



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

Recherche et identification de *Yersinia spp.* au niveau des sols et des eaux des lacs des régions de Djebel El Ouahch et de El Meridje

Présenté et soutenu par : *DJEMAL Messaouda*
MENNOUR Maroua

Le : 10/07/2019

Jury d'évaluation :

Président du jury : *MERGOUD Lilia* (MAA - UFM Constantine).

Rapporteur : *BOUZERAIB Latifa* (MAA - UFM Constantine).

Examineurs : *CHABBI Rabah* (MAA - UFM Constantine).

Année universitaire
2018 - 2019

Remerciement

Au terme de ce travail du mémoire de Master, nous remercions dieu le tout puissant de nous avoir donné la force pour survivre et qui nous a honoré par ce savoir, en nous apportant aide pour achever ce modeste travail.

Notre remerciements vont à notre encadreur Mme BOUZERAIB Latifa, pour toute sa gentillesse, pour ses précieux conseils et pour sa patience avec nous, ainsi tous ceux qui nous ont aidée et soutenue dans notre travail.

Nos sincères remerciements à Madame MERGOUD Lilia et Monsieur CHABBI Rabah, vous nous faites l'honneur de participer au jury de notre mémoire.

En fin, nos remerciements s'adresse vivement à tous les professeurs qui nous ont aidés et soutenus tout au long de notre cursus.

Merci à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

C'est grâce à ALLAH que ce modeste travail été réalisé, merci mon dieu pour me donner le courage, la patience, et surtout l'effort.

Je dédie ce travail

A mes très chers parents Djamel et Samia, pour tous leur sacrifices, leur tendresses et leur amour. Pour toute leur assistance et leur présence dans ma vie.

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

A ma belle sœur Asma " une sœur est un cadeau pour le cœur " merci.

A mes frères Ramzy et Ayoub je vous aime beaucoup.

A monsieur BOURASSE Youcef

A Charaf Eddine, Soumia et Warda, merci d'être toujours là pour m'aider, et encouragé, que Dieu vous protège.

A tous mes amis, avec qui j'ai partagé des moments des plus agréables.

A tous ceux qui sont chères, proches de mon cœur, et à tous ceux qui m'aiment et qui aurait voulu partager ma joie...merci

maroua

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

*A la plus belle femme sur terre, a cette source d'amour de
tendresse, de patience*

A ma mère

*A celui qui représente l'exemple du sacrifice, du dévouement et de
l'honnêteté, qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui!*

A mon père

A mes sœurs, à mon frère, et à toute ma famille

A mon binôme de travail ma chère Marcua

A tous mes amis et collègues

A tous ceux qui par un mot, m'ont donné la force de continuer

Merci

Messaouda

Résumé

L'objectif de ce travail est l'isolement et l'identification morphologique et biochimique des espèces de *Yersinia* recherchées. Le genre *Yersinia* appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Il comprend dix-huit espèces, trois d'entre elles sont pathogènes pour l'être humain. Quatre souches de *Yersinia enterocolitica* et deux souches de *Yersinia frederiksnii* ont été isolées durant la période Mars-Juin 2019. Les résultats obtenus montrent que l'enrichissement dans de l'eau péptonée à +4°C pendant 15 jours suivit du traitement alcalin par KOH à 5% et l'isolement sur milieu Mac Conkey à 30°C pendant 48h, s'est révélé être une méthode efficace pour l'isolement de quelques espèces de *Yersinia* à partir des échantillons environnementaux (eaux et sols des lacs). Ces espèces présentent les caractéristiques suivantes : bacilles à Gram négatif, oxydase⁻, catalase⁺, lactose⁻, glucose⁺, gaz⁻, H₂S⁻, uréase⁺, indole⁺, TDA⁻, réduisent les nitrates en nitrites, RM⁺, VP⁻, mannitol⁺, mobilité⁻ à 37°C, ONPG⁺, ADH⁻, ODC⁺ et n'utilisent pas le citrate comme seul source de carbone. Ces résultats nous ont permis de détecter la présence de *Yersinia* dans les lacs et les sols de Djebel El Ouhch et El Meridje.

Les mots clés : *Yersinia*, sols et eaux de lacs, Djebel El Ouahch, El Meridje, isolement.

Abstract

This work aims to isolate and describe on both the morphological and biochemical side for some species of *Yersinia*. The genus *Yersinia* belong to the family of Enterobacteriaceae, which contains eighteen species, three strains of it are pathogenic to humankind during the period extended between June-March 2019. Two species of *Yersinia frederiksnii* and four of *Yersinia enterocolitica* has been isolated. The obtained results prove that the enrichment in the peptone broth at 4°C for 15 days, followed with an alkaline treatment with KOH at 5% and the isolation in Mac Conkey medium at 30°C for 48h is revealed to be an effective method to isolate some species of *Yersinia* beginning with environmental samples (lake's soil and water). This species has the following characteristics: small Gram negative bacilli, oxidase -, catalase +, lactose -, glucose +, gas -, H₂S -, urease +, indole +, TDA -, reducing nitrates to nitrites, RM +, VP -, mannitol +, mobility - at 37°C, ONPG +, ADH -, ODC +, and without the use of citrate as single source for carbon. The previous results enabled us to detect the presence of *Yersinia* in the lake's soil and water located in Djebel El Ouahch and El Meridje.

Key words: *Yersinia*, soil and water's the lake, Djebel El Ouahch, El Meridje, isolation

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو العزل و الوصف المورفولوجي و البيوكيميائي لبعض من أنواع *Yersinia*. الجنس *Yersinia* ينتمي إلى عائلة Enterobacteriaceae و الذي يحتوي على ثمانية عشر نوعا، ثلاثة منها ممرضة للإنسان. خلال الفترة الممتدة ما بين مارس-جوان 2019 تم عزل: سلالتان من *Yersinia frederiksnii* و أربع سلالات من *Yersinia enterocolitica*. النتائج المتحصل عليها تثبت أن عملية التكاثر في محلول بيبتوني في درجة حرارة +4 °م لمدة 15 يوما، تليها المعالجة القاعدية بهيدروكسيد البوتاسيوم 5% و العزل في وسط الزرع Mac Conkey في درجة حرارة 30 °م لمدة 48 ساعة، تثبت أنها طريقة فعالة لعزل بعض أنواع *Yersinia* انطلاقا من عينات بيئية (مياه و تربة البحيرات). هذه الأنواع لها الخصائص التالية: عصيات سالبة ال Gram,

, oxydase⁻, catalase⁺, lactose⁻, glucose⁺, gaz⁻, H₂S⁻, uréase⁺, indole⁻, TDA⁻, réduisent les nitrates en nitrites, RM⁺, VP⁻, mannitol⁺, mobilité⁻ à 37°C, ONPG⁺, ADH⁻, ODC⁺, تستعمل citrate كمصدر وحيد للكربون. خذه النتائج مكنتنا من اثبات تواجد *Yersinia* في بحيرات و تربة جبل الوحش و المريج.

الكلمات المفتاحية: *Yersinia*، تربة و مياه البحيرات، جبل الوحش، المريج، العزل

Table des matières

Liste des abréviations	iv
Liste des tableaux	v
Liste des figures	vi
Introduction générale	01

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : les entérobactéries

1. Habitat	03
2. Classification	03
3. Pouvoir pathogène	04
4. La résistance aux antibiotiques.....	04
5. Les caractères biochimiques des Enterobacteriaceae	04

Chapitre 2 : le genre *Yersinia*

1. Historique	06
2. Définition	06
3. Classification	07
4. Habitat	07
5. Caractères cultureux	07
6. Caractères biochimiques	08
7. Les espèces de <i>Yersinia</i>	08
7.1. <i>Yersinia pestis</i>	08
7.1.1 La peste	09
7.2. <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	09
7.3. <i>Yersinia enterocolitica</i>	10
7.4. <i>Yersinia ruckeri</i>	13
7.4.1 La maladie de la bouche rouge	13
7.5. <i>Yersinia mollaretii</i>	14
7.6. <i>Yersinia intermedia</i>	14
7.7. <i>Yersinia frederiksenii</i>	14
7.8. <i>Yersinia krestensenii</i>	15
7.9. <i>Yersinia aldovae</i>	15
7.10. <i>Yersinia rohdei</i>	15

7.11. <i>Yersinia bercovieri</i>	15
7.12. <i>Yersinia aleksiciae</i>	16
7.13. <i>Yersinia massiliensis</i>	16
7.14. <i>Yersinia similis</i>	16
7.15. <i>Yersinia entomophaga</i>	17
7.16. <i>Yersinia nurmii</i>	17
7.17. <i>Yersinia pekkanenii</i>	17
7.18. <i>Yersinia wautersii</i>	18

Chapitre 3 : les méthodes d'isolement

1. Les milieux d'enrichissement	21
1.1. L'eau peptonée ..	21
1.2. Le tampon phosphaté salé + Mannitol	21
1.3. Le tampon phosphaté salé + Sorbitol + Sels biliaires	21
1.4. Bouillon rapport modifié + Carbénicilline (MRBC) et le milieu ITC	21
2. Les milieux d'isolement	22
2.1. Milieu Hektoen ..	22
2.2. Le milieu Mac Conkey	22
2.3. Le milieu CIN	22
2.4. Le milieu YM ou milieu YERSINIA	23
2.5. Le milieu CAL ..	23
3. Méthodes alternatives ou autres méthodes de détection	23

Partie 2 : Matériel et méthodes

1. Objectif d'étude	24
2. Lieu d'étude	24
3. Echantillonnage	24
3.1 Lieu de prélèvement	24
3.2 Prélèvement des échantillons	25
4. Enrichissement et l'isolement de <i>Yersinia</i>	26
4.1. Enrichissement ..	26
4.2. L'isolement	27
4.2.1. Isolement direct	27
4.2.2. Isolement après décontamination par KOH à 5%	27
5. Identification macroscopique et microscopique des souches	27

5.1. Examen macroscopique	27
5.2. Examen microscopique	28
6. Identification biochimique	28
6.1. Test d'oxydase	28
6.2. Test de catalase	29
6.3. Le milieu mannitol-mobilité	29
6.4. La recherche de la nitrate réductase.....	29
6.5. La galerie API 20 E	30

Partie 3 : résultats et discussion

1 Identification bactériologique	31
1.1 Examen macroscopique	31
1.2 Examen microscopique	33
2. Identification biochimique	34
2.1 Test d'oxydase	34
2.2 Test de catalase	34
2.3 Test de nitrate réductase	34
2.4 Test de mannitol mobilité	35
2.5 La galerie API 20 ^E	36
3 Discussion	38
Conclusion générale	40
Références bibliographiques	41
Annexe	

Liste des abréviations

- ADH : Arginine Dihydrolase
- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- AMY : Amylase
- ARA : Arabinose
- ARNr : Acide ribonucléique ribosomique
- CIT : Citrate de Simmons
- DNase : Désoxyribonucléase
- EPT : Eau peptoné
- GEL : Gélatinase
- GC% : Rapport Guanine-Cytosine (en %)
- GLU : Glucose
- GS : Gélose au sang
- IND : Indole
- INO : Inositol
- KCN : Cyanure de Potassium
- LDC : Lysine Décarboxylase
- MAN : Mannitole
- Mb : Mégabase
- MEL : Mélibiose
- RHA : Rhamnose
- RM : Rouge de Méthyle
- S : Svedberg
- SAC : Saccharose
- SOR : Sorbitol
- O : Biosérototype
- ODC : Ornithine Décarboxylase
- ONPG : Ortho-nitrophényl- β -galactosidase
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- Pb : Paire de base
- TDA : Tryptophane Désaminase
- TTR : Tétrathionate Réductase
- URE : uréase
- VP : Vosges-proskauer

Liste des tableaux

Tableau 01 : La classification des principaux genres appartenant à la famille des Enterobacteriaceae.	04
Tableau 02 : Quelques caractéristiques des genres sélectionnés parmi les Enterobacteriaceae..	05
Tableau 03 : Classification du genre <i>Yersinia</i>	07
Tableau 04 : Principaux réactions de diagnostic utilisées pour la distinction des principaux genres d'Entérobactéries. (Le genre <i>Yersinia</i>)	08
Tableau 05 : Résumé des caractères d'identification des espèces les plus fréquemment rencontrées chez le genre <i>Yersinia</i>	13
Tableau 06 : Les caractères biochimiques de certaines espèces de <i>Yersinia</i>	20
Tableau 07 : Description macroscopique des souches étudiées.	32
Tableau 08 : Les résultats des tests biochimiques des souches étudiées.	37
Tableau 09 : L'identification des souches étudiées.	38
Tableau 10 : La galerie API 20E : tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E.	v

Liste des figures

Figure 01 : Observation microscopique de la morphologie des entérobactéries x 100. (Le genre <i>Klebsiella</i>).....	03
Figure 02 : Observation microscopique de la morphologie de l'entérobactérie <i>Yersinia pestis</i> x 100.....	06
Figure 03 : Morphologie coloniale de la bactérie Gram négatif <i>Yersinia pestis</i> cultivée pendant 72h sur une gélose au sang	07
Figure 04 : Site de prélèvement à Djebel El Ouahche et El Meridje.	24
Figure 05 : Le lac de El Meridje.	25
Figure 06 : Les trois lacs de la forêt de Djebel El Ouahche.....	25
Figure 07 : Les quatre prélèvements (eaux et sols) à partir des quatre lacs différents.....	26
Figure 08 : Les enrichissements eau de lac en eau péptonée.	26
Figure 09 : Les enrichissements sol de lac en eau péptonée.	27
Figure 10 : Aspect macroscopique des souches sur milieu Mac Conkey.	33
Figure 11 : Aspect microscopiques des souches isolées.	34
Figure 12 : Révélation du test oxydase.	35
Figure 13 : Résultat du test catalase.	35
Figure 14 : Résultat du test nitrate réductase positif après l'ajout de zinc	36
Figure 15 : Résultat de test mannitol mobilité.	36
Figure 16 : Résultat de la galerie API 20E de la souche S3 (<i>Yersinia enterocolitica</i>). ..	vi
Figure 17 : Résultat de la galerie API 20E de la souche S6 (<i>Yersinia enterocolitica</i>).	vi
Figure 18 : Résultat de la galerie API 20E de la souche S8 (<i>Yersinia enterocolitica</i>). ..	vi
Figure 19 : Résultat de la galerie API 20E de la souche S1 (<i>Yersinia frederiksenii</i>).	vi
Figure 20 : Résultat de la galerie API 20E de la souche S2 (<i>Yersinia frederiksenii</i>).	vi
Figure 21 : Résultat de la galerie API 20E de la souche S7 (<i>Yersinia enterocolitica</i>).. ..	vi
Figure 22 : Résultat de la galerie API 20E de la souche S10(<i>Enterobacter intermedius</i>). ..	vi
Figure 23 : Résultat de la galerie API 20E de la souche S12(<i>Enterobacter intermedius</i>). ..	vi
Figure 24 : Résultat de la galerie API 20E de la souche S4 (<i>Enterobacter sakazakii</i>).	vi

Figure 25 : Résultat de la galerie API 20E de la souche S5 (*Serratia marcescens*). **vii**

Figure 26 : Résultat de la galerie API 20E de la souche S9 (*Hafnia alvei*). **vii**

Figure 27 : Résultat de la galerie API 20E de la souche S11 (*Aeromonas salmonicida*). . **vii**

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les entérobactéries doivent leur nom au fait que ce sont des hôtes normaux ou pathogènes du tube digestif des animaux notamment de l'homme, ce sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs, mobiles par des flagelles péritriches ou immobiles, cette famille est hétérogène car elle se compose d'environ trente genres, certains sont des bactéries commensales comme *Escherichia* et d'autres sont des parasites pathogènes comme *Shigella*, *Salmonella* et *Yersinia* [1].

L'historique de *Yersinia* remonte aux années 1884 où *Yersinia pseudotuberculosis* été isolé des cochons d'Inde comme agent responsable de tuberculose-like ; Dans les années 1894 le bactériologiste français Alexandre Yersin fut isolé l'agent responsable de la peste à Hong-Kong, nommée après *Yersinia pestis*. Dans les années suivantes l'isolement et la caractérisation des plusieurs espèces de *Yersinia* ont lieu. En 1944 le nom de *Yersinia* fut proposé en l'honneur d'Alexandre Yersin [2].

Ce genre fait partie de la famille des Enterobacteriaceae, dont il partage certaines caractéristiques : bacille à Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif, absence de capsule et de sporulation, il englobe dix-huit espèces, seules trois d'entre elles sont pathogène pour l'homme : *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*, l'espèce *Y. Wauterssi* est considérée comme une espèce pathogène pour l'homme mais nécessite d'être confirmée. Quatre autres espèces sont pathogènes d'animaux : *Y. ruckeri* pour les poissons et *Y. entomophaga* pour les insectes, *Y. bercovieri* et *Y. kristensenii* pour les souris [3], [4], [5].

Pour les dix autres espèces *Y. frederiksenii*, *Y. massiliensis*, *Y. intermedia*, *Y. molaretii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. alksiciae*, *Y. similis*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii*, sont considérées comme des bactéries non pathogènes [6], [7], [8], [9].

Les *Yersinia* sont des germes très répandus dans la nature, il existe un réservoir animal très diversifié (mammifères, oiseaux, poissons, insectes) mais sont également retrouvées dans les eaux et dans le sol [10].

Malgré le danger et la gravité de cette bactérie sur la santé humaine et animale, en Algérie, cette bactérie n'est pas recherchée en raison de la difficulté de son isolement et de la particularité de ses caractères cultureux [11].

INTRODUCTION

Plusieurs géloses sélectives ont été proposées comme CIN, Mac Conkey, YM et CAL mais l'isolement direct sur milieu sélectifs est rarement concluant. [12]

Jusqu'à ce jour il n'existe pas un milieu de culture spécifique pour *Yersinia* qui permet un isolement de 100% [11].

C'est dans ce contexte général que nous avons été amenées à entreprendre le présent travail.

L'objectif de notre travail est :

1. L'isolement de *Yersinia* dans les eaux et le sol des lacs de Djebel El Ouahch et El Meridje qui sont considérées comme des endroits publics naturels.
2. La réalisation d'une identification présomptive en se basant sur le phénotype biochimique à l'aide d'une série de tests.

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

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les entérobactéries

Les entérobactéries constituent une famille bactérienne hétérogène composée d'environ trente genres de bactéries et de plus de cent espèces [1], [13].

Les entérobactéries sont des bacilles, Gram négatif, aérobies-anaérobies facultatifs, mésophiles (la température optimale de développement est entre 24 et 37°C), elles sont immobiles ou mobiles par flagelles péritriches [13], [14].

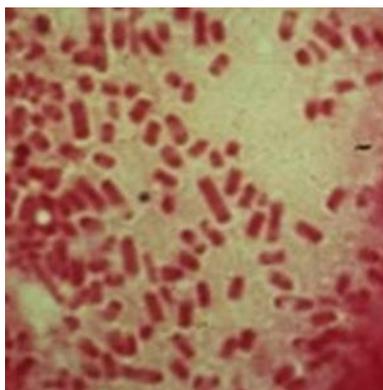


Figure 01 : Observation microscopique de la morphologie des entérobactéries X100
(Le genre *Klebsiella*) [15].

1. Habitat :

Ce sont des bactéries ubiquitaires, leur présence dans le tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud en fait un très bon marqueur de la contamination fécale des eaux, des végétaux et d'autres produits alimentaires [1].

2. Classification :

La classification des principaux genres appartenant à la famille des entérobactéries est représentée dans le tableau 01.

Tableau 01 : La classification des principaux genres appartenant à la famille des Enterobacteriaceae [16].

Domaine	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gamma-proteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	<i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Salmonella</i> <i>Serratia</i> <i>Shigella</i> <i>Citrobacter</i> <i>Erwinia</i> <i>Yersinia</i>

3. Pouvoir pathogène :

Les genres de cette famille sont en majorité des pathogènes du tube digestif humain, et d'autres sont des colonisateurs normaux [1].

4. La résistance aux antibiotiques :

L'évolution des résistances des antibiotiques est un phénomène réel, il expose à des difficultés de prise en charge thérapeutique des infections.

Le taux de résistance élevé aux principales classes d'antibiotiques, l'augmentation de la résistance entre 2005 et 2012 de 29,1 à 51,6% pour les Céphalosporines, de 29,2% à 44% pour la Ciprofloxacine, l'Imipénème, l'Amikacine et la Fosfomycine étaient les molécules les plus actives avec respectivement 1,3%, 12,9%, 13,4% des souches d'entérobactéries résistantes[17].

5. Les caractères biochimiques des Enterobacteriaceae :

Les entérobactéries ont une oxydase négative, catalase positive, des besoins nutritionnels relativement simples et fermentent les sucres (le glucose généralement) en divers produits finaux, la plus part réduisent les nitrates [14].

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Le tableau 02 montre les principaux caractères biochimiques de certains genres d'entérobactéries.

Tableau 02 : Quelques caractéristiques des genres sélectionnés parmi les Enterobacteriaceae [16].

Caractères /Genres	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Proteus</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Klebsella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Serratia</i>
RM	+	+	+	+	+	+	(+)	(-)	+	d
VP	-	-	-	-	d	- (37°)	(+)	+	(+)	+
Production de l'indole	(+)	d	-	d	d	d	d	-	(-)	(-)
Utilisation de Citrate	-	-	(+)	+	d	(-)	(+)	+	(+)	+
H ₂ S	-	-	(+)	d	(+)	-	-	-	(+)	-
Uréase	-	-	-	(+)	+	d	(+)	(-)	-	-
β-galactosidase	(+)	d	d	+	-	+	(+)	+	+	+
Gaz à partir de glucose	+	-	(+)	+	+	(-)	(+)	(+)	(-)	d
Acide à partir de lactose	+	-	(-)	d	-	(-)	(+)	(+)	d	d
Phénylalanine désaminase	-	-	-	-	+	-	-	(-)	(-)	-
Lysine décarboxylase	(+)	-	(+)	-	-	(-)	(+)	d	-	d
Ornithine décarboxylase	(+)	d	(+)	(+)	d	d	-	(+)	-	d
Mobilité	d	-	(+)	+	+	- (37°)	-	+	+	+
Liquéfaction de la gélatine	-	-	-	-	+	(-)	-	d	d	(+)
%GC	48- 59	49- 53	50- 53	50- 52	38- 41	46- 50	53- 58	52- 60	50- 54	52- 60
Taille du génome (Mb)	4.6- 5.5	4.6	4.5- 4.9	Nd	Nd	4.6	Nd	Nd	5.1	5.1

+ : Présent. ; - : absent.

(+) : généralement présent ; (-) : généralement absent.

- (37°C) : réaction négative à 37°C ; Nd : Non déterminé ; génome pas encore séquencé.

d : variation entre souches ou espèces dans la possession de ce caractère.

Chapitre 2 : Le genre *Yersinia*

1. Historique

Le 20 juin 1894 le français Alexandre Yersin a identifié et isolé à Hong-Kong le bacille de la peste.

En l'honneur de ses découvertes le nom de Yersin a été associé au genre *Yersinia* en 1944 [7].

2. Définition

Le genre *Yersinia* appartient à la famille des Enterobacteriaceae, ce sont des bacilles à Gram négatifs, aéro-anaérobie facultatifs, non sporulants, non capsulés, mobiles à 25°C et non mobiles à 37°C à l'exception de *Yersinia pestis* (immobile à toute les températures).

Le genre *Yersinia* capable de se multiplier à des basses et hautes températures (4° à 42°C), la température optimale de croissance entre 25° et 30°C, le temps de la division cellulaire deux heures, le pH compris entre 5 et 9,6.

Ce genre est disposé généralement en diplocoques [10], [18].

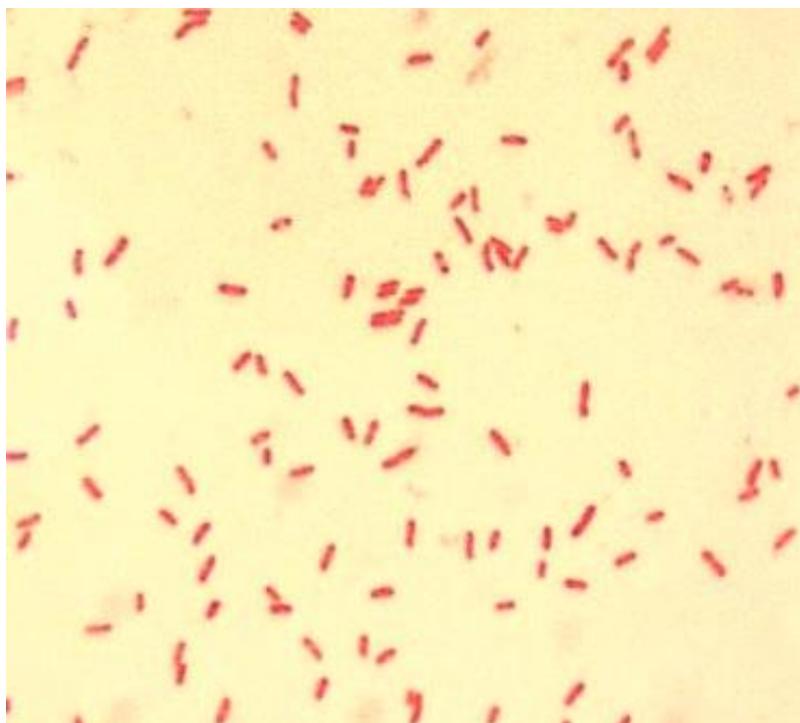


Figure 02: Observation microscopique de la morphologie de l'entérobactérie *Yersinia pestis*X100 [19].

3. Classification

La classification du genre *Yersinia* est représentée dans le tableau 03.

Tableau 03: Classification du genre *Yersinia* [16].

Domaine	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gamma proteobacteria
Ordre	Enterobacterial
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	<i>Yersinia</i>

Ce genre comprend 18 espèces : *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. wautersii*, *Y. reckeri*, *Y. entomophaga*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. bercovieri*, *Y. molaretii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. alksiciae*, *Y. similis*, *Y. massiliensis*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii* [8].

4. Habitat

Les *Yersinia* se trouvent dans l'eau, le sol sur les végétaux, ainsi que dans le tube digestif ou les déjections des animaux ou humains malades, ou porteurs sains [10].

5. Les caractères culturels

Aspect des colonies en tête d'épingle en 24h sur le milieu de culture gélose au sang, aspect en œuf sur le plat à 48h sur le même milieu [20].

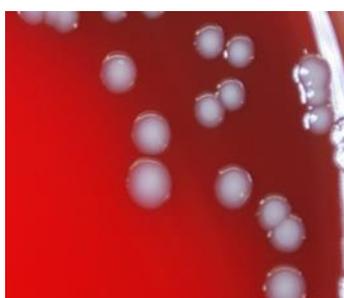


Figure 03 : Morphologie coloniale de la bactérie Gram négatif *Yersinia pestis* cultivée pendant 72h sur une gélose au sang [21].

6. Caractères biochimiques

Plusieurs réactions biochimiques sont utilisées dans l'identification biochimique du genre *Yersinia*

(Tableau 04).

Tableau 04 : Principaux réactions de diagnostic utilisées pour la distinction des principaux genres d'entérobactéries. (Le genre *Yersinia*) [17].

Tests / Genre	H ₂ S	Uréase	VP	Indole	Mobilité	Gaz sur glucose	β-Galactosidase	KCN	Citrate de Simmons	Utilisation du mucate	Rouge de méthyle	Utilisation de tartrate	Alanine désaminase	ADN (%G+C)
<i>Yersinia</i>	-	+	-	-	+ ^o	-	+	-	-	-	+	-	-	46-50

+^o : mobile à température ambiante, immobile à 37°C.

+ : résultat positif, - : résultat négatif.

7. Les espèces de *Yersinia*

7.1. *Yersinia pestis*

Yersinia pestis a été découverte le 20 juin 1894, par le médecin français Alexandre Yersin, au cours de la troisième pandémie de la peste [7].

Yersinia pestis est l'agent pathogène qui provoque la peste, est une entérobactérie appartenant au genre *Yersinia*, ovoïde et parfois coccobacille, avec un diamètre varie entre 0.5µm et 0.8µm et une longueur entre 1 et 3µm Gram négatif, non sporulée, intracellulaire facultative, strictement mobile quelle que soit la température [7], [23].

Yersinia pestis appartient au groupe des bacilles peu résistants aux facteurs environnementaux (les températures élevées, la dessiccation et la lumière solaire) [24].

Cette entérobactérie est un parasite des animaux et de l'homme, elle est capable de vivre dans deux habitats principaux ; l'estomac de différentes espèces de puces (vecteur) et le sang et les tissus de rongeurs sauvages [24], [25].

Cette bactérie se transmet par une piqûre d'une puce infectée (transmission indirecte) ou par contact avec une personne ou un animal infecté (transmission directe) [23].

7.1.1. La peste:

Très ancienne maladie, une zoonose causée par l'entérobactérie *Yersinia pestis*, elle a provoquée plusieurs millions de morts. Cette maladie a trois principales formes cliniques :

La forme pulmonaire: peut survenir à la suite d'une infection respiratoire primitive.

La forme bubonique : est la forme la plus observée, après une période d'incubation de 2 à 8 jours la maladie se déclare, caractérisée par quelques symptômes (fièvre, maux de tête, malaise ...etc.).

La forme septicémie : complique un bubon ou une pneumonie primitive [7], [23].

Yersinia pestis peut être mis en culture à partir de sang d'expectoration ; d'aspiration de bubon et de liquide céphalo-rachidien, tous les prélèvements doivent être effectués avant le début de l'antibiothérapie, le diagnostic sérologique et la détection de l'ADN par PCR (polymérase Chain réaction) est possible [7], [23].

7.2. *Yersinia pseudotuberculosis* :

Connu depuis 1883 en médecine vétérinaire, a été nommé le bacille de Malassez et Vignal, en 1954 Masshoff et Knapp ont attirés l'attention sur le rôle que ce bacille jouait en pathologie humaine [26].

Y. pseudotuberculosis est un coccobacille à Gram négatif appartient à la famille des entérobactéries [27].

Grace à 97% d'homologie de l'ADN de *Y. pseudotuberculosis* avec *Y. pestis* ; la *Yersinia pseudotuberculosis* aurait été le précurseur de bacille de la peste et est considérée comme un modèle d'évolution bactérienne ainsi qu'une homologie avec *Y. enterocolitica* [28].

Les infections de *Y. pseudotuberculosis* sont très répandues en hiver [29].

Elle est très répandue chez les animaux de ferme, les rongeurs sauvages, les lapins, les cerfs, et les oiseaux [30].

Les épidémies dues à *Y. pseudotuberculosis* ont été rapportées. En Europe du nord et de l'est. Ces épidémies généralement ont été associées à des produits crus. La source de contamination n'est pas claire et c'est le produit qui peut être contaminé lors du traitement par les rongeurs sauvages. La distribution de cette bactérie est dans le monde entier. [31], [32].

Y. pseudotuberculosis cause la yersiniose ou la pseudotuberculose. La maladie provoque une entéropathie aiguë, cette maladie comprend deux phases :

La phase aiguë qui dure jusqu'à 3 semaines et la phase arthritique qui dure jusqu'à 6 mois.

La population à risque est: les enfants, les jeunes adultes et les immunodéprimés [32].

Cette bactérie se transmet par contact avec les animaux ou les personnes infectées, par la consommation des aliments et de l'eau contaminés. La transmission par des produits sanguins infectés et la transmission nosocomiale sont possible [33].

Cette espèce est recherchée dans les cultures d'échantillon de selles ou dans les échantillons d'environnement contaminés, les cultures peuvent être enrichies à froid en les plaçant dans un bouillon tamponné au phosphate et en les incubant à 4°C pendant 7 jusqu'à 14 jours.

Le diagnostic par PCR en temps réel est un moyen pour distinguer l'infection dans les aliments [30].

7.3. *Yersinia enterocolitica*

En 1934 *Yersinia enterocolitica* fut décrite aux Etats-Unis par McIver et Pike, comme une probable nouvelle espèce.

En 1939 Schleifstein et Colmen décrivent cette bactérie comme proche de *Yersinia pseudotuberculosis*, et ils la nommèrent des 1943 *Bacterium enterocoliticum*, de nombreux nom lui furent attribués, jusqu'à 1964 elle prend le nom *Yersinia enterocolitica* [34], [35].

Yersinia enterocolitica appartient au genre *Yersinia* et à la famille des Enterobacteriaceae. C'est une bactérie à Gram négatif, aérobie anaérobie facultative, mobile,

non sporulée, intracellulaire facultative. Un petit bacille avec un diamètre varie entre 0.5µm et 0.8µm et une longueur entre 1µm et 2µm.

Cette espèce est résistante au froid (psychrophile) et est capable de proliférer à la température des réfrigérateurs 4°C. Leur génome a une taille de 4,6 Mb.

L'espèce *Yersinia enterocolitica* est subdivisée en 5 biotypes (1A/1B, 2, 3, 4,5) et 76 biosérotypes. Les principaux biosérotypes observés sont : 4/O:3, 2/O:9 et 2/O:5.

Yersinia enterocolitica est responsable de la yersiniose ; elle provoque une entérite s'accompagnant de fièvre, diarrhées parfois sanguinolentes, des crampes abdominales et des vomissements [36], [53], [54].

Cette infection peut être plus grave chez les enfants de moins de dix ans, et les personnes immunodéprimées [8], [18].

Les principaux réservoirs de cette espèce sont les porcs, les rongeurs, les volailles et quelques mammifères [35].

La transmission est par voie fécale-orale à partir de l'ingestion d'eau contaminée par des matières fécales ou des aliments contaminés comme la viande de porc et ses produits dérivés, ou bien par le contact direct avec des animaux ou personnes infectés [35].

Yersinia enterocolitica est recherchée principalement par coproculture ou par hémoculture (à partir du sang), autres tests sont possible comme le diagnostic moléculaire par la recherche de gène cible et le diagnostic sérologique [18].

En générale l'infection par cette espèce guérit d'elle même chez les personnes immunocompétentes [37].

Les caractères d'identification des espèces les plus fréquemment rencontrées chez le genre *Yersinia* sont montrés dans le tableau 05.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 05 : Résumé des caractères d'identification des espèces les plus fréquemment rencontrées chez le genre *Yersinia* [17].

Caractères	<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 ₃ ⁻ → NO ₂ ⁻	d/b	+/b	d/b
Fermentation glucose	+	+	+
Gaz en glucose	-	-	-
H ₂ S (kligler)	-	-	-
TTR	d	-	d
TDA	-	-	-
LDC	-	-	-
ODC	-	-	d
ADH	-	-	-
ONPG	+	+	d
PNPX (β-xylosidase)	+	+	-
Lipase (tween80)	-	-	d
ADNase	+	+	d
Gélatinase	-	-	+
Polypectate	+	+	+
Acidification de :			+
Glucose	+	+	
Glycérol	d	+	+
L-arabinose	+	+	+
D-arabinose	-	-	-
D-xylose	+	+	d
L-xylose	-	-	-
Adonitol	-	-	-
Galactose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Sorbose	-	-	+
Rgamnose	-	+	-
Dulcitol	-	-	-
Cellobiose	-	-	+
Maltose	d	+	+
Lactose	-	-	-/+
Mélibiose	d	+	-
Saccharose	-	-	d
Tréhalose	+	+	d
Raffinose	-	-	-
Inositol	-	-	+
Mannitol	+	+	+
Sorbitol	-	-	+

+ : Résultat positif. - : Résultat négatif

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

*: les souches du sérotype IV de *Y.pseudotuberculosis* sont positives.

d : variable.

d/b : variable selon le biotype.

d* : variable selon le sérotype IV de *Yersinia pseudotuberculosis*.

-/+ : négatif dans la majorité des cas.

+/b : positif sauf le biotype 5.

7.4. *Yersinia ruckeri*

Yersinia ruckeri est une espèce bactérienne appartient au genre *Yersinia* donc c'est une entérobactérie à Gram négatif en forme bâtonnet [38].

Yersinia ruckeri est naturellement présente dans l'hydro-écosystème aux Etats-Unis et au Canada [3].

Cette bactérie est responsable de la maladie de la bouche rouge chez la truite arc-en-ciel [3].

La souche 2396-61 est désignée comme la souche type de l'espèce, elle a été isolée la première fois en 1978 [39].

7.4.1. La maladie de la bouche rouge

La maladie de la bouche rouge (ERM : Enteric Red Mouth disease) est une maladie septicémique grave touche principalement les salmonidés causée par l'agent pathogène *Yersinia ruckeri*, ce dernier a constamment cause des pertes économiques dans l'aquaculture depuis sa première description dans la vallée de Hagerman, dans l'Idaho, aux Etats-Unis, dans les années 1950 [40], [41].

La maladie tire son nom des hémorragies sous-cutanées, elle peut causer aux coins de la bouche, des gencives et de la langue [38].

Cette bactérie peut être détecté par plusieurs méthodes : méthodes biochimiques classiques, méthodes sérologiques et aussi par des méthodes moléculaires [38].

7.5. *Yersinia mollaretii*

C'est une espèce qui semble à *Yersinia enterocolitica*, nommée en l'honneur de Henry Mollaret [42].

En 1978 Bercovier, *et al* ont désignés le biogroupe 3A d'après des échantillons d'écosystème terrestre, après des années de recherche génétique et sérologique et biochimique se groupe été séparé de *Yersinia enterocolitica* et proposé comme une nouvelle espèce sous le nom de *Yersinia mollaretii* [43].

Cette espèce a été isolée de: l'être humain, la nourriture, l'environnement, elle n'est pas considérée comme pathogène pour l'homme.

La taille du génome de cette espèce est de 4,65Mb avec un GC% égale à 49,1 [62].

7.6. *Yersinia intermedia*

Elle a été séparée de *Yersinia enterocolitica* par Brenner et ses collègues en 1980. Elle a été nommée *Y. intermedia* car elle possède des propriétés intermédiaires entre celles de *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* [45].

C'est une bactérie à Gram négatif, définie biochimiquement et génétiquement, elle contient plusieurs biotypes, elle n'est pas considérée comme un germe pathogène.

Les bactéries appartient à cette espèce ont été isolées de l'environnement, des animaux de la nourriture et de l'homme. La souche type est 3953 [45], [46].

7.7. *Yersinia fredriksnii*

Yersinia fredriksnii a été séparée de *Yersinia enterocolitica* en 1980 par Brenner et ses collègues. Elle peut provoquer des infections gastro-intestinales surtout chez les consommateurs du lait non pasteurisé [47], [48].

Les souches de cette espèce sont largement répandues dans la nature et ont été isolées chez l'homme, plusieurs espèces de mammifères, dans l'eau, dans le sol et d'autres aliments, l'identification correcte au niveau de l'espèce était de 41,7% (5 de 12 souches) [49].

7.8. *Yersinia krestensenii*

C'est une espèce bactérienne à Gram négatif, définie biochimiquement et génétiquement, elle a été séparée de *Yersinia enterocolitica* en 1981 [6], [50].

Elle infecte les souris et secrète une bactériocine qui a une activité inhibitrice pour *Yersinia enterocolitica*. La souche type est 105(=CIP80-30) [6], [9].

7.9. *Yersinia aldovae*

Elle a été nommée *Yersinia enterocolitica-like GroupeX2*, elle a été isolée chez des poissons et à partir des milieux aquatiques.

Grace aux tests biochimiques et génétiques ce groupe a été proposé comme une nouvelle espèce sous le nom de *Yersinia aldovae.sp.nov* [51], [52].

A un génome d'une taille de 4,47Mb avec un GC% de 47,7%. Elle a 4145 gènes. La souche type de cette espèce est CNY6005, elle a été isolée la première fois en 1984 [53].

7.10. *Yersinia rohdei*

C'est une espèce isolée des excréments des chiens et d'êtres humains, des eaux de surface, elle a été considérée comme biovars de *Y. enterocolitica*.

La souche type est H271-36/78, elle a été isolée la première fois en 1987, a une taille du génome de 4,37Mb avec un GC% égale à 47% [54], [55], [56], [57].

La pathologie de *Y. rohdei* sur la santé publique et la santé animale est inconnue [58].

7.11. *Yersinia bercovieri*

C'est une bactérie à Gram négatif, cette espèce a été séparé récemment de *Y. enterocolitica* et identifié comme une nouvelle espèce. Elle produit une entérotoxine thermostable qui a une activité biologique chez les souris. Les souches de cette espèce ont été isolées pour la première fois par Bercovier et al en 1978.

En 1988 Wauters et al ont proposés le nom de *Y. bercovieri*. Cette bactérie se trouve dans les aliments crus, les échantillons environnementaux et elle a été isolée également chez des patients souffrant des diarrhées [5].

Cette espèce est aussi nommée *Yersinia enterocolitica 3B* [59].

7.12. *Yersinia aleksiciae*

C'est une espèce à Gram négatif, coccoïde rond, grâce aux études génotypiques et à la comparaison avec les autres espèces du genre *Yersinia* que cette espèce a été proposée en 2005 comme une nouvelle espèce.

Le nom de *Yersinia aleksiciae* a été proposé en l'honneur du professeur Stojanca Aleksic. Elle a été isolée du monde entier et elle est considérée comme une bactérie de la flore digestive. Elle a un GC% égale à 48,1. La souche type est Y159(T) [60], [61].

7.13. *Yersinia massiliensis*

Elle a été isolée la première fois en 2008 dans l'eau douce à Marseille, en France, le nom de *Y. massiliensis* veut dire Massilia ancien nom romain de Marseille en France [61].

Yersinia massiliensis une entérobactérie à Gram négatif, coccobacille avec une longueur de 2,23µm et une largeur de 0.85µm, mobile à 28°C avec un a deux flagelles de 6,75µm, mésophile (la température de croissance entre 28-37°C), elle est considérée comme une bactérie non pathogène [61], [62].

La souche type est 50640^T, elle a été isolée dans une unité de dialyse du système de distribution d'eau dans un hôpital à Marseille [61].

Y. massiliensis a un génome de 4,99Mb et une teneur de GC de 49,3% [61], [62].

Le séquençage presque complet du gène de l'ARN 16S (1461bp), a montré que cette espèce présente une similarité avec *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri* et *Y. frederikseni* [61].

7.14. *Yersinia similis*

Sont des petites cellules coccoïdes, rondes, mobiles appartient au genre *Yersinia*.

Le nom *similis* veut dire *similis* = similar, ce genre présente une grande similarité à *Yersinia pseudotuberculosis*, cette similarité ne peut pas être détecté par les tests biochimiques classiques [63], [64].

Yersinia similis correspond au type génétique G4 de *Yersinia pseudotuberculosis* identifié précédemment qui n'est probablement pas pathogène car il ne possède pas les facteurs de virulence typique de *Yersinia pseudotuberculosis*. Cette espèce a été isolée chez plusieurs animaux sains [63], [64].

La souche type de cette espèce est *Y228T*, elle a été isolée la première fois en 2008 chez un lapin en Allemagne, a une taille du génome de 4,9Mb et une teneur de GC de 47% [64], [65].

7.15. *Yersinia entomophaga*

Elle a été isolée pour la première fois en 2011 chez des larves de Coléoptère en Nouvelle-Zélande, c'est une bactérie à Gram négatif, non sporulée, mésophile (la température de développement entre 25 et 42°C) a une morphologie cellulaire qui présente deux formes ; les bâtonnets mesurant 0,7µm de large et 1,7µm de long, tandis que des cellules plus grandes et allongées de 1µm de large et allant de 20 à 60µm de long avec un à trois flagelles péritriches. C'est une espèce pathogène pour les insectes, elle tue un grand nombre des espèces de Coléoptères [4].

La souche type de cette espèce est la souche MH96(T), a une teneur en GC de 49,3%. L'ARNr 16S la plus similaire à celle de MH96(T) est celle de la souche type *Yersinia mollaretii* (98,5% de similarité) [4].

Cette bactérie a un intérêt pour la protection des plantes contre les insectes nuisibles par la production des substances qui ont une activité biopesticide [66].

7.16. *Yersinia nurmii*

Une entérobactérie en forme bâtonnet, elle a été isolée la première fois à partir d'un morceau de viande de chair en 2011, elle possède un génome de taille de 4,1Mb [67].

Cette bactérie a un profil phénotypique diffère de celui des autres représentants du genre *Yersinia*, mais le plus semblable à celui de *Yersinia ruckeri*, les marqueurs de virulence typique de *Yersinia* pathogène n'ont pas été détectés. La souche type de cette espèce est APN3a-C(T) [67], [68].

7.17. *Yersinia pekkanenii*

C'est une bactérie à Gram négatif, ronde, avec un diamètre de 1-3µm. elle a été isolée de la salade. Le nom de *Yersinia pekkanenii* est proposé en l'honneur de Timo Pekkanen. Elle a un GC% égale à 47,5%. La souche type est ÅYV7.1KOH₂(T), elle a été isolée la première fois en 2011 [69].

7.18. *Yersinia wautersii*

Elle a été isolée la première fois en 2014, et elle est considérée comme une souche de *Yersinia pseudotuberculosis* [70].

Savin, et *al* l'ont proposée comme une nouvelle espèce sous le nom de *Yersinia wautersii*. La détection de gène de virulence sur le plasmide pYV et pVM82, montre que cette espèce est pathogène [70], [71].

Les caractères biochimiques de certaines espèces du genre *Yersinia* sont représentés dans le tableau 06.

Tableau 06: Les caractères biochimiques de certaines espèces de *Yersinia* [4], [67], [69].

Caractères	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sorbose	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
D-Xylose	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
Esculine	-	+	-	-	-	-	+	+	-	(+)	-	-	-	+
Salicine	-	+	-	(+)	(+)	-	+	(+)	-	(+)	+	(+)	-	+
Cellobiose	+	+	-	+	+	-	+	-	(+)	+	+	+	+	+
Lactose	+	-	-	-	(+)	-	-	-	(+)	(+)	+	-	+	-
Raffinose	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycérol	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Citrate	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Inositol	-	+	-	-	-	+	+	-	-	(+)	(+)	(+)	-	+
Sorbitol	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Mélibiose	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	(+)
L-Arabinose	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
L'hydrolyse de l'urée	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Lysine décarboxylase	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine décarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Voges-proskauer	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
La production d'Indole	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Les espèces :1, *Y. entomophaga* ;2, *Y. intermedia* ;3, *Y. ruckeri* ;4,*Y. bercovieri* ;5, *Y. rohdei* ;6, *Y. aldovae* ;7, *Y. fredriksnii* ;8, *Y. similis* ;9, *Y. nurmii* ;10, *Y. mollaretii* ;11, *Y. krestensenii* ;12, *Y. alekcisiae* ; 13, *Y. pekkanenii* ;14, *Y. massiliensis*.

+ : positive.

- : négative.

(+) : faiblement positive.

(-) : faiblement négative.

Chapitre 3 : L'isolement de *Yersinia*

Les *Yersinia* ont des caractères culturels particuliers (croissance plus lente que celle des autres Entérobactéries), qui rendent parfois difficile leur isolement à partir d'un échantillon polymicrobien comme les selles, donc l'utilisation de techniques de pré-enrichissement et de milieux sélectifs améliore l'isolement de ces bactéries [72].

1. Les milieux d'enrichissement :

1.1. L'eau peptonée (EP) :

Composé de peptone, NaCl et du phosphate disodique et monosodique, ce milieu est utilisé comme milieu de pré-enrichissement et d'enrichissement sélectif pour plusieurs entérobactéries comme *Salmonella* et *E. coli*.

On a pu montrer que pour mettre en évidence de nombreux germes dans les selles, les prélèvements fécaux sont enrichis dans une solution de tampon phosphaté ou du bouillon peptoné à une température de + 4°C pendant 3 à 7 jours, on favorise ainsi la multiplication de *Yersinia* [11].

1.2. Le tampon phosphaté salé + Mannitol (PBSM) :

C'est une autre modification du tampon phosphaté salé (PBS) auquel on rajoute du mannitol à 1%, ce qui confère à ce bouillon d'enrichissement un rendement élevé pour l'isolement de *Y. enterocolitica* dans les selles [73], [74].

1.3. Le tampon phosphaté salé + Sorbitol + Sels biliaires (PBSSB) :

Ce milieu est utilisé pour l'enrichissement de *Salmonella*, il a été montré par Wauters en 1973, c'est le tampon phosphaté salé (PBS) utilisé communément pour l'enrichissement à froid de *Yersinia*. Ce tampon a été additionné de sorbitol et de sels biliaires dans le but de favoriser l'enrichissement de *Y. enterocolitica* au dépend des autres microorganismes et de diminuer la période d'incubation [75], [76].

1.4. Bouillon rappaport modifié + carbénicilline (MRBC) et le milieu ITC :

Ce milieu contient plus de MgCl₂ et moins de vert de malachite que le milieu original, il a été additionné d'une faible quantité de Carbénicilline, antibiotique auquel les sérotypes O : 3 et O : 9 de *Y. enterocolitica* sont toujours résistants, ce qui lui confère l'usage réservé

pour la recherche de ces sérotypes et qui ne nous empêcherait pas d'étendre son usage à tous les sérotypes de *Y. enterocolitica*.

Wauters, *et al* en 1984, ont développés un nouveau bouillon d'enrichissement ITC dérivé du bouillon rappaport modifié (MRBC), supplémenté d'Irgasan, Ticarcilline et en chlorate de potassium, Irgasan : antiseptique Triclosan actif sur les champignons et les bactéries à Gram positif, Ticarcilline : antibiotique à large spectre, appartenant à la famille des Pénicilline [75].

2. Les milieux d'isolement :

2.1. Milieu Hektoen :

Gélose aux sels biliaires, lactosé, saccharosé, contenant de la salicine, utilisée communément pour l'isolement des entérobactéries, ce milieu permet la différenciation des entérobactéries pathogènes [77].

2.2. Le milieu Mac Conkey :

L'utilisation de ce milieu est recommandée pour isoler et dénombrer les entérobactéries dans les eaux, le lait, les matières alimentaires et dans les urines. Il peut aussi être utilisé pour la recherche des entérobactéries pathogènes dans les matières fécales. Toutes les Enterobacteriaceae y cultivent le cristal violet inhibe la croissance des bactéries à Gram positif [78].

2.3. Le milieu CIN (Cefsulodine-Irganan-Novobiocine) :

Un milieu semi-sélectif conforme à la norme NFISO10273 est considéré à ce jour comme le milieu de référence pour l'isolement de *Yersinia*, il provoque une bonne spécificité pour la détection de *Yersinia* après incubation à 28°C, la lecture est effectuée à 24 heures et à 48 heures [12].

Ce milieu contient des sels biliaires, du cristal violet, d'irgasan et d'antibiotiques (Cefsulodine et Novobiocine) qui inhibent le développement des bactéries à Gram positif et la plupart des bactéries à Gram négatif.

La sélection du milieu est due à la présence de ces substances. C'est pour cela qu'il est le plus inhibiteur vis-à-vis de la flore entérique normale et que son pouvoir récupérateur pour *Yersinia enterocolitica* était satisfaisant [79].

2.4. Le milieu YM ou milieu YERSINIA :

Milieu proposé par Soltesz puis modifié par Brewer, contenant de l'hydrolysate de caséine et de la peptone servant de sources de carbone et d'énergie respectivement une sélectivité lui est conférée, par ailleurs, par ces autres composants tels que : l'oxalate de sodium qui élimine la croissance des bâtonnets à Gram négatif particulièrement *Proteus* et *Pseudomonas*, les sels biliaires inhibent les bactéries à Gram positif [80].

2.5. Le milieu CAL ou milieu Cellobiose-Arginine-Lysine :

Ce milieu contient un disaccharide : le Cellobiose et deux acides aminés : l'Arginine et la Lysine. L'identification des colonies de *Y. enterocolitica* sur ce milieu est basée sur la morphologie et l'aspect des colonies qui permettent la différenciation avec les autres bactéries trouvées dans les eaux et les selles et ceci grâce à la fermentation ou non de Cellobiose et de la décarboxylation ou non de l'arginine ou de la lysine [81].

3. Méthodes alternatives ou autres méthodes de détection :

La plupart des méthodes alternatives ou autres méthodes de détection de *Yersinia* sont coûteuses et prennent beaucoup de temps.

- Méthodes immunologiques : test d'agglutination, Elisa...
- Méthodes de biologie moléculaire : PCR, Ribotypage RAPD, RFLP...
- Méthodes de typage : Biotypage, Sérotypage, lysotypage [12].

MATÉRIEL
ET
MÉTHODES

1. Objectif d'étude

Le but de notre étude est l'isolement et l'identification morphologique et biochimique de *Yersinia sp.*, à partir des échantillons (eaux et sols des lacs de Djebel El Ouahch et El Meridje). La figure 04 montre le site de prélèvement.

2. Lieu d'étude

Notre travail a été effectué durant la période Avril-Juin de l'année 2019, au niveau de laboratoire de la Microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université des Frères Mentouri, Constantine1).

3. Echantillonnage

3.1. Lieu de prélèvement :

Les prélèvements ont été effectués à partir d'eaux et de sols de quatre lacs, situés dans des zones naturelles biologiques, dont trois parmi eux sont situés dans la forêt de Djebel El Ouahch, et le quatrième dans la région de El Meridje comme les figures 04, 05 et 06 montrent.



Figure 04 : site de prelevement à Djebel El Ouahch et El Meridje. [82]

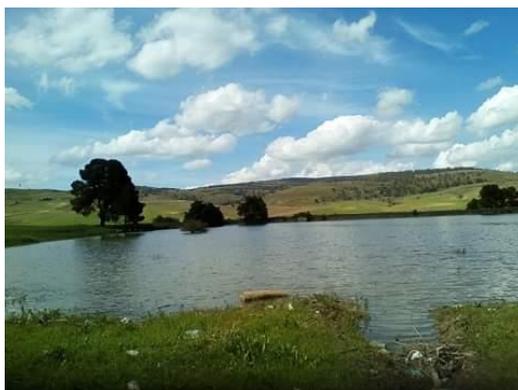


Figure 05 : Le lac de El Mridje.

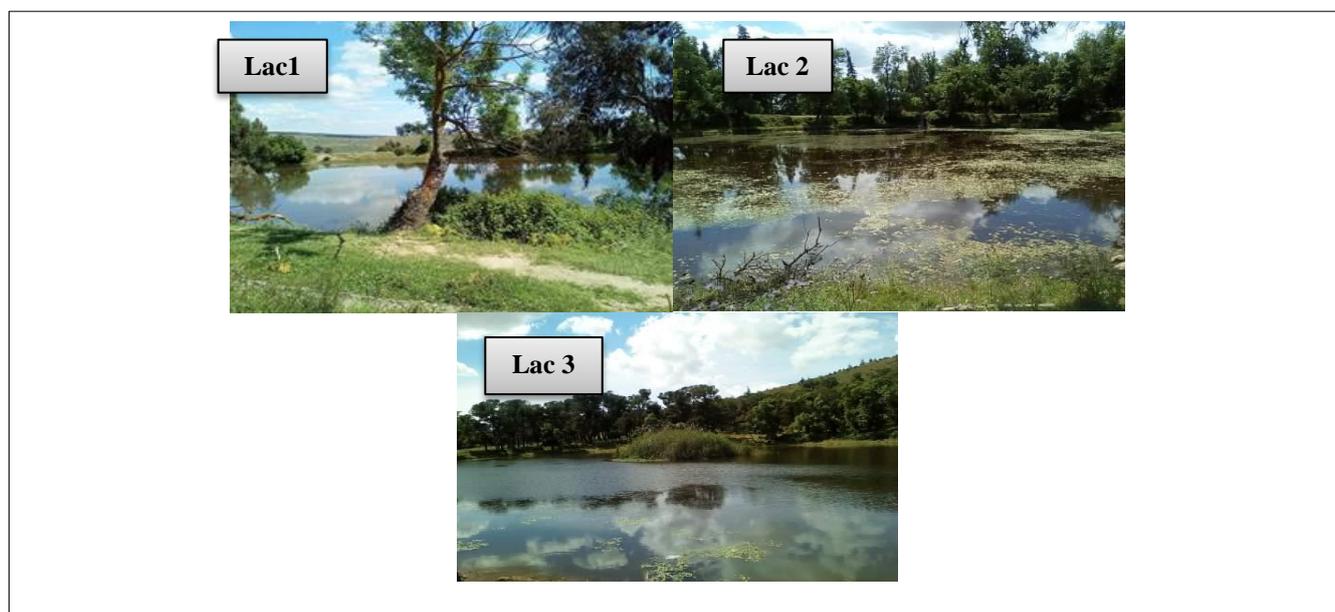


Figure 06 : Les trois lacs de la forêt de Djebel El Ouahche.

3.2. Prélèvement des échantillons :

Les échantillons d'eaux ont été prélevés dans des flacons stériles et les échantillons de sols (sol brun, humide) dans des boîtes de Pétri stériles, dans un intervalle du temps inférieur de dix minutes, comme représenté dans la figure 07.

Les échantillons du sol ont été prélevés après avoir enlevé 3cm de la couche superficielle.

Les échantillons ont été conservés pendant 12 heures dans un réfrigérateur pour fournir des conditions isothermes de 4°C.

L'analyse des échantillons (eaux et sols) a été réalisée le lendemain de l'échantillonnage.

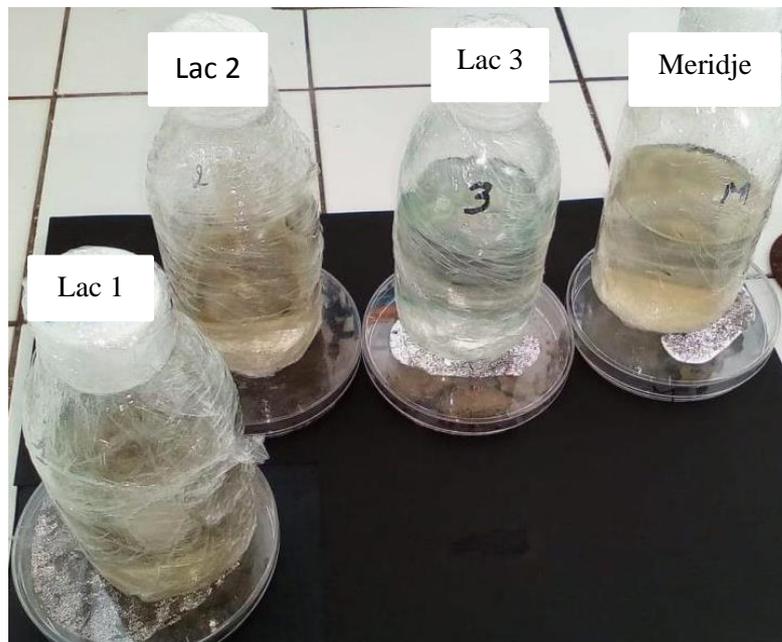


Figure 07 : les quatre prélèvements (eaux et sols) à partir des quatre lacs différents.

4. Enrichissement et l'isolement de *Yersinia*

4.1. Enrichissement :

L'eau :

- 40 ml d'eau sont ajoutés à 100 ml d'eau péptonée, puis le mélange est placé au réfrigérateur à 4° C pendant une durée maximum de 15 jours. (figure 08).

(Annexe 1)

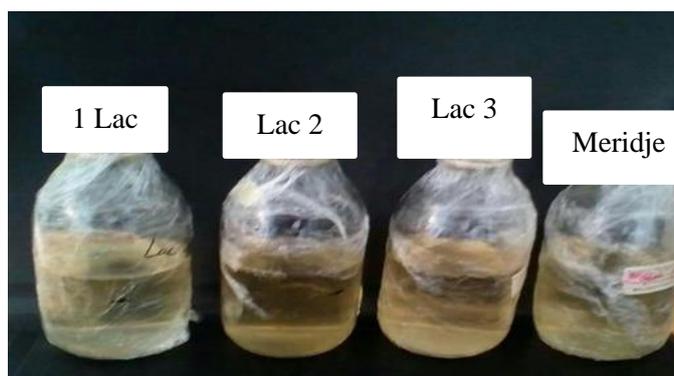


Figure 08 : les enrichissements eau de lac en eau péptonée.

Le sol :

- 1 g de sol est ajouté à 5 ml d'eau péptonée, puis le mélange est placé au réfrigérateur à 4° C pendant une durée maximum de 15 jours. (figure 09).

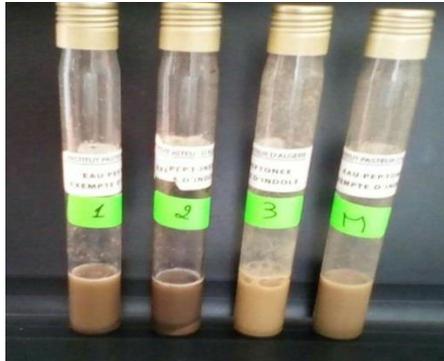


Figure 09: les enrichissements du sol de lac en eau péptonée.

4.2. L'isolement :

4.2.1. Isolement direct :

À partir de la suspension bactérienne enrichie et incubée pendant 15 jours à + 4°C, on prélève 0.1 ml à l'aide d'une pipette Pasteur, qui sera déposée sur le milieu Mac Conkey, l'ensemencement se fait en surface, par la méthode des cadrans. L'incubation à 30°C pendant 48 heures.

4.2.2. Isolement après décontamination par KOH à 5% :

1ml du bouillon d'enrichissement est rajouté à 5ml de solution de KOH à 5% et laisser pendant quelques secondes.

0.1ml est prélevé et déposé sur le milieu Mac Conkey, l'ensemencement se fait en surface, l'incubation est réalisée à 30°C pendant 48 heures [82] (**Annexe 1**).

5. Identification macroscopique et microscopique des souches

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

5.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est effectué sur le milieu Mac Conkey, après ensemencement et incubation à 30°C pendant 48 heures.

L'étude macroscopique des colonies isolées permet d'identifier la taille des colonies, la forme, la couleur, l'élévation, la transparence, la consistance, ainsi leur capacité à fermenter le lactose.

5.2. Examen microscopique

Après l'examen macroscopique et l'observation des colonies obtenues sur la gélose Mac Conkey, on réalise une coloration de Gram des colonies suspectes. (**Annexe 04**)

L'observation sous microscope optique au grossissement X100, nous a permis de déterminer le Gram des bactéries isolées, leur forme et leur regroupement.

6. Identification biochimique

6.1. Test d'oxydase

La Cytochrome oxydase ou oxydase est une enzyme de la chaîne respiratoire bactérienne qui catalyse des réactions d'oxydation, en présence d'oxygène ambiante cette enzyme peut oxyder un substrat incolore (méthyle du para-méthylène-diamine) en un produit oxydé coloré en rose violacé.

La recherche de l'oxydase est un test fondamental pour l'identification des bacilles à Gram négatif.

- La technique

Le réactif peut se trouver sous deux formes :

- ❖ Soit en solution : sur une lame, déposer un carré de papier filtre et l'imbiber d'une solution fraîche.
- ❖ Soit sous la forme d'un disque pré-imprégné par le réactif.

Dans les deux cas, écraser avec une pipette Pasteur boutonné et stérile une colonie de la bactérie à étudier.

- La lecture
 - ❖ Si la colonie prend une teinte rose violette => la bactérie possède une oxydase (test positif).
 - ❖ Si la colonie reste incolore => la bactérie ne possède pas une oxydase (test négatif) [12].

6.2. Test de catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et aérobies facultatives.

- La technique
 - ❖ Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée, à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée et stérile puis ajouter l'inoculum bactérien.
 - ❖ Ou bien au contact d'une colonie isolée déposer une goutte d'eau oxygénée.
- La lecture
 - ❖ Apparition de bulle ; dégagement gazeux de dioxygène => la bactérie possède une catalase (test positif).
 - ❖ Pas de bulles => la bactérie ne possède pas une catalase (test négatif) [12].

6.3. Le milieu mannitol-mobilité

Ce test permet de lire :

La fermentation du mannitol : les bactéries mannitol positif acidifient le milieu qui vire au jaune (teinte acide du rouge de phénol).

La mobilité : du fait de la faible teneur en agar du milieu, les bactéries mobiles peuvent s'y déplacer (les bactéries aérobies strictes ne cultivent pas dans la profondeur, leur mobilité ne pourra pas être lue).

La réduction des nitrates en nitrites et la production de gaz (CO₂).

- L'ensemencement
 - ❖ Par piqure centrale à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, puis incuber 24 heures à 25°C et 37°C pour la recherche de *Yersinia*.

6.4. La recherche de la nitrate réductase

Le bouillon nitraté est un bouillon de culture permettant la recherche de l'utilisation de ion nitrate par certaines bactéries.

- La lecture
 - ❖ Si les nitrites sont présents ils donnent une réaction colorée rose, en présence d'acide sulfanilique (Nit I) et de naphtylamine (Nit II).

- ❖ En absence de nitrites, il faut rechercher la disparition des nitrates par addition de poudre de zinc ; en effet le zinc réduit les nitrates en nitrites, deux cas sont possibles :
 - Coloration rouge : les nitrates encore présents dans le milieu ont été réduits en nitrite par le zinc=> la bactérie ne possède pas la nitrate réductase (test négatif).
 - Pas de coloration : les nitrates du milieu ont été réduits par les bactéries=> la bactérie possède la nitrate réductase (test positif) [12].

6.5. La galerie API 20 E

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests, les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. (**Annexe 05**)

- La technique

- ❖ Préparation de l'inoculum

Prélever une colonie d'une souche pure et l'introduire dans 5ml d'eau distillée stérile, en réalisant une suspension de 0,5Mac Farland.

- ❖ Inoculation de la galerie API 20 E

Avec la micro pipette introduire la suspension bactérienne dans les microtubes de la galerie. Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule. Pour les autres tests remplir uniquement les tubes, et pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose, en remplissant leur cupule d'huile de paraffine stérile.

La galerie doit être remplie d'eau pour former une chambre humide, fermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

RÉSULTATS
ET
DISCUSSION

1. Identification bactériologique

1.1. Examen macroscopique

Après l'ensemencement sur le milieu gélosé Mac Conkey et incubation pendant 48 heures à 30°C, les caractères macroscopiques des souches isolées sont résumées dans le tableau suivant. (Tableau 07).

Tableau 07 : Description macroscopique des souches étudiées.

La souche	La taille de la colonie	La forme	La couleur	La surface	Transparence	La consistance	L'élévation
S1	Colonie moyenne	Ronde à bord circulaire	Incolore	Lisse	Translucide	Crémeuse	Légèrement convexe
S2	Grosse colonie	Ronde à bords circulaire	Incolore	Lisse	Translucide	Crémeuse	Légèrement convexe
S3	Grosse colonie	Rondes à bord circulaire	Incolore	Lisse	Translucide	Crémeuse	Légèrement convexe
S4	Grosse colonie	Ronde à bord circulaire	Incolore	Lisse	Translucide	Crémeuse	Légèrement convexe
S5	Grosse colonie	Ronde à bord irrégulier	Rose	Lisse	Opaque	Crémeuse	Légèrement convexe
S6	Grosse colonie	Ronde à bord circulaire	Incolore	Lisse	Translucide	Crémeuse	Légèrement convexe
S7	Colonie moyenne	Ronde à bord circulaire	Incolore	Lisse	Opaque	Crémeuse	Convexe
S8	Grosse colonie	Ronde à bord circulaire	Incolore	Lisse	Translucide	Crémeuse	Légèrement convexe
S9	Grosse colonie	Ronde à bord irrégulier	Incolore	Lisse	colonie opaque au centre, et translucide sur les bords	Crémeuse	Plates
S10	Grosse colonie	Ronde à bord irrégulier	Rose	Lisse	Translucide	Crémeuse	Plates
S11	Colonie moyenne	Ronde à bord circulaire	Incolore	Lisse	Opaque	Crémeuse	Convexe
S12	Grosse colonie	Ronde à bord circulaire	Rose	Lisse	Opaque	Crémeuse	Convexe

RÉSULTAT ET DISCUSSION

L'aspect macroscopique des souches sur milieu Mac Conkey est représenté par la figure 10.

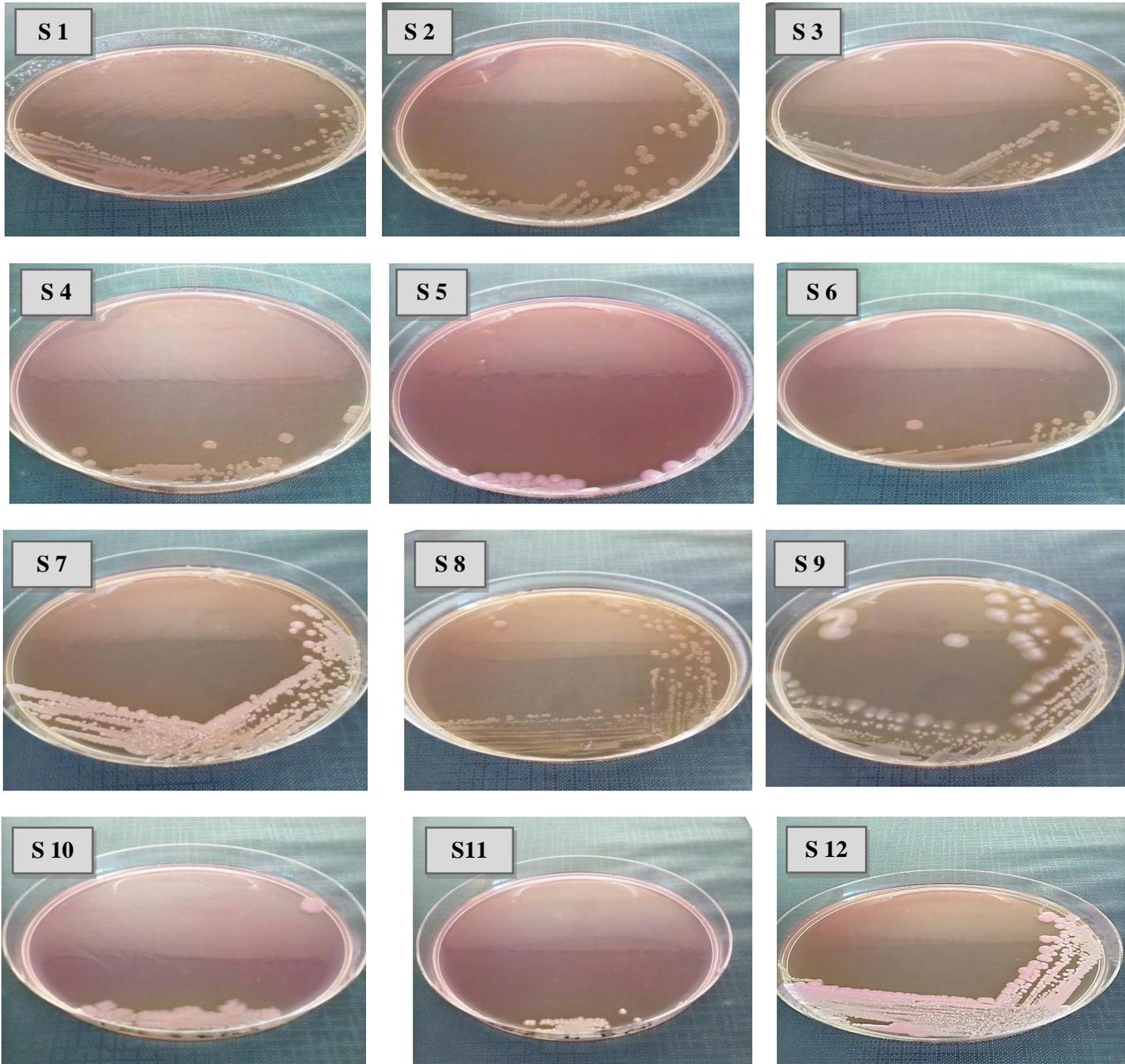


Figure 10 : Aspect macroscopique des souches sur milieu Mac Conkey.

1.2. Examen microscopique

La coloration de Gram a révélé que l'ensemble des colonies isolées sur Mac Conkey sont des bactéries à Gram négatif, en forme bacille (coccobacilles) comme illustré dans la figure 11.

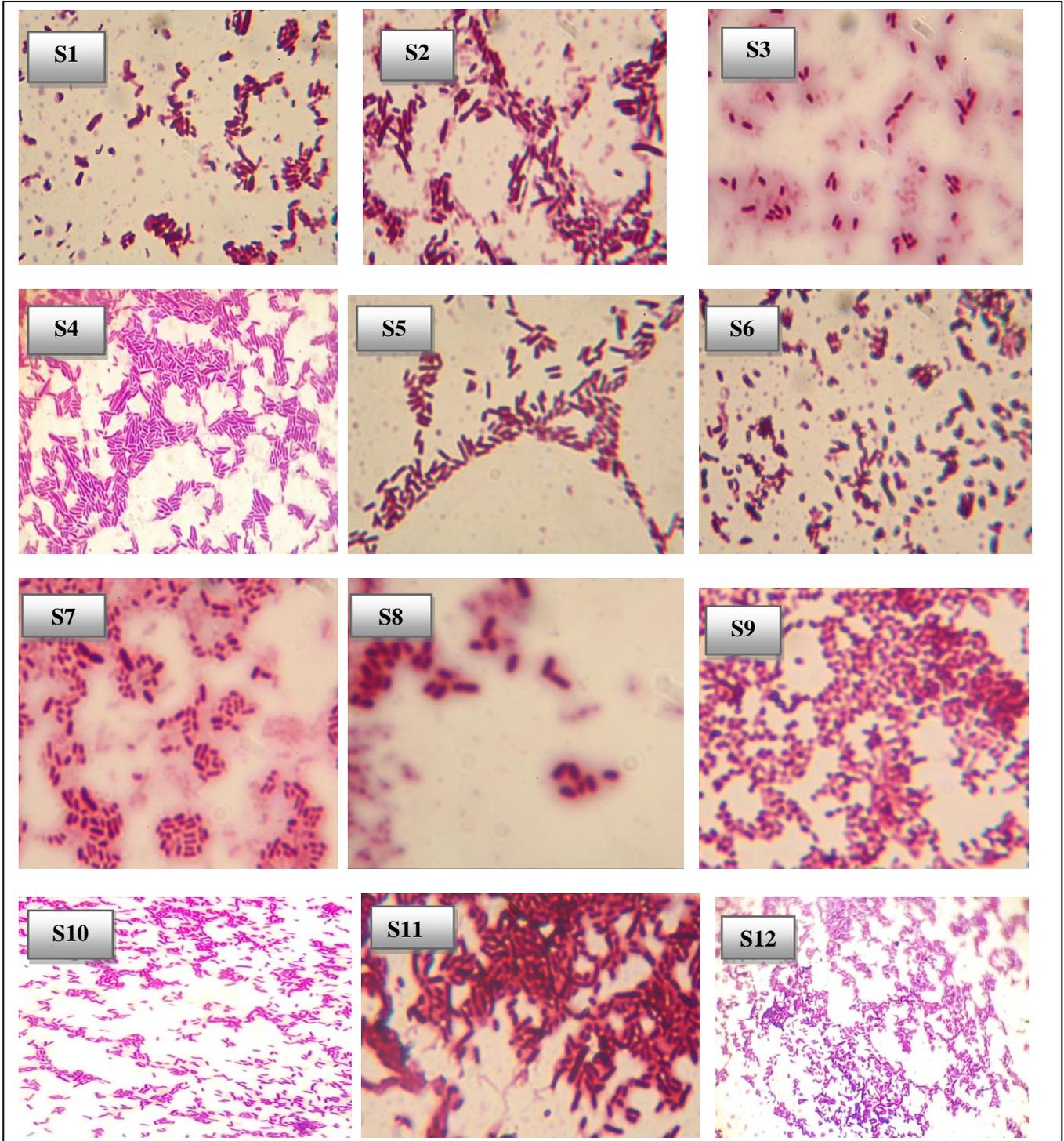


Figure 11: Aspect microscopiques des souches isolées après coloration de Gram X100 à immersion.

2. Identification biochimique

2.1. Test d'oxydase

Toutes les souches isolées sont oxydase négative sauf une seule souche (S11) qui est une oxydase positive possédant l'enzyme oxydase.

La réaction positive s'est traduite par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée. (Figure 12).

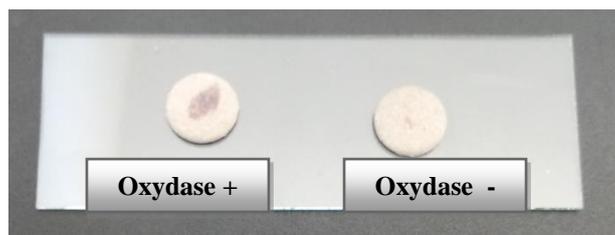


Figure12: Révélation du test oxydase.

2.2. Test de 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. (Figure 13).

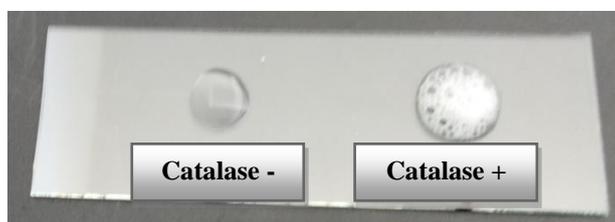


Figure 13: Résultat du test catalase.

2.3. Test de nitrate réductase

Après l'ajout des réactifs Nit I et Nit II, la coloration reste jaune, donc l'addition de poudre de zinc est nécessaire pour interpréter ce test.

Après l'ajout de poudre de zinc la coloration reste toujours jaunâtre ce qui confirme que toutes les souches étudiées possèdent la nitrate réductase (nitrate réductase positive), la coloration rouge n'est pas apparue puisque les nitrates (NO_3^-) sont dégradées jusqu'au stade de diazote (N_2), comme montré dans la figure 14.



Figure 14 : Résulta du test nitrate réductase positif après l’ajout de poudre de zinc.

2.4. Test de mannitol mobilité

- La fermentation du mannitol

Le virage de l’indicateur coloré rouge de phénol du rouge au jaune indique une acidification du milieu par la fermentation de mannitol.

Les souches étudiées présentent divers aspects certaines sont mannitol positif et d’autres sont mannitol négatif.

- La mobilité

Après incubation 24 heures à 37°C la culture est apparue tout au long de la piqûre seulement (pas de diffusion de la souche).

Donc les souches étudiées sont des souches immobiles à 37°C et mobile à 25°C.

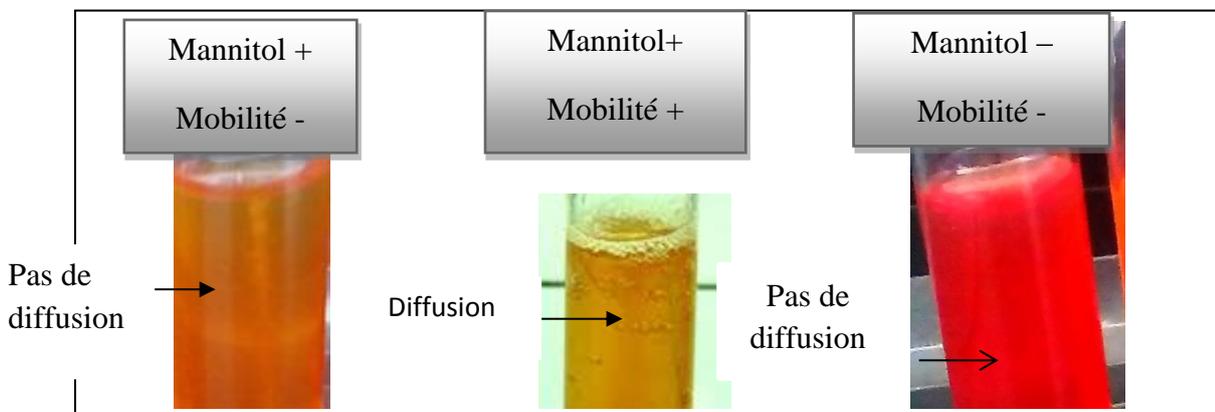


Figure 15: Résultat du test mannitol mobilité.

2.5. La galerie API 20E

La galerie API 20E nous a permis d'affiner nos résultats dans l'identification des souches.

Au total douze souches présomptives ont été retenues, les résultats des tests biochimiques sont représentés dans le tableau 08.

Tableau 08 : Les résultats des tests biochimiques des souches étudiées.

Test souche	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ortho- Nitro-phenyl-Galactoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Arginine Dihydrolase	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Lysine Décarboxylase	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Ornithine Décarboxylase	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
Citrate de Simmons	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
Thiosulfate de sodium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uréase	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Tryptophane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Pyruvate de sodium	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gélatinase	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Inositol	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Rhamnose	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
Saccharose	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Melibiose	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Nitrate réductase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : présence , - : absence

RÉSULTAT ET DISCUSSION

A partir du catalogue analytique l'identification des souches isolées sont montrées dans le tableau suivant.

Tableau 09 : L'identification des souches étudiées.

La souche	Le nom	L'origine
S1	<i>Yersinia frederikseni</i>	Eau de lac 1 (Djebel El Ouahch)
S2	<i>Yersinia frederikseni</i>	Eau de lac 1 (Djebel El Ouahch)
S3	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Eau de lac 1 (Djebel El Ouahch)
S4	<i>Enterobacter sakazakii</i>	Eau de lac2 (Djebel El Ouahch)
S5	<i>Serratia marcescens</i>	Sol de lac 2 (Djebel El Ouahch)
S6	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Sol de lac 1 (Djebel El Ouahch)
S7	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Eau de lac 2 (Djebel El Ouahch)
S8	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Sol de lac 3 (Djebel El Ouahch)
S9	<i>Hafnia alvei</i>	Eau de lac de El Meridje
S10	<i>Enterobacter intermedius</i>	Eau de lac 3 (Djebel El Ouahch)
S11	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Eau de lac de El Meridje
S12	<i>Enterobacter intermedius</i>	Eau de lac de El Meridje

3. Discussion

Notre étude avait pour but principal, l'isolement et la caractérisation de certaines espèces de genre *Yersinia* isolées à partir des eaux et des sols de lacs. Et aussi l'objectif de cette étude est l'identification de douze isolats, en se basant sur les caractéristiques morphologiques et biochimiques.

❖ Enrichissement des *Yersinia* :

L'eau peptonée permet l'enrichissement à froid des souches de *Yersinia*, selon plusieurs auteurs l'enrichissement sur milieu liquide avant l'isolement sur milieu solide a comme but d'augmenter le nombre des souches de *Yersinia* dans différents échantillons analysés [12].

❖ Isolement des *Yersinia* :

Le milieu d'isolement spécifique Mac Conkey présente une sélectivité qui a permis à de nombreuses colonies de *Yersinia* de cultiver, aussi le traitement par la solution de KOH (traitement alcalin) permet la sélection des colonies de *Yersinia*, selon Aulisio et al les *Yersinia* sont des bactéries qui peuvent survivre dans les conditions alcalines [12], [82].

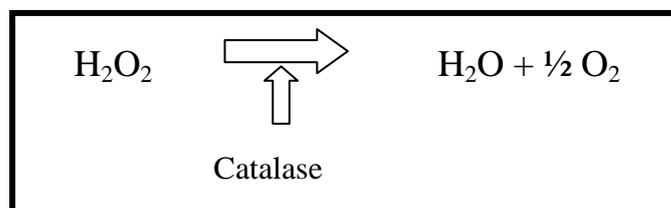
L'isolement sur ce milieu nous a montré des colonies de taille moyennes de 1 à 3 mm, incolores qui indiquent que les *Yersinia* ne fermentent pas le lactose, légèrement convexe, rondes aux bords circulaires [82].

Selon Wauters, le meilleur procédé de culture de routine de *Yersinia* n'est pas encore définitivement imposé et même le milieu CIN qui est considéré depuis longtemps comme meilleur milieu sélectif d'isolement de *Yersinia* reste une procédure inefficace [12].

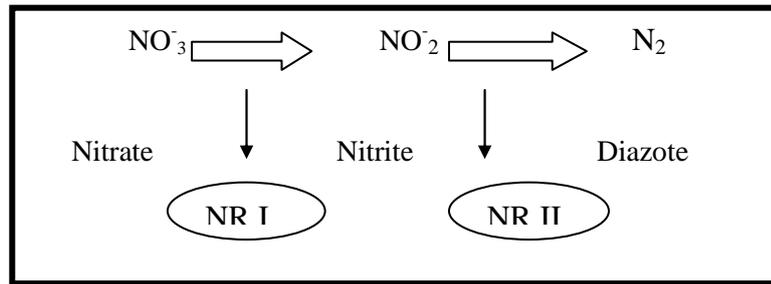
La coloration de Gram montre des bacilles (coccobacilles) à Gram négatif.

❖ Identification biochimiques :

L'isolement des souches nous a permis de tester les colonies de *Yersinia*. La plus part des colonies testées présentent une oxydase négative, une catalase positive, donc ont la capacité de décomposer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène.



Et une nitrate réductase positive, la réduction de nitrate par la nitrate réductase traduit par la réaction suivante.



Uréase positive et TDA négative, ces tests sont fondamentaux pour identifier les *Yersinia*, aussi la fermentation du glucose et l'immobilité à 37°C sont des caractères importants pour définir les *Yersinia*.

L'activité uréasique en milieu urée- indole est remarquable, les souches de *Yersinia* sont uréase positive ce test est très rapide et est préliminaire pour l'identification du genre *Yersinia* [83].

La galerie API 20 E nous a permis d'identifier douze souches :

Quatre souches de *Yersinia enterocolitica*, deux souches de *Yersinia frederiksenii*, une souche de *Hafnia alvei*, une souche de *Aeromonas salmonicida*, deux souches de *Enterobacter intermedium* et une souche de *Enterobacter sakazakii* et une souche de *Serratia marcescens*.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les objectifs de notre travail consistaient d'une part à l'isolement des bactéries du genre *Yersinia* à partir des échantillons des eaux et de sols puis la caractérisation morphologique, culturale et biochimique de ces espèces d'autre part de mettre en évidence une méthode d'isolement qui permet d'obtenir des meilleurs résultats vis-à-vis la culture de *Yersinia*.

Le genre *Yersinia* appartient à la famille des Enterobacteriaceae, ce sont des bacilles, à Gram négatifs, aérobie-anaérobie facultatifs, non sporulants, non capsulés, mobiles à 25°C et non mobiles à 37°C, capable de se multiplier à des basses et hautes températures (4 à 42°C), leurs pH compris entre 5 et 9,6.

L'étude de l'aspect morphologique des colonies est la première étape pour l'identification d'une bactérie, puis l'identification biochimique. Il existe d'autres méthodes alternatives ou les méthodes de détections.

L'isolement sur milieu Mac Conkey après l'enrichissement à froid et le traitement alcalin a permis d'obtenir des bons résultats.

On a pu confirmer également l'existence de quelques espèces du genre *Yersinia* dans les lacs de Djebel El Ouahche et El Meridj ainsi que le sol qui les entoure.

Perspective :

- Réaliser une caractérisation plus approfondie : les technique de base de haute performance comme : l'extraction de l'ADN, la PCR, le séquençage, détermination de sérotype...
- Réaliser un antibiogramme pour déterminer le profil de résistance
- Augmenter le nombre des échantillons.
- Essayer avec d'autres méthodes d'isolement et comparer les résultats.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]- **Lagha,N.(2015).**Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -Lactamine a spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. Thèse de Doctorat: Biologie. Tlemcen : AbouBekr Bel kaid Tlemcen, 84p.
- [2]-**Hallanvuori,S. (2009).**Food born *Yersinia* identification and molecular epidemiology of isolates from human infections : Dissertation académique : chimie appliquée et microbiologie .Finland :université de Helsinki,132p .
- [3]-**Catalogue et Index des Sites Médicaux de langue Français.** <http://www.cha-rouen.fr/page/mesh-descripteur/yersinia-ruckeri> .(Page consultée le 03/03/2019).
- [4]- **Hurst,M,R. et al (2011).***Yersinia entomophaga* sp. Nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*.Microbiology. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61(10), 844-849.
- [5]-**Alexander,S. et al.(1999).**Production of enterotoxin by *Yersinia bercovieri*, a Recently identified *Yersinia enterocolitica*-Like species. American society for microbiology, 97(2), 968-971.
- [6]-**wikipedia.** https://en.m.wikipedia.org/wiki/yersinia_kristensenii. (Page consultée le 19/04/2019).
- [7]-**Toan,N. (2004).** Suivi in vivo et en temps réel du processus infectieux induit par *Yersinia pestis* .thèse de Doctorat : Microbiologie des procaryotes et eucaryotes. Paris : Université Paris Diderot ,95p.
- [8]-**Carniel,E .et al. (2011)** .Centre national de référence de la peste et autres yersiniose : Bilan des activités 2011-2015.19p.
- [9]-**Toora,S (1995).** Partial purification and characterization of bacteriocin from *Yersinia kristensenii*. Journal of Applied Bacteriology , 78(3),224-228
- [10]- **Cristian,C. et al. (2008).** Microbiologie hygiène : Bases microbiologiques de la diététique. France : Lavoisier. 429p.
- [11]-**Bulletin,O.(1980).** Infection intestinale due à *Campylobacter*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigelle*, 58(5) ,691-711.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [12]-**Camille,D. (2007).**Microbiologie pratique pour le laboratoire ; d'analyses ou de contrôle sanitaires Paris : Lavoisier.476 p.
- [13]-**Cristian ,C. et al. (2008).** Microbiologie hygiène : Bases microbiologiques de la diététique. France : Lavoisier. 429p.
- [14]-**Campus De Microbiologie Médicale.** <http://www.microbesedu.org/etudiant/entero.html>
(Page consultée le 25/04/2019).
- [15]-**Cécile,O,E.et al. (2015).**Evolution de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à l'hôpital général de Douala. The Pan African Medical Journal, 20(227).
- [16]-**Prescott. et al. (2010).** Microbiologie. Paris: de Boeck. 1088p.
- [17]-**Madigan,M., Martinko,J. (2007).** Brock biologie des microorganismes 11^{ème} édition: Person Education France, France.1047p.
- [18]- **Jèrome,L. (2014)** .Nouveaux anticorps monoclonaux contre les *Yersinia* pour le diagnostic et l'immunothérapie. Thèse de Doctorat : Microbiologie. Paris : université Paris Sud, 190p.
- [19]-<http://www.bacteriainphotos.com/colonies-of-yersinia-pestis.html>. (Page consultée le 18 /02/2019).
- [20]- **Microbiologie DCEM1 Faculté Lyon Sud» Minifiches bactériologie. *Yersinia pestis*.** <http://spiralconnect.univlyon1.fr/webapp/course/course.html?id=1676778&viewMode=visu&idChapter=167778> (page consultée le 18 /02/2019).
- [21]-<https://pixnio.com/fr/science-fr/microscopie-images/peste-yersinia-perstis/yersiniapestis-petit-gramme-negatif-bacillus>. (Page consultée le 18 /02/2019).
- [22]- **Espace Professionnel Des Biologie Médicale.**
<https://www.microbes-edu.org/professionnel/yer1.html> (page consultée le 20/02/2019).
- [23]- **Futura Santé.** <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medcine-bacille-yersin-7819/> .(page consultée le 20/02/2019).
- [24]-**Wallonie (décembre 2018).** Familles sante handicap, AVIQ La peste.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

<https://www.wiv-isp.be/matra/Fiche/Peste.pdf>. (Page consultée le 18 /02/2019).

[25]-**Bossi,P. et al.** Recommandations Bichat sur la prise en charge clinique des patients présentant une peste liée ou non à un acte de bioterrorisme .Eurosurveillance, 9(12), 1-7.

[26]- **Wikipedia.** http://fr.m.wikipedia.org/wiki/Yersinia_pseudotuberculosis .(Page consultée le 19/02/2019).

[27]- **Gouvernement du Canada.Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents pathogènes-*Yersinia pseudotuberculosis*.** <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-technique-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/yersinia-pseudotuberculosis.html>. (Page consultée le 19/02/2019).

[28]-**Brady,M,F.,Bhimji.S.S.(2019).** *Yersinia pseudotuberculosis*. [En ligne]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430717/>.(Page consultée le 25 /02/2019).

[29]- <https://emedicine.medscape.com/article/226871-overview#a2>. (Page consultée le 20/02/2019).

[30]-**Thomas,M,D.(2010).***Yersinia pseudotuberculosis* www.antimicrobe.org/b265.asp. (Page consultée le 20/02/2019).

[31]- **Glenn, Morris,J.(2019).** Other *Yersinia* species isolated from humans, Infections Disease Advisor.<https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/homme/decision-support-in-medicine/infections-diseases/yersinia-pseudotuberculosis/>. (Page consultée le 22/02/2019)

[32]-**Gouvernement du Canada. Fiche technique santé sécurité : agents pathogènes *Yersinia pseudotuberculosis*.**

<https://www.canada.ca/fr/sante-public/services/biosecurite-biosecurite-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agentspathogenes-evaluation-risques/yersinia-pseudotuberculosis.html>(page consultée le 25/02/2019).

[33]- **MSDSonline.** <https://www.msdsonline.com/resource/sds-resources/free-safety-data-sheet-index/yersinia-enterocolitica>. (Page consultée le 22/02/2019).

[34]- **Cyril,S.,Elisabeth,C. (2008).**Les diarrhées d'origine bactérienne le cas de *Yersinia enterocolitica*.EM.consulte, 38(400), 49-58.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [35]- **Leclercoq, A. (Avril 2006)** .*Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis*
https://umvf.omskosma.ru/infectiologie.com/site/medias/_documents/officiels/afssa/Yersinia090207.pdf. (Page consultée le 27/02/2019).
- [36]-**Yersinia enterocolitica. (2009)**.Transfusion
http://www.researchgate.net/publication/51593581_TransfusionTransmitted_Yersinia_enterocolitica_Sepsis(page consultée le 18/02/2019).
- [37]-**Yersinia (infection entérique). (2016)**
<https://publications.msss.gouv.qc.ca/msss/fichiers/guide-garderie/chap7-yersinia.pdf> (page consultée le 18/02/2019).
- [38]-**Kumar,G. et al (2015)**. *Y. ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in fish ,46,(1),103.
- [39]-**Ewingt,A,J. et al. (1978)**. *Yersinia ruckeri sp.nov* .the Remouth (RM) Bacterium. International Journal of Systematic. Bacteriology ,1(37),
- [40]-**Lucia,F. et al. (2007)**. Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Y. ruckeri*. Veterinary microbiology.125, 1-2.
- [41]-**Furones,D., Munn.C.B (1993)**. *Yersinia ruckeri* the causal agent of enteric red mouth disease ERM in fish. Elsevier, 3,105-125.
- [42]- **NCBI**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1397> (page consultée le 19/04/2019)
- [43]- **Wautters,G.et al.(1988)**. *Yersinia mollaretii sp.nov.* and *Yersinia bercovieri sp.* Nov formerly called *Yersinia enterocolitica* Biogroups 3A and 3B. International Union of Microbiology Societies, 38(4), 424-429.
- [44]- **D-BITE, Yersinia**
https://bioinfo.bisr.res.in/cgi-bin/project/docter/get_details.cgi?organism=yersinia&species=yersinia%20mollaretii. (Page consultée le 19/04/2019)
- [45]- **Liliane,M.et al.(2009)**. Characterization of a typical isolates of *Yersinia intermedia* and definition of two new biotypes.Journal of Clinical Microbiology, 47(8), 2377-2380.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [46]- **Brenner,D,J. et al (1980).***Yersinia intermedia* : A new species of enterobacteriaceae composed of rhamnose- positive, melibiose-positive, raffinose-positive strains(formerly called *Yersinia enterocolitica* or *enterocolitica-like*). Current Microbiology ,4 (4),207-212.
- [47]- **Stock (2003).**Natural antimicrobial susceptibilities and biochemical profiles of *Yersinia enterocolitica* –Like strains: *Y. frederiksenii*,*Y. intermedia*,*Y. kristensenii* and *Y. rohdei*.OXFORD ACADEMIC,38(2), 139-152.
- [48]-**Mary,T,C et al. (1993)** .*Yersinia frederiksenii* infection and colonization in hospital staff.Jornal of hospital infection, 24(2), 109-115.
- [49]- **Hans,J,L et al. (1999).** Identification of *Yersinia* species by the Vitek GNC Card .Jornal of clinialMicrobiology, 37(1), 211-214.
- [50]- **Bercovier,H. et al. (1980).** *Yersinia kristensnii* : A new species of Enterobacteriaceae composed of sucrose. Negative strais (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica-Like*). Cuuent Microbiology ,4(4),219-224.
- [51]- **Bercovier,H.et al. (1984).***Yersinia aldovae*(formerly *Yersnia enterocolitica-Like Groupe X2*) : new species of Enterobactericea Isolated from Aquatic Ecosystems . International Journal of Systematic. Bacteriology, 34(2), 166-172.
- [52]- **NCBI.** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=yersinia%20aldovae> (page consultée le 18/04/2019).
- [53]- **Wikipedia.** https://en.m.wikipedia.org/wiki/yersinia_aldovae , (page consultée le 17/04/2019).
- [54]- **Arnold,G, S. et al. (1987).***Yersinia rohdei sp.nov.*Isolated from human and dog faces and surface water. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 37(4), 327-332.
- [55]- **ATCC.** <https://www.atcc.org/products/all/43871.aspx> . (Page consultée le 15/04/2019)
- [56]- **Hans-JÖrrrg,L. et al. (1999).** Identification of *Yersinia* species by the vitek GNI card. Journal of Clinical Microbiology, 37(1), 211-214.
- [57]- **NCBI.** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1758>. (Page consultée le 18/04/2019).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [58]- **Jonas,B. et al. (2018)**. Occurrence of *Yersinia rohdei* among feral reideer(Gangifert. Tarandus) and kelp gulls (*Larus dominicanus*) on the sub Antarctic island South Georgia. *Journal Infection Ecology & Epidemiology* ,8(1).
- [59]- **Ingo,S. et al.(2002)**.Natural antibiotic sseptibility and biochemical profiles of *Yersinia enterocolitica-like strains* : *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*,*Y. aldovae* and *Y. ruckeri*. *J.Med .Microbiol*, 51, 56-69.
- [60]- **Spraguet,L,D., Neubauer,H .(2005)**.*Yersinia aleksiciae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55 (10), 831-835.
- [61]- **Marhej,V.et al .(2008)**. *Yersinia massiliensis sp. nov* , isolated from fresh water.*International journal of systematic and evolutionary Microbiology* [En ligne], 58.
- [62]- **Matthew,C.et al. (2018)**. First Complete Genome Sequence of *Yersinia massiliensis* .*Genome Announcements*, 6(20).416-418.
- [63]- **Laukkanen,R,N et al. (2011)** .Population structure of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex according to multilocus sequence typing.*EnvironnMicrobiol*,13(12),3114-3127.
- [64]- **Sparague,L,D.et al. (2008)** .*Yersinia silimis sp. nov.* *International of systematic and Evaluatory microbiology*58, 952-958
- [65]- **Lisa,D,S;Heinrich,N.(2014)**. Genome sequence of *Yersinia similis*Y288T a member of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex.*Genome Announcements*, 2(2), 216.
- [66]- **Mark,R.,Mark,H.(2018)**.*Yersinia entomophaga*, a potential new biopesticide for locusts. *INT J SYST EVOL MICR* ,10 .
- [67]- **Nurro,K,L.et al.(2011)**. *Yersinia nurmii sp.nov* .*Internationalof systematic and Evaluatory microbiology* 61, 2368-2372
- [68]- **Europe Nucleotide Archive. Yersinia nurmii**. (Page consultée le 09/04/2019) https://bacteria.ensembl.org/Yersinia_nurmii/Info/Index
- [69]- **Murros, Koutiainen, A. (2011)**. *Yersinia pekkanenii sp.nov*.*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(10), 2363-2367

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [70]- **Savin, C. et al. (2014)**, the *Yersinia pseudotuberculosis* complex: characterization of new species, *Yersinia wautersii*. Int J Med microbiol, 304, 314.
- [71]- LPSN (List of prokaryotic names with standing in nomenclature). www.bacterio.net.yersinia.html (Page consultée le 15/04/2019).
- [72]- **Les diarrhées d'origine bactériennes : le cas de *Yersinia enterocolitica***.
<https://docplager.fr/55983437-les-diarrh-es-d-origine-bactriennes-le-cas-deYersinia-enterocolitica.htm/>. (Page consultée 21-5-2019).
- [73]- **Weissfeld, A. (1980)**. Rapid isolation of *Yersinia enterocolitica* from humans. Journal of clinical microbiology, 9, 712-715.
- [74]- **Pai, C.H. (1997)**. Efficacy of cold enrichment technique for recovery of *Yersinia enterocolitica* from humans. Journal of clinical microbiology, 9, 712-715.
- [75]- **Wauters, J. (1973)**. Diagnostic biologique des infections à *Yersinia enterocolitica*, Med, mal, inf, 4(11), 437-441.
- [76]- **Mehlman, I.J. (1978)**. Problems in recovery and identification of *Yersinia enterocolitica* in food. J. Association of official agricultural chemists, 61, 761-771.
- [77]- **Université Lyon .Milieu hektoen**.
https://www2.aclyon.fr/enseigne/biothech/microbio/Milieu_culture/HEKTOEN.htm. (Page consultée le 21-05-2019).
- [78]- **Microbeonline**. <http://google.com/amp/s/microbeonline.com/macconkey-agar-mac-composition-preparation-uses-and-colony-characteristics/amp/>. (Page consultée le 22-05-2019).
- [79]- **Microbiologie médicale**.
www.microbiologiemedicale.fr/milieuxdisolement/selectifs/gram-/cin.htm. (Page consultée le 22-05-2009).
- [80]- **Dudley, M.V (1997)**. Mesim of isolation of *Yersinia enterocolitica*. Journal of clinical microbiology, 180-183.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[81]-**Aulisio,C,G .et al.(1980)**. Alkali methode for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis* from food.Jornal microbiol.135-140.

[82]- <https://maps.app.goo.gl/ubp37WwJ54B8snLCA>.

[83]-**Boulahlib,S,.Benrahma,M.(2013)**.Caracterisation et etude de lantibioresistance de *Yersini enterocolitica*. Memoir de Master :Microbiologie. Constantine :Université des freres Mentouri,78p.

[84]-**Euzeby,J ,P.(2000)**.*Yersinia enterocolitica* In **Dictionnaire de bacteriologie veterinaire**. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html> .(Page consultée le 16-06-2019).

ANNEXES

Annexe 01:

Eau peptonée (g/l) : pH = 7.2

Peptone de viande	10
Chlorure de sodium	05
Phosphate disodique anhydre	3,5
Dihydrogène phosphate de potassium	1,5

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

Peptone	20
Lactose	10
Sels biliaires	1,5
Cristal violet	0,001
Rouge neutre	0,05
NaCl	05
Agar	15

Solution de KOH à 5% (g/l)

NaCl	05
KOH	05
Eau distillée	99ml

Milieu Gélose Hektoen (g/l) : pH= 7,6

Peptone de viande	12
Extrait de levure	03
Sels biliaires	09
Lactose	12

ANNEXES

Saccharose	12
Salicine	02
Chlorure de sodium	05
Hyposulfite de sodium	05
Citrate de fer ammoniacal	1,5
Bleu de bromothymol	0,064
Fushine acide	0,040
Agar 13,5	13,5
Le milieu CIN (g/l) : pH= 7,4	
Peptone de gélatine	17
Peptone de caséine et de viande	03
Extrait de levure	02
Mannitol	20
Chlorure de sodium	01
Pyruvate de sodium	02
Sulfate de magnésium	0,10
Rouge neutre	0,030
Cristal violet	0,001
Cefsulodine	0,015
Irgasan	0,004
Novobiocine	0,025
Cholate de sodium	0,125
Désoxycholate de sodium	0,5

Agar 13,5

Milieu ITC (g/l) : pH= 7,4

- Milieu de base

Tryptone 10

Extrait de levure 01

Chlorure de magnésium 60

NaCl 05

Vert de malachite 0,2%

- Solution de ticarcilline

Ticarcilline 10mg

Eau 10ml

- Solution alcoolique d'Irgasan

Irgasan 10mg

Ethanol à 95% 10ml

- Solution de chlorate de potassium

Chlorate de potassium 10

Eau 100ml

- Milieu complet

Milieu de base 988ml

Solution de ticarcilline 1ml

Solution d'irgasan 1ml

Solution de chlorate de potassium 10ml

Milieu YM ou milieu YERSINIA (g/l)

ANNEXES

Peptone	12
Hydrolysate de caséine	08
Extrait de levure	02
Lactose	10
NaCl	05
CaCl ₂	0,02
Oxalate de Na	16
Sels biliaires	05
Rouge neutre	0,008
Agar	20
Tween 80	10ml
Milieu CAL: Cellobiose-Arginine-Lysine (g/l)	
Cellobiose	3,5
L-Arginine	6,3
L-Lysine	6,5
Extrait de levure	03
NaCl	05
Désoxycholate de Na	1,5
Rouge neutre	0,03
Eau distillée	1 L

Annexe 02: Les réactifs

Réactif de la recherche d'oxydase :

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

Réactif de Kovacs

Diméthylamino-4-benzaldéhyde07g/l

Alcool isoamylique 75ml

Acide chlorhydrique concentré20ml

Réactif de Voges-Proskauer I et II

VP I

Hydroxyde de Potassium40g/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 sulfamilique0,8g/l

Acide Acétique 5N 100ml

Nitrate réductase II

Naphtylamine0,5g/l

Acide Acétique 5N 100ml

Annexe 03: Les 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: La 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

Le frottis destiné à la coloration est préparé selon le protocole suivant :

- Étalement

Prendre une lame propre, faire un prélèvement du produit à examiner et étaler à couche mince.

- Séchage et fixation

Sécher rapidement en passant la préparation au-dessus de la flamme d'un bec bunsen.

3. Réalisation de la coloration

Le protocole est le suivant

- Recouvrir le frottis de violet de **Gentiane ou cristal violet** ; laisser agir 1min ; rincer à l'eau distillée.
- Verser du **Lugol** et le laisser agir pendant 1min ; rincer à l'eau distillée.
- Décolorer à l'**alcool à 95°** entre 15 et 30 secondes ; rincer à l'eau distillée.
- Recolorer avec la **fuschine** ou la **safranine** pendant 1min ; rincer à l'eau distillée.
- Sécher la lame entre 2 feuilles de papier buvard.

4. Observation microscopique

- Observer au microscope à l'objectif X100 à immersion.

5. Lecture

- Avec cette coloration, les bactéries "Gram-positif" apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries "Gram-négatif" sont colorées en rose.

Annexe 05 : la galerie API 20 E

Principe :

Le système API® BioMérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries.

Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la micro galerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs.

Elle permet l'identification d'une centaine de bacilles à Gram négatif dont les Entérobactéries.

Elle comprend 20 tests biochimiques.

Technique :

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation

Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule de Suspension Medium (ou un tube d'eau distillée stérile)
- Prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé.
- Réaliser une suspension bactérienne faible (opacité 0,5 sur l'échelle Mc Farland)

Inoculation de la galerie

Avec la micro pipette introduire la suspension bactérienne dans les microtubes de la galerie. Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule. Pour les autres tests remplir uniquement les tubes, et pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose, en remplissant leur cupule d'huile de paraffine stérile.

Réhydrater la galerie en ajoutant de l'eau distillée stérile dans le fond de la boîte en plastique, fermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Tableau 10 : Tableau de la lecture de la galerie miniaturisée.

Microtube	Substrat	Caractere recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si necessaire)	Resultat +	Resultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		



Figure 16 : Profil sur API 20E de la souche S3 (*Yersinia enterocolitica*).



Figure 17 : Profil sur API 20E de la souche S6 (*Yersinia enterocolitica*).



Figure 18 : Profil sur API 20E de la souche S8 (*Yersinia enterocolitica*).



Figure 19 : Profil sur API 20E de la souche S1 (*Yersinia frederiksenii*).



Figure 20 : Profil sur API 20E de la souche S2 (*Yersinia frederiksenii*).



Figure 21 : Profil sur API 20E de la souche S7 (*Yersinia enterocolitica*).



Figure 22 : Profil sur API 20E de la souche S10 (*Enterobacter intermedium*).

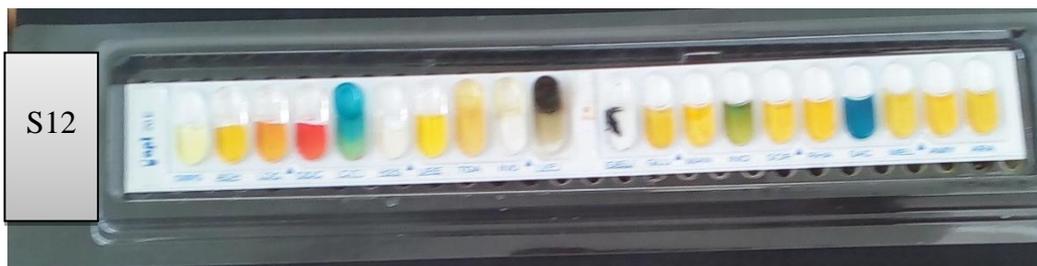


Figure 23 : Profil sur API 20E de la souche S12(*Enterobacter intermedium*).



Figure 24 : Profil sur API 20E de la souche S4 (*Enterobacter sakasaki*).



Figure 25 : Profil sur API 20E de la souche S5 (*Serratia marcescens*).

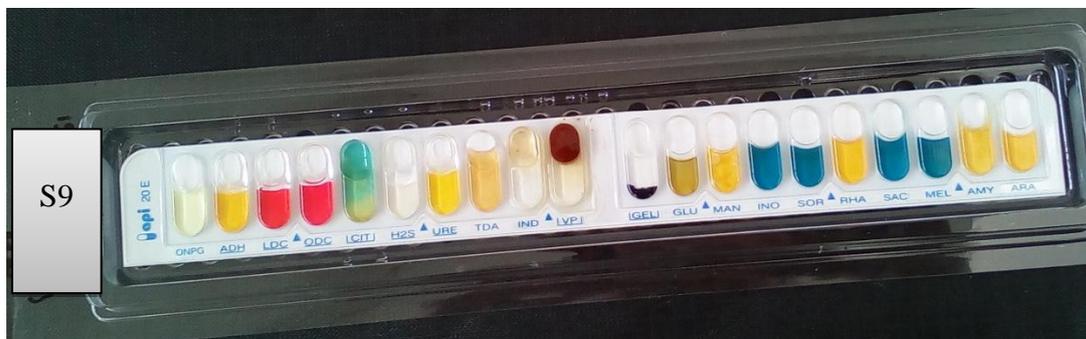


Figure 26 : Profil sur API 20E de la souche S9 (*Hafnia alvei*).

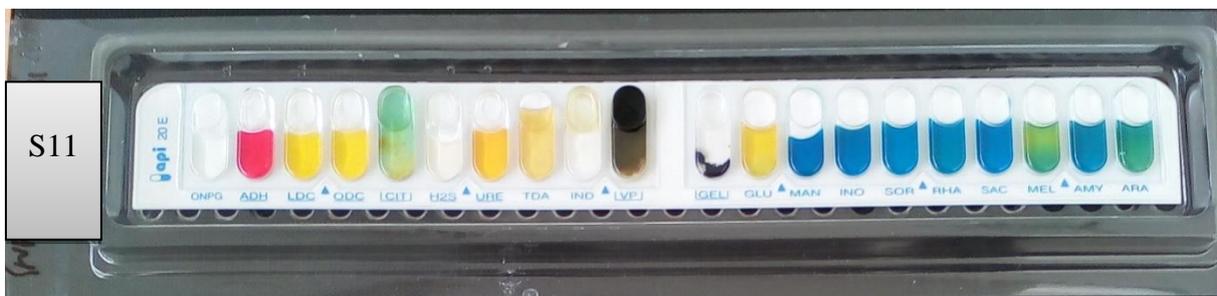


Figure 27 : Profil sur API 20E de la souche S11 (*Aeromonas salmonicida*).

RECHERCHE ET IDENTIFICATION DE *YERSINIA SPP.* AU NIVEAU DES SOLS ET DES EAUX DES LACS DES RÉGIONS DE DJEBEL EL OUAHCH ET D'EL MERIJE

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

Résumé

L'objectif de ce travail est l'isolement et l'identification morphologique et biochimique des espèces de *Yersinia* recherchées. Le genre *Yersinia* appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Il comprend dix-huit espèces, trois d'entre elles sont pathogènes pour l'être humain. Quatre souches de *Yersinia enterocolitica* et deux souches de *Yersinia frederiksenii* ont été isolées durant la période Mars-Juin 2019. Les résultats obtenus montrent que l'enrichissement dans de l'eau péptonée à +4 °C pendant 15 jours suivit du traitement alcalin par KOH à 5% et l'isolement sur milieu Mac Conkey à 30°C pendant 48h, s'est révélé être une méthode efficace pour l'isolement de quelques espèces de *Yersinia* à partir des échantillons environnementaux (eaux et sols des lacs). Ces espèces présentent les caractéristiques suivantes : bacilles à Gram négatif, oxydase -, catalase +, lactose -, glucose +, gaz -, H₂S -, uréase +, indole +, TDA -, réduisent les nitrates en nitrites, RM +, VP -, mannitol +, mobilité - à 37°C, ONPG +, ADH -, ODC + et n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone. Ces résultats nous ont permis de détecter la présence de *Yersinia* dans les lacs et les sols de Djebel El Ouhch et El Meridje.

Les mots clés : le genre *Yersinia*, Enterobacteriaceae, isolement, enrichissement, traitement alcalin, Mac Conkey, espèces de *Yersinia*, échantillons environnementaux.

Mots clés : *Yersinia*, sols et eaux de lacs, Djebel El Ouahch, El Meridje, isolement.

Laboratoire de recherche : laboratoire de microbiologie

Jury d'évaluation :

Président du jury : MERGOUD Lilia (MAA - UFM Constantine),
Rapporteur : BOUZERAIB Latifa (MAA - UFM Constantine),
Examineur : CHABBI Rabah (MAA - UFM Constantine).

Date de soutenance : 10/07/2019