ONPG +, ADH-, ODC + and not using citrate as a single source of carbon.

The study of the resistance of the strains used to the different antibiotics by the conventional method shows that: the isolated bacilli are marked by a high sensitivity towards all antibiotics except amoxicillin, amoxicillin + clavulanic acid and cefazoline, which showed resistance.

The electrophoretic patterns of total DNA identified strains were also obtained.

Our results have confirmed the previous research on the characters of *Yersinia enterocolitica* traits.

---

**Key words:** Enterobacteria, *Yersinia enterocolitica*, identification, antibiotic resistance, electrophoretic profiles.

---

---

## الملخص

---

*Yersinia enterocolitica* هو نوع من البكتيريا التي تنتمي الى السالالت المعوية. تم تحديد عشرة سالالت من

*Y. enterocolitica* بين الفترة من مارس وجوان عام 2018.

يهدف هذا العمل إلى وصف عشرة سالالت من *Y. enterocolitica* على الصعيد المورفولوجي ، الفيزيولوجي والبيوكيميائي باستخدام أساليب ميكروبيولوجية موحدة. ولتحديد مقاومتها للمضادات الحيوية المختلفة عن طريق الطريقة القياسية للمضادات الحيوية التي أوصت بها CLSI ثم تحقيق انماط الكتروفوروتية من الحمض النووي الكلي.

بينت النتائج أن السالالت قد نمت جيدا الوسط GN وكذلك على الوسط النتقائي DCL و Mac Conkey عند درجة الحرارة 73 درجة مئوية ولها الخصائص التالية:  $\text{petites bacilles à Gram négatif, oxydase}^-$ ,  $\text{catalase}^+$ ,  $\text{lactose}^-$ ,  $\text{glucose}^+$ ,  $\text{gaz-}$ ,  $\text{H}_2\text{S}^-$ ,  $\text{uréase}^+$ ,  $\text{indole}^-$ ,  $\text{TDA}^-$ ,  $\text{réduisant les nitrates en nitrites}$ ,  $\text{RM}^+$ ,  $\text{VP}^-$ ,  $\text{citrate}$  كمصدر وحيد الكربون.  $\text{mannitol}^+$ ,  $\text{mobilité}^+$  à 25°C,  $\text{ONPG}^+$ ,  $\text{ADH}^-$ ,  $\text{ODC}^+$ .

تبين دراسة مقاومة السالالت المستخدمة للمضادات الحيوية المختلفة بالطريقة التقليدية أن: العصيات المعزولة تتميز بحساسية عالية تجاه جميع المضادات الحيوية باستثناء الأموكسيسيلين وأموكسيسيلين + حمض clavulanic و سيفازولين ، والتي أظهرت المقاومة. وقد تم أيضا الحصول على الهجرة الكهربائية للحمض النووي الكلي للسالالت التي تم تحديدها.

وقد اكدت نتائجنا ما توصلت اليه البحوث السابقة حول خصائص *Yersinia enterocolitica*.

---

**الكلمات المفتاحية** *Yersinia enterocolitica*، البكتيريا المعوية : مقاومة المضادات الحيوية، الهجرة الكهربائية.

---

## Table Des Matières

Liste des abréviations .....	iv
Liste des tableaux .....	vi
Liste des figures.....	vii
<b>Introduction générale.....</b>	<b>01</b>
<b>Partie 1 : Synthèse bibliographique</b>	
<b>1 Les <i>Enterobacteriaceae</i> .....</b>	<b>03</b>
1.1 Définition des Enterobacteriaceae et caractéristiques principales.....	03
1.2 Classification .....	04
<b>2 <i>Yersinia</i> .....</b>	<b>06</b>
2.1 Généralités .....	06
2.2 Historique .....	06
2.3 Définition.....	08
2.4 Classification.....	09
2.5 Habitat.....	09
2.6 Caractères bactériologiques.....	09
2.6.1 Morphologie et structure .....	09
2.7 Caractères cultureux .....	09
2.8 Caractères biochimiques .....	10
2.9 Les différentes espèces de <i>Yersinia</i> .....	13
<b>2.10 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .....</b>	<b>14</b>
2.10.1 Classification et nomenclature.....	14
2.10.2 Habitat.....	15
2.10.3 Caractères bactériologiques.....	15
2.10.3.1 Morphologie et structure.....	15
2.10.4 Caractères cultureux.....	15
2.10.5 Caractères biochimiques.....	15
2.10.6 Mode de transmission.....	16
2.10.7 Pouvoir pathogène naturel.....	16
<b>2.11 <i>Yersinia pestis</i> .....</b>	<b>16</b>
2.11.1 Nomenclature.....	17
2.11.2 Habitat.....	17
2.11.3 Caractères bactériologiques.....	17
2.11.3.1 Morphologie et structure.....	17
2.11.4 Caractères cultureux.....	18
2.11.5 Caractères biochimiques.....	18
2.11.6 Mode de transmission.....	18
2.11.7 Pouvoir pathogène naturel.....	19
2.11.8 <i>Yersinia pestis</i> comme arme bactériologique.....	19
<b>3 <i>Yersinia enterocolitica</i> .....</b>	<b>19</b>
3.1 Classification et nomenclature.....	20
3.2 Habitat.....	20

3.3 Morphologie et structure.....	20
3.4 Caractères culturels, croissance et métabolisme.....	21
3.5 Facteurs de développement.....	21
3.6 Caractères biochimiques.....	22
3.7 Caractères antigéniques.....	23
3.7.1 Les antigènes somatiques (O).....	23
3.7.2 Les antigènes de flagelles (H).....	24
3.8 Pouvoir pathogène.....	24
3.9 Physiopathologie et facteurs de virulence.....	25
3.10 Source de contamination.....	29
3.11 Mode de contamination.....	29
3.12 Résistance et sensibilité aux antibiotiques.....	29
3.13 Manifestations cliniques.....	29
3.13.1 Population à risque.....	30
3.13.2 Fluctuations saisonnières.....	30
3.13.3 Dose minimale infectante.....	30
3.13.4 Durée d'incubation.....	30
3.13.5 Symptômes.....	31
3.13.6 Manifestations primaires.....	31
3.13.7 Manifestations secondaires.....	32
3.13.8 Formes généralisées et septicémiques.....	32
3.14 Le diagnostic.....	33
3.14.1 Diagnostic bactériologique.....	34
3.14.2 Diagnostic sérologique.....	35
3.15 Traitement.....	37
3.16 Épidémiologie.....	37
3.17 Prophylaxie.....	37
3.18 Autres espèces bactérienne décrites comme appartenant au genre <i>Yersinia</i> .....	37
4. Les antibiotiques.....	39
4.1 Généralités.....	39
4.2 Mode d'action des antibiotiques.....	39
4.3 Classes des antibiotiques.....	40
4.4 Résistance aux antibiotiques.....	41
4.5 Types de résistance aux antibiotiques.....	41
4.5.1 Résistance naturelle.....	41
4.5.2 Résistance acquise.....	41
4.5.3 Résistance croisée et co-résistance.....	42
4.6 Mécanismes de résistance.....	42
4.7 L'antibiogramme.....	42
4.7.1 Définition.....	42
4.7.2 Principe.....	43
4.7.3 Techniques classiques d'antibiogramme.....	43
<b>5 Analyse de l'ADN bactérien.....</b>	<b>43</b>
5.1 Extraction du matériel génétique.....	43

5.2 Visualisation de l'ADN par électrophorèse.....	44
<b>Partie 2 : Matériel et méthodes</b>	
1 Objectif de l'étude.....	45
2 Lieu d'étude.....	45
3 Matériels.....	45
3.1 Souches utilisées.....	45
4 Méthode d'étude.....	45
4.1 Revivification des souches.....	45
4.2 Identification macro et microscopique des souches.....	45
4.2.1 Examen macroscopique.....	46
4.2.2 Examen microscopique.....	46
4.3 Identification présomptive des souches.....	46
4.3.1 Identification par tests biochimiques.....	46
4.4 L'antibiogramme.....	56
4.5 Analyse de l'ADN bactérien.....	59
4.5.1 Extraction de l'ADN bactérien.....	59
4.5.2 Electrophorèse.....	60
<b>Partie 3 : Résultat et discussion</b>	
1 Identification bactériologique.....	61
1.1 Examen macroscopique.....	61
1.2 Etude microscopique.....	62
2 Identification biochimique.....	62
3 L'antibiogramme.....	73
4 Profils électrophorétiques de l'ADN.....	74
Discussion.....	75
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>80</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>82</b>
<b>Annexes</b>	

## Liste Des Abréviations

- ADH : Arginine Dihydrolase
- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- Ag : Antigène
- AMC : Amoxicilline+ acide Clavulanique
- AMX : Amoxicilline
- ARNm: Acide Ribonucléique messenger
- ATB : Antibiotique
- Aw: Activity water
- BET : Bromure d'thidium
- BGN: Bacille Gram Négatif
- BT: Biotype
- c : Chloramphénicol
- CIN : Cefsulodine-Irgasan-Novobiocine
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institue
- CTX : Céfoxitine
- DCL : Désoxycholate-Citrate-Lactose
- FOX : Céfoxitine
- GC% : Rapport Guanine- Cytosine (en %)
- Glu : Glucose
- GN : Gélose nutritive
- HLA-B27: Human leucocyte antigen B27
- HLG : Gentamicine
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :Peroxyde d'hydrogène
- H<sub>2</sub>S : Sulfure d'hydrogène
- I : Intermédiaire
- ITC : Bouillon irgasan ticarcilline et potassium chlorate
- ISO : Organisation internationale de normalisation
- Kb : Kilobase
- KCN : Cyanure de Potassium
- KIA : Kligler-Hajna
- KOH : Hydroxyde de potassium
- KZ : Cefazoline
- Lac : Lactose
- LDC : Lysine Décarboxylase
- Lps: Lipopolysaccharide
- M : Marqueur de taille
- MH : Mueller-Hinton
- NO : Nitroxoline
- NR : Nitrate Réductase

- ODC: Ornithine Décarboxylase
- ONPG: Ortho-nitrophényl-  $\beta$ -galactoside.
- OX: Oxydase
- PA : Acide Pipémidique
- PCR : Polymerase chain reaction
- PEF : Pefloxacine
- PI : Pipéracilline
- PSB : Bouillon peptoné au sorbitol et aux sels biliaires
- PYV: Plasmid for *Yersinia* virulence
- r : Résistance
- RFLP : Polymorphisme de Longueur de Fragment de Restriction
- RM : Rouge de Méthyle
- Rpm : Rotation par minute
- s : Sensible
- S : Svedberg
- SS: Gélose *Salmonella-Shigella*
- SXT : Triméthoprime + Sulfaméthoxazole
- SSDC: Gélose *Salmonella/Shigella*, au désoxycholate de sodium et au chlorure de calcium
- TBE : Tris Borate EDTA
- TDA : Tryptophane Désaminase
- TTR: Tétrathionate Réductase
- UFC :Unité Formant Colonie
- VP : Vosges-Proskauer
- Yop : *Yersinia* outer membrane proteins

## Liste Des Tableaux

<b>Tableau 01</b> : Principaux Réactions de diagnostic utilisées pour la distinction des principaux genres d'Entérobactéries.....	<b>05</b>
<b>Tableau 02</b> : Résume les caractères d'identification des espèces les plus fréquemment rencontrés chez le genre <i>Yersinia</i> .....	<b>11</b>
<b>Tableau 03</b> : Les facteurs de virulence de <i>yersinia</i> .....	<b>13</b>
<b>Tableau 04</b> : Maladies transmises par les aliments et l'eau ou par voie oro-fécale.	<b>14</b>
<b>Tableau 05</b> : Caractères différentiels des biotypes de <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	<b>23</b>
<b>Tableau 06</b> : Les principaux facteurs de virulence.....	<b>28</b>
<b>Tableau 07</b> : Spectre de yersinioses d'après Bottone (1999).....	<b>33</b>
<b>Tableau 08</b> : Caractères différentiels des espèces récentes attribuées au genre <i>Yersinia</i> (a).....	<b>38</b>
<b>Tableau 09</b> : Recherche Nitrate réductase.....	<b>64</b>
<b>Tableau 10</b> : Recherche de l'utilisation du Glucose, du lactose, de la production de Gaz et H <sub>2</sub> S sur milieu KIA. ....	<b>65</b>
<b>Tableau 11</b> : Recherche de l'utilisation du Citrate.....	<b>66</b>
<b>Tableau 12</b> : Test mannitol-mobilité.....	<b>66</b>
<b>Tableau 13</b> : Test uréase, Test de la TDA.....	<b>67</b>
<b>Tableau 14</b> : Recherche production d'indole.....	<b>68</b>
<b>Tableau 15</b> : Test rouge de méthyle (RM).....	<b>68</b>
<b>Tableau 16</b> : Test Voges Proskauer (VP).....	<b>69</b>
<b>Tableau 17</b> : Test production de la $\beta$ -galactosidase.....	<b>70</b>
<b>Tableau 18</b> : Les caractères d'identification des dix souches de <i>Y.enterocolitica</i> ...	<b>72</b>
<b>Tableau 19</b> : Les résultats de l'antibiogramme pour toutes les souches.....	<b>73</b>

## Liste Des Figures

<b>Figure 1</b> : Observation microscopique de la morphologie des <i>Entérobactéries</i> x 100.....	<b>04</b>
<b>Figure 2</b> : Observation microscopiques de la morphologie des <i>Entérobactéries</i> mobile par flagelle péritriche x100.....	<b>04</b>
<b>Figure 3</b> : Aspect des colonies de <i>Yersinia enterocolitica</i> sur milieu CIN après 24 heures d'incubation à 30°C, d'après Hallanvuo et coll. 2006.....	<b>10</b>
<b>Figure 4</b> : Aspect des colonies de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> sur milieu gélose au sang.....	<b>16</b>
<b>Figure 05</b> : Mode opératoire préconisé pour la recherche des <i>Y. enterocolitica</i> présumées pathogènes ISO 10273 (projet ISO 2003 d'après Leclercq, 2003).....	<b>36</b>
<b>Figure 06</b> : Les étapes de l'antibiogramme.....	<b>58</b>
<b>Figure 07</b> : Aspect des colonies sur Gélose Nutritive.....	<b>61</b>
<b>Figure 08</b> : Aspect des colonies sur DCL.....	<b>61</b>
<b>Figure 09</b> : Aspect des colonies sur Mac Conkey.....	<b>62</b>
<b>Figure 10</b> : Aspect microscopique (coloration de Gram) de <i>Y.enterocolitica</i> . (G×100).....	<b>62</b>
<b>Figure 11</b> : Résultat du test de catalase.....	<b>63</b>
<b>Figure 12</b> : Aspect des milieux avant utilisation ODC, LDC, ADH, Témoin.....	<b>71</b>
<b>Figure 13</b> : Production des décarboxylases ODC, LDC, ADH.....	<b>71</b>
<b>Figure 14</b> : Résultats de l'antibiogramme.....	<b>74</b>
<b>Figure 15</b> : Résultats de l'extraction de l'ADN bactérien.....	<b>74</b>
<b>Figure 16</b> : Profils électrophorétiques de l'ADN des souches.....	<b>75</b>

# **INTRODUCTION GENERALE**

## Introduction

La famille des entérobactéries regroupe l'ensemble des bacilles droits, ayant un diamètre de 0.3-1.8  $\mu\text{m}$ . Les cellules prennent une coloration à Gram négatif étant mobiles (flagelles péritriches) ou immobiles. Ce sont des germes anaérobies facultatifs et chimioorganotrophes ayant un métabolisme simultanément de type fermentatif et respiratoire. De type oxydase négative et catalase positive, la plupart réduisent les nitrites, excepté certains genres ou espèces.

Certaines espèces sont responsables des diarrhées et/ou d'infections opportunistes (infections urinaires, infections respiratoires, surinfections des plaies, septicémies, méningites). [1]

La connaissance de *Yersinia enterocolitica* remonte à une cinquantaine d'années environ, mais pendant long temps son identité est demeurée imprécise ; jusqu'à ce que Frédérikson propose en 1964, sa dénomination admise à l'heure actuelle.

Dans la famille des *Enterobacteriaceae*, *Y. enterocolitica* appartient au genre *Yersinia* qui rassemble une dizaine d'espèces omniprésentes, dont trois sont incriminées en pathologie humaine: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*.

*Y. enterocolitica* est l'une des bactéries entéropathogènes à Gram négatif, petite bacille parfois coccobacillaire, dont la mobilité dépend de la température, l'activité uréasique est remarquable.

Le réservoir est essentiellement les animaux, ainsi que l'environnement (l'eau, le sol et les aliments souillés d'origine animale ou végétale).

L'augmentation de taux des maladies humaines causés par *Y. enterocolitica* est due à la consommation d'aliments crus ainsi que la capacité de la bactérie à se multiplier à des températures basses.

Le danger *Yersinia enterocolitica* figure parmi les microorganismes émergents. En effet, bien que connue depuis 1939, *Yersinia enterocolitica* ne fait l'objet d'études microbiologiques et épidémiologiques que depuis une trentaine d'années. Elle a été sans doute potentialisée par la généralisation de l'utilisation du froid pour conserver les denrées

alimentaires. Elle demeure peu connue du grand public et des professionnels bien qu'elle puisse être à l'origine d'anadémies spectaculaires et de séquelles gênantes. [11]

L'incidence des infections à *Yersinia enterocolitica* en Algérie n'est pas connue à cause de l'absence de la recherche de cette bactérie au niveau de nos laboratoires. De plus, les procédures de routin sont coûteuses et longues. Cela entraîne probablement une sous-estimation de l'incidence des infections à *Yersinia enterocolitica*. [10]

En Algérie, ce sujet n'est abordé que par peu d'études. C'est dans ce contexte général que nous avons été amenées à entreprendre le présent travail.

Notre travail repose sur trois principaux points :

- La réalisation d'une identification présomptive en se basant sur le phénotype biochimique à l'aide d'une série de tests.
- L'étude de profil de résistance/sensibilité des souches de *Y.enterocolitica* aux antibiotiques.
- L'extraction et la visualisation de l'ADN total des souches de *Y.enterocolitica*.

Notre manuscrit comporte trois parties en premier la synthèse bibliographique ayant pour but de situer le travail dans son contexte scientifique et une deuxième présente le matériel et les différentes méthodes mise en œuvre afin de caractériser les souches de *Y.enterocolitica* et les résultats obtenus avec ces différentes méthodes sont discutés dans la troisième partie. Enfin cette partie se termine par une conclusion finale et soulignera les perspectives de ce travail.

**SYNTHESE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1 Les Entérobactéries**

### **1.1 Définition des *Enterobacteriaceae* et caractéristiques principales**

La définition de la famille est circonscrite biochimiquement et génétiquement à un large groupe apparenté qui présente une hétérogénéité substantielle du point de vue écologique, éventail d'hôtes et du pouvoir pathogène pour l'homme, les animaux, les insectes et les plantes. La position phylogénétique des entérobactéries se trouve parmi les *Gammaproteobacteria*. Leurs proches voisins sont les familles *Alteromonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae*, et *Pasteurellaceae*. [1]

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif (figure 1), le plus souvent courts (1 à 6 µm), droits, mobiles par des flagelles péritriches (figure 2) ou immobiles, se développent sur des milieux ordinaires (18 à 24 heures à pH neutre à 37°C). Non sporulés, ils sont aérobies- anaérobies facultatifs, Ils sont dépourvus d'oxydase, possédant une catalase.

Toutes les espèces fermentent le glucose en acide avec ou sans production de gaz, De manière caractéristique, les nitrites sont produits à partir de nitrates (exception *Erwinia* seulement).

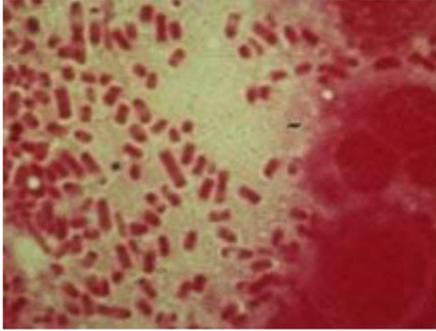
Les entérobactéries ont une composition caractéristique des bases constituant leur ADN (GC% compris généralement entre 50% et 60%), ce qui permet de les différencier des *Pseudomonas* et des *Vibrionaceae*. [2], [3]

Les différences entre les nombreux genres et espèces viennent de critères plus précis, comme la fermentation des différents sucres, la production ou non des sulfures, la production d'indole, la production d'uréase, la présence ou l'absence d'enzyme du métabolisme (désaminase, décarboxylase)...etc. [2], [3]

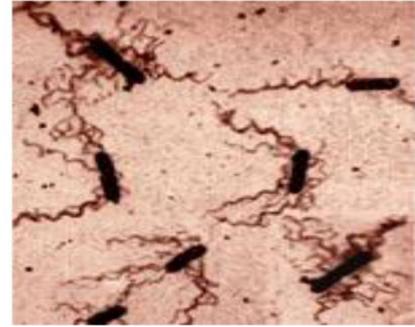
La composition antigénique est mieux décrite comme une mosaïque ce qui entraîne des interrelations sérologiques entre les différents genres, allant même jusqu'à d'autres familles. [2], [3]

De nombreux sont des parasites des animaux et certains parasites des plantes causent des brûlures et des pourritures molles. [2], [3]

Les Entérobactéries sont très répandues dans la nature, on les retrouve également dans le sol et les eaux en raison de la contamination de l'environnement par l'intermédiaire des matières fécales animales et humaines et des eaux d'égout. [2], [3]



**Figure 01:** Observation microscopique de la morphologie des *Entérobactéries* x 100. [4]



**Figure 02:** Observation microscopique de la morphologie des *Entérobactéries* mobile par flagelle péritriche x100. [4]

## **1.2 Classification des entérobactéries : [5]**

Règne : *Bacteria*.

Embranchement : *Proteobacteria*.

Classe : *Gammaproteobacteria*.

Ordre : *Enterobacteriales*.

Famille : *Enterobacteriaceae*.

**Genres principaux :** *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Enterobacter*. [6]

**Tableau 1 :** Principaux Réactions de diagnostic utilisées pour la distinction des principaux genres d'Entérobactéries. [6]

Genre	H <sub>2</sub> S	Uréase	VP	Indole	Mobilité	Gaz sulfuré	$\beta$ Galactosidase	KCN	Citrate	Utilisation d'umucate	Rouge désoxyméthyle	Utilisation de citrate	Alimentésamine	ADN(%G+C)
<i>Escherichia</i>	-	-	-	+	+/-	+	+	-	-	+	+	+	-	48-52
<i>Enterobacter</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	52-60
<i>Shigella</i>	-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	-	+	-	-	50
<i>Edwardsiella</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+/-	-	-	53-59
<i>Salmonella</i>	+	-	-	-	+	+	+/-	-	+/-	+/-	+	+/-	-	50-53
<i>Klebsiella</i>	-	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	-	+/-	-	53-58
<i>Citrobacter</i>	+/-	-	-	-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	-	50-52
<i>Proteus</i>	+/-	+	-	+/-	+	+/-	-	+	+/-	-	+	+	+	38-41
<i>Providencia</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	39-42
<i>Yersinia</i>	-	+	-	-	+ <sup>c</sup>	-	+	-	-	-	+	-	-	46-50
<i>Haemophilus</i>	-	-	+	-	+	+	+/-	+	+	-	+	-	-	46-49

<sup>c</sup> Mobile à température ambiante, immobile à 37°C.

(+): Résultat positif. (-) : Résultat négatif.

+/- : Variable.

## 2 *Yersinia*

### 2.1 Généralités

Le genre *Yersinia* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à l'embranchement de *Proteobacteria* et à la famille des *Enterobacteriaceae* et comprend une dizaine d'espèces ubiquitaires. [7]

Yersin a nommé ce genre après son professeur après la découverte de l'agent de la peste en 1894. [7]

Cependant, cet organisme (*Pasteurella pestis*) et *P. pseudotuberculosis* ont été déplacés vers le nouveau genre *Yersinia* et *P. tularensis* vers le nouveau genre *Francisella*. [7]

Les *Yersinia*, contrairement aux *Francisella* et aux *Brucella*, ont des besoins de croissance simples et ne sont pas des parasites intracellulaires. Ce genre est maintenant inclus dans la famille des *Enterobacteriaceae*. [7]

Ces organismes sont des bâtonnets Gram négatifs, pléomorphes courts, qui peuvent présenter une coloration bipolaire. Ils ne forment pas de spores et sont catalase positive, oxydase négative et micro-aérophiles ou anaérobies facultatifs. [7]

La plupart ont des animaux comme leurs hôtes naturels, mais ils peuvent produire des maladies graves chez l'homme. [7]

Le genre *Yersinia* comprend *Yersinia pestis*, la cause de la peste; *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica*, causes importantes de maladies diarrhéiques humaines et d'autres. [8]

*Francisella tularensis* a des réservoirs d'animaux vertébrés et invertébrés et occasionnellement des infections septiques chez l'homme. Plusieurs espèces de *Pasteurella* sont principalement pathogènes pour les animaux, mais peuvent également produire des maladies humaines. [8]

### 2.2 Historique

Le genre *Yersinia* fut créé en 1974 après le démembrement du genre *Pasteurella*.

Le nom *Yersinia* fut proposé dès 1944 en l'honneur d'*Alexandre Yersin* qui isola et identifia la bactérie responsable de la peste en 1894.

Ce n'est qu'en 1954 que le genre *Yersinia* a été inclus dans la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce n'est pas, pour autant, une bactérie intestinale. [9]

*Y. Pseudotuberculosis* fut décrite pour la première fois en 1883 par *Louis-Charles Malassez et William Vignal*. Au cours du temps, cette bactérie reçut de nombreux noms : *bacille de la tuberculose zoogléique* (1883), *Bacillus pseudotuberculosis* (1889), *Bacterium pseudotuberculosis rodentium* (1894) *Pasteurella pseudotuberculosis* (1936) jusqu'en 1974 où elle obtient son nom actuel.

*Y. enterocolitica* fut décrite pour la première fois en 1934 aux États-Unis par *McIver et Pike* comme une probable nouvelle espèce sous le nom de *Flavobacterium pseudomallei Whitmore*.

En 1939 et à partir de cette isolat, *Schleifstein et Coleman* décrivent cette bactérie comme proche de *Pasteurella pseudotuberculosis* (l'ancien nom de *Y. Pseudotuberculosis*) et ils la nommèrent dès 1943 *Bacterium enterocoliticum*. Elle fut également isolée en Europe une dizaine d'années après. De nombreux noms lui furent attribués : *Pasteurella pseudotuberculosis type b*, *Pasteurella X*, *Pasteurella Y*, *Germe X*.

En 1964, au Danemark, *Frederiksen* (1964) étudie 55 souches, issues principalement de chinchillas dont 2 souches de *Bacterium enterocoliticum* d'Amérique du Nord. Il trouve que ces souches sont suffisamment différentes de *Yersinia* (ex-*Pasteurella*) *pseudotuberculosis* pour justifier la définition d'une nouvelle espèce mais néanmoins assez proches pour être incluses dans le même genre. Il propose le nom d'espèce *Yersinia enterocolitica* (*Frederiksen, 1964*).

Il est apparu plus tard que de nombreuses espèces apparentées à *Y. enterocolitica* étaient des espèces de *Yersinia* environnementales différentes et non pathogènes.

En 1976, survient une première épidémie de yersiniose dans cinq écoles de l'état de New York. Après avoir consommé du lait chocolaté, 222 enfants et employés tombent malades. La contamination est vraisemblablement due au sirop de chocolat contaminé par *Y. enterocolitica* O:8 ajouté au lait pasteurisé.

Cette épidémie conduit à une véritable prise de conscience de l'importance de cette bactérie en pathologie humaine. [10], [11]

### 2.3 Définition

Les *Yersinia* sont des bacilles droits, se rapprochant parfois d'une forme sphérique, 0.5-0.8µm de diamètre et 1-3µm de longueur à Gram négatif appartenant au groupe des entérobactéries, dans l'ensemble sensibles à de nombreux antibiotiques.

Immobilisés à 37 °C, mais mobiles par des flagelles péritriches lorsqu'il est cultivé en dessous de 30 °C, à l'exception de certaines souches *Y.ruckeri* et *Y.pestis* qui est toujours immobilisés. Anaérobies facultatives

Chimioorganotrophes, ayant à la fois un métabolisme respiratoire et un type de métabolisme fermentaire. La température optimale est de 28°C-30 °C.

D-Glucose et d'autres glucides sont catabolisés avec la production d'acide, mais peu ou pas de gaz, produisant une uréase très active (base de l'identification) mais pas de tryptophane désaminase.

Le genre *Yersinia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et regroupe aujourd'hui 18 espèces : *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. aleksiciae*, *Y. massiliensis*, *Y. similis*, *Y. entomophaga*, *Y. pekkanenii*, *Y. nurmii* et *Y. wautersii*.

*Yersinia pestis*, la cause de la peste; *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica*, causes importantes de maladies diarrhéiques humaines. *Y. wautersii* est la dernière espèce décrite et serait potentiellement pathogène pour l'homme. *Y. ruckeri* est un pathogène important des poissons, en particulier des salmonidés, responsable de la maladie entérique de la bouche rouge. [8], [10], [12], [13], [14]

*Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* peuvent traverser la muqueuse gastro-intestinale pour infecter les tissus sous-jacents, *Y. pestis* pénètre dans le corps par piqûre d'insecte et ainsi, n'a à traverser aucune surface du corps d'elle-même. [15]

### 2.4 Classification

Selon la référence [16]

Règne : *Bacteria*.

Division: *Proteobacteria*.

Classe: *Gammaproteobacteria*.

Ordre: *Enterobacteriales*.

Famille: *Enterobacteriaceae*.

Genre: *Yersinia*.

### 2.5 Habitat

Les *Yersinia* se trouvent dans l'eau, le sol et sur les végétaux, ainsi que dans le tube digestif ou les déjections des animaux ou humains malades ou porteurs sains. Les germes peuvent se propager à partir des carcasses ou cadavres. [17]

Plus occasionnellement, une grande variété d'animaux peuvent être porteurs asymptomatiques tels les animaux de compagnie (chatons et chiots), les moutons, les chevaux, les rats. L'homme se contamine le plus souvent par consommation de viandes de porc mal cuites ou par contact avec des animaux infectés. L'homme n'est qu'un hôte accidentel. [18]

### 2.6 Caractères bactériologiques

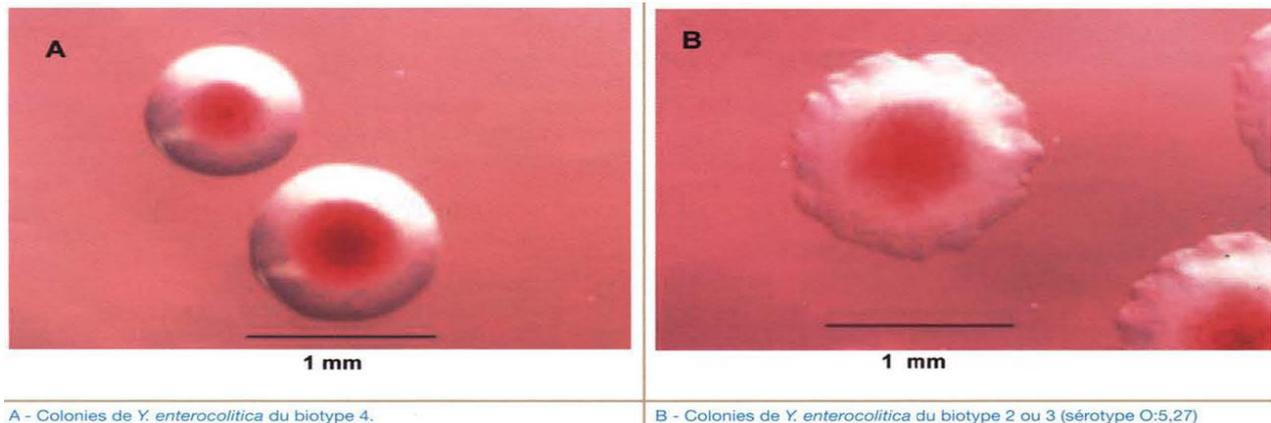
#### 2.6.1 Morphologie et structure

Bacilles droites, s'approchant parfois d'une forme sphérique, 0.5-0.8µm de diamètre et 1-3µm de longueur. Gram négatif. Immobiles à 37°C, mais mobiles par des flagelles péritriches lorsqu'il est cultivé en dessous de 30 °C, à l'exception de certaines souches *Y.ruckeri* et *Y.pestis* qui est toujours immobiles. La température optimale est de 28-30 ° C. [13]

#### 2.7 Caractères cultureux

Petites Colonies fines, pousse mieux à 28°C sur Gélose ordinaire. [19], [20]  
Actuellement, le milieu CIN (cefsulodine-irgasan novobiocine) décrit par Schiemann est recommandé. La gélose est ensemencée avec un échantillon de selles, puis est incubée à 28-29°C (ou à température ambiante). Après 18-24 heures, les colonies (à centre rouge sombre, par suite de la fermentation du mannitol inclus dans le milieu) ont un très faible diamètre (0,5 mm). Elles grandissent si l'incubation est maintenue 18 heures supplémentaires, et atteignent

alors un diamètre de 2 à 3 mm (Figure 03) cet aspect morphologique des colonies est très caractéristique de *Yersinia*. [21]



**Figure 3 :** Aspect des colonies de *Yersinia enterocolitica* sur milieu CIN après 24 heures d'incubation à 30°C, d'après Hallanvuo et coll. 2006. [22]

### 2.8 Caractères biochimiques

Les différences entre les nombreux genres et espèces viennent de critères plus précis, comme la fermentation des différents sucres, la production ou non de sulfure, la production d'indole, la production d'uréase, la présence ou l'absence d'enzymes du métabolisme (désaminases, décarboxylases)...etc. [23], (Tableau02)

**Tableau 2** : Résumé les caractères d'identification des espèces les plus fréquemment rencontrées chez le genre *Yersinia* [24]

	<i>Y.pestis</i>	<i>Y.pseudotuberculosis</i>	<i>Y.enterocolitica</i>
Mobilité à 28°C	-	+	+
Mobilité à 37°C	-	-	-
Uréase	-b	+	+
Indole	-	-	d
RM à 28°C	+	+	+
RM à 37°C	+	+	+
VP à 28°C	-	-	+
VP à 37°C	-	-	-
Citrate de Simmons à 28°C	-	d*	-
Citrate de Simmons à 37°C	-	-	-
Malonate	-	d*	-
Citrate de Christensen	-	-	d*
NO <sub>3</sub> →NO <sub>2</sub> /type	d/b	+/b	d/b
Fermentation glucose OF	+	+	+
Gaz en glucose	-	-	-
H <sub>2</sub> S (kligler)	-	-	-
TTR	d	-	d
TDA	-	-	-
LDC	-	-	-
ODC	-	-	d
ADH	-	-	-
ONPG	+	+	d
PNPX (β-xylosidase)	+	+	-
Lipase (tween80)	-	-	d
Dnase	+	+	d
Gélatinase	-	-	+
polypectate	+	+	+
Acidification de :			
Glucose	+	+	+
Glycérol	D	+	+
L-arabinose	+	+	+
D-arabinose	-	-	-
D-xylose	+	+	d
L-xylose	-	-	-
Adonitol	-	-	-
Galactose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Sorbose	-	-	+
Rhamnose	-	+	-
Dulcitol	-	-	-
Cellobiose	-	-	+
Maltose	d	+	+
Lactose	-	-	-/+
Mélibiose	d	+	-
Saccharose	-	-	d
Tréhalose	+	+	d
Raffinose	-	-	-
Inositol	-	-	+
Mannitol	+	+	+
sorbitol	-	-	+
Esculine (noircissement)	+	+	d

a : les tests réalisés à 28°C hormis ceux mentionnés à 37°C. Les recherches enzymatiques sont effectuées à 37°C à partir de culture bactériennes incubées à 28°C.

-b : certaines souches de *Y.pestis* en primo culture sont uréase positive.

\* : les souches du sérotype IV de *Y.pseudotuberculosis* sont positives. B: Nitrate réductase type B.

+: Résultat positif      - : Résultat négatif      d : variable

d/b : variable selon le biotype

d\* : Variable selon le sérotype IV de *Yersinia pseudotuberculosis*

+/- : négatif dans la majorité des cas.

**2.9 Les différents Espèces de yersinia**

*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*,  
*Y. frederiksenii*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. aleksiciae*, *Y. massiliensis*, *Y. similis*, *Y. entomophaga*, *Y. pekkanenii*, *Y. nurmii* et *Y. wautersii*. [10]

**Tableau 3** : les facteurs de virulence de *yersinia* [7]

Emplacement du gène	Phénotype	Fonction	Présence de phénotype			Effet de la perte de fonction sur la virulence
			<i>Y.pestis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y.pseudotuberculosis</i>	
Plasmide (72Kb)	Vwa	Ca <sup>+</sup> exigence	+	+	+	Réduction profonde
		Synthèse de V Ag	+	+	+	
		Synthèse de W Ag	+	+	+	
		Synthèse de POMP <sub>s</sub>	* +	+	+	
		production de fibrilles de surface	Nk <sup>+</sup>	+	+	
		Hémagglutination résistant au mannose	Nk <sup>+</sup>	+	+	
		Autoagglutination; hydrophobie de surface	-	+	+	
		La résistance à l'action bactéricide du sérum.	-	+	-	
		Cytotoxicité pour les macrophages	+	+	+	
		Adhésion aux cellules épithéliales	-	+	+	
		Résistance à la phagocytose par les macrophages	+	+	Nk <sup>+</sup>	
Plasmide (9 Kb)	Pst				Réduction majeure	
Plasmide (-100Kb)		synthèse de pesticide, de coagulase et de fibrinolysine.	+	-	-	
		synthèse de toxine murine (probable)	+	-	-	
Chromosome	Fra	synthèse d'Ag capsulaire (F1)	+	-	-	Réduction mineure chez les cochons d'Inde mais pas chez les souris
	Pgm	Stockage de l'hémine exogène	+	-	-	Réduction majeure
	Inv	Capacité d'envahir les cellules épithéliales en culture.	Nk <sup>+</sup>	nk	+	Seulement dosé in vitro
		synthèse d'entérotoxine thermostable	Nk <sup>+</sup>	+	Nk <sup>+</sup>	Aucun

\* :Non synthétisé sur la croissance en culture; synthétisé pendant l'infection in vivo. Nk<sup>+</sup> : Pas connu.

(+) : Résultat positif (-) : Résultat négatif

**Tableau 4 :** Maladies transmises par les aliments et l'eau ou par voie oro-fécale : [25]

Maladies	Bactéries	Cibles	Symptômes et signes	Transmission
Yersiniose	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Tractus Gastro-intestinal	Entérite, entérocolite, Fièvre, selles aqueuses, lymphadénite mésentérique aiguë, arthrite, érythème noueux.	Aliments, eau, animaux
Peste	<i>Yersinia pestis</i>	Voies lymphatiques, poumons	Hémorragies sous cutanées, fièvre, céphalée, Fatigue, bubons, lymphadénite, Sepsis, pneumonie.	Puce, aérosol.

### 2.10 *Yersinia pseudotuberculosis*

Découverte en 1883 par Malassez et Vignal chez un cobaye inoculé à partir d'un nodule cutané d'un enfant mort de méningite tuberculeuse, *Y. pseudotuberculosis* responsable de la « tuberculose zoogléique » ou « pseudotuberculose » (ainsi nommée en raison de l'aspect macroscopique des lésions constatées chez les animaux), fut ensuite retrouvée chez un grand nombre d'espèces animales. [24]

L'espèce *Y. pseudotuberculosis* comprend six sérotypes (I à VI), le sérotype I étant le plus fréquent. [26]

#### 2.10.1 Classification et nomenclature

Une vingtaine d'appellations ont été successivement proposées, parmi lesquelles : bacilles de la tuberculose zoogléiques (Malassez et Vignal, 1883), *Bacillus pseudotuberculosis* (Pfeiffer, 1889), *Bacterium pseudotuberculosis rodentium* (Lehmann et Neumann, 1896), *Pasteurella pseudotuberculosis* (Topley et Wilson, 1936), *Cillopasteurella pseudotuberculosis rodentium* (Prévost, 1948), *Yersinia pseudotuberculosis* (Mollaret et Thal, 1974). [24]

### 2.10.2 Habitat

*Y.pseudotuberculosis* est présente chez l'homme et les animaux malades (ganglions mésentériques, fèces, sang, micro-abcès disséminés), chez les porteurs sains (éventuellement l'homme mais surtout les animaux, rongeurs et oiseaux, qui constituent le réservoir principal). *Y. pseudotuberculosis* est rarement isolée dans l'environnement et les infections se produisent avec la consommation de végétaux souillés par des animaux. [10], [24]

### 2.10.3 Caractères bactériologiques

#### 2.10.3.1 Morphologie et structure

*Yersinia Y. pseudotuberculosis* est un bacille coccoïde, asporulé, anaérobie facultatif Gram négatif qui appartient au genre *Yersinia* et à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il est mobile à la température ambiante mais non mobile à 37 °C. Les membres de cette espèce mesurent habituellement 0,5-0,8 µm par 1-3 µm. Il possède 15 sérotypes différents (8 groupes thermostables, I-VIII, avec 9 sous-types et 5 antigènes H thermolabiles, a-e); le sérotype O:1 est responsable de 60 à 70 % des cas de pseudotuberculose humaine (à *Yersinia*). Les sérogroupes sont déterminés par les antigènes présents dans la bactérie. [27]

#### 2.10.4 Caractères cultureux

Les colonies de *Yersinia pseudotuberculosis* sur gélose nutritive ont une surface granuleuse. Un centre surélevé et plus opaque et un bord diffus transparent. (Gélose B nutritive, 24 heures à 37°C ; lumière réfléchie + lumière transmise indirecte).

*Yersinia pseudotuberculosis* sur gélose au sang au bout de 2 jours. Les colonies sont moins bien différenciées que sur gélose nutritive et même au bout de 2 jours, ne présentent pas les bords flous que l'on voit sur gélose nutritive. (Gélose B au sang, 2 jours à 37 °C ; lumière réfléchie) (Figure 04). [28]

#### 2.10.5 Caractères biochimiques

*Y.pseudotuberculosis* ne produit pas de gaz lors de fermentation sucrées.

Les souches de *Y.pseudotuberculosis* sont d'une très grande homogénéité biochimiques seules les souches du séro groupe 4 diffèrent par l'utilisation du citrate de

Simmons et du malonate. Enfin de rares souches peuvent acidifier l'adonitol en 3 jours. L'activité uréasique en milieu urée-indole est intense et rapide (positive en 5 à 10min). [24]

### 2.10.6 Mode de transmission

Le principal mode de transmission est la voie fécale orale, soit directement par contact avec des animaux infectés soit, plus fréquemment, par ingestion d'aliments souillés (eau, lait, divers aliments dont la viande de porc). [26]

### 2.10.7 Pouvoir pathogène naturel

Les infections dues aux *Yersinia* sont appelées yersiniose. Les infections à *Y.pseudotuberculosis* peuvent être décrites sous le terme de pseudotuberculose. Elles sont réparties dans le monde entier même si leur incidence est supérieure dans les pays froids et tempérés. Elles peuvent toucher toutes les tranches d'âges. [10]

L'adénite mésentérique est plus fréquente avec *Y.pseudotuberculosis*. Elle survient, en général, chez des enfants âgés de plus de 5 ans. Elle se manifeste par des douleurs abdominales dans la fosse iliaque droite, de la fièvre et des vomissements ; la diarrhée est rare. Cette symptomatologie simule une appendicite aiguë et les malades subissent le plus souvent une appendicectomie. [12]



**Figure 04 :** Aspect des colonies de *Yersinia pseudotuberculosis* sur milieu gélose au sang. [29]

### 2.11 *Yersinia pestis*

*Y.pestis* (ex *Pasteurella pestis*), ou bacille de Yersin, est l'agent de la peste, maladie des rongeurs éventuellement transmissible à l'homme.

Après les deux pandémies classiques (peste de justinien du VI<sup>e</sup> siècle ; peste noire de 1347-1352 avec persistance en Europe jusqu'en 1845), *Y.pestis* a été isolée durant la troisième pandémie par Yersin à Hong-Kong en juin 1894, à partir de bubons de pestiférés puis de cadavres de rats. [24]

Des études récentes suggèrent que *Y.pestis* est un clone dérivé de *Yersinia pseudotuberculosis*, par acquisition de 2 plasmides supplémentaire. Il serait apparu il y a 9000 à 40000 ans. [30]

### 2.11.1 Nomenclature

La nomenclature du bacille changea de nombreuses fois, passant de *Bacterium pestis* à *Bacillus pestis* en 1900 puis *Pasteurella pestis* en 1923 en référence au mentor de Yersin. Depuis 1974, le bacille porte le nom de *Yersinia pestis* en l'honneur de son découvreur. [10]

### 2.11.2 Habitat

Le réservoir est essentiellement le rat et le vecteur la puce, qui contamine l'homme par piqûre. [26]

Dans le milieu extérieur *Y.pestis* est capable de se conserver dans le sol et même de s'y multiplier. Elle été retrouvée dans le sol de terriers de rongeurs morts de peste. En dehors de ces conditions particulières, *Y.pestis* ne persiste pas dans le matériel infecté (pus, expectoration, pansement). [24]

La plasticité génomique de *Y.pestis* lui permet de s'adapter continuellement et de coloniser de nouvelles niches écologiques (milieu urbain, ou semi-désertique, forêt) et de nouveaux réservoirs (musaraignes, chameaux, hérissons). [30]

### 2.11.3 Caractères bactériologiques

#### 2.11.3.1 Morphologie et structure

*Y.pestis* apparaît dans les conditions de culture usuelle comme un petit bacille (1.5 µm x 0.4), immobile, non sporulé, à Gram négatif, présentant un certain pléiomorphisme (forme coccobacillaires associées à des formes bacillaires à bouts ronds ; courtes chainettes de 3 à 5 éléments, surtout en milieu liquide). à partir de cultures en milieux enrichis en sérum ou lors

d'examen direct d'organe de malades, on peut noter la présence d'une enveloppe que certains auteurs désignent comme une capsule. [24]

Les souches de *Y. pestis* sont subdivisées en 3 biovars: *Antiqua*, *Medievalis* et *Orientalis*. Il se différencie par leur capacité à réduire les nitrates en nitrites et à fermenter le glycérol. [30], [31]

### 2.11.4 Caractères cultureux

*Y.pestis*, aéro-anaérobie facultative, est auxotrophe et nécessite la présence de cinq acides aminés (cystéine, méthionine, proline phénylalanine, thréonine) et des facteurs de croissance (biotine, thiamine) pour utiliser une source d'énergie en milieu minimal. [24]

*Y. pestis* se distingue des deux autres bactéries par un temps de génération deux fois plus long et par ses autotrophies. En effet, *Y. pestis* ne croît que dans des milieux supplémentés en glycine, phénylalanine, valine, isoleucine et méthionine. [31]

Après 24 h d'incubation sur gélose au sang, les colonies sont gris-blanc, translucides et généralement beaucoup plus petites que celles des autres *Enterobacteriaceae* ou considérées comme des colonies individuelles, mais après 24 h d'incubation, les colonies sont environ 1-2 mm de diamètre, de couleur gris-blanc à légèrement jaune et opaque. [32]

### 2.11.5 Caractères biochimiques

*Y.pestis* ne produit jamais de gaz lors de la fermentation de substrats carbonés.il existe des souches fermentant le rhamnose en 3 à 5 jours, mais ce sucre n'est jamais acidifié en 24h. De même des souches fraîchement isolées de malades peuvent posséder une activité uréasique qu'elles perdent après subculture. Il existe trois variétés (chimiotypes) de *Y.pestis*, et qui correspondent à des répartitions géographiques particulières. [24]

### 2.11.6 Mode de transmission

*Y.pestis* est transmise de vertébrés infectés à vertébrés sains par piqure de puce.

Environ 200 espèces ou sous-espèces de rongeurs ont été reconnues naturellement infectées ; celles des familles *Sciuridae* et des *Muridés* sont les plus généralement impliquées dans la circulation de *Y.pestis*. [24]

La transmission est possible par voie aérienne, par inhalation de gouttelettes aérienne contaminées, donnant naissance à la peste pulmonaire, encore plus grave et plus rapidement mortelle. [17], [33]

### 2.11.7 Pouvoir pathogène naturel

La peste est due à *Y.pestis*, un bacille à Gram négatif. Cette maladie, qui touche principalement les rats, se transmet d'un animal à un autre par la puce du rat, *Xenopsylla cheopis* infectées par *Yersinia pestis*. [34] [35]

*Y.pestis*, contenant les gènes du virulon Yop (*Yersinia* outer membrane proteins).

Il y a trois formes cliniques majeures de la peste. La peste bubonique ; la peste septicémique et la peste pulmonaire. Une fois introduite dans le sang, *Y.pestis* échappe au système immunitaire de l'hôte en se multipliant et en proliférant à l'intérieur de macrophages inactifs, qui constituent son principal réservoir chez l'homme. [36], [37]

### 2.11.8 *Yersinia pestis* comme arme bactériologique

Le premier cas de guerre biologique mentionné dans l'histoire remonte aux années de la grande peste au 14<sup>e</sup> siècle quand les Tartares catapultèrent des cadavres pestiférés par dessus les remparts de Kaffa (aujourd'hui la presqu'île de Crimée), une stratégie qui leur permit de conquérir la ville en quelques jours.

Les survivants qui parvinrent jusqu'en Europe provoquèrent l'extension foudroyante de ce fléau qui coûta la vie à un tiers de la population de l'Europe d'alors. Au siècle dernier, divers pays ont cultivé des virus de la peste dans le but de produire une arme biologique sous forme d'aérosol. Plusieurs propriétés de *Yersinia pestis* en font un bon candidat à l'arme biologique. Les virus sont relativement résistants aux influences environnementales. Ils sont de plus disséminables sous forme d'aérosols et du fait qu'ils sont transmissibles d'homme à homme, ils se propagent rapidement. [38]

## 3 *Yersinia enterocolitica*

*Y. enterocolitica* a été identifié en 1939 et nommé par Frederiksen en 1964. [39]  
*Y. enterocolitica* s'imposa, en 1962, par la vague épizootique qui détruisit les élevages de chinchillas d'Europe occidentale. Elle atteignit ensuite les lièvres puis les porcs. À partir de 1964, les cas humains apparaissent et les années suivantes, la liste des espèces atteinte et celle des pays infectés cessent de s'accroître. Par la suite, la découverte de souche gardées en

collection, isolées aux États-Unis dès 1939 ou en Suisse en 1949, montra qu'en fait cette espèce attendait seulement les conditions nécessaires à sa diffusion. [24]

*Yersinia enterocolitica* est différenciée par diverses caractéristiques biochimiques, la structure antigénique, et son insensibilité aux phages spécifiques des autres yersinias. En dépit de cela, la bactérie semble posséder une pathogénicité naturelle similaire à celle du bacille de Mallasez et de Vignal, et les images anatomo-pathologiques qui l'accompagnent chez l'homme et chez les animaux, rappellent celles de l'infection par *Yersinia pseudotuberculosis*. [40]

Seules certaines souches sont pathogènes (sérotypes O:3 et O:9 et dans une moindre mesure 5 et 8). [41]

### 3.1 Nomenclature :

Selon la référence [24], [42]

Schleifstein et Coleman (1943) proposent le nom *Bacterium enterocoliticum*.

*Pasteurella X*.

*Pasteurella pseudotuberculosis* type B.

*Germe X*.

*Y. enterocolitica*.

*Yersinia X*.

### 3.2 Habitat

Elle est largement répandue dans le sol, les eaux, les végétaux, dans les produits alimentaires et en particulier dans les volailles et produits à base de viandes de volailles. [43], [44].

Il existe des souches adaptées à un environnement ou à un hôte (homme ou animal) et des souches non adaptées rencontrées dans le sol, l'eau, le tube digestif des micromammifères. [45]

### 3.3 Morphologie et structure

Il s'agit d'un bacille droit, souvent coccobacillaire, Gram<sup>-</sup>, immobile à 37 °C et mobile à 30°C par une ciliature péritriche, de longueur 1,0-5 µm et une largeur de 0,5-0,8 µm.

La culture est possible sur des milieux sélectifs comme Hektoen, SS, DCL. Cependant le milieu CIN (cefsulodine, irgasan, novobiocine) est préféré, car il est capable de détecter de

faible quantité de *Yersinia enterocolitica* dans les selles. Ces milieux sont incubés à 30°C pendant 24 à 48 heures. [46], [47]

Non capsulé, les flagelles péritriches sont rarement nombreux (1 à 18) et n'apparaissent que si les bactéries sont cultivées à une température inférieure à 30°C. [24]

### 3.4 Caractères culturels, croissance et métabolisme

*Yersinia enterocolitica*, culture sur milieu CIN. Le milieu CIN (cefsulodine-irgasan-novobiocine) est sélectif pour isoler *Y. enterocolitica* dans les selles. Après 48 h d'incubation, *Y. enterocolitica* apparaît sous formes de colonies roses à centre rouge (Gélose CIN, 48 h à 37°C). [48]

Sur les milieux solides usuels, *Y. enterocolitica* produit, après 24 h d'incubation à 28°C, des colonies lisses, translucides, légèrement bleutées, à bords irréguliers, d'un diamètre de 1.5 mm, qui atteignent 3 mm de diamètre en 48 h.

En milieu liquide, la culture de *Y. enterocolitica* est peu abondante en 24 h (léger trouble) mais si, en 48 h, elle ressemble à celle des autres Entérobactéries (trouble avec ondes moins nettes). Il n'y a pas de présence de dépôts floconneux comme ceux observés pour *Y. pestis* ou *Y. pseudotuberculosis*.

Les souches de *Y. enterocolitica* cultivent bien sur les milieux aux sels biliaires et notamment sur milieu SS si l'incubation est réalisée à 28°C. La taille des colonies sur ce milieu est moitié moindre que sur gélose ordinaire.

Les souches de *Y. enterocolitica* sont presque toutes prototrophes à 28°C et auxotrophes à 37 °C ou elles nécessitent l'apport de facteur de croissance (biotine et thiamine).

Les voies du métabolisme intermédiaire de *Y. enterocolitica* ont été peu étudiées mais devraient correspondre à celles d'autres Entérobactéries. Toutefois, contrairement à *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* produit de l'acétoïne. [24]

### 3.5 Facteurs de développement

- **Température :** La capacité de *Y. enterocolitica* à se multiplier à basse température est un sujet de préoccupation majeur pour les producteurs d'aliments. La plage de croissance rapportée est de -2 à 42 °C. La température optimale est de 28-29 °C, alors

qu'à 37°C cette bactérie devient exigeante en facteurs de croissance. A température tiède, la salaison ou les bactéries lactiques inhibent sa croissance.

La congélation ralentit la multiplication, mais elle ne l'inhibe pas complètement.

*Y. enterocolitica* peut se multiplier dans les aliments comme la viande et le lait à des températures approchant et même au-dessous de 0 °C. (*Yersinia* est inactivée en partie lors du caillage du lait et en totalité pendant l'affinage, elle est réduite par la pasteurisation). Le temps de génération à la température optimale de croissance (environ 28-30°C) est d'environ 34 minutes. [49], [50], [51]

- **Type respiratoire** : Aéro-anaérobies facultatives, les *Yersinia* ont un type respiratoire à la fois oxydatif et fermentatif. Le glucose et d'autres oses sont fermentés avec acidification, mais sans production de gaz ou presque. [11]
- **pH** : *Y. enterocolitica* est capable de se multiplier sur une échelle de pH allant d'environ 4 à 10, avec un pH optimal de croissance autour de 7,6. Le pH minimum pour la croissance a été rapporté entre 4,2 et 4,4. [52], [49]
- **Activité de l'eau** : Comme les autres bacilles à Gram négatif, *Y. enterocolitica* est un microorganisme très hygrophile. L'*Aw* (*Activity water*) minimale permettant sa croissance à température optimale est relativement haute : 0,96 - 0,97. [53], [54], [55]

### 3.6 Caractères biochimiques

Comme les autres espèces de *Yersinia*, *Y. enterocolitica* ne produit pas de gaz à partir de substrats carbonés acidifiés.

Et pour certains caractères biochimiques d'identification (les tests VP,  $\beta$ -galactosidase, ornithine décarboxylase et fermentation de sucres sont généralement positifs à 20 ou 28 °C et négatifs à 37°C)

Les *Yersinia enterocolitica* sont lactose<sup>-</sup>, possèdent une uréase mais pas de désaminase.

Cette hétérogénéité a permis de subdiviser *Y. enterocolitica* en 5 chimiotypes dont les caractères sont donnés dans le tableau 05. [24], [56]

Au point de vue biochimique, elle est proche des *Proteus*. [41]

**Tableau 05** : Caractères différentiels des biotypes de *Yersinia enterocolitica*. [57]

	Indole	DNase	Lipase <sup>(1)</sup>	Nitrites <sup>(2)</sup>	Xylose	Saccharose	D-tréhalose
Biovar 1	+	-	+	+	+	+	+
Biovar 2	+	-	-	+	+	+	+
Biovar 3	-	-	-	+	+	+	+
Biovar 4	-	+	-	+	-	+	+
Biovar 5	-	+	-	-	-	V	-

(1) : Technique de Tween (2) : Réduction de nitrates en nitrites.

(+) : Résultat positif. (-) : Résultat négatif.

V : Variable.

### 3.7 Caractères antigéniques

L'étude antigénique des souches de *Yersinia enterocolitica* et des espèces apparentées permet de caractériser plus de 78 antigènes O et plus de 48 antigènes H. [58]

Ils définissent des sérogroupes utiles pour les études épidémiologiques. Un petit nombre de sérogroupes est associé à une pathologie humaine ou animale. Une modification de la distribution des types des souches isolées dans les selles chez l'homme est observée depuis 1985. En effet, si O:3 est toujours le plus fréquent, O:9 semble en régression et il y a une notable augmentation des souches de chimiotype 1 (O:6 ; O:5...), réputées non pathogènes, dans d'authentiques syndromes diarrhéique. [45]

#### 3.7.1 Les antigènes somatiques (O)

*Y. enterocolitica* possède des antigènes de paroi (somatiques) ou antigènes O qui correspondent aux polysides fixés sur les lipopolysaccharides (LPS) et qui constituent les endotoxines des bactéries à Gram négatif. [23]

Le lipopolysaccharide (LPS) est un constituant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. C'est une molécule complexe composée de trois segments : Un lipide A, un core qui est un oligosaccharide et une chaîne polysaccharidique qui est l'antigène O. Le core est ramifié. [59]

Le lipide A serait responsable de l'activité endotoxine et jouerait un rôle central dans la septicémie et le choc septique aux bactéries à Gram négatif. [60]

Pensent que le core serait à l'origine de la résistance aux mécanismes de défense, particulièrement ceux qui impliquent des peptides bactéricides. [61]

Le rôle de l'antigène O n'est pas encore élucidé mais on sait qu'il est nécessaire à l'expression de virulence complète. [59]

Il est important de noter qu'il existe des communautés antigéniques entre *Yersinia enterocolitica* O:9 et *Brucella abortus* si bien que chez l'homme et chez les animaux, les sérums des sujets infectés par *Yersinia enterocolitica* donnent ou peuvent donner une réponse positive vis-à-vis des tests utilisés dans le diagnostic ou le dépistage des brucelloses (séroagglutination de Wright, épreuve à l'antigène tamponné, fixation du complément, ELISA...). [58]

### 3.7.2 Les antigènes de flagelles (H)

Les espèces mobiles possèdent en plus des antigènes de flagelles ou antigènes H de nature protéique, constitués de flagellines. [24]

### 3.8 Pouvoir pathogène

L'intérêt médical de *Y. enterocolitica* n'est reconnu que depuis 1960. Ce germe est surtout responsable d'entéocolites aiguës et de syndromes pseudo-appendiculaires observés surtout chez l'enfant de 8 à 12 ans. Des polyarthrites inflammatoires réactionnelles et des érythèmes noueux ont été observés. Ces formes extra-digestives seraient consécutives à des formes digestives peu intenses. Elles sont observées préférentiellement chez des adultes jeunes appartenant au groupe tissulaire HLA-B27.

Les septicémies sont beaucoup plus rares et surviennent chez des sujets âgés ou fragilisés par un diabète. Une cirrhose, un cancer ou une surcharge en fer.

L'aptitude de *Y. Enterocolitica* à se multiplier à +4°C explique que cette bactérie soit responsable de plus de la moitié des chocs septiques post-transfusionnels, souvent mortels, qui ont été décrits. Aucun des tableaux cliniques réalisés n'est en lui-même évocateur et c'est l'isolement du germe au laboratoire qui permet de faire la preuve étiologique. Des examens sérologiques peuvent être utiles pour documenter une arthrite ou un érythème noueux. *Y. enterocolitica* a aussi été retrouvée par coproculture systématique chez des porteurs sains. [62]

### 3.9 Physiopathologie et Facteurs de virulences

*Yersinia enterocolitica* est un pathogène entérique causant une variété de syndromes gastro-intestinaux et systémiques, y compris l'entéocolite, l'iléite terminale, la lymphadénite mésentérique et la septicémie. L'infection est initiée lorsque les cellules *Y. enterocolitica* pénètrent dans les plaques de Peyer et prolifèrent dans le tissu lymphoïde de l'intestin grêle. De là, les bactéries peuvent être disséminées dans tout le corps. Il existe des preuves que l'invasine de la protéine de la membrane externe codée par un chromosome (Inv) est requise pour le processus d'entrée initial. Inv médie la liaison à de multiples récepteurs de l'intégrine b1 des cellules de mammifères et favorise par la suite l'internalisation du micro-organisme. [63]

*Yersinia enterocolitica* fut la première espèce pour laquelle les capacités invasives ont été rattachées à la présence d'un plasmide pYV de 70 kb environ (plasmid for *Yersinia* virulence), nécessaire à l'expression complète de la virulence. [45], [11]

Les produits de ces gènes correspondent aux différentes protéines d'adhésion/invasion (Yad A), antiphagocytaire (Yop), de transformation et d'excrétion des protéines Yops et de régulation (Lcr, antigène V). [45]

Les bactéries ingérées atteignent l'iléon terminal. Elles traversent la muqueuse au niveau des cellules M recouvrant les plaques de Peyer. Elles prolifèrent surtout dans les tissus lymphoïdes associés au tube digestif et gagnent généralement les ganglions mésentériques. Elles ont une localisation principalement extracellulaire.

*Yersinia enterocolitica* a la capacité d'envahir des cellules épithéliales (ce qui lui permet de traverser la muqueuse intestinale). Deux protéines, situées dans la membrane externe, sont impliquées dans ce processus et sont codées par des gènes chromosomiques. La première, l'invasine, (gène *inv*) n'est produite que vers 28°C. Elle intervient probablement à la phase initiale de l'infection et se lie à une intégrine de la cellule eucaryote. [64]

La seconde, produite par le gène *ail* (*Attachement/ Invasion Locus*), s'exprime à 37°C. La bactérie possède également un plasmide de virulence qui porte un gène pour une adhésine et les gènes des protéines Yop (*Yersinia* Outer-Membrane Proteins). Les gènes plasmiques permettent à la bactérie d'injecter dans les cellules eucaryotes certaines protéines Yop qui ont pour effet de désorganiser la signalisation intracellulaire et cytosquelette. Il en résulte une incapacité des macrophages à phagocyter les bactéries. [64]

La régulation des gènes de virulence est sous la dépendance de la température et/ou du pH et de concentration en calcium. L'expression de Yops est optimale à 37°C en absence de calcium. *Y. enterocolitica* produit, à 26°C mais pas à 37°C, une toxine similaire à l'enterotoxine ST de *E. coli*. En raison de sa non production à une température inférieure à 30°C, son rôle de l'infection et la survenue de diarrhée n'est pas clairement établi. [45][65]

Seule la production d'une entérotoxine ST thermostable et soluble dans le méthanol a pu être décelée, le plus souvent chez les souches d'origine clinique. Elle s'avère thermostable (121°C-30 mn), au froid (4°C pendant 7 mois), aux variations de pH (pH 1 à 11). [50]

Tous les isolats cliniques de *Y. enterocolitica* produisent une uréase, codée par le complexe génique *ure* situé sur le chromosome. Cette enzyme hydrolyse l'urée pour produire de l'acide carbonique et de l'ammoniaque, ce qui conduit à une augmentation du pH. L'activité uréasique contribue à la virulence de *Y. enterocolitica* en lui conférant sa tolérance à l'acidité, ce qui augmente sa survie dans l'estomac et dans les autres milieux acides. [66], [67]

Par ailleurs, les souches pathogènes de *Y. enterocolitica* produisent une substance mucoïde de nature fibrillaire, dénommée myf (mucoïde Yersinia factor). Elle est produite à 37°C uniquement sur des milieux acides (gélose tamponnée contenant 1% de Glucose) et n'est pas liée à la présence du plasmide. Leiva et coll. ont proposé un test de coagglutination au moyen d'un sérum anti-myf. Ce réactif n'est cependant pas produit commercialement à l'heure actuelle. [68]

Chez l'homme, en particulier chez l'enfant. L'infection à *Y. enterocolitica* réalise un tableau de gastro-entérite et des signes d'infection systémique. La bactérie provoque une diarrhée selon un mécanisme entéro-invasif. La porte d'entrée se situe sur l'iléon terminal et le cæcum au niveau desquels sont observées les principales lésions sous forme de zone inflammatoire et d'ulcération dans la zone des plaques de Peyer. Les bactéries ont une multiplication intracellulaire dans les cellules de la muqueuse formant des granulomes inflammatoires et des micro-abcès qui évoluent vers la nécrose entraînant ulcération et hémorragie. Les ganglions mésentériques sont aussi le siège d'une multiplication bactérienne dans les cellules mononuclées avec la formation de granulomes inflammatoires l'adénite mésentérique. [45]

Le lipopolysaccharide (LPS) est un constituant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. C'est une molécule complexe composée de trois segments :

Un lipide A, un core qui est un oligosaccharide et une chaîne polyosidique qui est l'antigène O. Le LPS de *Y.enterocolitica* O:3 a une structure particulière : le core est ramifié. Le lipide A serait responsable de l'activité endotoxinique et jouerait un rôle central dans la septicémie et le choc septique dus aux bactéries à Gram négatif .Skurnik *et al.* (1999) pensent que le core serait à l'origine de la résistance aux mécanismes de défense, particulièrement ceux qui impliquent des peptides bactéricides. Les sérotypes de *Y.enterocolitica* sont surtout déterminés par la variabilité de l'antigène O. Le rôle de l'antigène O n'est pas encore élucidé mais on sait qu'il est nécessaire à l'expression d'une virulence complète. Skurnik *et al.* (1996) ont montré qu'une absence totale d'antigène O chez *Y.enterocolitica* O:3 réduit la virulence chez un modèle de souris infectée. [69], [70], [71], [11]

Le fer est un nutriment essentiel pour la plupart des bactéries, y compris *Y.enterocolitica*. Plusieurs mécanismes de captation et d'utilisation du fer par *Yersinia* ont été élucidés. Pour capturer le fer, les souches de biosérototype 1B/O:8 synthétisent une molécule qui chélate le fer, appelée la yersiniabactine. Les gènes de la biosynthèse et du transport de la yersiniabactine sont regroupés dans une région du chromosome qu'on appelle « îlot de haute pathogénicité ». Les souches moins virulentes, correspondant à d'autres biosérotypes, comme le biosérototype 4/O:3, sont capables de se lier à des sidérophores exogènes, comme la ferrioxamine et le ferrichrome, et de les internaliser. [72], [73]

**Tableau 06 :** Les principaux facteurs de virulence. [11]

Origine Génomique	Locus gène	Déterminant	Fonction	Température d'expression
Plasmide (70 kb)	<i>yad</i>	Yad A	Attachement/ invasion	37°C
	<i>yop</i>	Yop H	Résistance à la phagocytose des macrophages. Phosphorylation des protéines de la cellule hôte.	
		Yop B	Supprime le facteur de nécrose tumorale alpha. Échappement aux réponses immunitaires et inflammatoires.	
		Yop E	Cytotoxicité	
	<i>ysc</i>	Système de sécrétion de type III	Dispositif de sécrétion des protéines Yop	
Chromosomique	<i>inv</i> (3 kb)	Invasine (103 kDa)	Attachement/invasion	28°C
	<i>ail</i> (1 kb)	Ail (17 kDa)	Attachement/invasion	37°C
	<i>yst</i>	Yst (entérotoxine)	Augmentation des sécrétions intestinales	28°C
	<i>Plusieurs gènes codant pour le LPS</i>	Lipide A	Activité endotoxinique responsable (cf. septicémie)	-
		Core	Résistance aux mécanismes de défense impliquant des peptides bactéricides	-
		Antigène O	Nécessaire à l'expression d'une virulence complète	-
	<i>ure</i>	Uréase	Tolérance à l'acidité	-
	Îlot de haute pathogénicité	Yersiniabactine	Captation du fer	37°C

### 3.10 Source de contamination

Les souches de *Yersinia enterocolitica* sont présentes dans l'environnement, notamment dans les eaux de surface, dans les aliments d'origine animale et végétale et dans le tube digestif de diverses espèces animales (porcs, bovins, ovins, caprins, chiens, chats, renards, porcs-épics, chinchillas, lagomorphes, rongeurs et volailles).[74]

### 3.11 Mode de contamination

En raison de l'importance des manifestations digestives et de la prépondérance de lésions au niveau de l'iléon et du caecum, il est admis que la voie de transmission la plus courante de *Y. enterocolitica* pathogène est la voie orale. La contamination par inhalation existe aussi. On peut également trouver, dans des syndromes atypiques, des *Yersinia enterocolitica* comme agent de surinfection des plaies. Par voie digestive après ingestion d'aliments et d'eau contaminés. Par contact direct. [11], [74]

### 3.12 Résistance et sensibilité aux antibiotiques

*Yersinia enterocolitica* et *Serratia fonticola* produisent naturellement une céphalosporine inductible de classe C (groupe fonctionnel I) et une enzyme de classe A. Chez *Y. enterocolitica*, cette dernière est une pénicillinase constitutive de classe A produite à bas niveau (groupe fonctionnel 2b).

*Y. enterocolitica* est résistante aux aminopénicillines, à leur association avec le clavulanate, aux carboxypénicillines et aux CIG. La résistance aux uréidopénicillines n'apparaît pas *in vitro*. [75]

Les souches *Yersinia enterocolitica* peuvent produire des bêta-lactamases ce qui les rend pratiquement toujours résistantes à la céfalotine, à l'ampicilline, à la ticarcilline et à la pipéracilline. En revanche, elles sont généralement sensibles aux céphalosporines de troisième génération, à l'imipénème, à l'aztréonam, au latamoxef, à la gentamicine, à la streptomycine, au chloramphénicol, à la ciprofloxacine et aux tétracyclines. L'association sulfaméthoxazole – triméthoprime est active *in vitro* mais a peu d'efficacité *in vivo*. [76]

### 3.13 Manifestations cliniques

En pathologie humaine, le tableau clinique prédominant est celui d'une infection du tractus intestinal avec classiquement la triade fièvre –douleurs abdominales –diarrhées. Il

n'est cependant pas rare qu'un seul de ces trois symptômes soit observé. A noter en particulier que les formes cliniques sans diarrhées ne sont pas rare .ces formes digestives d'infections à *Y.enterocolitica* touchent surtout l'enfant de moins de 10 ans (49.5%). [77]

### 3.13.1 Populations à risque

- Les nourrissons et les enfants ont le plus haut risque d'infection symptomatique.
- Les personnes atteintes d'une maladie hépatique avancée et les syndromes associés à une surcharge en fer présentent le risque le plus élevé de maladie septicémique.
- Les populations rurales et celles vivant dans des zones tempérées plus fraîches.
- Certains groupes raciaux et ethniques par l'exposition à des aliments particuliers et à des méthodes de préparation des aliments. [78]

### 3.13.2 Fluctuation saisonnières

La saisonnalité semble jouer un rôle pivot dans l'incidence des infections à *Y.enterocolitica* dans certaines zones géographiques avec une fréquence plus élevée durant les mois les plus froids de l'année. [11]

### 3.13.3 Dose minimale infectante

La dose minimale infectante n'est pas précisément connue. Cependant, selon l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) elle serait de  $10^6$  bactéries (*Y.enterocolitica* / gramme), alors que selon l'agence de santé publique du Canada, elle serait au minimum de  $10^8$  bactéries. [10], [79]

D'autre part elle est estimée à 100-1000 microorganismes par gramme, en précisant qu'il faut un apport et une multiplication dans l'aliment. [80]

### 3.13.4 Durée d'incubation

La période d'incubation des infections à *Yersinia* entéropathogène varie de 1 à 11 jours et la durée des symptômes varie de 3 à 28 jours. [10]

### 3.13.5 Symptômes

La symptomatologie varie avec l'âge, l'état physiologique de l'hôte et les propriétés pathogènes de la souche en cause: diarrhée fébrile chez le jeune enfant, elle peut être accompagnée chez l'adulte d'érythème noueux, d'arthrite ou de foyers osseux. Chez l'adolescent, une adénite mésentérique peut donner un tableau pseudoappendiculaire. [81], [82]

Les infections à *Y.enterocolitica* peuvent être asymptomatiques. Néanmoins, l'entérocologie et l'iléite terminale restent les formes prédominantes 60-75% des cas. [11], [54]

### 3.13.6 Manifestations primaires

*Y.enterocolitica* peut causer des symptômes gastro-intestinaux allant de diarrhées limitées à une lymphadénite mésentérique aiguë évoquant l'appendicite. Les symptômes d'entérocologie persistent de 5 à 14 jours, mais ils peuvent parfois durer plusieurs mois. La durée d'excrétion de *Y.enterocolitica* dans les selles est de 14 à 97 jours. Le biosérotype 4/O:3 est le type de *Y.enterocolitica* le plus couramment isolé chez les patients atteints de diarrhée. [11]. [82], [83], [84], [85], [86], [87], [88]

Chez les patients de moins de 5 ans, la yersiniose se présente comme une diarrhée muqueuse (78-96% ) et parfois sanglante (<10 %), souvent accompagnée d'une légère fièvre (43-47 %) et, inconstamment, de douleurs abdominales (22-84%). Les enfants plus âgés (> 5 ans) et les jeunes adultes (< 20 ans) peuvent présenter une yersiniose aiguë qu'on appelle « syndrome pseudo-appendiculaire », souvent confondu avec l'appendicite; le sérotype le plus fréquemment en cause est le sérotype O:8. En effet, *Yersinia enterocolitica* entraîne rarement une véritable appendicite et la chirurgie subie par les patients révèle, dans la plupart des cas, un appendice sain ou légèrement enflammé, une adénite mésentérique inconstante associée à une iléite terminale. Les adultes de 20 à 60 ans présentent, en général, des troubles abdominaux aigus, des diarrhées et des arthrites. [89], [90], [91], [92], [93]

Parfois, des inflammations localisées, comme une pharyngite, une cellulite, un abcès sous-cutané, une pneumonie et une méningite, peuvent survenir sans gastro-entérite). [11], [82], [94], [95]

Des complications telles que des ulcérations intestinales, des péritonites, des perforations intestinales, des gangrènes de l'intestin grêle ont été signalées mais sont rares. [91]

### 3.13.7 Manifestations secondaires

Normalement, la yersiniose évolue vers une guérison spontanée, mais des séquelles (arthrite réactionnelle, érythème noueux, uvéite, glomérulonéphrite ou myocardite) peuvent apparaître à long terme, dans 5 % des cas. Les complications post-infectieuses se développent habituellement au bout d'une semaine à un mois après le début de la phase symptomatique mais elles peuvent être les seules manifestations cliniques notables d'une infection à *Yersinia enterocolitica* [83], [93], [96], [97]

L'arthrite réactionnelle et l'érythème noueux sont les complications les plus fréquentes. Elle est bilatérale, généralement symétrique et touche préférentiellement les genoux, les chevilles et les poignets. Elle peut persister plusieurs mois (de 1 à 6 mois) et conduit en général à une guérison sans séquelles, sauf chez les personnes HLA-B27 + qui peuvent développer des formes chroniques, récurrentes, allant jusqu'à la spondylarthrite ankylosante. [11], [83], [84], [96], [98]

### 3.13.8 Formes généralisées et septicémiques

La septicémie est une complication rare de l'infection à *Y. enterocolitica*, à l'exception des enfants de moins de 3 mois (20 à 30 % des cas), des patients qui ont une maladie prédisposante sous jacente ou qui présentent une surcharge en fer. Des formes généralisées ou métastatiques de yersiniose ont été signalées. Ces formes sont graves [34 à 50 % de mortalité] et elles associent une hyperthermie en plateau souvent supérieure à 39°C, des troubles digestifs (47 % des cas), un ictère (40 % des cas) et une hépatomégalie (73 % des cas). Les localisations secondaires les plus fréquentes sont des abcès hépatiques (30 % des cas). [11], [82], [91], [99], [100]

La septicémie peut aussi survenir lors d'une transfusion sanguine. La réaction post-transfusionnelle se manifeste par un syndrome de choc septique dans les minutes ou les heures suivant la transfusion et une défaillance cardio- respiratoire. Le tableau clinique comporte toujours une hyperthermie à 39°C- 40°C, une tachycardie et une hypertension

artérielle. Les autres manifestations (anurie, diarrhée, érythème, urticaire) sont en revanche inconstantes. [101], [102], [103]

L'ensemble des manifestations cliniques des infections à *Y. enterocolitica* est résumé dans le tableau 07: [11]

**Tableau 07** : Spectre des yersiniozes d'après Bottone (1999). [11]

Type de L'infection	Manifestation	Population
Gastro-intestinal	Entérocolite, parfois bactériémie chez jeunes Enfants	Jeunes enfants
	Syndrome pseudo appendiculaire (lymphadénite mésentérique aiguë, iléite terminale)	Enfants de plus de 5 ans et jeunes adultes
Septicémie	Syndrome de choc septique, suite à Transfusion	Individus immunodéprimés, surcharge en fer
Métastatique	Abcès: foie, rein, rate, poumon	
	Manifestations cutanées : cellulite, myosite suppurée, pustules et lésions bulleuses	
	Pneumonie, pneumonie cavitaires	
	Méningite	
	Panophtalmie	
	Endocardite, anévrisme mycotique	
Séquelles post-infectieuses	Ostéomyélite	
	Arthrite réactionnelle	HLA-B27
	Myocardite	
	Glomérulonéphrite	
Pharyngite	Érythème noueux	Femmes de plus de 50-60 ans
		Fréquente après ingestion orale de <i>Y. enterocolitica</i>

### 3.14 Le diagnostic

Le diagnostic clinique d'une infection à *Yersinia* entéropathogènes repose généralement sur un diagnostic bactériologique avec l'isolement et l'identification de la bactérie responsable. Il n'existe pas de procédure unique permettant de détecter toutes les souches pathogènes. C'est une caractérisation plus poussée par biotypage ou sérotypage qui

permet ensuite de déterminer s'il s'agit ou non de souches pathogènes. D'autres tests, comme le diagnostic moléculaire par la recherche de gènes cibles ou le diagnostic sérologique peuvent être utiles quand la bactérie n'a pu être isolée. [10]

*Y. enterocolitica* est recherchée principalement dans les selles (coproculture) et plus rarement à partir du sang (Hémoculture) ou de Localisations profondes. Le recueil des prélèvements ne nécessite aucune technique particulière spécifique à cette espèce. Néanmoins, il ne faut pas hésiter & répéter les prélèvements devant toute suspicion d'infection à *Yersinia*. [22]

### 3.14.1 Diagnostic bactériologique



#### Prélèvement

- Sellesensemencées immédiatement (conservation possible à +4°C).
- Ganglion mésentérique.



#### Examen direct

- Bleu de méthylène : mise en évidence de nombreux leucocytes en faveur du caractère invasif du germe au niveau de la muqueuse intestinale.
- Coloration de Gram : on notera un déséquilibre de la flore bactérienne avec la présence de nombreux bacilles à Gram négatif (entérobactéries). [104]



#### Caractères cultureux

*Yersinia enterocolitica* peut être isolée sur de nombreux milieux d'usage courant en bactériologie ainsi que sur les milieux destinés à l'isolement des entérobactéries. Toutefois, la culture est lente à 37 °C et au sein d'une flore polymorphe, la croissance de *Yersinia enterocolitica* peut être masquée par les bactéries à croissance rapide. [58]

- Enrichissement : à + 4°C (eau peptonée) ; Bouillon de Rappoport modifié Wauters (incubé 48 h à 20°C).
- Culture : sur milieu sélectif (SS, Mac Conkey, DCL, CIN).  
L'incubation sera réalisée de préférence à 30°C (ou à température ambiante) pendant 25 heures à 48 heures. [104]



#### Identification

Devenish et Schiemann (1981) ont déterminé le nombre minimum de tests biochimiques à réaliser pour identifier *Yersinia* parmi les bactéries qui poussent sur gélose CIN et présentent une morphologie de colonie similaire. Deux tests suffisent : le test de

Kligler et le test à l'urée de Christensen. *Y. enterocolitica* peut être identifiée avec des tests biochimiques comme la fermentation du saccharose, du rhamnose et du mélibiose. [11]



### Confirmation du pouvoir pathogène

Seules les souches adaptées à l'homme peuvent induire des manifestations cliniques. Les souches non adaptées sont généralement issues de l'environnement et ne peuvent s'implanter dans le tube digestif. La détermination du biotype sera au minimum réalisée.

Les déterminations du sérotype et du lysotype sont réalisées dans les laboratoires spécialisés.

- Biotypes : 5 chimiotypes (1 à 5) selon les caractères de la lipase, de l'Indole, du xylose, du tréhalose.

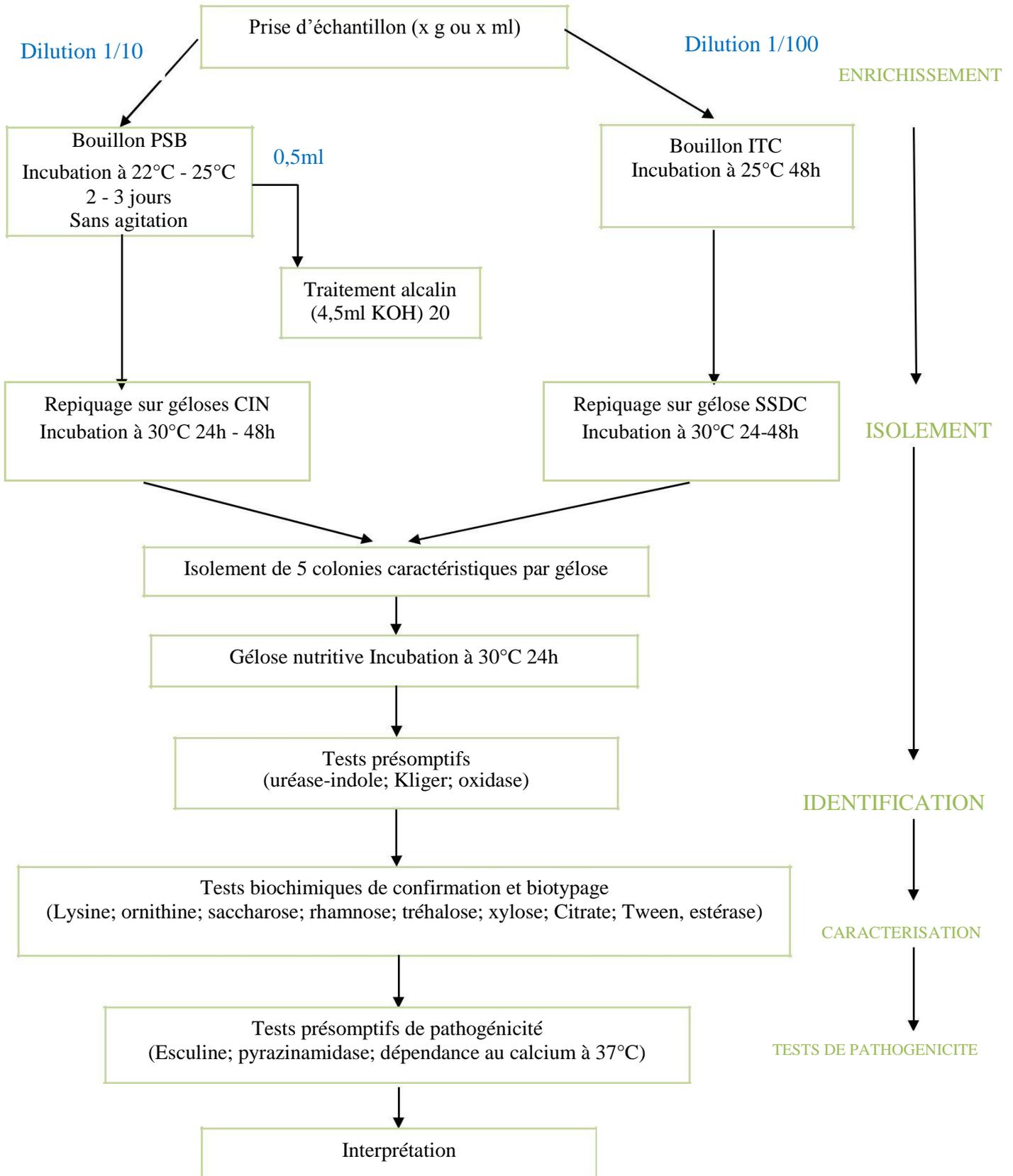
Les biotypes 2 et 4 sont les plus fréquents en France.

Identification antigénique : il existe 34 sérogroupes O et 16 antigènes flagellaires différents, mais seulement 2 sérotypes sont responsables de la quasi-totalité des infections humaines : O : 3 (biotype 4), O : 9 (biotype 2). [104]

### 3.14.2 Diagnostic sérologique

La recherche des anticorps peut s'effectuer par agglutination en utilisant des bactéries inactivées par le formol ce qui permet la mise en évidence des anticorps anti-O et anti-H. Un titre supérieur à 160 ou une augmentation significative du titre en anticorps (examen de deux sérums prélevés à deux semaines d'intervalle) sont considérés comme une réaction positive. Des tests immuno-enzymatiques ou des tests d'immunofluorescence peuvent également être utilisés et ils permettent la caractérisation des diverses classes d'immunoglobulines.

Cependant l'interprétation de ce test sérologique est délicate car plusieurs sérotypes ont en commun des antigènes avec d'autres entérobactéries. [58]



**Figure 05 :** Mode opératoire préconisé pour la recherche des *Y. enterocolitica* présumées pathogènes ISO 10273 (projet ISO 2003 d'après Leclercq, 2003). [11]

### 3.15 Traitement

Le diagnostic est rarement suffisamment précoce pour mettre en place un traitement. Des antibiotiques à spectre large, agissant sur les Gram négatif peuvent être administré tel que : Céphalosporines de troisième génération, aminosides (néomycine, gentamycine, kanamycine), polymyxine, florphénicol, quinolones et tétracyclines, fluoroquinolones systémiques ou aux macrolides. [58], [81]

### 3.16 Épidémiologie

La yersiniose n'est pas une maladie à déclaration obligatoire. Son épidémiologie est donc approximative. La yersiniose est répandue dans le monde entier avec des particularités de répartition des biotypes et/ou des sérotypes. Par exemple, le biosérotype 1B/O:8 est associé au Nord de l'Amérique et est très rare en Europe. Les pics d'isolement des souches ont lieu durant la saison froide dans les climats tempérés comme en France. Les enfants de moins de 10 ans sont plus touchés que les adultes. Une augmentation récente du nombre de patients masculins est constatée. Son incidence a été estimée à 16 cas/100000 habitants en 2003. La proportion de coprocultures positives à *Yersinia spp.* a été estimée à 0,5% entre 1994 et 1997. La séroprévalence des différentes *Yersinia* entéropathogènes est inconnue en France. Le taux d'hospitalisation pour entérite à *Yersinia enterocolitica* est estimé à 172/an et le taux de létalité est inconnu. [18]

Il n'existe pas de réseau international de surveillance mais un centre collaborateur de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) des *Yersinia* entéropathogènes (Institut Pasteur, Paris) assure une surveillance internationale. [105]

### 3.17 Prophylaxie

La prophylaxie sanitaire est rendue difficile par la fréquence des porteurs latents. La mesure préventive la plus importante reste la protection de l'eau et des aliments contre la contamination fécale des oiseaux et des rongeurs. [58]

### 3.18 Autres espèces bactériennes du genre *Yersinia*

Le genre *Yersinia* comprend actuellement 18 espèces : *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia bercovieri*, *Yersinia mollaretii*, *Yersinia rohdei*, *Yersinia*

*ruckerii*, *Yersinia aldovae*, *Yersinia aleksiciae*, *Yersinia massiliensis*, *Yersinia similis*, *Yersinia entomophaga*, *Yersinia nurmii*, *Yersinia pekkanenii* et *Yersinia wautersii*. [106]

Seules, les trois premières espèces citées sont pathogènes pour l'homme. *Y. wautersii* est la dernière espèce décrite et serait potentiellement pathogène pour l'homme. *Y. ruckerii* est un pathogène important des poissons, en particulier des salmonidés, responsable de la maladie entérique de la bouche rouge. [10]

**Tableau 08 :** Caractères différentiels des espèces récentes attribuées au genre *Yersinia* (a): [24]

	<i>Yersinia</i>					
	<i>Enterocolitica</i> chimiotypes1-4	<i>Kristensenii</i>	<i>Frederiksenii</i>	<i>Intermedia</i>	<i>Ruckerii</i>	<i>Aldovae</i>
LDC	-	-	-	-	+	-
Gélatinase	-	-	-	-	+	-
Uréase	+	+	+	+	-	+
Sorbitol	+	+	+	+	-	+
Cellobiose	+	+	+	+	-	-
Indole	d	d	+	+	-	-
Xylose	d	+	+	+	-	+
VP	+	-	+	+	-	+
Saccharose	+	-	+	+	-	-
Rhamnose	-	-	+	+	-	+
Mélibiose	-	-	-	+	-	-
$\alpha$ -Méthyl-D-glucoside	-	-	-	+	-	-
Citrate de Simmons	-	-	D	+	-	+
Type de nitrate-réductase	B	B	A ou B	A ou B	?	B

(a) Ces résultats sont obtenus lorsque les tests incubés à 28°C ; à 37 °C le Citrate de Simmons est toujours négatif et les autres tests donnent des résultats irréguliers.

(-) résultats négatif.

(+) résultats positif.

A : Nitrate réductase type A.

B : Nitrate réductase type B.

d : variable.

?: pas connu

Les autres caractères biochimiques de *Y.Kristensenii* , *Y.frederiksenii* et *Y.entermedia* sont identiques à ceux commun aux souches *Y.enterocolitica* des chimiotypes 1 à 4. Par contre, mis à part les caractères de famille des Entérobactéries. *Y.ruckerii* n'a en commun avec ces espèces que la présence d'une mobilité à 28°C qui disparaît souvent à 37°C, d'une OPNGase, d'une ornithine décarboxylase et l'acidification du mannitol, du glycérol, du maltose et du tréhalose. [24]

## 4. Les antibiotiques

### 4.1 Généralités

Les antibiotiques sont des agents antibactériens naturels d'origine biologique produit par le métabolisme secondaire de certains micro-organismes, bactéries ou champignons et/ou synthétique et/ou semi synthétique. [107]

Capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autre micro-organisme par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux des germes. [108]

Les antibiotiques agissent sur deux grands lieux d'action : la paroi et le cytoplasme. Ces molécules ont cinq modes d'action : la synthèse du peptidoglycane, l'altération de la paroi, la synthèse des protéines, la synthèse des acides nucléiques et aussi sur le métabolisme intermédiaire. [107]

### 4.2 Mode d'action des Antibiotiques

Les antibiotiques agissent sur les bactéries en inhibant des fonctions physiologiques précises, telles que : la synthèse de la paroi, la réplication et la transcription de l'ADN, la synthèse protéique ou encore la respiration cellulaire. Pour exercer leur action, ils doivent se lier à des cibles spécifiques le plus souvent intracellulaires.

On distingue deux types d'antibiotiques :

- Les antibiotiques bactéricides : qui tuent les bactéries.
- Les antibiotiques bactériostatiques : qui ralentissent la croissance bactérienne peuvent aller jusqu'à l'arrêt de la croissance bactérienne. [109]

#### Action sur la paroi bactérienne

Bacitracine, Pénicilline, Céphalosporines agissent sur les germes en croissance inhibent la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine composant essentiel de la

paroi bactérienne, qui confère à la bactérie sa forme et sa rigidité, se qui lui permet de résisté à la forte pression osmotique intra cytoplasmique). Or, la pénicilline est un antibiotique empêche la synthèse de peptidoglycane ; par conséquent, la paroi cellulaire est grandement affaiblie et la cellule finit par se lyse. Puisque la pénicilline agisse seulement sur les cellules en croissance active. [110], [111]

### **Action sur la structure de la membrane cytoplasmique :**

La polymixine B et la colistine sont deux antibiotiques qui agissent sur la membrane cytoplasmique, en perturbant sa synthèse. Ils sont actifs sur les bacilles à Gram négatifs. En désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échange électrolytique avec le milieu extérieur. [109], [112]

### **Action sur la synthèse protéique**

Après fixation sur des constituants spécifiques du ribosome bactérien (sous unités 30S et 50S), ces antibiotiques vont empêcher la traduction de l'ARNm et donc la formation de nouvelle protéines. C'est l'exemple des tétracyclines, aminosides, chloramphénicol, macrolides, acides fucidique et linézolide. [109]

### **Action sur la synthèse ou le fonctionnement des acides nucléiques**

Les Rifampicines, sulfamides, quinolones et triméthoprimé inhibent la synthèse ou le fonctionnement des acides nucléiques de différentes façons selon les familles d'antibiotiques :

- Inhibition de la réplication de l'ADN.
- Inhibition de la transcription /ARN polymérase.
- Diminution de la synthèse des précurseurs nucléotidiques. [109]

### **Action sur le métabolisme intermédiaire**

Le cotrimoxazole est un antibiotique bactéricide, il inactive les enzymes impliqués dans la synthèse des porines et de certains acides aminés essentiels. [109]

## 4.3 Classes des antibiotiques

Les betalactamines, les aminosides ou aminoglycosides, phenicoles (chloramphenicol et thiamphenicol), les tetracyclines, les polypeptides, la Polymyxine, macrolides, lincosanides, synergistines, les quinolones, les nitrofuranes, sulfamides et triméthoprimé. [113], [114]

### **4.4 Résistance aux antibiotiques**

De nombreuses molécules des antibiotiques d'origine naturelle ou synthétique, ont été découvertes de la fin des années 1940 jusqu'aux années 1970. Le succès fulgurant des premiers traitements anti-infectieux a fait considérer un peu hâtivement le problème des maladies infectieuses comme définitivement réglé. Mais, rapidement, l'enthousiasme a décliné avec l'apparition des premières résistances des bactéries aux antibiotiques. Les bactéries ont su s'adapter et résister plus ou moins vite à chaque nouvel antibiotique introduit en thérapeutique. [115]

Ces résistances peuvent avoir un spectre étroit, limité à un ou quelques antibiotiques de structure voisine, mais on observe depuis plusieurs années l'émergence de mécanismes de résistances croisées à des drogues de structures et de modes d'actions différents. [116]

Aujourd'hui, apparaissent de véritables « monstres » bactériens résistants à tous les antibiotiques potentiellement actifs. [117]

### **4.5 Types de résistance aux antibiotiques**

#### **4.5.1 Résistance naturelle**

Leur mécanisme sur le génome bactérien est constant dans un taxon et est généralement chromosomique. Elle correspond à la résistance de toutes les souches d'une même espèce bactérienne à un antibiotique. Elle est due soit à une absence de cible pour l'antibiotique soit à une imperméabilité de la paroi à cet antibiotique.

A ce titre, elle constitue un critère d'identification. La résistance naturelle détermine les phénotypes « sauvages » des espèces bactériennes vis-à-vis des antibiotiques. [118]

#### **4.5.2 Résistance acquise**

Le terme de résistance acquise est utilisé pour désigner des processus permettant à des bactéries appartenant à une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques.

La résistance acquise résulte de l'emploi thérapeutique des antibiotiques et elle est déterminée par des modifications génétiques consistant à des mutations sur des gènes déjà

présents chez la bactérie (résistance par mutation chromosomique), ou en l'acquisition de nouveaux gènes de résistance par transfert horizontal (résistance extra-chromosomique). [119]

### 4.5.3 Résistance croisée et Co-résistance

La résistance croisée correspond à la résistance à tous les membres d'une classe d'antibiotiques due à un seul mécanisme de résistance. La résistance est de niveau variable selon les antibiotiques, en général d'autant plus faible que la molécule est plus active.

La conséquence majeure de la résistance croisée est la sélection croisée, n'importe quel antibiotique de la classe peut sélectionner des bactéries résistantes à tous les autres membres. [109]

La Co-résistance est liée à plusieurs mécanismes (plusieurs gènes de résistance impliqués) et concerne des antibiotiques appartenant à différentes familles. [14]

### 4.6 Mécanismes de la résistance

Il existe quatre types principaux :

- Diminution de la perméabilité cellulaire à l'antibiotique par modification de la paroi.
- Inactivation de l'antibiotique par modification chimique : pénicillinase.
- Modification d'une voie métabolique lorsque la première voie interfère avec l'antibiotique.

[120]

- l'efflux des antibiotiques à l'extérieur de la cellule par des pompes énergie dépendantes.

[109]

### 4.7 Antibiogramme

#### 4.7.1 Définition

Un antibiogramme consiste à mettre en contact une série d'antibiotiques avec une bactérie. Il permet de savoir comment une bactérie donnée réagit à un antibiotique donné.

L'antibiogramme permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne. Il permet donc de juger l'efficacité d'un antibiotique. [121]

### 4.7.2 Principe

L'antibiogramme a pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis de divers antibiotiques. La détermination de cette valeur est peu précise, mais elle est consacrée par l'usage et elle bénéficie d'une masse importante d'informations recueillies à son sujet.

### 4.7.3 Techniques classiques d'antibiogramme

Il existe plusieurs techniques : méthodes de dilution, méthodes de diffusion (antibiogramme standard). [122]

## 5 Analyse de l'ADN bactérien

Il existe un grand nombre de techniques, permettant l'étude moléculaire d'une population bactérienne. Ces outils peuvent servir pour comparer, caractériser des populations ou mettre en évidence certains genres, espèces ou souches dans un échantillon. [123]

### 5.1 Extraction du matériel génétique

Avant toute chose, l'ADN bactérien doit être extrait de la matrice de départ. Les méthodes d'extraction les plus utilisées font appel à trois étapes : une lyse par un détergent, une incubation avec une protéase et la précipitation des acides nucléiques. [124]

La technique d'extraction d'ADN bactérien la plus simple est un traitement thermique. Les cultures bactériennes sont plongées pendant 5 minutes dans un bain marie à 96°C. Cette technique suffit pour extraire l'ADN des cellules mais n'élimine pas les composés inhibiteurs des réactions d'amplification ; elle convient donc très bien pour des cultures pures mais pas pour des échantillons de terrains. [125]

En plus des différents protocoles mis au point, il existe des kits commerciaux pour l'extraction d'ADN. Deux techniques sont communément employées ; le passage sur colonnes de silice ou l'utilisation de billes magnétiques. Dans les deux cas, le principe est le même, l'ADN est lié à la membrane de la colonne ou aux billes magnétiques et l'échantillon est débarrassé des différents contaminants. Ensuite, l'ADN est séparé de son support. [126], [127]

### 5.2 Visualisation de l'ADN par électrophorèse

Une fois les différentes étapes décrites plus haut réalisées, il faut visualiser le résultat de l'amplification ou du traitement réalisés sur les amplicons. Pour ce faire, différents types d'électrophorèses peuvent être réalisés, de la plus classique sur gel d'agarose à des processus complexes tels que des gels contenant des gradients d'agents dénaturants et alliant donc dans la même étape le traitement de l'ADN et sa visualisation. L'électrophorèse permet de séparer des particules en fonction de leur charge électrique et de leur taille. Les molécules d'ADN, chargées négativement, sont attirées vers l'anode au travers d'un réseau solide non mobile (généralement un gel en agarose ou polyacrylamide). Ce réseau permet de retenir les molécules en fonction de leur taille, les plus petites gagnant plus rapidement l'anode que les grandes. Plus le réseau est dense, mieux les molécules de petites tailles seront séparées. [128]

**MATERIEL**  
**ET**  
**METHODES**

## **1. Objectif d'étude**

Le but de notre étude est l'identification morphologique et biochimique des dix souches présumés *Y. enterocolitica*, la détermination de leur antibiorésistance ainsi que l'extraction et la visualisation de l'ADN total des souches étudiées.

## **2. Lieu d'étude**

Notre travail a été effectué durant la période Mars-Juin de l'année 2018 au niveau de laboratoire de Zoologie, dans lequel nous avons réalisé un ensemble d'analyses microbiologiques et biochimiques sur dix souches présumés *Yersinia enterocolitica* et la réalisation d'un profil électrophorétique de l'ADN total des souches au niveau du laboratoire de biologie moléculaire de la faculté des sciences de la nature et de la vie Université des frères Mentouri. Constantine 1.

## **3. Matériels**

### **3.1 Souches utilisées**

Notre étude a été portée sur des souches de *Yersinia enterocolitica* (dix souches) préidentifiées au niveau de la faculté des sciences de la nature et de la vie Université des frères Mentouri. Constantine 1. La conservation des souches a été réalisée en mini-tubes de conservation.

## **4 Méthodes d'étude**

### **4.1 Revivification des souches**

Avant leurs utilisation les souches conservées sont récupérées et subissent une revivification dans du bouillon nutritif. Et sont ensemencées sur géloses : Mac Conkey, gélose nutritive ordinaire et DCL (désoxycholate-citrate-lactose) puis incubation à 37°C pendant 48 heures.

### **4.2 Identification macro et microscopique des souches**

L'identification s'est basée essentiellement sur l'étude des caractéristiques macromorphologiques et micromorphologiques des souches.

### 4.2.1 Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures sur milieux Mac Conkey et DCL (désoxycholate- citrate-lactose) et gélose nutritive est le premier examen effectué à partir de l'isolement. Après incubation à 37°C pendant 48 heures.

Le milieu de Mac Conkey contient deux inhibiteurs de la flore Gram positive, les sels biliaires et le cristal violet qui permettent, en plus des bactéries à Gram positif et l'inhibition du développement en nappe des *Proteus*.

Le milieu DCL contient le Désoxycholate ainsi que la forte concentration en citrate qui inhibe les bactéries à Gram positif.

L'étude de l'aspect macroscopique des colonies isolées permet l'effectuation d'une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. La lecture se fait par l'observation des boîtes à l'œil nu. Les éléments d'identification macroscopique sont :

La forme des colonies, la taille, le chromogène, l'élévation, l'opacité et la surface.

### 4.2.2 Examen microscopique

Les colorations sont effectuées selon les méthodes de Gram classique. Des frottis de colonies répondant aux caractéristiques macroscopiques des bactéries sont préparés (Une goutte de la suspension bactérienne a été étalée en couche mince et régulière sur la lame. Après fixation du frottis, la coloration de Gram a été réalisée). L'observation sous microscope optique au grossissement X100 nous a permis de déterminer le Gram des bactéries et leurs morphologies. (Annexe 04)

## 4.3 Identification présomptive des souches

L'identification des souches a porté sur une série de tests biochimiques et un antibiogramme.

### 4.3.1 Identification par tests biochimiques

Si les examens précédents répondent aux caractéristiques de *Yersinia enterocolitica*, l'identification est poursuivie par la galerie conventionnelle.

### Préparation de la suspension bactérienne

La suspension bactérienne de chacune des dix souches a été préparée dans de l'eau distillée stérile avec des colonies prélevées à partir d'un milieu solide (GN, DCL, Mack Conkey).

La préparation de la suspension bactérienne s'effectue par le transfert d'une colonie bien isolé à l'aide d'une anse de platine bien stérile vers un tube d'eau distillée stérile dans les conditions aseptique. La suspension est homogénéisée. Cette suspension sert à ensemencer différents milieux de culture en tubes permettant ainsi de mettre en évidence les différents caractères biochimiques de chaque souche.

- **Test oxydase**

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivé méthyle du para-méthylène-diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacée.

Déposer, sur une lame porte-objet propre, un disque « Ox » et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile. Prélever une partie de la colonie à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile et l'étaler sur le disque. L'observation du résultat a été immédiate et sans incubation.

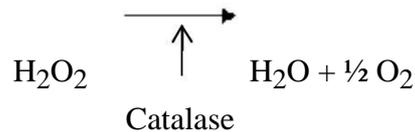
Le test de l'oxydase est fondé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif pour former un composé coloré en violet « l'indophénol ».

### Lecture

- ✓ La réaction positive s'est traduite par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée soit immédiatement, soit quelques seconds après : test oxydase+.

- **Production de Catalase**

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage selon :



La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveau toxique de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) formé comme sous produit de processus métabolique.

Pour mettre en évidence cette enzyme, sur une lame propre une goutte d'eau oxygénée est déposée, puis à l'aide d'une pipette Pasteur, l'inoculum bactérien est rajouté. L'observation est immédiate.

### Lecture

✓ Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de catalase : test catalase+.

### • Recherche de nitrate - réductase

En l'absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Cette respiration anaérobie est liée à l'activité d'enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne.

Le bouillon nitraté est un bouillon de culture permettant la recherche de l'utilisation de l'ion nitrate par certains micro-organismes, notamment par respiration nitrate.

Les bactéries, lorsqu'elles possèdent une nitrate réductase, sont capables de transformer les nitrates ( $\text{NO}^{-3}$ ) en nitrites ( $\text{NO}^{-2}$ ) et éventuellement en azote ( $\text{N}_2$ ).

Un bouillon nitraté estensemencé avec la bactérie étudiée et incubé pendant 24 à 48 heures à  $37^\circ\text{C}$ . Après incubation, quelques gouttes d'une solution d'acide sulfanilique (Nit I) et 3 gouttes d'une solution de naphthylamine (Nit II) sont ajoutées au bouillon.

Si une coloration rose fugace apparaît, les nitrates ont été réduits au stade nitrites. En l'absence de coloration, soit les nitrates ont y été réduits au stade azote, soit la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. L'addition de poudre de zinc (réactif de Zobell, qui va réduire les nitrates en nitrites) permet de trancher : Si une coloration rose apparaît, la bactérie ne possède pas de nitrate réductase ; Si aucune modification de coloration n'est visible après l'ajout du zinc, alors les nitrates ont été réduits au stade azote.

- **Le milieu Kligler-Hajna (KIA)**

Le milieu de Kligler-Hajna est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est utilisé principalement pour l'identification des *Enterobacteriaceae*. Il renferme du lactose, du glucose, du thiosulfate et des ions ferreux. L'indicateur de pH est le rouge de phénol.

### Utilisation des glucides (lactose et glucose)

Deux glucides sont retrouvés dans le milieu Kligler-Hajna, le glucose et le lactose. L'utilisation des glucides par une bactérie suit toujours la loi de la diauxie : quand une bactérie est capable de cataboliser deux glucides dont le glucose, elle utilise dans un premier temps exclusivement le glucose jusqu'à son épuisement dans le milieu. Elle utilisera ensuite le deuxième glucide (ici le lactose). Il est par ailleurs important de se rappeler qu'une bactérie glucose négatif est toujours lactose négatif, le catabolisme du lactose passant par celui du glucose (L'hydrolyse du lactose donne les deux oses simples glucose et galactose, et ce dernier est isomérisé en glucose).

### Ensemencement

La pente est abondamment ensemencée par stries serrées ou par inondation, et le culot par simple pique à l'aide de la même pipette ouverte ou fermée. Le milieu est incubé 48 heures à 37°C. Ne pas oublier de dévisser partiellement le bouchon pour permettre les échanges gazeux.

### Lecture

- ✓ La fermentation du glucose au niveau de culot se traduit par la coloration jaune.
- ✓ La fermentation du lactose au niveau de la pente se traduit par une coloration jaune.
- ✓ La production d'H<sub>2</sub>S sera visualisée par le précipité noir de sulfure de fer.
- ✓ La production de gaz sera mise en évidence par des bulles dans la gélose ou un décollement de celle-ci.

- **Citrate de Simmons**

Le milieu citrate de Simmons est un milieu solide en pente, ne contenant aucune autre source de carbone que le citrate, les autres constituants étant les ions minéraux indispensables. Ce milieu permet d'affirmer, en cas de résultat positifs (culture et virage de

l'indicateur), l'utilisation de citrate comme seule source de carbone et d'énergie.

Seules les bactéries possédant un citrate perméase seront capables de se développer sur ce milieu. L'utilisation du citrate peut se faire de diverses manières, ce qui suivant le cas, il se traduira par une alcalinisation ou une acidification du milieu, plus ou moins importante.

Une bactérie sera citrate plus si elle alcalinise le milieu en utilisant le citrate. Cette réaction est indiquée par le changement de couleur de l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol qui devient bleu.

La pente du milieu estensemencée par des stries à l'anse sur toute la surface, l'inoculum ne pas apporter de substrat, en dévissant le bouchon pour permettre les échanges gazeux. Puis, incubé à 37°C, pendant 48heures.

### Lecture

La lecture de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone est possible grâce à la présence :

- ✓ d'un indicateur de pH, le bleu de bromothymol.
- ✓ d'un seul composé carboné, le citrate de sodium
- ✓ Citrate + : pousse avec alcalinisation du milieu → le milieu vert devient bleu.
- ✓ Citrate - : pas de pousse → le milieu reste inchangé (vert).

### • **Le milieu mannitol-mobilité**

Le milieu mannitol mobilité est un milieu semi solide qui permet d'étudier simultanément la dégradation du mannitol (la dégradation en anaérobiose conduit à la formation de fructose qui est un produit de dégradation du mannose, dont la réaction à des acides à chaîne très courtes : acide formique et acide acétique) et la mobilité. Cette dégradation entraîne le virage du milieu vers le jaune.

On ensemence le milieu par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit chargé de la suspension bactérienne, l'incubation se fait à 25°C et à 37°C pendant 24 heures.

### Lecture

La lecture de l'utilisation du mannitol est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol. L'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune).

- ✓ Mannitol+: le milieu rouge devient jaune
- ✓ Mannitol- : le milieu reste rouge
- ✓ La mobilité du fait de la faible teneur en gélose du milieu (gélose molle), les bactéries peuvent s'y déplacer
- ✓ Mobilité + : les bactéries mobiles troublent le milieu.
- ✓ Mobilité - : les bactéries immobiles persistent près de la piqûre centrale.
- **Le milieu de Clarck et Lubs (test RM et VP)**

Le milieu d'identification Clark et Lubs permet de déterminer les voies de fermentation de glucose : différenciation entre les fermentations « acides mixtes » et « butylène glycolique ».

La fermentation des acides mixtes (par le test RM = Rouge de Méthyle) et la fermentation butanédiolique (par le test VP = Voges-Proskauer).

On ensemence directement le milieu Clark et Lubs. Après avoir incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures on divise le milieu en deux tubes pour pratiquer les deux tests : VP, RM.

### 1. Test RM (Rouge de Méthyle)

Ce test permet la mise en évidence, grâce au rouge de méthyle, la fermentation des acides mixtes par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose. Les acides produits par un microorganisme y sont de deux ordres : du CO<sub>2</sub>, acide faible et volatil et des acides organiques plus ou moins forts : acides succinique, malique, oxalique, éthanoïque, (acétique), butanoïque (butyrique), méthanoïque (formique).

En additionnant 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle, la lecture immédiate.

- ✓ Résultat positif RM<sup>+</sup> : coloration rouge → les bactéries sont des bactéries produisant des acides organiques relativement forts (acide éthanoïque.) par voie des acides mixtes.
- ✓ Résultat négatif RM<sup>-</sup> : coloration jaune → les bactéries sont des bactéries produisant des acides organiques relativement faibles et plutôt du CO<sub>2</sub> par voies butane-diolique.

### 2. Test VP (Voges-Proskauer)

Ce test permet la mise en évidence de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxybutanone ou acétyl-méthyl carbynol) au cours de la fermentation butylène glycolique:

en présence d'une base forte (soude ou potasse) et d'  $\alpha$  -naphthol, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné.

En ajoutant quelques gouttes du réactif VP I et même le volume de réactif VP II

Incliner le tube et attendre de 10 minutes.

- ✓ Test positif VP<sup>+</sup> : coloration rose.
- ✓ Test négatif VP<sup>-</sup> : le milieu reste incolore.

- **Le milieu urée-tryptophane (urée-indole)**

Le milieu urée-tryptophane, improprement appelé urée-indole est un milieu de culture synthétique complexe fournissant un ensemble de résultats utiles à l'identification des entérobactéries. Ce milieu permet la recherche de trois activités enzymatiques.

La production de l'indole, l'hydrolyse de l'urée, la désamination du tryptophane par le tryptophane désaminase.

Onensemencer directement le milieu urée-indole avec quelques gouttes de suspension bactérienne, Incubation à 37°C pendant 48 heures. La lecture se fait comme suit :

### 1. Recherche de l'uréase

Les entérobactéries capables de dégrader l'urée qui est un composé organique et qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase.

La dégradation se fait selon la réaction suivante :

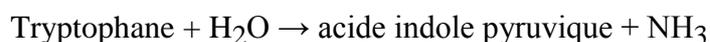


Les ions  $\text{CO}_3^{2-}$  vont entraîner une forte alcalinisation du milieu qui sera révélée par un virage de l'indicateur de pH (le rouge de phénol) à sa teinte basique (rouge).

- ✓ La coloration rouge traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée : uréase+.
- ✓ La coloration orange ou jaune montre l'absence d'hydrolyse de l'urée : uréase -.

### 2. Recherche du tryptophane désaminase

La TDA dégrade le tryptophane selon la réaction suivante :



Ajouter le réactif perchlorure de Fer III (TDA) dans un aliquote du milieu Urée Tryptophane ensemencé et incubé. En présence d'acide indole-pyruvique il y a formation d'un complexe acide indole-pyruvique/Fe III qui précipite. La lecture est immédiate.

- ✓ Obtention d'un précipité brun foncé: TDA +
- ✓ Absence de précipité : TDA -

### 3. Recherche de la production d'indole

Le milieu urée-indole permet la culture des germes ne présentant pas d'exigences particulières. En aérobiose, certaines bactéries dégradant le tryptophane en indole, en acide pyruvique et de l'ammoniaque par l'intermédiaire d'une tryptophanase, l'indole produit est révélé par le réactif de Kovacs.

La tryptophanase hydrolyse le tryptophane selon la réaction suivante :



L'indole forme un complexe coloré en rouge en présence de réactif de Kovacs.

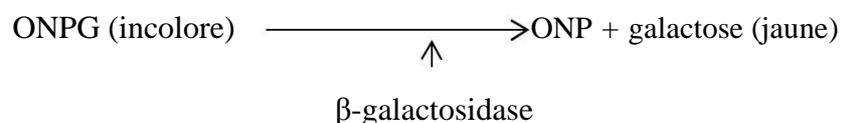
- ✓ Anneau rouge : indole +.
- ✓ Anneau jaune : indole -

#### • Recherche de la $\beta$ -galactosidase (test ONPG)

Il s'agit d'une recherche particulière dans le cadre de l'étude de la dégradation du lactose, dans le cas de bactéries lactose - (dans le but de préciser l'origine de l'incapacité à utiliser le lactose).

Le test ONPG consiste à rechercher la présence de  $\beta$ -galactosidase. On utilise comme substrat, non pas le lactose, mais un autre  $\beta$ -galactoside: l'ortho-nitro-phényl-galactoside (ONPG) qui présente l'avantage d'être hydrolysé en un produit coloré (l'orthonitrophénol: ONP). Ceci est possible car la  $\beta$ -galactosidase n'est pas spécifique du lactose, mais des  $\beta$ -galactosides.

L'hydrolyse de l'ONPG par une  $\beta$ -galactosidase libère du galactose et de l'orthonitrophénol (ONP) de couleur jaune selon cette réaction :



Prélever à l'aide d'une anse une culture bactérienne à partir d'un milieu lactosé gélosé (pente du milieu Kligler-Hajna) et faire une suspension dense dans de l'eau distillée stérile, déposer un disque imprégné d'ONPG, incuber au bain-marie à 37°C pendant 30 minutes ou à 37°C pendant 24 heures.

### Lecture

- ✓ Une coloration jaune traduit l'hydrolyse de l'ONPG : ONPG<sup>+</sup>.
- ✓ L'absence de coloration jaune : ONPG<sup>-</sup>.

### • Production des décarboxylases des acides diamines (ODC, LDC,ADH)

Ces trois tests ont été réalisés sur les tubes des bouillons LDC (lysine décarboxylase), ODC (ornithine décarboxylase), et ADH (arginine dihydrolase) appelés milieux Moeller Falkow.

- Le premier tube contient de la lysine, pour la mise en évidence de la LDC.
- Le deuxième tube contient de l'ornithine, pour la mise en évidence de l'ODC.
- Le troisième tube contient de l'arginine, pour la mise en évidence de l'ADH.
- Un tube témoin ne contiendra aucun acide aminé sera aussi ensemencé.

Nous avons préparé ensuite une suspension bactérienne en eau physiologique de la souche à étudier, ensuite nous avons ensemencé chaque milieu avec 2 à 3 gouttes de cette suspension et nous avons ajouté l'huile de paraffine pour assurer l'anaérobiose (car il s'agit d'enzyme anaérobie « cytoplasmique »).

A la fin, les trois tubes et le tube témoin ont été incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Le test individuel peut être effectué sur le milieu de Moeller contenant l'acide aminé étudié (la lysine, l'ornithine, ou l'arginine), du glucose et un indicateur coloré, le bromocrésol pourpre. La réaction s'effectue en deux temps : Lorsque le glucose est fermenté, il y a un virage au jaune du bromocrésol pourpre, lorsque l'acide aminé est décarboxylé, il y a une réalcalinisation du milieu qui vire au violet. Après incubation de 24 heures à 37°C, un milieu violet trouble correspond à une réaction positive.

Cette alcalinisation est due à :

- l'apparition de produit particulièrement alcalin cadavérine pour LDC, putrescine pour l'ODC, ammoniac et ornithine pour l'ADH.

#### **4.4 L'antibiogramme**

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

Le principe consiste à placer la culture de la bactérie en présence des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci.

#### **Disques d'antibiotiques**

Pour étudier le comportement de *Yersinia enterocolitica* vis-à-vis des antibiotiques, 12 Disques ont été utilisés pour réaliser un antibiogramme sur milieu solide Mueller-Hinton (MH) par la méthode de diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques selon les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), il s'agit : Céfotaxime (CTX, 30µg), Chloramphénicol (C, 30µg), Gentamicine (HLG, 120µg), Sulfaméthoxazole + Triméthoprime (SXT, 25µg), Céfazoline (KZ, 30µg), Péfloxacin (PEF, 5µg), Acide pipémidique (PA, 20µg), Pipéracilline (PI, 100µg), Amoxicilline-acide clavulanique (AMC, 30µg), Céfoxitine (FOX, 30µg), Nitroxoline (NO, 30µg), Amoxicilline (AMX, 25µg), dont leurs diamètres critiques sont représentés . (Annexe 05)

#### **Méthode de diffusion en gélose**

##### **a- Préparation de la gélose**

La gélose Mueller-Hinton fondue au bain-marie a été versée en boîte de Pétri de façon uniforme en respectant une épaisseur d'environ 4mm.

##### **b- Préparation et ajustement de l'inoculum**

A partir d'une culture pure de 18h à 24h sur gélose nutritive, racler à l'aide d'une anse de platine une colonie bien isolée et la transférer dans un tube contenant 3 ml d'eau physiologique stérile. Bien homogénéiser la suspension bactérienne, par la suite l'inoculum est ajusté à l'étalon 0.5 Mac Farland

##### **c- Ensemencement**

L'ensemencement se fait écouvillonnage (méthode de Kirby) :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (inoculum à 0.5 Mac Farland de turbidité).

- L'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube pour le décharger.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Recharger l'écouvillon pour chaque boîte de Pétri.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Après 15 minutes de séchage des boîtes, les disques choisis sont déposés délicatement sur la gélose à 30 mm l'un de l'autre à l'aide d'une pince métallique stérile, en appuyant doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu. Les boîtes sont ensuite laissées à la température ambiante pendant 30 minutes sur la paillasse pour permettre la prédiffusion de l'antibiotique dans la gélose.

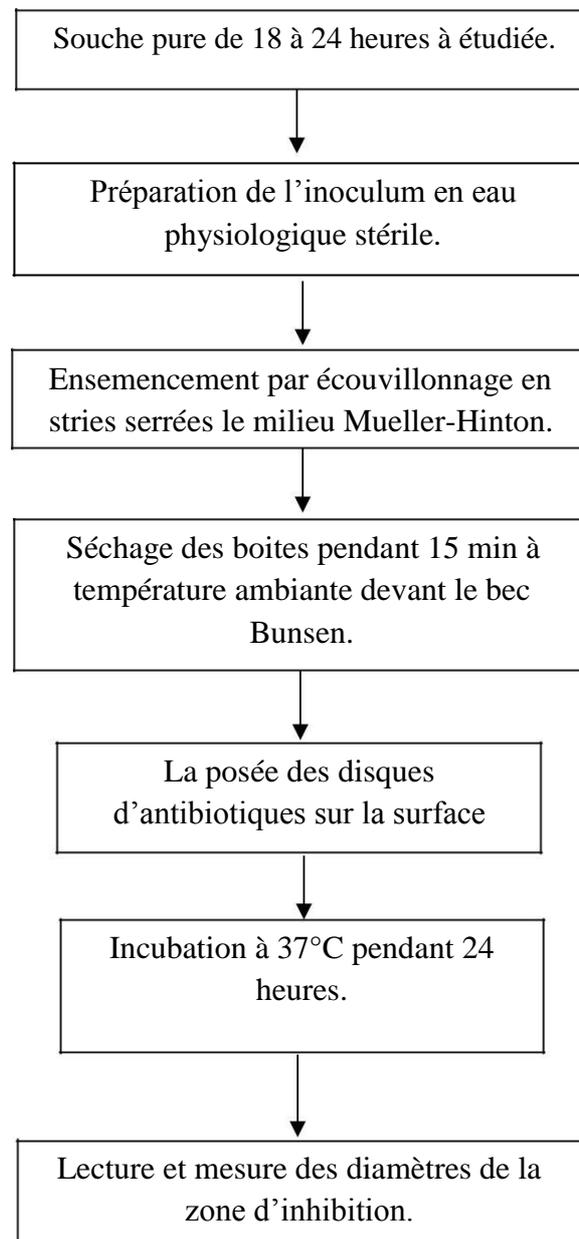
L'incubation se fait à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

### **d- Lecture des résultats**

La lecture doit se faire dans les délais recommandés : 18 à 24 heures pour la méthode par diffusion pour les bactéries de croissance rapides et 2 à 3 jours pour les espèces de croissance difficile.

La lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque d'antibiotique à l'aide du pied à coulisse ou d'une règle, à l'extérieur de la boîte fermée. Les résultats sont exprimés en mm, puis, classer la bactérie dans une des catégories : sensible (S), résistante (R), intermédiaire (I) en se référant aux normes du CLSI (Clinical an Laboratory Standards Institute).

La figure suivante récapitulant la démarche adoptée.



**Figure 06 :** Les étapes de l'antibiogramme.

## **4.5 Analyse de l'ADN bactérien**

### **4.5.1 Extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN total destiné à l'électrophorèse, a été réalisée à partir des suspensions bactériennes.

#### **Etape 1 de la lyse cellulaire**

- Mettre 1.5ml de la culture bactérienne dans un tube eppendorf stérile.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 min pour séparer la biomasse bactérienne du surnageant (riche en métabolites secondaires).
- Retirer le surnageant et redissoudre le culot dans 600 µl de la solution de lyse afin de détruire toutes les membranes biologiques, mélanger au vortex pendant 1 à 3 s.
- Incuber 5 min à 80°C, puis laisser les tubes refroidir 5 min à température ambiante.
- Ajouter 1µl de RNase (pour éliminer les ARN). mélanger en retournant le tube 2 à 5 fois.
- Incuber 15-30min à 37°C, laisser les tubes refroidir sur la paillasse 5 min.

#### **Précipitation des protéines**

- Ajouter 200 µl de protéinase K pour la destruction des protéines (nucléases ..... ) et mélanger vigoureusement pendant 20s.
- Incuber 5 min à 37°C (afin de permettre l'activité de protéinase K).
- Centrifuger 3min à 13000 -16000 rpm.

#### **Précipitation et réhydratation de l'ADN :**

- Récupérer délicatement 600µl de surnageant et les transférer dans un tube propre de 1.5ml puis rajouter 600µl d'isopropanol (pour la précipitation et la déshydratation de l'ADN).
- Mélanger délicatement en inversant le tube (jusqu'à l'apparition une méduse blanche « ADN »).
- Centrifuger 2min à 13000-16000 rpm à 4°C.
- Eliminer délicatement le surnageant à l'aide d'une micropipette.
- Ajouter 600µl d'éthanol 70% et mélanger délicatement en inversant le tube pour laver le culot d'ADN et pour éliminer le maximum de la solution de lyse et de l'isopropanol.

- Centrifuger 2min à 1300-1600 rpm à 4°C.
- Eliminer délicatement le surnageant.
- Inverser le tube et laisser sécher 15-30 min sur la paillasse (évaporation de l'éthanol).
- Ajouter 100µl de la solution de réhydratation de l'ADN et incuber 1h à 65°C ou laisser le tube toute la nuit à 4°C.

### 4.5.2 Electrophorèse

- L'électrophorèse sera réalisée sur gel d'agarose à 1%
- Peser l'agarose, verser dans un erlen.
- Rajouter 50 ml de tampon TBE 0,5X. (Tris Borate EDTA) préparé à partir de TBE 10X (0,89M Tris, 0,89M Acide Borique, 20Mm EDTA).
- Chauffez au micro-onde jusqu'à ébullition (Vérifier que l'agarose soit complètement dissout).
- Laissez refroidir jusqu'à environ 55°C (point de fusion de l'agarose)
- Rajouter deux gouttes de BET (Bromure d'Ethidium).
- Placer les supports de gel et les peignes sur le plateau.
- Verser lentement la solution d'agarose tiède. Ne pas verser l'agarose bouillant sur le support. ça l'abime. Ne pas attendre cependant qu'il soit gélifié. Mettre les peignes.
- Laisser polymériser le gel au moins 30 min à température ambiante.
- Une fois la polymérisation définitive, ôter les peignes avec précaution.
- Transférer un gel dans la cuve d'électrophorèse MUPID (Eurogentec) contenant environ 400 ml de tampon TBE 0.5X.
- Préparer 08µl de votre échantillon + 2µl de tampon de charge.
- Charger les échantillons dans les puits
- Charger le Marqueur de taille moléculaire (3µl).
- Faire migrer en appliquant le courant 100V pendant 20 min dans le bon sens de migration.
- Surveiller la migration

La visualisation a été faite sous UV à l'aide d'un imageur relié à une imprimante. La présence de l'ADN est révélée grâce à la fluorescence du BET piégé entre les molécules.

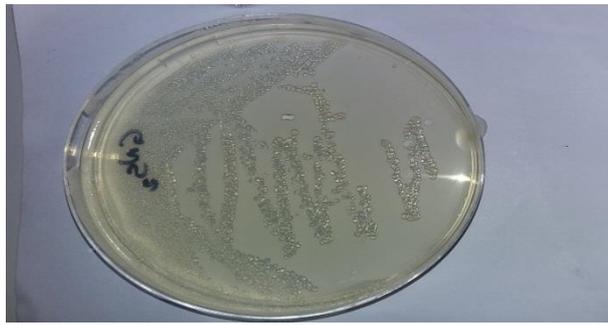
**Résultats**  
**et**  
**discussion**

# 1 Identification bactériologique

## 1.1 Examen macroscopique

Après ensemencement sur les trois milieux de Mac Conkey, de DCL et au GN et incubation à l'étuve à 37°C, nous avons observé au bout de 48 heures la formation des colonies sur les trois milieux avec une croissance très importante et détectable sur milieu Mac Conkey.

- Sur milieu Gélose Nutritive : plusieurs colonies de tailles variables entre 1- 4mm de diamètres se sont formées, transparentes (incolores), brillantes, présentant des différents aspects : ronds, bombés, lisses, contour réguliers.



**Figure 07 :** Aspect des colonies sur Gélose Nutritive.

- Sur milieu DCL : les colonies apparaissent sont des colonies transparentes (incolores), ne ferment pas le lactose et de taille comprise entre 1-3 mm de diamètre, de forme circulaires, légèrement bombées lisses à bords réguliers.



**Figure 08 :** Aspect des colonies sur DCL.

- **Sur milieu Mac Conkey :** les colonies observées avaient les aspects suivants :
  - ✓ Colonies incolores (ferment pas le lactose) de taille comprise entre 1 à 4 mm.
  - ✓ Colonies à surface lisse et semi-bombée, sous forme rondes à bords réguliers, légèrement bombées.



**Figure 09 :** Aspect des colonies sur Mac Conkey.

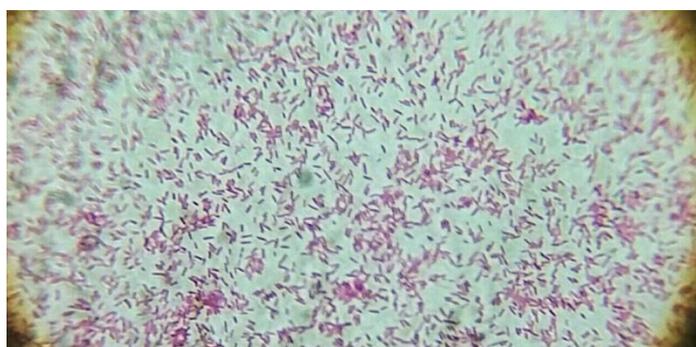
- ✚ Les colonies sur les différents milieux possèdent une odeur caractéristique (odeur de rose).

### 1.2 Etude microscopique

A partir de chaque colonie présomptive, nous avons réalisé une coloration de Gram.

- **Aspect microscopique**

La coloration de Gram a révélé que l'ensemble des colonies isolées sur DCL, Gélose Nutritive, Mac Conkey, sont des bactéries Gram négatif en forme de bacilles (coccobacilles) de taille différente isolées ou en amas, de couleur roses, se sont des bactéries à Gram négatif compatible avec l'aspect microscopique de *Y.enterocolitica*, elle a permis également de vérifier la pureté de la culture.



**Figure 10 :** Aspect microscopique (coloration de Gram) de *Y.enterocolitica*. (G  $\times$ 100).

L'ensemble des résultats obtenus relatifs à l'aspect macroscopique et microscopique suggèrent que les souches ont la même description des *Y.enterocolitica*.

**2 Identification biochimiques:** l'identification de *Y.enterocolitica* est basée sur l'étude des caractères biochimiques en utilisant la galerie classique, qui nécessite dans un premier temps la réalisation d'une suspension bactérienne et ensuite l'ensemencement des

différents milieux de culture qui constituent la galerie, ce qui nous indique l'appartenance de ces souches à l'espèce *Y. enterocolitica*.

### ✚ Test de l'oxydase

La réaction positive s'est traduite par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée soit immédiatement, soit quelques secondes après.

L'absence de coloration violette révèle un résultat négatif sur les disques d'oxydase. Donc les souches étudiées sont oxydase<sup>-</sup>.

### ✚ Test catalase

Toutes les colonies testées sont catalase positive dont la présence se manifeste par un dégagement de bulles d'air dès leur contact avec l'eau oxygénée.

Donc Les souches identifiées sont catalase+.



**Figure 11:** Résultat du test de catalase.

### Nitrate réductase

**Tableau 09** : Recherche Nitrate réductase.

Aspect du milieu avant utilisation	Aspect du milieu après utilisation	Résultats
		<p>Le milieu devient rouge : présence de nitrites. Donc la bactérie possède une nitrate réductase. Elle est dite NR+.</p> <p>Coloration jaune du milieu : absence de nitrate dans le milieu à cause de :- absence de nitrite réductase ou réduction Des nitrates jusqu'au stade N<sub>2</sub>. Dans ce cas on ajoute au milieu une petite quantité de poudre de zinc qui est un catalyseur chimique la réduction des nitrates en nitrites et qui va réagir avec d'éventuels nitrates Restant dans le milieu.</p> <p>-coloration rouge du milieu après addition de zinc : on a donc eu transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possédait pas cette enzyme. Elle est dite NR-</p> <p>-coloration jaune du milieu après addition de zinc : les nitrates ont été transformés par la bactérie au delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. Elle est dite NR+.</p>

**NB** : Les souches identifiées sont Nitrate réductase (+).

### Milieu KIA

Après incubation du milieu KIA à 37°C pendant 48 heures nos souches ont présenté différents aspects.

**Tableau 10:** Recherche de l'utilisation du Glucose, du lactose, de la production de Gaz et H<sub>2</sub>S sur milieu KIA.

Aspect du milieu avant Utilisation	Aspect du milieu après Utilisation	Résultats
		<p>La fermentation des glucides (glucose et lactose) provoque une production d'acide qui est détectée par l'indicateur de pH (rouge de phénol).</p> <p>Fermentation du glucose :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Culot rouge : glucose non fermenté.</li> <li>-Culot jaune : glucose fermenté.</li> </ul> <p>▪ Fermentation du lactose :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Pente inclinée rouge : lactose non fermenté.</li> <li>-Pente Inclinée jaune : lactose fermenté.</li> </ul> <p>▪ La production de gaz :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Apparition des bulles de gaz dans la gélose ou un décollement de celle-ci.</li> <li>▪ Formation d'H<sub>2</sub>S : Production d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la pique.</li> </ul>

**NB :** Les souches de *Yersinia enterocolitica* étudiées sont : glu<sup>+</sup>, lac<sup>-</sup>, gaz<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> à l'exception des souches 8 et 7 qui sont lac<sup>+</sup>, glu<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>S<sup>-</sup>, gaz<sup>-</sup>.

**Citrate de Simmons**

**Tableau 11 :** Recherche de l'utilisation du Citrate.

Aspect du milieu avant utilisation	Aspect du milieu après utilisation	Résultats	
		Résultat positif	Résultat négatif
		<p>-une croissance et virage au bleu de l'indicateur de pH (alcalinisation du milieu).</p> <p>- la souche est capable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone : souche citrate de Simmons <sup>+</sup>.</p> <p>- Elle n'a donc pas besoin de facteurs de croissance.</p>	<p>-aucune croissance, ou la présence de traces de croissance sans changement de couleur. (absence d'alcalinisation).</p> <p>- la souche Est incapable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone : souche citrate De Simmons <sup>-</sup>.</p> <p>-Soit elle besoin de facteurs De croissance soit Elle ne peut Pas métaboliser le citrate.</p>

**NB :** Les souches de *Y. enterocolitica* étudiées sont Citrate-.

**Milieu Mannitol Mobilité**

**Tableau 12 :** Test Mannitol-Mobilité.

Aspect du Milieu Avant utilisation	Aspect du milieu après utilisation	Résultats
		<p>-Acidification du milieu révélée par un virage de l'indicateur de pH (rouge de phénol) vers le jaune. (mannitol<sup>+</sup>).</p> <p>-Absence d'acidification du milieu, (le milieu reste rouge). (mannitol<sup>-</sup>)</p> <p>-Diffusion des bactéries autour de la piqure centrale. (mobilité<sup>+</sup>).</p> <p>-Culture uniquement au niveau de la piqure centrale. (mobilité<sup>-</sup>).</p>

**NB:** Les souches de *Y. enterocolitica* utilisées sont :  
 Mannitol (+), mobilité (+) à 25°C.  
 Mannitol (+), mobilité (-) à 37°C.

✚ Milieu urée-tryptophane (urée-indole)

Tableau 13 : Test uréase, Test de la TDA.

Aspect du milieu avant utilisation	Aspect du milieu après utilisation	Résultats
		<p>-la dégradation de l'urée par les bactéries possédant une uréase s'accompagne d'une alcalinisation qui provoque le virage au rouge violet de l'indicateur coloré (rouge de phénol) et formation de carbonate d'ammonium. Elle est dite uréase+.</p> <p>-La coloration orange ou jaune montre l'absence d'hydrolyse de l'urée. Elle est dite uréase-.</p>
		<p>-la présence de la TDA se caractérise par un virage immédiat du milieu, du brun-claire au brun-rouge, avec ou sans précipité (présence d'acide indole-pyruvique). Elle est dite TDA +.</p> <p>-coloration jaune (coloration inchangé) montre l'absence d'acide indole-pyruvique. Elle est dite TDA- .</p>

NB: les souches étudiées sont : TDA (-), uréase (+).

**Tableau 14:** Recherche production d'indole.

Aspect du milieu avant utilisation	Aspect du milieu après utilisation	Résultats
		<p>-Formation d'un anneau rouge traduit la présence d'indole. Elle est dite indole +.</p> <p>- Absence de coloration rouge (anneau jaunâtre) montre l'absence de production d'indole. Elle est dite indole -.</p>

**NB :** toutes les souches utilisées sont indole (-) à l'exception de la souche 2 et 4 qui sont indole (+).

**Test RM**

**Tableau 15 :** Test Rouge de Méthyle (RM)

Aspect du milieu avant utilisation	Aspect du milieu après utilisation	Résultats
		<p>-La coloration rouge montre un milieu relativement acide. la bactérie provoque d'abord une forte acidification du milieu. Elle est dite RM<sup>+</sup>.</p> <p>-la coloration jaune montre un milieu légèrement acide ou alcalin. La bactérie acidifie peu ou réalcalinise. Elle est dite RM<sup>-</sup>.</p>

**NB :** les souches sont RM (+).

Test VP

Tableau 16 : Test Vosges Proskauer (VP).

Aspect du milieu avant utilisation		Résultats
		<p>Coloration rose est due à l'action de la 3-hydroxybutanone sur les peptones, catalysée par le naphth-1-ol en milieu alcalin et oxygéné. La bactérie produit donc 3-hydroxybutanone ou un de ses dérivés. Elle est dite VP<sup>+</sup>.</p> <p>l'absence de coloration rose montre l'absence de production 3-hydroxybutanone. Elle est dite VP<sup>-</sup>.</p>

**NB:** les souches utilisées sont VP (-)

### Test ONPG

**Tableau 17** : Test production de la  $\beta$ -galactosidase.

Aspect du milieu avant utilisation	Aspect du milieu après utilisation	Résultats
		-Une coloration jaune traduit l'hydrolyse de l'ONPG. Elle est dite ONPG+  -L'absence de coloration jaune montre l'absence d'hydrolyse De l'ONPG. Elle Est dite ONPG-.

**NB:** Les souches étudiées sont ONPG (+)

### Production des décarboxylase :

Les enzymes recherchés sont :

- ✓ LDC : lysine décarboxylase.
- ✓ ODC : ornithine décarboxylase.
- ✓ ADH : arginine dihydrolase.

Qui catalysent respectivement la décarboxylation de la lysine, l'ornithine et l'arginine. Cette dégradation aboutit à la formation de produits basiques ; l'alcalinisation du milieu est révélée par un virage de l'indicateur de pH (le pourpre de bromocrésol) à sa teinte basique (violette). Nous avons obtenu les résultats suivants :

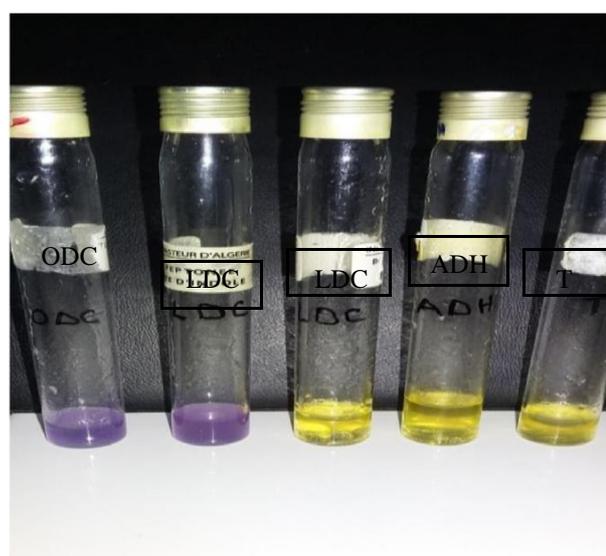
Pour les huit souches de *Y. enterocolitica* le milieu ODC n'a pas changé de couleur et il est resté violet (il y a eu acidification du milieu liée à la fermentation du glucose puis il y eu réalcalinisation du milieu liée à la dégradation du substrat (ornithine) par la bactérie donc elle est dite ODC positif.

Pour le milieu ADH a changé de couleur et est devenu jaune car il y a eu acidification du milieu liée à l'utilisation du glucose mais il n'y a pas eu réalcalinisation. Le substrat n'a donc pas été dégradé. Elle est dite ADH négatif.

Par contre les résultats sont variables pour le milieu LDC, les souches S1, S2, S3, S4 et S10 sont dite LDC positif car le milieu n'a pas changé de couleur et il est resté violet. En ce qui concerne les souches S5, S6, et S9 sont dite LDC négatif. (Coloration jaune du milieu).



**Figure 12 :** Aspect des milieux avant utilisation (ODC, LDC, ADH, Témoin).



**Figure 13 :** Production des décarboxylases ODC, LDC, ADH.

✚ Récapitulation des résultats

Le tableau récapitule les résultats d'identification des dix souches.

**Tableau 18** : les caractères d'identification des dix souches de *Y. enterocolitica*.

Souches		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Tests											
Coloration de Gram		Gram -									
Forme		Cocco-bacille									
Oxydase		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
catalase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate réductase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lactose		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
H <sub>2</sub> S		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gaz		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate de Simmons		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mobilité	25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uréase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole		-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
TDA		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RM		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC		+	+	+	+	+	+	NF	NF	+	+
LDC		+	+	+	+	-	-	NF	NF	-	+
ADH		-	-	-	-	-	-	NF	NF	-	-

(+): positif.

(-): négatif.

NF : non fait

### 3 L'antibiogramme

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion des disques sur gélose Mueller-Hinton et interprété après la mesure des diamètres d'inhibition selon les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

L'interprétation de test de l'antibiogramme a été faite par la méthode de détermination de la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis de divers antibiotiques.

Après 48 heures d'incubation et pour chaque antibiotique on mesure le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne et cela est fait à l'aide d'une règle.

La sensibilité aux antibiotiques : le diamètre mesurer permet donc d'indiquer si les germes sont sensibles ou résistants à l'antibiotique testé : les résultats obtenus ont été comparés aux valeurs critiques, on peut les classer en trois catégories : Sensible (S), Résistante (R), Intermédiaire (I).

Les résultats d'antibiogramme, sont reportés dans le tableau n° 19 :

**Tableau 19 :** Les résultats de l'antibiogramme pour toutes les souches

Souches Tests	Diamètres mesurés	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
AMX	12-25	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
FOX	22-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CTX	06-33	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
AMC	14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PI	25-37	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KZ	<06	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PA	16-34	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NO	≥30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	06-30	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
PEF	06-26	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
SXT	06-25	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
HLG	06-27	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S

S : Sensible

R : Résistance

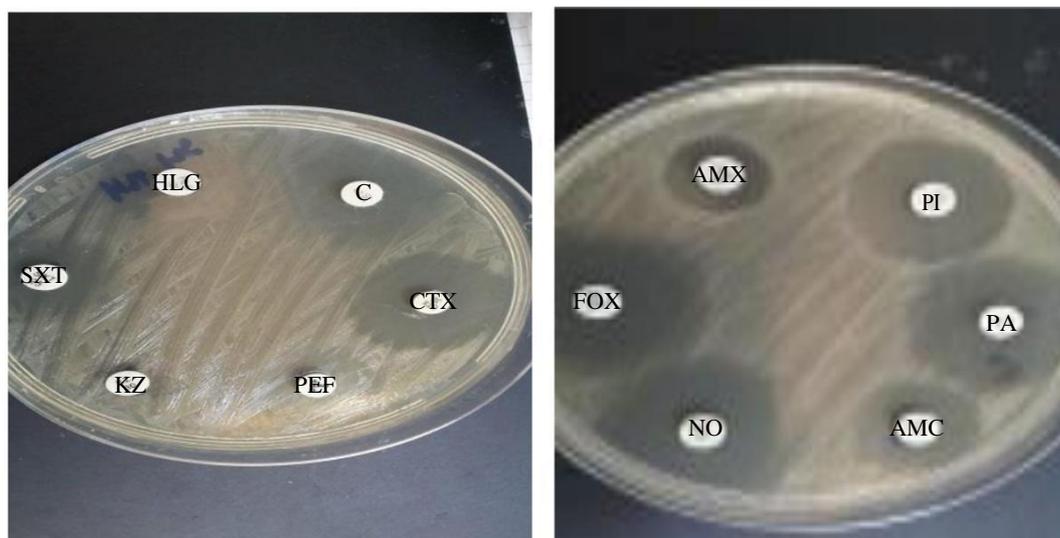


Figure 14 : Résultats de l'antibiogramme.

### 4 Profil électrophorétique de l'ADN total

L'identification bactérienne se fait traditionnellement à partir des caractères phénotypiques de la bactérie : coloration de Gram, morphologie, aptitude à croître sur certains milieux de cultures, caractères biochimiques et physiologiques ... etc. détectés par diverses techniques. Toutefois la caractérisation génotypique est utilisée.

Après les différentes étapes d'extraction de l'ADN des souches de *Y. enterocolitica* on observe l'apparition d'une pelote blanche. (Figure 15).

L'électrophorèse sur gel d'agarose nous a permis d'établir les profils électrophorétiques de huit souches identifiées. (Figure 16).

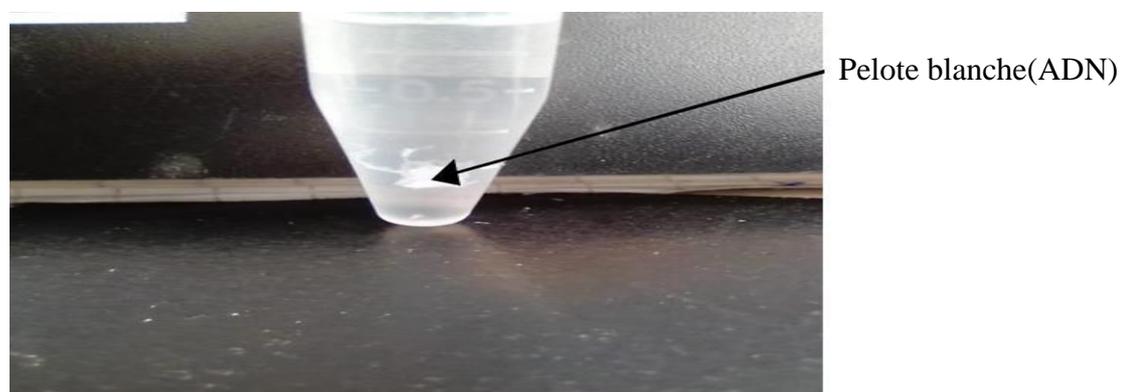
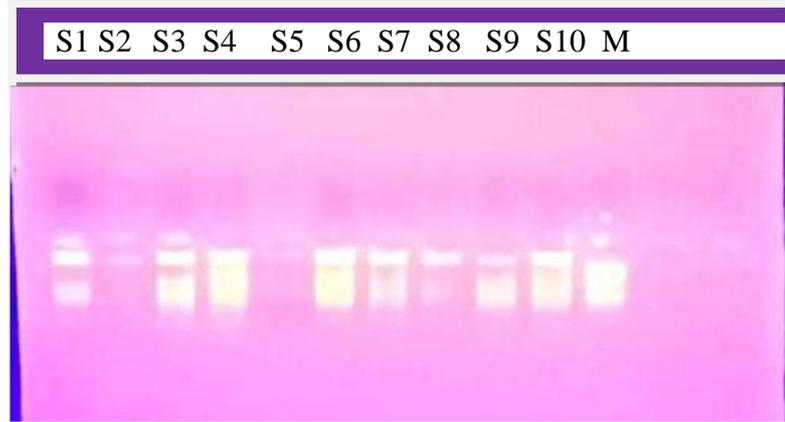


Figure 15 : Résultat de l'extraction de l'ADN bactérien.



**Figure 16 :** Profils électrophorétiques de l'ADN des souches.

### Discussion des résultats

Cette étude a été menée dans le but de caractériser dix souches de *Yersinia enterocolitica* sur le plan morphologique, culturale et biochimique, l'étude de leur comportement vis-à-vis des antibiotiques et dans un deuxième temps l'extraction ainsi que la visualisation de l'ADN totale des souches étudiées.

#### 1. Purification et identification des souches

Après revivification nous avons commencé par la présentation de l'aspect macroscopique ainsi que le Gram des souches. Après examen, nous avons identifiés les souches par leurs caractères biochimiques (Galerie classique), nous avons testés leurs sensibilités aux antibiotiques en utilisant le milieu Mueller-Hinton. Enfin nous avons extrait et visualisé l'ADN totale des souches.

Les milieux d'isolement Mac Conkey et DCL ont présenté une sélectivité plus ou moins efficace qui a permis l'apparition de différentes colonies. Mais aussi plusieurs colonies ont pu croître sur GN, ces milieux ont montré une valeur d'isolement égale pour les dix souches, qui ont bien poussé avec des colonies typiques ainsi que la présence de l'odeur spécifique de *Y. enterocolitica* (l'odeur de rose).

Cependant le milieu CIN (cefsulodine, irgasan, novobiocine) est préféré, car il est capable de détecter de faible quantité de *Yersinia enterocolitica*. [46]

En effet, les aspects microscopiques et morphologiques des colonies des souches étudiées sont en accord avec la description faite par les auteurs. Notre étude microscopique montre des coccobacilles de différentes tailles à Gram négatif.

L'isolement sur ces milieux spécifiques, nous a permis de tester les colonies présomptives prélevées sur ces milieux. Toutes les souches testées présentaient une Oxydase négative.

Le but du test d'oxydase est la recherche d'un système Cytochrome C des bactéries (oxydase positive). Ce test est un bon contrôle pour les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, car elles sont toutes oxydases négatives. [129]

Après avoir effectué le test catalase, toutes les souches étudiées présenter un caractère catalase (+).

Ces trois résultats (Gram, oxydase et catalase) de nos souches nous orientons vers la famille des entérobactéries. De plus, ne possédant pas de désaminase TDA ce qui exclut les genres *Proteus*, *Morganella* et *Providencia*.

Selon la littérature, les souches de *Y. enterocolitica* sont nitrate réductase positive. Ce qui est concorde parfaitement avec nos résultats.

Il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des *Yersinia enterocolitica* grâce aux galeries biochimiques classiques.

Le milieu KIA permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du glucose, lactose avec ou sans production de gaz et de la production de sulfure d'hydrogène.

Nos souches sont lactose négatif, utilisent le glucose par voie fermentative sans production de gaz et ne produisent pas de sulfure d'hydrogène.

La fermentation du mannitol se traduit par une acidification du milieu. Durant cette étude, nous avons bien observé que toutes les souches utilisent le mannitol comme source de carbone et d'énergie.

D'après cette étude, les souches ont obtenu des résultats positifs concernant le test de mobilité à température ambiante (25°C), mais toutes les souches présentent des résultats négatifs à 37°C.

Le milieu citrate de Simmons est un milieu synthétique où la seule source de carbone est le citrate. L'utilisation de citrate se traduira par une alcalinisation du milieu (virage de

l'indicateur). Dans l'étude qui a été faite la couleur du milieu reste verte avec toutes les souches donc n'utilisent pas le citrate.

Avec les souches de *Y. enterocolitica* étudiées, nous avons constaté une réponse à l'urée fortement positive. Ce phénomène nous s'explique par le fait que ces souches possèdent une uréase très active qui entraîne la formation d'ions ammonium. La base d'identification des *Yersinia* est l'activité uréasique.

L'étude des différentes voies fermentatives intermédiaires permet d'effectuer une différenciation entre la fermentation des acides mixtes (réaction rouge de méthyle : RM) et butylène glycolique (réaction Voges-Proskauer : VP). Une souche RM<sup>+</sup> est habituellement VP<sup>-</sup> est vice versa. Les souches de *Y. enterocolitica* utilisées pendant notre étude sont VP<sup>-</sup>, RM<sup>+</sup> à 37°C.

Dans le test ONPG, c'est donc la β-galactosidase qui est recherchée, cette enzyme permet de scinder le composé synthétique, incolore, ONPG, (orthonitrophényl-β-D-galactopiranoside) et libérer l'orthonitrophénol soluble qui donne la coloration jaune. Dans notre étude, nous avons observé le caractère lactose (-) chez toutes les souches sur les milieux lactosés habituels mais l'ONPG est positif.

Les enzymes décarboxylases (LDC, ODC) et décarboxylase et dihydrolase (ADH) utilisées dans les galeries biochimiques réalisées pour l'identification des souches bactériennes isolées, présentent toutes un intérêt taxonomique.

Les tests de l'ODC sont positifs, celui de LDC sont variables et l'ADH et du tryptophane désaminase TDA, indole sont constamment négatifs.

On remarque que parmi les propriétés physiologiques générales de *Y. enterocolitica*, le métabolisme thermodépendant constitue une caractéristique originale et dominante d'autant plus qu'elle est psychrophile.

En somme, les résultats de la caractérisation physiologique révèlent que les souches sont : Gram<sup>-</sup>, oxydase<sup>-</sup>, catalase<sup>+</sup>, nitrate réductase<sup>+</sup>, lactose<sup>-</sup>, glucose<sup>+</sup>, gaz<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>S<sup>-</sup>, citrate<sup>-</sup>, RM<sup>+</sup>, VP<sup>-</sup>, mannitol<sup>+</sup>, mobilité<sup>+</sup> à 25°C, ONPG<sup>+</sup>, uréase<sup>+</sup>, indole<sup>-</sup>, TDA<sup>-</sup>, ADH<sup>-</sup>, ODC<sup>+</sup> et LDC variable.

A travers ces résultats qui sont en parfait accord avec ceux des auteurs cités précédemment [24, 39, 46, 47, 48, 56], nous pouvons admettre que nos souches possèdent un profil de *Y.enterocolitica*.

D'une manière générale, d'après notre étude et la série de tests biochimiques et bactériologique que nous avons réalisés, nos résultats montrent qu'ils sont dans la majorité des cas stable et intéressants pour l'identification bactérienne.

En comparant nos résultats avec ceux rapportés par Boulahlib.S et Benrahma.M (2013). [130], nous pouvons dire que notre identification par rapport à ces caractères biochimiques et microbiologiques sont en accord avec les résultats trouvés lors de cette étude.

### 2. Antibiogramme

D'après les résultats de l'antibiogramme les antibiotiques les plus actifs sur nos souches étaient : sulfaméthoxazole + triméthoprim, péfloxacin, chloramphénicol, cefotaxime, acide pipémidique nitroxoline et céfoxitine.

En ce qui concerne la pipéracilline nos résultats présentent une discordance avec les résultats décrits par Biomnis. [76] qui a confirmé la résistance de *Y.enterocolitica* à la pipéracilline, alors que notre étude, nous avons trouvé que 100% des souches de cette espèce sont sensibles.

La gentamicine gardent une excellente activité et reste jusque là très actifs sur les entérobactéries.

En revanche les antibiotiques les moins actifs sur nos souches étaient les  $\beta$ -lactamines (amoxicilline, amoxicilline + acide clavulanique et cefazoline,

Cette résistance aux  $\beta$ -lactamines a été décrite par Bingen et ses collaborateurs [75] ; et Biomnis [76], qui rapportent que cette résistance est due à la production de  $\beta$ -lactamase qui hydrolyse le noyau  $\beta$ -lactame.

Nous observons que la souche 7 présente un comportement avec les antibiotiques diffère que les autres souches de *Y.enterocolitica*.

La situation n'est pas alarmante vue la sensibilité aux autres antibiotiques qui représentent une excellente activité.

Ces résultats montrent que les souches utilisées dans notre étude sont sensibles à la quasi-totalité des antibiotiques testés.

### 3. Profils électrophorétiques

Le typage des isollements de *Y. enterocolitica* était déterminé uniquement par l'analyse des marqueurs phénotypiques utilisant le biotypage et le sérotypage. Le génotypage de *Y. enterocolitica* s'est beaucoup amélioré durant les dernières décennies, et plusieurs méthodes différentes basées sur l'analyse de l'ADN ont été utilisées pour caractériser les souches de *Y. enterocolitica*. C'est pourquoi de nombreux facteurs liés à l'épidémiologie de *Y. enterocolitica*, tels que les sources et les voies de transmission, restent encore à prouver. [11]

L'apparition de la méduse blanchâtre nous confirme que on a vraiment extrait l'ADN génomique des souches de *Yersinia enterocolitica*.

L'extraction des souches ainsi que leur électrophorèse sur gel d'agarose a permis d'obtenir des bandes fluorescentes après observation sous UV.

Les profils électrophorétiques des souches renseignent sur la possibilité d'utiliser cette technique en microbiologie afin de confirmer la place systématique des germes isolés. Cependant, il faut améliorer la qualité des gels pour faire meilleur distinction entre les individus bactériens.

Les discordance liées à la recherche de certains caractères peuvent être expliqués par une mauvaise manipulation dont la contamination qui est un phénomène courant lors d'isolement des bactéries au niveau du laboratoire qui est à l'origine de difficulté d'avoir une souche pure, ou bien ces discordances sont dues à la mutation qui nécessite une grande attention quand on sait que la mutation et le réarrangement sont deux mécanismes permettant aux bactéries de créer de nouveau gènes de résistance aux antibiotiques, à travers une modification ponctuelle ou un réarrangement de leurs ADN.

# **CONCLUSION GENERALE**

### Conclusion générale

Les objectifs de ce travail étaient d'une part l'identification biochimique et microbiologique (caractérisation morphologiques et culturelles) par des méthodes conventionnelles de dix souches de *Y. enterocolitica* et la détermination de leur résistance vis-à-vis les antibiotiques couramment utilisés, d'autre part l'extraction et la visualisation de l'ADN total des souches étudiées.

La caractérisation repose sur un ensemble de tests biochimiques pour une identification phénotypique classique et une électrophorèse en raison d'identification génotypique. Ce couple de techniques (phénotypique et génotypique) permettant une meilleure identification des souches.

Alors, dans cette étude dix souches de *Y. enterocolitica* ont été caractérisés. Les résultats obtenus, nous a permis de confirmer l'appartenance des souches étudiées à *Yersinia enterocolitica*.

L'étude de l'aspect morphologique est le premier test effectué pour identifier une bactérie. Nos souches sont des petits bacilles (coccobacilles) à Gram négatif. La culture est possible sur des milieux sélectifs comme DCL et Mac Conkey. Après 48 heures d'incubation à 37°C les souches de *Y. enterocolitica* apparaissent sous forme des petites colonies de taille variable.

Au vu des résultats des tests biochimiques obtenus, il ressort que les souches étudiées ont présenté les caractéristiques suivantes : oxydase<sup>-</sup>, catalase<sup>+</sup>, nitrate réductase<sup>+</sup>, lactose-, glucose+, gaz-, H<sub>2</sub>S-, RM+, VP-, mannitol+, ONPG+, uréase+ ODC+.

Les tests suivants sont négatifs à 37°C: citrate, indole, TDA, ADH.

Le test de la mobilité présente une dépendance vis-à-vis la température de croissance : mobilité positif à 25°C et négatif à 37°C.

Dans notre étude nous avons essayée aussi de déterminer le profil de la résistance des nos souches vis-à-vis des antibiotiques sur milieu gélosé par la méthode de diffusion des disques, selon les recommandations du CLSI. Les résultats obtenus nous ont permis de constater que :

Les bacilles isolées sont marquées par une forte sensibilité vis-à-vis tous les antibiotiques sauf l'amoxicilline, l'amoxicilline + l'acide clavulanique et la cefazoline, qui ont présenté une résistance.

L'extraction ainsi que les profils électrophorétiques de l'ADN total des souches étudiées a donné un début de résultats qu'il faut développer plus avec d'autre méthode moléculaire (PCR, RFLP, profil de restriction).

Les résultats obtenus ouvrent des perspectives futures :

- ✚ Mener une étude prospective sur le nombre d'infection à *Y.enterocolitica* en Algérie.
- ✚ Etudier les mécanismes de la multi résistance aux antibiotiques des souches isolées.
- ✚ Caractérisation moléculaire de la résistance aux antibiotiques.
- ✚ Les méthodes phénotypiques restent cependant limitées à un diagnostic présomptif, qui devrait être soutenu par des techniques plus performantes (les techniques moléculaires) qui pourrait mieux contribuer à identifier les souches.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

### Références bibliographiques

- [1]-**Habi, S. (2000)**. Etude de la Métallo-résistance et de l'Halo-tolérance des Entérobactéries Isolées des Eaux de Surface de la Région de Sétif. Thèse de doctorat: Microbiologie. Sétif : Université Ferhat Abbas, 156 p.
- [2]-**Full text of "Bergey's manual of determinative bacteriology"**. [En ligne]. (Page consultée le 15-02-2018)  
[https://archive.org/stream/bergeysmanualofd00amer/bergeysmanualofd00amer\\_djvu.txt](https://archive.org/stream/bergeysmanualofd00amer/bergeysmanualofd00amer_djvu.txt) [3]-
- [3]-**Bendoukhane, H., Djafer, K. (2016)**. MALDI -TOF spectrométrie de masse: Un outil efficace pour l'identification rapide et fiable des souches bactériennes. Mémoire Master:Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes .Constantine :Université Mentouri, 68p.
- [4]-<http://www.microbes-edu.org/etudiant/entero.html>. [En ligne]. (Consulté le 16-02-2018)
- [5]-[fr.wikipedia.org/wiki/Enterobacteriaceae](http://fr.wikipedia.org/wiki/Enterobacteriaceae). [En ligne]. (Consulté le 16-02-2018)
- [6]-**Madigan, M., Martinko, J. (2007)**. Brock biologie des microorganismes 11<sup>ème</sup> édition:Pearson Education France, France.354-357-706p.
- [7]-**Bernard D,D., Renato, D., Herman N, E., Harold S, G. (1990)**. Microbiology: fourth edition. Lippincott Company, J. B: United States of America. 601- 603p. [8]-**Brooks, G., Butel, J., Ornston, N. (1995)**. Medical Microbiology: 20<sup>ème</sup> édition:Appleton & Lang, London. 239p.
- [9]-**Pinon, G., Robert, V. (1982)**. La nouvelle bactériologie médicale: des régions développées, ellipses, Paris.293-56p.
- [10]-**Jérôme, L. (2014)**. Nouveaux anticorps monoclonaux contre les *Yersinia* pour le diagnostic et l'immunothérapie. Thèse de doctorat : Microbiologie. Paris : Université PARIS-SUD, 235 p.
- [11]-**Marie-Agnès, A. (2003)**. Le danger *Yersinia enterocolitica*. Thèse de doctorat :Vétérinaire. Paris : École nationale vétérinaire d'Alfort, 121 p.
- [12]-**Berche, P., Louisgallard, J., Simonet, M. (1988)**. Bactériologie: les bactéries des infections humaines. : Flammarion, Paris.128p.
- [13]-**Holt, J., krieg, N., Sneath, P., Staley, J., Williams, S. (1994)**. Bergay's Manuel of determinative Bacteriology Ninth Edition : Williams & Wilkins, Baltimore. 189p.

- [14]-Badri, N. et Necib, T. (2016). Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches des *Entérobactéries* isolée de fromage frais artisanale "Jben". Mémoire de Mastère: Microbiologie Appliquée à la Santé et l'Environnement. Tébessa : Université de Larbi Tébessi, 126 p.
- [15]-Cornelis-G,R., Boland, A., Boyd-A,P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., et al, (1998). Thirulence plasmide of yersinia, An antihoste genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, **62**, 1315-1352
- [16] Bioweb. [Uwlax.edu/bio203/2007./taylor-kri2/classification.htm](http://Uwlax.edu/bio203/2007./taylor-kri2/classification.htm)
- [17]-Carip, C. (2008). Microbiologie hygiène: Bases microbiologique de la diététique. Ed TEC & DOC Lavoisier, Paris.89-257p.
- [18]-Agence française de sécurité sanitaire des aliments. (2016). Fiche de description de danger transmissible par les aliments: *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*. Agent de la yersiniose, pseudotuberculose.
- [19]-Denis, F., Poly, C.M., Martin, C., Bingen, E., Quentin, R. (2007). Bactériologie médicale: 2<sup>ème</sup> édition : techniques usuelles. Elsevier Masson, Paris.333p. [20]-Grosjeau, J., Clavé, D., Archambaud, M., Pasquier, C. (2011). Bactériologie et virologie pratique: 2<sup>ème</sup> édition, de boeck, Paris. 128p.
- [21] <http://www.microbes-edu.org/professionnel/yer1.html>. [En ligne]. (Consulté le 25-02-2018)
- [22]-Savin, C., Carniel, E. (2008). Les diarrhées d'origine Bactérienne le cas de *Yersinia enterocolitica*. Maladies réglementées chez primates. Thèse de doctorat: vétérinaire. Université Paul-Sabaluer de Toulouse, 285p.
- [23]-Meziani, M. (2012). Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*. Mémoire de Magistère : Biochimie. Constantine : Université Mentouri Constantine, 96 p.
- [24]-le Minor, L., Véron, M. (1989). Bactériologie médicale: 2<sup>ème</sup> édition, Edition Flammarion médecine- science, Paris.390-464p.
- [25]-Paolozzi, L., Claude-Liébart, J. (2015). Microbiologie: Biologie des procaryotes et de leurs virus, Dunod, Paris.432p.
- [26]-[www.lab-cerba.com/pdf/0539F.pdf](http://www.lab-cerba.com/pdf/0539F.pdf). [En ligne]. (Consulté le 25-02-2018)
- [27]-Santé sécurité: Agent pathogène- yersinia pseudo. [En ligne] <http://www.canda.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques-yersinia-pseudotuberculosis.html> . (Consulté le 25-02-2018)

- [28]-Olds, R.J. (1979). Atlas en couleurs de Microbiologie: Maloine, Paris. 64p.
- [29]-[http://atlas.sund.ku.dk/microatlas/veterinary/bacteria/Yersinia\\_pseudotuberculosis](http://atlas.sund.ku.dk/microatlas/veterinary/bacteria/Yersinia_pseudotuberculosis). [En ligne]. (Consulté le 25-02-2018)
- [30]-Danis, M. Bégué, P. Kerouédan, D. et al (2012). Médecine tropicale: 6<sup>ème</sup> édition, Lavoisier, Paris. 551-52p.
- [31]-Florent,S. (2002).Caractérisation génétique du locus uréase de *Yersinia pestis* et *Yersinia pseudotuberculosis* : thèse de doctorat: biologie et santé. Université des sciences et technologie de Lille, 174p.
- [32]- Publiche health England. (2015). Identification of yersinia species, Bacteriology identification, 3, 1- 22
- [33]-Klein, Harly, Willy, Sherwood, Woolverton. (2010). microbiologie 3<sup>ème</sup> édition :Boeck, Paris. 962p.
- [34]-Tortra, G., Funke, B., Case, C. (2003). Introduction à la microbiologie : édition du Renouveau Pédagogique INC, Québec. 698p.
- [35]-Eben-Moussi, E. (2014). Le Monde des microbes: Fascinant, redoutable, rebelle:L'Harmattan, Paris. 142-144p.
- [36]-Singleton, P. (2005). Bactériologie: pour la médecine, la biologie et la biotechnologie 6<sup>ème</sup> édition: Dunod, Paris.464-467p.
- [37]-Bousseboua, H. (2005). Elément de microbiologie 2<sup>ème</sup> édition : Programme de graduation biologie, médecine, pharmacie, chirurgie dentaire, science vétérinaire, science alimentaire, Agronomie. Campus – Club, Constantine (Algérie). 275p.
- [38]-Confédération suisse. (2012). Peste: agent pathogène *Yersinia pestis*, laboratoire de Spiez, 1-2p
- [39]-Fredriksson-A,M. (1964).*Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Food borne diseases, 4–99
- [40]-Rabson, R., Koornhof, J. (1972). *Yersinia enterocolitica* infection in South Africa, suplement. South African journal of laboratory and clinical medicine.798-803
- [41]-Pierre-Guiraud, J. (1998). Microbiologie Alimentaire : Dunod, Paris.84p.
- [42]-Daniel,J. J., Goudzwaard, C.(1963). Enkele stammen Van een op *Pasteurella pseudotuberculosis* gelijkendniet geidentificeerd species geïsoleerd bij knaagdieren. Tijdschrift voor diergeneeskunde, 88(2), 96-102
- [43]-Pierre-Guiraud, J. (2012). Microbiologie Alimentaire: Dunod, Paris.139p.

- [44]-Beerens, H. (1986). Société française de microbiologie: section microbiologie alimentaire, Paris. 132-141p.
- [45]-Avril, J., Dabernat, H., Denis, F., Montel, H. (2000). Bactériologie Clinique 3<sup>ème</sup> édition: ellipses, France.221p.
- [46]-Béraud, J. (2001). Le technicien d'analyse biologique : guide théorique et pratique, Lavoisier, Paris. 842p.
- [47]-Vorgelet,V. (2003). Einbéitrag zum vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Hackfleisch and fleischerzeug nissen vom shwein im hinblick auf die eingesetz ten kultur-und isolierungsvefahren, tierarztlichen Fakultat derludwing- Ma maximilian-universitat munchen, 88p.
- [48]-Hart, T., Paul, S. (1997). Atlas de Poche de microbiologie: Médecine Sciences Flammarion, Paris. 133p.
- [49]-Bari, L., Houssain, A., Isshikie, K., Ukuku, D. (2011). Behavior of *Yersinia enterocolitica* in food, 1-13
- [50]- [www.liste-hygiène.org/yersinia.htm](http://www.liste-hygiène.org/yersinia.htm). [En ligne]. (Consulté le 05-03-2018)
- [51]-Schiemann, DA. (1989). *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In:doyle mp (Ed.), Foodborne Bacterial Pathogens, Marcel Dekker, New York, **15**, 601-672
- [52]-Robins-browne, RM. (1997). *Yersinia enterocolitica*. In: doyle mp, beuchat lr, montville TJ. (Ed.). Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington D.C, 192-215.
- [53]-Rozier, J., Carlier,V., bolnot, F. (1985). Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Service d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale. 220p.
- [54]-Rozier, J., Carlier, V. (1997). Dangers microbiens. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Service d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale, 79p.
- [55]- Davila, A.M. (1999). Les bactéries potentiellement pathogènes. Polycopié. Institut National Agronomique Paris Grignon, Cours supérieur d'alimentation et de nutrition humaine, Sécurité et microbiologie alimentaire. 12p.
- [56]-Guiraud, J., Philippe, J. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire, France. 138p.
- [57]-Joffin, J., Leyral, G. (1998). Microbiologie Technique: Documentaire technique, 2<sup>ème</sup> édition, biologie technique, France.144p.

- [58]-Poncellet, J. (2007). Les entérites infectieuses, société nationales des groupements technique vétérinaire **122**, 1-5
- [59]-Skurnik, M., Zhang, L. (1996). Molecular genetics and biochemistry of *Yersinia* lipopolysaccharide: AMPIS, **104**, 849-872
- [60]-Skurnik, M., Venho, R., Bengoechea, J.A., Moriyon, I. (1999). The lipopolysaccharides outer core of *Y. enterocolitica* sérotype O:3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity. *Mol. microbiol.* **31**, 1443-1462
- [61]-Wauters, G., Aleksic, S., Charlier, J., Schulze, G. (1991). Somatic and flagellar antigens of *Y. enterocolitica* and related species : *Contr. Microbiol. Immunol.* **12**, 239-243
- [62]-Avril, J., Fauchère, J., (2002). Bactériologie générale et médicale: ellipses, Paris. 257-258p.
- [63]-Klaus, R., Reggenkamp, A., Schubert, S., (1996). Differential contribution of microbicidal Action of Neutrophils infection and Immunity, *64*(3), 724-733
- [64]-Naucil, C., (2000). Bactériologie médical: Masson, Paris. 145p.
- [65]-Meyer, A., Deiana, J., Bernard, A. Cour de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés 2<sup>ème</sup> édition, doin , 326p.
- [66]-DeKoning-ward, TF., ward, AC., Robins-browne, RM. (1994). Characterisation of the urease encoding gene complex of *Yersinia enterocolitica*. *Gene*, **145**, 25-32
- [67]-De koning-ward, TF., Robins-browne, RM. (1995). Contribution to urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.*, **63**, 3790-3795
- [68]-Freny, J., Renaud, F., Hansen, W., et Bollet, C. (2000). Précis de Bactériologie Clinique: Edition ESKA, Paris. 1167p.
- [69]-Skurnik, M., Zhang, L. (1996). Molecular genetics and biochemistry of *Yersinia* lipopolysaccharide. *APMIS*, **104**, 849-872
- [70]-Skurnik, M., Venho, R., Bengoechea, JA., Moriyón, I. (1999). The lipopolysaccharide outer core of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity. *Mol. Microbiol.* **31**, 1443-1462
- [71]-Wauters, G., Aleksic, S., Charlier, J., Schulze, G. (1991). Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species. *Contr. Microbiol. Immunol.*, **12**, 239-243
- [72]-Koornhof, HJ., Smegora, M., Nicol, M. (1999). Yersiniosis II: The pathogenesis of *Yersinia* infections. *Eur. J. Clin. Infect. Dis.* **18**, 87-112

- [73]-Rakin, A., Noelting, C., Schuert, S., Heesemann, J. (1999). Common and specific characteristics of the high-pathogenicity islands of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun., **67**, 5265-5274
- [74]-Molto, N. (2010). Les maladies réglementées chez les Primates. Thèse de doctorat: vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse, 285p.
- [75]-Bingen, E., Leclercq, R., Courvalin, P. (2006). AntibioGramme: 2<sup>ème</sup> édition ESKA, Paris. 64 p.
- [76]-biomnis. (2015). yersiniose-précise biopathologie Analyses médicale spécialisées, 1-2p.
- [77]-Carniel, E., Sophie, A. la peste et autres yersiniose. Center national de reference, 1- 9p.
- [78]-August. (2009). *Yersinia enterocolitica*, suplement. (49), 1-3p
- [79]-Davila.A.M. (1999). Les bactéries potentiellement pathogènes. Polycopié. Institut nationale Agronomique Paris Grigon, Cours supérieure d'alimentation et de nutrition humaine, Sécurité et microbiologie alimentaire.12p.
- [80]-Rozier, J., Carlier, V. (1997). Dangers microbiens. Polycopié. Ecole Nationale vétérinaire d'Alfort. Service d'hygiène et Industrie des Denrées Alimentaire d'origine Animale, 79p.
- [81]-Collège des Enseignants de nutrition. (2011). les toxi-infections alimentaires collectives: aspects cliniques et épidémiologiques. Université Médicale virtuelle Francophone.1-35p.
- [82]-Cover, TL., Aber, RC. (1989). *Yersinia enterocolitica*. New England Journal of Medecine, **321**,16-24p.
- [83]-Ahvonen, P. (1972). Human yersiniosis in Finland: II. Clinical features. Ann. Clin. Res.,**4**, 39-48
- [84]-Dequeker, J., Jamar, R., Walravens, M. (1980). HLA-B27 arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Rheumatol*, **87**, 706-710
- [85]-Gonzalez-hevia, MA., Alvarez-riesgo, JA., Mendoza, MC. (1990). Epidemiological, clinical and microbiological features of *Yersinia enterocolitica* infections in a community during a four-year period. Eur. Clin. Epidemiol., **6**,184-190
- [86]-Konttinen, S., Sivonen, A., Renkonen, OV. (1994). Increased yields of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by cold enrichment. Scand. J. Infect. Dis., **26**,685-691
- [87]-Munk-Petersen, A., Vinther-Nielsen, S., Meyer, D., Ganer, P., Ladefoged, K. (1996). Bacterial gastro-enteritis among hospitalised patients in a Danish County. Scand. J. Gastroenterol., **31**,906-911

- [88]-Stolk-Engelaar ,VMM., Hoogkamp-Korstanje, JAA. (1996). Clinical presentation and diagnosis of gastrointestinal infections by *Yersinia enterocolitica* in 261 Dutch patients. Scand. J. Infect. Dis. **28**,571-572
- [89]-Hoogkamp-korstanje, J.A.A., Stolk-Engelaar, V.M.M. (1995). *Yersinia enterocolitica* infection in children. Pediatr. Infect. Dis. J., **14**,771-775
- [90]- Stoddard, JJ., Wechsler, DS., Nataro JP., Casella, JF. (1994). *Yersinia enterocolitica* infection in a patient with sickle cell disease after exposure to chitterlings. Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol., **16**,153-155
- [91]-Euzeby, JP. (2000). *Yersinia enterocolitica*. In : Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. [En ligne]. (Mise à jour le 11 décembre 2000) [<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html>]
- [92]-Shorter, NA., Thompson, MD., Mooney, DP., Modlin, JF. (1998). Surgical aspects of an outbreak of *Yersinia enterocolitica*. Pediatr. Surg. Int., **13** (1), 2-5
- [93]-Roberts,TA., Baird-Parker,AC., Tompkin,RB.(1996). Microorganisms in foods, Microbiological specifications of food pathogens, ICMSF, Blackie Academic & Professional, **5**, 513
- [94]-Tacket, CO., Davis, BR., Carter, GP., Randolph, JF., Cohen, ML. (1983). *Yersinia enterocolitica* pharyngitis. Ann. Intern. Med. **99**, 40-42
- [95]-Rose, FB., Camp, CJ., Antes, EJ. (1987). Family outbreak of fatal *Yersinia enterocolitica* pharyngitis. Am. J. Med., **82**,636-637
- [96]-Sievers, K., Ahvonen, K., Aho, K. (1972). Epidemiological aspects of *Yersinia arthritis*. Int. J. Epid. **1**,45-46
- [97]-Toivanen, A., Granfors, K., Lahesmaa-rantala, R., Leino, R., Stahlberg, T., Vuento, R. (1985). Pathogenesis of *Yersinia*-triggered arthritis: immunological, microbiological and clinical aspects. Immunol. Rev.**86**, 47-70
- [98]-Leirisalo-repo M. (1987) *Yersinia arthritis*. Acute clinical picture and long-term prognosis. Contr. Microbiol. Immunol,**9**,145-154
- [99]-Kellogg, CM., Tarakji, EA., Smith, M., Brown, PD. (1995). Bacteremia and suppurative lymphadenitis due to *Yersinia enterocolitica* in a neutropenic patient who prepared chitterlings. Clin. Infect. Dis.,**21**, 236-237
- [100]-Hopfner, M., Nitsche, R., Rohr, A., Harms, D., Schubert, S., Folsch, UR. (2001). *Yersinia enterocolitica* infection with multiple liver abscesses uncovering a primary hemochromatosis. Scand. J. Gastroenterol., **36**, 220- 224

- [101]-Mitchell, K.M.T., Brecher, M.E. (1999). Approaches to the detection of bacterial contamination in cellular blood products. *Transfus. Med. Rev.*, **13**, 132-144
- [102]-Mollaret, HH., Wallet, P., Gilton, A., Carniel, E., Duederi, N. (1989). Le choc septique transfusionnel dû à *Yersinia enterocolitica*. A propos de 19 cas. *Med. Mal. Infect.*, **19**, 186-192
- [103]-Tipple, MA., Bland, LA., Murphy, JJ., Arduino, MJ., Panlilio, AL., Farmer, JJ., et al. (1990). Sepsis associated with transfusion of red cells contaminated with *Yersinia enterocolitica*. *Transfusion*, **30(3)**, 207-213
- [104]-Dieusaert, P. (1996). Guide pratique des analyses médicales: Maloine, Paris. 1101-1102p.
- [105]-ANSES agence nationale de sécurité sanitaire alimentation environnement travail [http://www.anses.fr/fr/systeme/Files/mic\\_2011s00262](http://www.anses.fr/fr/systeme/Files/mic_2011s00262)
- [106]-Murros, A. (2017). Identification and characterization of *Yersinia* from food and environmental sources. Thèse de doctorat: Food Hygiene and Environmental Health. Finland : université de Helsinki, 59p.
- [107]-Lavigne, J-P. (2007). Effet des antibiotiques et mécanismes de résistance. Cours de Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.
- [108]-Benhaddoudi, A. (2016). Étude de l'activité de l'imipénème combine aux huiles essentielles contre *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant. Mémoire de Master: Microbiologie Appliquée. Telemcen : Université Aboubekr Belkaide de Telemcen, 44p.
- [109]-Bouskraoui, M., Benaouda, A., Zerouali, K., et al. (2007). guide pratique des bactéries pathogènes, Somipev, 17-18p.
- [110]-Zeba, B. (2005). Overview of  $\beta$ -lactamase incidence on bacterial drug resistance. *African journal of biotechnology*, **4(13)**, 1559-1562
- [111]-Tortora, G., Funke, B., et al. (2003). Introduction à la microbiologie: Edition du renouveau, Québec. 608-612p.
- [112]-Flandrois, J.C., Courco, L., Lemeland, J.F., Ramuc, M., Sirot, J., et Souny, C.J., (1997). Bactériologie médicale. Pesses Universitaire de Lyon. ISBN.2729705678
- [113]-Yala, D. (2001). Classification et mode D'action des Antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, **(91)**, 1-12

- [114]-Singleton, P. (2005). Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. Ed Dunno, 6<sup>ème</sup> édition. Science SUP.15 : 343-467.
- [115]- Ploy, M.C., Gassama, A., Chainier, D., et Denis, F., (2005). Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. Integrons: an antibiotic resistance gene capture system. Immuno-analyse & Biologie spécialisée. **20**, 343-352
- [116]-Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature, **406**, 775-81
- [117]-Ploy, M.C., Lambert, T., Gassama, A., et Denis, F., (2000). Place des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Annales de Biologie Clinique. **58(4)**, 439-44
- [118]-Benabdallah-Khodja, A., Hamlaoui, Y. (2016). Etude phénotypique de quelques souches d'*Escherichia coli* productrices des carbapénèmes. Mémoire de Master :Microbiologie générale et biologie moléculaire des microorganismes. Constantine :Université des frères Mentouri Constantine, 65p.
- [119]-Eslahpasir, J. (1993). Etude prospective de sensibilité des bacilles Gram négatif en milieu tropical .Thèse de médecine, **534**, 131.
- [120]-Ben moussa, MT. (2003), les antibiotiques. Département de pharmacie, Batena.13p.
- [121]-<http://sante-medecine.commentcamarche.net/fac/65766antibiogramme#qu-est-ce-qu-un-antibiogramme>
- [122]-Nelly,B., Texier,A. (2003). L'antibiogramme. La détermination des sensibilités aux Antibiotiques, des bactériologies.1-29p.
- [123]- Huybens.N., Mainil, J., Marlier,D. (2009). Les techniques de la biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes. Complexes formation continue-Article de synthèse, **153**, 112-128p.
- [124]-Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E., Ausubel, F.M. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. J. Bacteriol., **149**, 114-122p.
- [125]-Sweeney, W., Whitlock, R.H., Mcadams, S.C. (2006).Comparison of three DNA preparation methods for real-time polymerase chain reaction confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis growth in an automated broth culture system. J. Vet. Diagn. Invest., **18**, 587-590

- [126]-Boom, R., Sol, C., Weel, J., Lettinga, K., Gerrits, Y., Van-breda, A., Wertheimvan-Dillen, P. (2000). Detection and quantitation of human cytomegalovirus DNA in faeces. *J. Virol. Methods*, **84**, 1-14
- [127]-Alderton, R.P., Eccleston, I.M., Howe, P., Read, C.A., Reeve, M.A., Beck, S.(1992). Magnetic bead purification of M13 DNA sequencing templates. *Anal. Biochem.*, **201**,166-169p.
- [128]-Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, j.A., Struhl, K. (1989). *Current Protocols in molecular biology*. John Wiley: New York.
- [129]- Dhayanithi N.B., Ajith Kumar T.T., Kathiresan K. (2010). Effect of neem extract against the bacteria isolated from marine fish. *Journal of Environmental Biology*. **31** : 409-412.
- [130]Boulhlib, S., Benrahma, M. (2013).caractérisation et étude de l'antibiorésistance de *yersinia enterocolitica*. Mémoire master : Microbiologie. Université Mentouri Constantine, 42p.

# ANNEXES

**Les annexes :**

**Annexe 01 : Les compositions des milieux**

**Gélose nutritive (g/l) : pH = 7.4**

Extrait de viande de bœuf .....	01
Extrait de levure .....	02
Peptone .....	05
Chlorure de sodium .....	05
Agar.....	15

**Milieu Citrate de Simmons (g/l) : pH = 7**

Sulfate de Magnésium.....	0.2
Phosphate monoammoniaque.....	01
Phosphate dipotassique.....	01
Citrate de sodium.....	02
Chlorure de sodium.....	05
Bleu de bromothymol.....	0.08
Agar.....	15

**Milieu Mannitol Mobilité (g/l) : pH = 7.6 à 7.8**

Peptone tryptique de viande .....	20
Agar.....	04
Mannitol .....	02
Nitrate de potassium .....	01
Rouge de phénol à 1%.....	04ml

**Bouillon Nitraté (g/l) : pH =7.2**

Peptone de viande .....	10
Extrait de viande .....	05
Chlorure de sodium.....	05
Nitrate de potassium.....	01

**Eau peptonée exempte d'indole (g/l) : pH = 7.2**

Peptone de viande .....	10
Tryptone.....	10
Chlorure de sodium.....	05

**Milieu urée-indole (g/l) : pH = 6.7**

L.Tryptophane.....	03
Phosphate diacide de potassium.....	01
Phosphate monoacide de potassium.....	01
Chlorure de sodium.....	05
Urée.....	20
Alcool à 95°.....	10ml
Rouge de phénol en solution à 1% .....	20.5ml
Eau distillée .....	1000ml

**Milieu KIA (g/l) : pH =7.4**

Extrait de viande de boeuf.....	03
Extrait de levure .....	03
Peptone .....	20
NaCl.....	05
Citrate ferrique.....	0,3
Thiosulfate de sodium .....	0,3
Lactose.....	10
Glucose.....	01
Rouge de phénol.....	0,05
Agar .....	12

**Milieu Clarck et Lubs (g/l) : pH = 7.5**

Peptone.....	05
Glucose.....	05
Hydrogénophosphate de potassium.....	05

**Milieu Mueller-Hinton (g/l) : pH = 7.3**

Extrait de viande .....	03
Hydrolysate acide de caséine.....	17.5
Amidon.....	10.5
Agar.....	16

**Milieu Moeller (g /l) : pH = 6**

Peptone.....	05
Extrait de viande.....	05
BCP.....	0.1

## ANNEXES

Rouge de crésol.....	05mg
Pyridoxal.....	05mg
Agar.....	0.5

### **Milieu Gélose Désoxycholate-Citrate Lactose (DCL) (g/l) : pH = 7.3**

Extrait de viande.....	05
Peptone bactériologique.....	05
Désoxycholate de sodium.....	05
Thiosulfate de sodium.....	5.4
Citrate ferrique.....	01
Citrate de sodium.....	8.5
Lactose.....	10
Rouge neutre.....	0.02
Agar.....	12

### **Milieu Mac Conkey (g/l): pH = 7.1**

Peptone.....	20
Lactose.....	10
Sels biliaires n°3.....	1.5
Cristal violet.....	0.001
Rouge neutre.....	0.05
Chlorure de sodium.....	05
Agar.....	15

### **Bouillon nutritif (g/l) : pH = 7.3**

Peptone.....	10
Chlorure de sodium.....	05
Extrait de bœuf.....	10
Eau physiologique (g/l)	
NaCl.....	09
Eau distillée.....	1000ml

**Annexe 02 : Réactifs**

**Réactif de la recherche d'oxydase :**

Disque imprégné d'une solution à 1% de chlorhydrate de Tetraméthylparaphénylène-diamine.

**Réactif de Kovacs**

diméthylamino-4-benzaldéhyde.....	07g/l
Alcool isoamylique.....	75ml
Acide chlorhydrique concentré.....	20ml

**Réactif de Voges-Proskauer I et II**

**VP I**

Hydroxyde de Potassium.....	40g/l
Eau.....	100ml

**VP II**

Alpha-naphtol.....	06g/l
Ethanol 95°C.....	100ml

**Réactif de GRIESS-ILOSAY pour la recherche des nitrites**

**Nitrate réductase I**

Acide sulfamilique.....	0.8g/l
Acide Acétique 5N.....	100ml

**Nitrate réductase II**

Naphtylamine.....	0.5g/l
Acide Acétique 5N.....	100ml

**Solution d'eau Oxygénée à 10%**

Eau oxygénée à 10 V.....	0.5ml
Eau distillée.....	14.5ml

**Rouge de méthyle**

Rouge de méthyle.....	50mg
Hydroxyde de sodium NaOH (0.1M).....	02ml
Alcool éthylique.....	50ml
Eau distillée.....	40ml

**Disque ONPG**

Disque de papier filtre stérile imprégné de tampon et de l'ortho-nitro-phényl-galactoside

**Annexe 03: Colorants**

**Violet de Gentiane**

Violet de Gentiane.....	01g
Ethanol à 90%.....	10ml
Phénol.....	02g
Eau distillée.....	100ml

**Lugol**

Iode .....	01g
Iodure de potassium.....	02g
Eau distillée.....	300ml

**Fuschine**

Fuschine basique.....	01g
Alcool éthylique à 90°.....	10ml
Phénol.....	05g
Eau distillée.....	10ml

**Annexe 04 : Coloration de Gram**

**1. Prélèvement**

- ✚ A partir d'une culture liquide : prélever un aliquote de suspension à l'anse (ou à la pipette stérile) après avoir homogénéisé le milieu.
- ✚ A partir d'un milieu solide : réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette stérile).
- ✚ A partir de produits alimentaires ou biologiques : prélever un aliquote du produit (dilué ou non) à l'anse (ou à la pipette stérile) après avoir homogénéisé le milieu.

**2. Préparation du Frottis**

En effectuant une fixation simple à l'eau et à la flamme selon les indications suivantes :

## ANNEXES

Sur une lame, déposer une goutte d'eau stérile. Ajouter à l'anse isolée. Etaler et fixer à la chaleur à environ 40°C pendant 10 à 15 minutes. Poser la lame séchée sur le portoir reposant sur un bac de coloration. de platine stérilisée une goutte de la colonie

### 3. Réalisation de la coloration

1-Coloration primaire : coloration par le **violet de Gentiane** ou **cristal violet**.

Laisser agir de 30 seconds à 1 minute. Rincer à l'eau distillée. 2-Mordantage au **lugol** (solution d'iode iodo-iodurée) : étaler le **lugol** et laisser agir 60 secondes ; Rincer à l'eau distillée.

3- Décoloration à l'**alcool (+acétone)** : verser goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (5 à 10 seconds). Rincer sous un filet d'eau distillée.

4- Contre-coloration à la **safranine** ou à la **fuschine**. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute.

5-Laver doucement à l'eau distillée. Sécher la lame entre 2 feuilles de papier buvard.

### 4. Observation microscopique

Observer à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile à immersion.

**Annexe 05** : Les antibiotiques utilisés dans notre étude.

Famille d'antibiotique	antibiotique	L'abréviation	La charge du disque	Diamètres critiques (mm)
β-lactamines	amoxicilline	AMX	25µg	≥ 23 <16
	Céfoxitine	FOX	30µg	≥ 22 < 15
	Céfotaxime	CTX	30µg	≥26 <23
	Cefazoline	KZ	30µg	≥21 <27
	Pipéracilline	PI	100µg	≥24 <30
	Amoxicilline+ Acide clavulanique	AMC	30µg	≥23 <16
Aminosides	Gentamicine	HLG	120µg	≥16 <23
Phénicoles	Chloramphénicol	C	30µg	≥23 <19
Sulfamides et association	Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole	SXT	25µg	≥16 <10
Quinolones	Acide pipémidique	PA	20µg	≥19 <14
	Péfloxacine	PEF	5µg	≥22 <16
Polypeptides	Nitroxoline	NO	30µg	≥30 <12

## Etude et identification de *Yersinia enterocolitica*. Détermination des profils antibiotypiques et électrophorétiques de l'ADN total

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

### Résumé :

*Yersinia enterocolitica* est une entérobactérie qui fait partie des espèces entéropathogène. Dix souches de *Y. enterocolitica* ont été identifiées, entre la période de Mars-Juin 2018.

Ce travail vise à caractériser dix souches de *Y. enterocolitica* sur le plan morphologique, physiologique et les tests biochimiques par des méthodes microbiologiques standardisées. Et de déterminer leur résistance vis-à-vis des antibiotiques différents par la méthode de l'antibiogramme standard préconisé par le CLSI. Puis une analyse moléculaire par la réalisation de profils électrophorétiques de l'ADN total des souches identifiées.

Les résultats montrent que les souches ont bien cultivées sur le milieu GN ainsi que sur les milieux sélectifs DCL et Mac Conkey à 37°C et présentent les caractéristiques suivantes : petites bacilles à Gram négatif, oxydase<sup>-</sup>, catalase<sup>+</sup>, lactose<sup>-</sup>, glucose<sup>+</sup>, gaz<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>S<sup>-</sup>, uréase<sup>+</sup>, indole<sup>-</sup>, TDA<sup>-</sup>, réduisant les nitrates en nitrites, RM<sup>+</sup>, VP<sup>-</sup>. mannitol<sup>+</sup>, mobilité<sup>+</sup> à 25°C, ONPG<sup>+</sup>, ADH<sup>-</sup>, ODC<sup>+</sup> et n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone.

L'étude de la résistance des souches utilisées aux différents antibiotiques par la méthode classique montre que : Les bacilles isolées sont marquées par une forte sensibilité vis-à-vis tous les antibiotiques sauf l'amoxicilline, l'amoxicilline + l'acide clavulanique et la cefazoline, qui ont présenté une résistance.

Les profils électrophorétiques de l'ADN total des souches identifiées ont été aussi obtenus.

Nos résultats ont permis de confirmer les données des recherches antécédentes sur les caractères de *Yersinia enterocolitica*.

**Mots clés :** Entérobactéries, *Yersinia enterocolitica*, identification, résistance aux antibiotiques, profils électrophorétiques.

**Laboratoire de recherche :** laboratoire de Zoologie de la FSNV (UFM-C)

Jury d'évaluation :

<b>Présidente du jury :</b>	Mme RIAH N.	(MCB- UFM Constantine 1)
<b>Rapporteur :</b>	Mme BOUZERAIB L.	(MAA- UFM Constantine 1)
<b>Examinatrice :</b>	Mr CHABBI R.	(MAA-UFM Constantine 1)

**Date de soutenance :** le 24/06/2018