



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2019

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenté par :

MEDDAH Khaoula

Thème

Evaluation du milieu CHROMagar Yersinia enterocolitica.

Soutenu le : 08 / 07 / 2019

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M^r. Remini H.</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M^{me}. Medboua C.</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M^{me}. Benamrouche N.</i>	<i>MCB</i>	<i>Inst. Pasteur</i>	<i>Co-Promoteur</i>
<i>M^{me}. Lezzoum S.</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>

Année Universitaire : 2018/2019

Remerciements

Avant tous je remercie Dieu, Allah tout puissant, de m'avoir donné la force, le courage et la volonté pour la réalisation de ce modeste travail.

Je tiens à remercier le personnel de l'Institut Pasteur d'Alger pour leur accueil chaleureux, et pour m'avoir permis de réaliser ce mémoire.

J'exprime mes sincères reconnaissances à ma Co-promotrice D^r Benamrouche N. chef du laboratoire des Entérobactéries et Autres Bactéries Apparentées au niveau de l'Institut Pasteur d'Alger, pour sa disponibilité quotidienne, ses précieux conseils, pour son aide, ses orientations et ses encouragements

Je remercie vivement ma promotrice D^r Medboua C., qui m'a fait l'honneur d'accepter de diriger ce travail, tout en apportant, les meilleures idées, et pour son aide, ses précieux conseils, ses efforts et ses sacrifices.

J'adresse mes vifs remerciements au D^r Zemam Siham l'assistante du chef de laboratoire pour son temps consacré et son aide dans la réalisation de la partie pratique.

Je tiens aussi à remercier avec une grande admiration l'équipe du laboratoire des Entérobactéries et Autres Bactéries Apparentées M^{me} Belkader, M^{me} Sadat M^{me} Belhadj, pour toutes les informations utiles qu'elles m'ont données.

Je tiens aussi à remercier M^{me} Bourabia et M^{me} Rabia pour son aide.

Mes remerciements vont également à :

M^r Remini H. qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.

M^{me} Lezzoum S. d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Aux D^r Aissat Abdelkrim et à D^r Toumi Wissam, Merci pour votre générosité et pour les bons moments que nous avons partagés ensemble. Je vous remercie pour le soutien et la serviabilité que vous m'avez apporté.

J'adresse mes remerciements au Directeur général de l'Institut Pasteur d'Algérie D^r Harrat Zoubir pour m'avoir accueilli au sein de son établissement.

Aussi à toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'accomplissement et à la réussite de ce mémoire.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A ma famille et spécialement mes parents, mon père Said, ma Mère Ouardia ainsi qu'à ma sœur Ikhlas, mes frères Zakaria et Khalil, pour leur soutien moral et affectif et pour leur encouragement dans tous les projets que j'ai entrepris depuis mon jeune âge. Merci de m'avoir permis de partager de nombreux moments heureux avec vous et de m'avoir épaulée lors d'épreuves les plus difficiles. Mes parents m'ont transmis de belles valeurs, dont la persévérance qui m'a grandement aidée à me rendre jusqu'ici. À travers votre fierté et votre amour, j'ai souvent trouvé la motivation à poursuivre et à me surpasser. Il est difficile de décrire tout ce que vous avez pu m'apporter, mais sachez que j'en suis pleinement reconnaissante.

A mes oncles et tantes et leurs familles, veuillez accepter l'expression de ma profonde gratitude pour votre soutien, encouragement et affection, j'espère que vous trouverez ici le témoignage de mes sentiments sincères et de mes vœux de santé et de bonheur.

A mes cousins, cousines, en témoignage de mon respect et de mon profond attachement, je vous souhaite une longue et heureuse vie.

A mon Doudou, merci pour ta confiance, tes encouragements et ton soutien moral.

A mes meilleurs amies, Zohra, Farah, Fariza, Asma, Nathalie, sabrina, Sanaa, avec lesquels j'ai partagé beaucoup de moments forts tout au long de ce mémoire entre rires et pleures, déprimés et bonheurs.

MEDDAH Khaoula...

SOMMAIRE

Liste des tables

Liste des figures

Liste des abréviations

Glossaire

Introduction.....01

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I-Généralité sur *Yersinia enterocolitica*.....03

I-1- Historique.....03

I-2. Caractères généraux.....03

I-3. Taxonomie et nomenclature.....04

I-4. Habitat, réservoirs et cycle infectieux.....04

I-5. Physiopathologie et facteurs de virulence.....05

I-6. Manifestations cliniques.....07

II -Diagnostic de *Yersinia enterocolitica*.....09

II -1. *Diagnostic bactériologique*09

II -1-1. Enrichissement.....09

II -1-1-1. Enrichissement au froid.....09

II -1-1-2. Enrichissement sélectif.....10

II -1-2. Isolement.....10

II -1-3. Identification.....13

II -1-4. Caractérisation des souches.....14

II-2. *Autres méthodes de détection*.....16

III-Traitements de yersiniose.....17

MATERIELS ET METHODES

I-1. Matériel de laboratoire.....18

I-2. Souches utilisées.....18

II- Méthodes d'études.....	18
II-1. Isolement de <i>Yersinia enterocolitica</i>	18
II-2. Identification macro et microscopique des souches.....	19
II-2.1. Examen macroscopique.....	20
II-2.2. Examen microscopique.....	20
II-3. Identification des souches.....	20
II-3-1. Identification par tests biochimiques.....	20
II-3-2. Sérotypage.....	27
II-4. Test d'évaluation du CHROMagar <i>Yersinia enterocolitica</i>	28

RESULTATS ET DISCUSSION

I-Résultats.....	29
I-1. Aspects culturels.....	29
I-1.1. Examen macroscopique.....	29
I-1.2. Examen microscopique.....	32
I-2. Identification biochimique.....	33
I-3. Sérotypage.....	42
I-4. Evaluation du CHROMagar <i>Yersinia enterocolitica</i>	44
II-Discussion des résultats.....	45
III- Conclusion générale et perspectives.....	50

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Caractères biochimiques à 28°C différenciant <i>Y. enterocolitica</i> des autres espèces de <i>yersinia</i> (tableau modifié à partir de Carniel et Coll., 2006) (Abraham et al., 1997).	14
II	Schéma de biotypage modifié à partir de Wauters et Coll, 1987 (Benoit et al., 1996).	15
III	Association Biotype/Sérotype/ Pathogénicité des souches de <i>Y. enterocolitica</i> isolées chez l'homme (Cyril et Elisabeth, 2008).	15
IV	Résultats de repiquage des souches tests.	31
V	Résultats des repiquages des souches de contrôle de qualité.	32
VI	Résultats de la galerie API 20 E de la souche 09.94.	40
VII	Résultats de la galerie API 20 E de la souche 12.94.	41
VIII	Résultats de la galerie API 20 E de la souche 01.92.	41
IX	Résultats de la galerie API 20 E de la souche 08.92.	42
X	Résultat des agglutinations des souches de <i>Yersinia enterocolitica</i> avec les anti sérum anti-O : 3 et anti-O :9.	43
Tableaux en annexes		
I	Étapes et principe de la coloration de Gram.	
II	Tableau d'identification de la galerie API 20 E.	

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Aspect des colonies de <i>Y. enterocolitica</i> sur milieu CIN après 24h d'incubation à 30°C (Hallanvuo <i>et al.</i> , 2006).	12
02	Colonies de <i>Y. enterocolitica</i> sur CHROMagar <i>Yersinia enterocolitica</i> après 48h d'incubation à 28°C. Notez la croissance à la fois d'un isolat pathogène (Colonies mauves) et d'un isolat non pathogène (Colonies bleu métallique) (John et Perry, 2017).	13
03	Aspect des colonies de <i>Yersinia enterocolitica</i> sur milieu CIN après 24h d'incubation à 30°C.	29
04	Aspect des colonies de <i>Yersinia enterocolitica</i> sur milieu CIN après 48h d'incubation à 30°C.	30
05	Aspect des colonies de <i>Yersinia enterocolitica</i> sur milieu CHROMagar <i>Yersinia enterocolitica</i> après 24h d'incubation à 30°C.	30
06	Aspect des colonies de <i>Yersinia enterocolitica</i> sur milieu CHROMagar <i>Yersinia enterocolitica</i> après 48h d'incubation à 30°C.	31
07	Aspect microscopique (coloration de Gram) de <i>Y. enterocolitica</i> (G ×100).	33
08	Révélation du test d'oxydase.	34
09	Aspect du bouillon nitrate ensemencées par <i>Yersinia enterocolitica</i> après incubation à 25°C et à 37°C et après ajout des 2 réactifs NR1 et NR2.	34
10	Aspect du milieu TSI ensemencées par <i>Yersinia enterocolitica</i> après incubation à 25°C et à 37°C.	35
11	Aspect du milieu Citrate de simmons ensemencées par <i>Yersinia enterocolitica</i> après incubation à 25°C et à 37°C.	35
12	Aspect du milieu mannitol-mobilité ensemencées par <i>Yersinia enterocolitica</i> après incubation à 25°C et à 37°C.	36
13	Aspect du milieu Clark et Lubs ensemencées par <i>Yersinia enterocolitica</i> après incubation à 25°C et à 37°C et après ajout des 2 réactifs VP I et VP II.	37
14	Résultat du test de l'uréase après incubation à 30°C.	37
15	Résultat du test de l'indole après incubation à 30°C et après ajout du réactif de Kovacs.	38
16	Aspect du test de la TDA après incubation à 30°C et après ajout du réactif de TDA.	38
17	Résultat du test d'ONPG après incubation à 25°C et à 37°C.	39
18	Aspect du milieu ODC, LDC, ADH ensemencées par <i>Yersinia enterocolitica</i> après incubation à 25°C et à 37°C.	39
19	Résultat de la galerie API 20 E de la souche 09.94.	40
20	Résultat de la galerie API 20 E de la souche 12.94.	41
21	Résultat de la galerie API 20 E de la souche 01.92.	42
22	Résultat de la galerie API 20 E de la souche 08.92.	42
23	Résultat de sérotypage des souches de <i>Yersinia enterocolitica</i> par les deux antisérum O :3 et le O :9.	44

Liste des abréviations

ADH : Arginine dihydrolase

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ail : Locus d'attachement et d'invasion

AMG : α Méthyl-D-Glucoside

ATCC : American Type Culture Collection

BOS : Bile-Oxalate-Sorbose

CAY : CHROMagar *Yersinia*

CAYe : CHROMagar *Yersinia enterocolitica*

CEL : Cellobiose

CIN : Cefsulodine-Irgasane-Novobiocine

CIT : Citrate de Simmons

DC : Citrate-désoxycholate

ESC : Esculine

FUC : Fucose.

Glu : Glucose

GN : Gélose nutritive

H₂S : Sulfure d'hydrogène

IND : Indol

Inv : Invasine

Ip : Institut pasteur

ITC : Irgasan Ticarcillin Chlorate Broth

KOH : L'hydroxyde de potassium

Lac : Lactose

LDC : Lysine décarboxylase

LPS : Lipopolysaccharides

MAC : MacConkey

MALDI-TOF : Spectrométrie de masse

MEL : Melibiose

MLST : Multilocus sequence typing

MRB : Bouillon Rappaport modifié
MUC : Mucate
NB : Nota bene
nd : Non déterminé.
NR : Nitrate réductase
ODC : Ornithine décarboxylase
ONPG : Ortho-Nitrophenyl- β -galactoside
PBS : Phosphate buffered saline
PCR : Polymerase chain reaction
PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis
pH : Potentiel hydrogène
PI : La protéine
pYV : Plasmid of *Yersinia* virulence
PYZ : Pyrazinamidase
RHA : Rhamnose
SAC : Saccharose
SBS : Sorbose
SBT : Sorbitol
SS : *Salmonella-Shigella*
ST : Entérotoxine thermostable
T80 : Tween estérase
TDA : Tryptophane désaminase
TSI : triple sugar iron
U.S.A. : États-Unis d'Amérique
URE : Uréase
V : variable
VN : Vrais négatifs
VP : Voges-Proskauer
VP : Vrais positifs
VYE : Virulent *Yersinia enterocolitica* agar
Yop : *Yersinia* outer proteins.

Glossaire

- ✚ **Anadémie** : Propagation d'une maladie transmissible par contamination d'une population à partir d'un réservoir animal de germes.
- ✚ **Animaux asymptomatiques** : Animal qui, ne présentant aucun signe de maladie ou rétabli d'une maladie, est susceptible de transmettre une maladie infectieuse soit directement à d'autres animaux ou aux humains, soit indirectement du fait qu'il en porte le vecteur.
- ✚ **Anticorps** : Une molécule biologique impliquée dans l'immunité, capable de réagir en présence d'un antigène.
- ✚ **Antigène** : Substance chimique isolée ou portée par une cellule, un microorganisme, qui provoque une réaction immunitaire accompagnée d'une production d'anticorps.
- ✚ **Coproculture** : Culture en laboratoire, aux fins d'isolement et d'identification des bactéries entéropathogènes dans les selles.
- ✚ **Diarrhée** : Emission d'un nombre important de selle par jour (plus de trois selles par jour) les selles sont généralement liquides.
- ✚ **Mesures hygiéno-diététiques** : Ensemble des mesures, des procédés et des techniques mis en œuvre pour préserver et pour améliorer la santé.
- ✚ **Psychrophile** : Organisme dont la température optimale de croissance est inférieure à 20 °C.
- ✚ **Septicémie** : Infection généralisée due à la présence de germes pathogènes dans le sang.
- ✚ **Sérotype-Sérovar** : Type ou variété de bactérie déterminée par le sérotypage.

Introduction

Yersinia enterocolitica a été identifié en tant que pathogène chez l'homme dès 1939 ; mais il a fallu attendre les années 1970 pour une véritable prise de conscience de l'importance de cette bactérie en pathologie humaine conduisant à des recherches quasi-systématiques au laboratoire (Bourgeois et *al.* 1996).

Les résultats ne se firent pas attendre ; les cas notifiés dans le monde étaient au nombre de 23 en 1966, 642 en 1970, plus de 1 000 en 1972, environ 4 000 en 1974. Dans certains pays *Y. enterocolitica* serait le germe entérique le plus souvent isolé (200 000 cas en 1979 au Danemark, incidence comparable aux Salmonelles en Allemagne Fédérale et dans certaines régions du Canada) (Doyle, 1985).

Au fil des années, les yersiniose se sont affirmées comme des maladies pouvant être transmises par les aliments. Leur émergence récente seraient même liée aux modifications du comportement alimentaire ; l'utilisation large de la réfrigération domestique, la consommation de légumes crus et le développement de la restauration collective sont autant de facteurs probables de cette évolution (Bourgeois et *al.* 1996). Toutefois, l'infection humaine restant sporadique dans les pays industrialisés, son intérêt hygiénique a sensiblement décliné ces dernières années (Fauchère et Avril, 2002). Singulièrement, alors que *Yersinia enterocolitica* est maintenant reconnu comme un agent de toxi-infections alimentaires collectives, l'absence de véritable foyer d'origine alimentaire conduit à considérer les yersiniose plutôt comme des maladies alimentaires mineures (Bourgeois et *al.* 1996).

L'isolement de *Y. enterocolitica* des selles est fastidieux, car il est souvent masqué par d'autres *entérobactériaceae*. Des milieux partiellement sélectifs contenant des cocktails antimicrobiens ont été proposés pour faciliter la récupération de *Y. enterocolitica* à partir d'échantillons fécaux, et la gélose sélective à la cefsulodine-irgasane-novobiocine (CIN) développée par Schiemann il y a 40 ans (Schiemann, 1979) est toujours la plus utilisée par les microbiologistes médicaux à cette fin. Cependant, l'observation de la morphologie de la colonie ne permet pas de distinguer entre pathogène et non pathogène (Fukushima et *al.*, 2011). En vue de sélectionner des colonies virulentes de *Y. enterocolitica*, Fukushima (Fukushima, 1987) et Jiang et *al.* (Jiang et *al.*, 2000) ont développé une gélose Virulent *Yersinia enterocolitica* agar (VYE) en ajoutant de l'esculine et du citrate ferrique à la CIN. Cependant, ils ont été constatés que les produits noirs d'hydrolyse de l'esculine produits par des colonies autres que *Yersinia* se

diffusaient dans le milieu et masquaient des colonies potentiellement virulentes de *Y. enterocolitica* négatives pour l'esculine (Weagant, 2008).

CHROMagar *Yersinia enterocolitica* est un nouveau milieu chromogénique récemment mis au point pour l'isolement et l'identification présomptive des biotypes entérovirulents de *Y. enterocolitica* (Renaud et al., 2012). Ces dernières sont colorées en mauve après 48 h d'incubation à 28 ° C, tandis que les souches non pathogènes de l'espèce et des isolats occasionnels d'autres *Enterobacteriaceae* poussent sous forme de colonies bleu métallique après aussi peu que 24 h d'incubation à la même température (Renaud et al., 2013 ; Nguyen et al., 2016).

Dans la présente étude, nous avons évalué la performance du CHROMagar *Yersinia enterocolitica* par rapport au milieu de référence CIN pour la détection systématique de *Y. enterocolitica* pathogène. Ce travail a été déroulé au laboratoire des Entérobactéries et Autres Bactéries Apparentées de l'Institut Pasteur d'Algérie. Ainsi, ce manuscrit s'articule autour de trois parties présentées comme suit :

- ✓ La première partie portera sur la revue de la littérature concernant *Yersinia enterocolitica*, la culture de *Yersinia*, le milieu CIN et sur le CHROMagar *Yersinia enterocolitica*.
- ✓ La deuxième partie présentera le matériel et les méthodes expérimentales utilisés.
- ✓ La troisième partie sera consacrée à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent. Nous terminerons ce travail par une conclusion et des perspectives de recherche à venir.

Revue bibliographique

I- Généralité sur *Yersinia enterocolitica*

I-1. Historique

Yersinia enterocolitica fut décrite pour la première fois en 1934 aux États-Unis par McIver et Pike comme une probable nouvelle espèce sous le nom de *Flavobacterium pseudomallei* Whitmore (Bottone, 1997). En 1939 et à partir de cette isolat, Schleifstein et Coleman décrivent cette bactérie comme proche de *Pasteurella pseudotuberculosis* (l'ancien nom de *Y. pseudotuberculosis*) et ils la nommèrent dès 1943 *Bacterium enterocoliticum* (Schleifstein et Coleman, 1939 ; Schleifstein et Coleman, 1943). Elle fut également isolée en Europe une dizaine d'années après. De nombreux noms lui furent attribués : *Pasteurella pseudotuberculosis* type b, *Pasteurella X*, *Pasteurella Y*, Germe X et enfin *Yersinia enterocolitica* en 1964 (Frederiksen, 1964). Il est apparu plus tard que de nombreuses espèces apparentées à *Y. enterocolitica* étaient des espèces de *Yersinia* environnementales différentes et non pathogènes. On retrouva la bactérie chez de nombreuses espèces animales mais très peu de cas humains furent reportés jusqu'à la fin des années 60, date à partir de laquelle ce nombre augmenta de façon spectaculaire. En 1976, survient une première anadémie dans cinq écoles de l'État de New York. Après avoir consommé du lait chocolaté, 222 enfants et employés tombèrent malades. Cette anadémie conduisit à une véritable prise de conscience de l'importance de cette bactérie en pathologie humaine (Bottone, 1999).

I-2. Caractères généraux

Le genre *Yersinia* regroupe des bacilles droits, parfois cocco-bacillaires, à Gram négatif, avec une tendance à la coloration bipolaire (Avril et *al.* 1992), *Y. enterocolitica* est une petite bactérie (1.3 à 3.5 µm) aéro-anaérobie facultative dont la morphologie va d'un petit coccobacille aux extrémités arrondies à un bacille plus allongé, à 25°C, elle possède une ciliature péritriche (2 à 15 flagelles) qui la rend mobile, tandis qu'à 37°C elle ne possède pas ou peu de flagelles et elle est immobile, non capsulés et non sporulés (Bottone, 1977).

Y. enterocolitica présentent les caractères généraux des *Enterobacteriaceae* auquel le genre appartient avec cependant des particularités comme l'expression de caractères phénotypiques dépendant de la température (Avril et *al.* 1992 ; François et *al.* 2011), elle fermente le glucose sans production de gaz, ne possède pas de d'oxydase et réduit les nitrates en nitrites (sauf le biotype 5). En présence de sels biliaires, les colonies ne fermentent pas le

lactose. Les caractères d'orientation rapide pour *Y. enterocolitica* sont : Uréase + très rapide, Citrate -, ODC +, TDA - (François et al. 2011).

I-3. Taxonomie et nomenclature

Le genre *Yersinia* est constitué de plusieurs espèces qui peuvent être séparées en deux groupes ; d'une part les espèces virulentes : *Y. pestis* (bacille de Yersin), *Y. pseudotuberculosis* (bacille de Malassez et Vignal) et *Y. enterocolitica* (sérogroupes 0:3, 0:8, 0:9 et 0:5,7) ; et d'autre part les espèces non virulentes pour l'homme : *Y. enterocolitica* des autres sérogroupes, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. aldovae*, *Y. ruckeri*, pathogène pour les poissons. Deux nouvelles espèces, *Y. mollaretii* et *Y. bercovieri* ont été récemment décrites. *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis* sont deux espèces très proches sur le plan génétique (homologie d'hybridation ADN-ADN très élevée) et pourraient être deux variants pathogènes d'une même espèce (Avril et al. 1992).

Selon le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, l'espèce *Yersinia enterocolitica* est rattaché au règne *Bacteria*, division des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, ordre des *Enterobacteriales* et à la famille des *Enterobacteriaceae* (Bergey's manual, 2007).

I-4. Habitat, réservoirs et cycle infectieux

Yersinia enterocolitica possède une distribution et un réservoir beaucoup plus vastes. De plus l'hétérogénéité qui sera décrite sur le plan biochimique existe également au point de vue épidémiologique (Avril et al. 1992). Elle est largement répandue dans le sol, les eaux, les végétaux, dans les produits alimentaires et en particulier dans les volailles et produits à base de viandes de volailles (Guiraud, 2012 ; Guiraud et Philippe, 2004). Il existe des souches adaptées à un environnement ou à un hôte (homme ou animal) et des souches non adaptées rencontrées dans le sol, l'eau, le tube digestif des micromammifères (Avril et al., 2000).

Y. enterocolitica a été isolée chez une grande variété d'animaux symptomatiques et asymptomatiques. On retrouve des animaux domestiques, des animaux d'élevage, des animaux de parcs zoologiques, et des animaux sauvages (Carniel et al., 2006).

L'espèce *Y. enterocolitica* est un groupe hétérogène de souches (Galindo et al., 2011).

Les caractéristiques biochimiques et génétiques permettent la classification des souches de *Y. enterocolitica* dans 6 biotypes (1 A, 1 B, 2, 3, 4, 5) (Bottone, 1997), plus de 75 sérotypes (Savin et al., 2003) et (2) subsp (*Y. enterocolitica* subsp *enterocolitica* et subsp. *paleartica*)

(Neubauer et *al.*, 2000). Les biotypes peuvent être différenciés selon leur degré de pathogénicité : le biotype 1A est considéré comme non pathogène, les biotypes 2, 3, 4 et 5 comme faiblement pathogènes et le biotype 1B comme très pathogène. Il existe de nombreux sérotypes mais seulement onze ont été associés à des cas humains et la majorité le sont seulement avec quatre sérotypes : O:3, O:5, 27, O:8 et O:9. Il existe une corrélation entre le biotype et la répartition géographique des souches isolées chez l'homme (Bottone, 1999). Les souches du biotype 1A sont très fréquemment retrouvées dans l'environnement. Il est même le biotype retrouvé de façon prédominante dans les échantillons de fèces (Fredriksson-Ahomaa et *al.*, 2012). Ce biotype n'a jamais été associé avec des cas cliniques humains (Sihvonen et *al.*, 2012). Les *Y. enterocolitica* pathogènes du biosérototype 4/O:3 sont les plus fréquentes et sont retrouvées dans le monde entier, suivies par les souches du biosérototype 2/O:9 (Carniel et *al.*, 2006). Ces deux souches sont plus souvent associées à des cas sporadiques ou des anadémies limitées à un cercle restreint (Moriki et *al.*, 2010). Les *Y. enterocolitica* du biotype 1B sont présentes dans l'environnement, notamment l'eau, et chez le porc (Ackers et *al.*, 2000).

Après ingestion d'aliments souillés par les *Yersinia* entéropathogènes, les animaux contaminés deviennent le plus souvent porteurs chroniques, L'homme s'infecte par voie orale, soit en consommant des aliments souillés ou de l'eau contaminée, soit par contact avec des animaux domestiques ou sauvages porteurs du bacille, soit par transmission interhumaine manuportée depuis un individu malade ou porteur asymptomatique (Guinet et *al.*, 2011), la dose infectante est d'environ 10^5 - 10^6 bactéries (Guiraud, 2012). Après transit dans le tractus digestif où les bactéries exercent leur pouvoir pathogène, elles se retrouvent dans les fèces et peuvent servir de source de contamination pour un nouvel hôte ou l'environnement. Une transmission nosocomiale ou par des produits sanguins infectés existe mais elle est très rare (Guinet et *al.*, 2011).

I-5. Physiopathologie et Facteurs de virulence

Les *Yersinia* pathogènes possèdent en commun plusieurs facteurs de virulence.

Y. enterocolitica fut la première espèce pour laquelle les capacités invasives ont été rattachées à la présence d'un plasmide, mécanisme maintenant commun aux *Shigella*, *Salmonella* et aux souches entéro-invasives d'*E. coli*. Un plasmide de virulence (pYV) de 70 kb est présent dans les souches pathogènes. Plusieurs gènes plasmidiques codent des protéines de la membrane externe (Yop) dont l'antigène V ou W ; la synthèse de ces protéines est réalisée à 37°C en absence d'ions calcium, mais pas ou peu à 28°C. Ces protéines permettraient de résister à la

phagocytose. La protéine PI, produite indépendamment des ions calcium est constituée de sous-unités recouvrant, sous forme de fibrilles, la surface des bactéries. Codée par pYV, cette protéine serait le support de l'adhésion et protégerait la bactérie de l'action bactéricide du sérum. Deux gènes chromosomiques responsables de l'invasion ont été identifiés. L'un nommé *inv*, présent chez *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* code une protéine de 103 kDa ou "invasine", produite à 28°C, présente à la surface de la bactérie et dans la membrane externe. L'autre gène chromosomique d'invasion est le gène *ail* (locus d'attachement et d'invasion) qui code une protéine de 17 kDa produite à 37°C. Seules les souches pathogènes possèdent *ail* alors que le gène *inv* est présent mais non fonctionnel chez les souches non pathogènes (de l'environnement) de *Y. enterocolitica*. Les souches très virulentes, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* 0:8, possèdent des protéines de haut poids moléculaire (190 kDa) synthétisées dans un milieu carence en fer. Le gène est absent chez les autres espèces et chez *Y. enterocolitica* 0:3 et 0:9. *Y. enterocolitica* produit à 28°C une entérotoxine aux propriétés identiques à celles de l'entérotoxine thermostable (ST) de *E. coli* (Avril et al. 1992). Des études suggèrent qu'en présence d'urée, les *Yersinia* entéropathogènes sont capables de survivre plus de 90 minutes à un pH inférieur à 2 (Carniel et al., 2006). L'uréase, par les altérations de la muqueuse produites par l'ammoniaque libéré à partir du contenu intestinal, participerait à la colonisation bactérienne. *Y. enterocolitica* possède naturellement deux gènes chromosomiques codant des bêta-lactamases appelées enzymes A (pénicillinase constitutive) et B (céphalosporinase inductible) (Pham et al., 2000 ; Bonke et al., 2011). Code pour la résistance à l'amoxicilline et à la ticarcilline, sensibilité intermédiaire à l'amoxicilline-clavulanate et au céfaclor, sensibilité intermédiaire ou résistance à la céfazoline (Pham et al., 2000). De nombreux facteurs vont donc participer à la virulence de *Y. enterocolitica* (Avril et al. 1992).

Les formes systémiques sont dues à la translocation des bactéries présentes dans la lumière intestinale vers les organes profonds (foie, rate), sans transiter par les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques (Barnes et al., 2006). La bactérie provoque une diarrhée selon un mécanisme entéro-invasif. La porte d'entrée se situe sur l'iléon terminal et le caecum au niveau desquels sont observées les principales lésions sous forme de zones inflammatoires et d'ulcérations dans la zone des plaques de Peyer. Les bactéries ont une multiplication intracellulaire dans les cellules de la muqueuse formant des granulomes inflammatoires et des micro-abcès qui évoluent vers la nécrose entraînant ulcérations et hémorragies. Les ganglions mésentériques sont aussi le siège d'une multiplication bactérienne dans les cellules

mononuclées avec formation de granulomes inflammatoires ; l'adénite mésentérique peut parfois présenter un aspect pseudotumoral (Avril et *al.* 1992).

I-6. Manifestations cliniques

La période d'incubation des infections à *Yersinia* entéropathogène varie de 1 à 11 jours et la durée des symptômes varie de 3 à 28 jours. Les infections à *Y. enterocolitica* peuvent provoquer deux formes cliniques différentes. La forme digestive, décrite comme une entérite aiguë, touche surtout les jeunes enfants. Elle est accompagnée des différents symptômes suivants : principalement la diarrhée et parfois des douleurs abdominales, fièvre, ténésme et vomissements (Rosner et *al.*, 2013). Il faut noter que la diarrhée est le plus souvent retrouvée chez les enfants âgés de moins de cinq ans et peuvent persister durant quatorze jours alors que les douleurs abdominales sont plus prépondérantes après cet âge (Marks et *al.*, 1980). D'autres symptômes, tels que les maux de tête, la fatigue, présence de sang dans les selles ou nausées, peuvent se produire moins fréquemment. L'infection est le plus souvent modérée et résolutive spontanément. La forme extra-digestive correspond à des formes graves avec localisations profondes et/ou dissémination systémique (septicémie), elle engage souvent le pronostic vital. La présence *Y. enterocolitica* a déjà été associée avec des anévrismes mycotiques et des endocardites (Brouqui et Raoult, 2001). Dans les cas d'infections de longue durée, une altération importante de l'état général est parfois observée. Ces infections sévères et invasives à l'issue parfois fatale sont retrouvées plus fréquemment chez les personnes âgées et chez certains sujets malades présentant une surcharge en fer (thalassémie, hémochromatose...), présentant une immunodéficience, sous traitement d'hémodialyse, souffrant de maladies hépatiques ou souffrant de diabète (Carniel et *al.*, 2006). Les douleurs abdominales peuvent être localisées au niveau de la fosse iliaque droite et peuvent évoquer une appendicite (syndrome pseudo appendiculaire) (Rosner et *al.*, 2013).

Les *Yersinia* entéropathogènes peuvent fréquemment causer de graves complications secondaires telles que la polyarthrite réactionnelle et l'érythème noueux (Kaasch et *al.*, 2012). La polyarthrite réactionnelle est une complication auto-immune secondaire qui touche les grosses articulations. Elle peut survenir 1 à 2 semaines à la suite de la forme digestive et peut durer de 1 à 4 mois (Sieper et *al.*, 1996). L'érythème noueux est une hypodermite qui survient 2 à 30 jours après le début des signes cliniques. Il prédomine au niveau des membres inférieurs et s'accompagne parfois d'une fièvre. D'autres manifestations comme le syndrome de Fiessenger-Leroy-Reiter, la glomérulonéphrite ou la myocardite peuvent être considérées

comme des complications secondaires à une infection aux *Yersinia* entéropathogènes. *Y. enterocolitica* est une des bactéries les plus fréquemment responsables du choc septique post-transfusionnel.

Cette forme rare mais gravissime d'infection peut arriver à cause de la capacité des *Yersinia* à se multiplier à basse température. En effet, des bactéries circulant de façon transitoire dans le sang d'un donneur asymptomatique peuvent être prélevées et se multiplier dans les concentrés globulaires au cours de leur stockage au froid (Carniel et *al.*, 2006). Lors de la transfusion, une dose massive de bactéries est alors injectée directement par voie intraveineuse chez le receveur. Le choc septique qui en résulte est très fréquemment mortel (Guinet et *al.*, 2011)

Le diagnostic clinique d'une infection à *Yersinia* entéropathogènes repose généralement sur un diagnostic bactériologique avec l'isolement et l'identification de la bactérie responsable. Il n'existe pas de procédure unique permettant de détecter toutes les souches pathogènes. C'est une caractérisation plus poussée par biotypage ou sérotypage qui permet ensuite de déterminer s'il s'agit ou non de souches pathogènes. D'autres tests, comme le diagnostic moléculaire par la recherche de gènes cibles ou le diagnostic sérologique peuvent être utiles quand la bactérie n'a pu être isolée. Les méthodes d'isolement dépendent de la source du prélèvement. Il est généralement plus difficile de trouver des isolats pathogènes dans des échantillons alimentaires ou de l'environnement que d'en trouver dans les selles de patients infectés. En effet, *Y. enterocolitica* est souvent le microorganisme dominant lors de gastro-entérite aiguë ou d'abcès dus à *Y. enterocolitica* (Ahvonen, 1972).

II -1. Diagnostic bactériologique

L'isolement direct, même sur milieu sélectif, est rarement concluant et les étapes d'enrichissement sont nécessaires (Fredriksson-Ahoomaa, 2001). Aucune procédure unique qui détecterait tous les sérotypes pathogènes n'est actuellement disponible (De Boer, 1992).

II -1-1. Enrichissement

Les espèces du genre de *Yersinia* ont un temps de dédoublement plus lent que celui des autres entérobactéries. Leur isolement à partir d'un échantillon biologique contenant de nombreux autres germes commensaux, comme c'est le cas des selles, est de ce fait difficile (Cyril et Elisabeth, 2008).

Pour augmenter les chances d'isolement de souches de *Yersinia* dans ces échantillons, un enrichissement sur milieu liquide est toujours préconisé avant l'isolement sur milieu solide (De Boer, 1992).

II -1-1-1. Enrichissement au froid

La croissance possible des *Yersinia* à +4°C permet l'utilisation d'enrichissement au froid pour augmenter la proportion de *Yersinia* dans l'échantillon (Savin *et al.*, 2012).

En 1975 Eiss a proposé un enrichissement dans différentes solutions à 4°C pendant des périodes prolongées (Letellier *et al.*, 1999). Cet enrichissement consiste à resuspendre l'échantillon dans du PBS (Phosphate buffered saline) pH 7,6 et à l'incuber à 4°C pendant 1 à 3 semaines. Il est possible d'y associer une étape d'alcalinisation au KOH afin de réduire encore la flore commensale (Carniel *et al.*, 2006).

L'inconvénient majeur de l'enrichissement à froid est la longue période d'incubation, en général 21 jours, Doyle et Hugdahl (1983) ont montré que l'incubation dans une solution de PBS pendant 1 à 3 jours à 25°C était aussi efficace que l'enrichissement à 4°C pendant plusieurs semaines. Il s'ajoute la présence d'autres bactéries psychrotrophes dans les denrées, notamment les espèces apparentées, qui se multiplient aussi pendant l'enrichissement (Leclercq, 2003). On peut réduire la flore secondaire en traitant les enrichissements au froid avec de l'hydroxyde de potassium (KOH), et faciliter ainsi la sélection des colonies de *Yersinia* (Schiemann, 1983). Ce traitement alcalin a été développé par Aulisio *et al.* (1980) après avoir observé que les *Yersinia spp.* étaient beaucoup plus tolérantes aux solutions alcalines que la plupart des bactéries à Gram négatif (Aulisio *et al.*, 1980).

II -1-1-2. Enrichissement sélectif

Plusieurs milieux sélectifs pour l'isolement de *Y. enterocolitica* ont été développés (Wauters, 1973 ; Schiemann, 1982 ; Wauters *et al.*, 1988), associant différents agents antimicrobiens. Incubés à des températures plus élevées (Fredriksson-Ahomaa et Korkeala, 2003). Wauters (1973) a formulé un bouillon Rappaport modifié (MRB) contenant du chlorure de magnésium, du vert de malachite et de la carbénicilline, dans lequel l'échantillon est incubé à 25°C pendant 2 à 4 jours (Wauters, 1973).

Plus tard, Wauters *et al.* (1988) ont développé un nouveau bouillon d'enrichissement (ITC), dérivé du Rappaport modifié, supplémenté en irgasan, en ticarcilline et en chlorate de potassium. L'irgasanTM est un antiseptique (nom générique : triclosan) actif sur les champignons et les bactéries à Gram positif. La ticarcilline, comme la carbénicilline, est une pénicilline à large spectre (Leclercq, 2003). Ces deux milieux se sont avérés efficaces pour les souches de biosérotype 4/O:3 mais inhibiteurs pour les souches de biosérotype 2/O:5,27 et 1B/O:8 (Wauters *et al.*, 1988). Schiemann (1982) a développé un milieu d'enrichissement sélectif Bile-Oxalate-Sorbose (BOS), qui permet un enrichissement efficace des souches de biotype 1B (Fredriksson-Ahomaa et Korkeala, 2003). Un ensemble de chercheurs ont modifié l'ITC pour mieux récupérer les souches 2/O:9 en diminuant la concentration en chlorure de potassium et en vert de Malachite, le bouillon ITC incubé 2 à 4 jours à 24°C (Fredriksson-Ahomaa et Korkeala, 2003 ; Carniel *et al.*, 2006).

II -1-2. Isolement

Du fait de leur croissance plus lente que celle des autres entérobactéries, la détection de colonies de *Y. enterocolitica* parmi de nombreux autres micro-organismes présents dans les selles est souvent difficile (Bottone, 1997). De plus, aucune procédure ne permet d'isoler efficacement tous les biotypes pathogènes de *Y. enterocolitica* (De Boer, 1992).

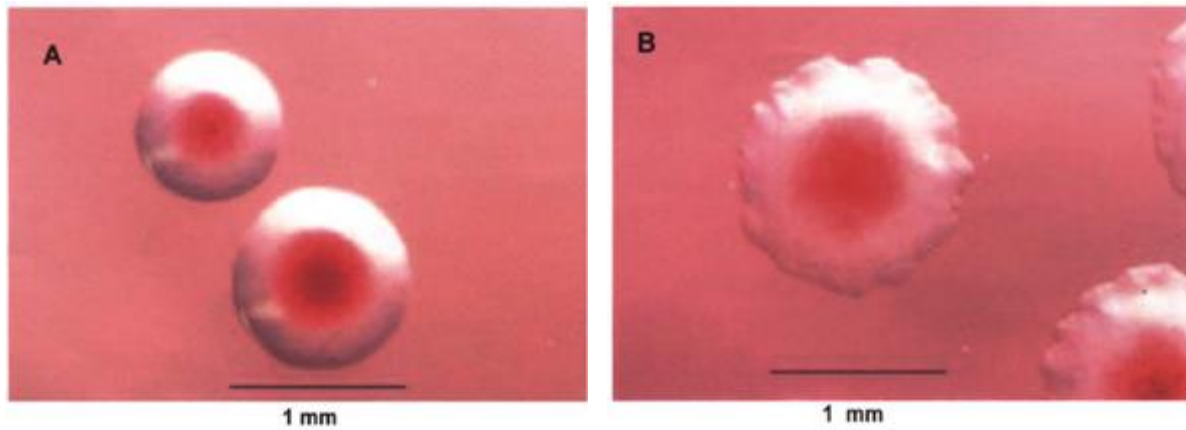
Plusieurs géloses sélectives ont été utilisées pour isoler *Y. enterocolitica*. Au début, ont été utilisés des milieux développés pour d'autres entéropathogènes, tels que les géloses MacConkey (MAC), citrate-désoxycholate (DC) et *Salmonella-Shigella* (SS). Sur ces milieux, les souches de *Y. enterocolitica* poussent bien mais lentement et sont facilement envahies par d'autres bactéries entériques du fait de la faible sélectivité (Niléhn, 1969).

Schiemann (1979) a développé un milieu Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) pour l'isolement de *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*. À la gélose de base est additionnée

de la cefsulodine, de l'irgasan et de la novobiocine (François et *al.* 2011). Plusieurs études comparatives ont montré que cette gélose CIN était le milieu le plus sélectif pour *Yersinia spp.* (Schiemann, 1983). Les microorganismes capables de fermenter le mannitol, comme *Yersinia*, produisent sur gélose CIN des colonies typiques de 24 heures dites « en oeil de bison ». Leclercq (2003) en fait la description suivante : « Ces colonies sont très petites (0,5 à 1 mm) par rapport aux souches non *Yersinia*, lisses, à centre rouge sombre en cocarde, occupant la moitié de la colonie, avec un pourtour dégradé du rosâtre à l'incolore. En dessous des colonies bien isolées, la gélose n'est pas décolorée en jaune (Figure 01). Après 48h d'incubation, les colonies sont plus grandes et la couleur rouge du centre devient diffuse (Carniel et *al.*, 2006 ; Hallanvuori et *al.*, 2006). A la loupe binoculaire, ce centre rouge foncé apparaît constitué de petits granules de « précipités » rosâtres. Le pourtour de ce centre ne comporte pas ces granules d'où sa translucidité. Sous une certaine inclinaison de la boîte de Pétri, la colonie reflète la lumière car elle est convexe (dôme) et lisse. Le pourtour de la colonie est net et bien rond en général (Devenish et Schiemann, 1981).

Malheureusement le milieu CIN ne permet pas de distinguer les isolats de *Y. enterocolitica* pathogènes et non pathogènes, ce qui nécessite la caractérisation des propriétés biochimiques associées à la virulence (c'est-à-dire l'hydrolyse de l'esculine et l'activité de la pyrazinamidase, caractéristiques du biovar 1A (Kandolo et Wauters, 1985), ou la détection par la PCR de protéines codées par le pYV (Fukushima et *al.*, 2011).

Cependant, il est même plus difficile d'isoler *Y. pseudotuberculosis* sur le milieu CIN en raison de la présence de cefsulodine et de son incapacité à distinguer les autres bactéries qui fermentent le mannitol (Tan et *al.*, 2014).



A- Colonies du *Y. enterocolitica* Biotype 4

B- Colonies du *Y. enterocolitica* du Biotype 2 ou 3 (sérotipe O : 5.27).

Figure 01 : Aspect des colonies de *Y. enterocolitica* sur milieu CIN après 24h d'incubation à 30°C (Hallanvuori et al., 2006).

Les milieux de culture incorporant des substrats enzymatiques liés à des chromophores d'indole (Manafi, 2000) thermostables et solubles dans l'eau sont de plus en plus utilisés dans les laboratoires cliniques. Le clivage du substrat par des enzymes spécifiques dans le microorganisme cible libère le chromophore et colore ainsi les colonies microbiennes en croissance. Par conséquent, l'utilisation d'agar chromogéniques peut éliminer le besoin de sous-cultures et peut permettre l'identification présomptive d'un microorganisme choisi. Cette approche raccourcit le délai d'exécution du diagnostic microbien, réduit la charge de travail analytique et génère des économies de coûts par rapport aux méthodes classiques d'isolement et d'identification des agents pathogènes bactériens (Renaud et al., 2013).

Récemment, Un nouveau milieu chromogénique, CHROMagar *Yersinia*, s'est avéré utile pour l'identification des pathogènes de *Y. enterocolitica* (Renaud et al., 2013), après 48h d'incubation à 28°C (température optimale de la croissance), les colonies pathogènes ou non pathogènes, ou les isolats occasionnels d'autres *Enterobacteriaceae* peuvent être distingués par leurs couleurs (Nguyen et al., 2016).

Les colonies pathogènes de *Y. enterocolitica* apparaissent mauve, tandis que les *Y. enterocolitica* non pathogènes et les autres espèces de *Yersinia* ont une couleur bleu métallique dans les mêmes conditions (Figure 02) (Nguyen et al., 2016).

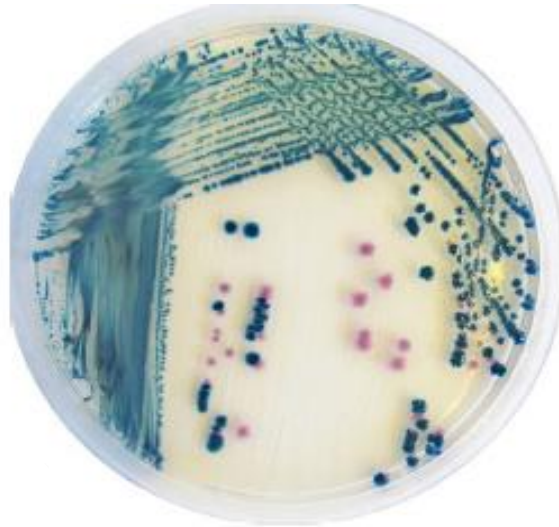


Figure 02 : Colonies de *Y. enterocolitica* sur CHROMagar *Yersinia enterocolitica* après 48h d'incubation à 28°C. Notez la croissance à la fois d'un isolat pathogène (Colonies mauves) et d'un isolat non pathogène (Colonies bleu métallique) (John et Perry, 2017).

II -1-3. Identification

Devenish et Schiemann (1981) ont déterminé le nombre minimum de tests biochimiques à réaliser pour identifier *Yersinia* parmi les bactéries qui poussent sur gélose CIN et présentent une morphologie de colonie similaire. Deux tests suffisent : le test de Kligler et le test à l'urée de Christensen. *Y. enterocolitica* peut être identifiée avec des tests biochimiques comme la fermentation du saccharose, du rhamnose et du mélibiose (Schiemann, 1989).

Les principaux caractères biochimiques permettant de différencier *Yersinia enterocolitica* des autres espèces du genre *Yersinia* sont donnés dans le tableau I.

Des tests commerciaux d'identification rapide constituent des alternatives fonctionnelles aux traditionnels tubes à essai (Linde *et al.*, 1999). Les galeries, telles que les galeries Api 20E ou IDE 32E (BioMérieux, Marcy-L'Etoile). Cependant pour une identification fiable (taux d'identification correcte de 93 % pour la galerie AP120E), les galeries doivent être incubées à 28°C et non à 37°C (Fredriksson-Ahomaa et Korkeala, 2003).

Tableau I : Caractères biochimique à 28°C différenciant *Y. enterocolitica* des autres espèces de *Yersinia* (tableau modifié à partir de Carniel et Coll., 2006) (Abraham et al., 1997).

	LDC	URE	ODC	PYZ	IND	VP	CIT	MUC	T80	ESC	SAC	RHA	MEL	AMG	CEL	SBT	SBS	FUC
<i>Y. enterocolitica</i>	-	+	+	V	V	+/-	-	-	V	V	+	-	-	-	+	+/-	V	V
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	-	+	-	-	-	-	-/(+)	-	-	+	-	+	+/-	-	-	-	-	-
<i>Y. pestis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	V	-	-	-	-	nd
<i>Y. intermedia</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>Y. frederiksenii</i>	-	+	+	+	+	+/-	+/-	+	V	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Y. kristensenii</i>	-	+	+	+	V	-	-	V	V	V	-	-	-	-	+	+	+	V
<i>Y. rohdei</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	V	-	+	+	nd	nd
<i>Y. aldovae</i>	-	+	+	+	-	+	+	V	V	-	-	+	-	-	-	V	-	V
<i>Y. bercovieri</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	-	V	+	-	-	-	+	+	-	+
<i>Y. mollaretii</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	-	V	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>Y. ruckeri</i>	+	-	+	Nd	-	-	-	-	Nd	Nd	-	-	-	-	-	-	nd	nd
<i>Y. aleksiciae</i>	+	+	+	+	V	-	-	V	V	V	-	-	-	-	+	+	+	V

LDC : Lysine décarboxylase, **URE** : Uréase, **ODC** : Ornithine décarboxylase, **PYZ** : Pyrazinamidase, **IND** : Indol, **VP** : Voges-Proskauer **CIT** : Citrate de Simmons, **MUC** : Mucate, **T80** : Tween estérase, **ESC** : Esculine, Formation d'acide a partir de **SAC** : Saccharose, **RHA** : rhamnose, **MEL** : Melibiose, **AMG** : α méthyl-D-glucoside, **CEL** : Cellobiose, **SBT** : Sorbitol, **SBS** : Sorbose, **FUC** : Fucose. += Positif, - = Négatif, +/- = la plupart des souches positives, -/+ = la plupart des souches négatives, **V**= variable, (+) = Réaction faible, **nd**= non déterminé.

II -1-4. Caractérisation des souches

Une fois l'espèce *Y. enterocolitica* confirmée, il est essentiel de déterminer s'il s'agit ou non d'une souche pathogène (Savin et Carniel, 2008). Pour cela, le biotype en est le meilleur indicateur. Les souches du biotype 1A ne sont qu'en transit dans le tube digestif humain et ne sont pas responsables des symptômes intestinaux observés. En revanche, les souches de tous les autres biotypes (1 B, 2, 3, 4 et 5) peuvent potentiellement causer une symptomatologie digestive. La différenciation des souches en six biotypes repose sur huit tests, présentées dans le tableau II (Wauters et al., 1987).

Cependant, la différenciation entre les *Y. enterocolitica* non-pathogènes (biotype 1A) et pathogènes peut se faire à l'aide de deux caractères : la pyrazinamidase et la salicine, qui sont positifs chez les premières et négatifs chez les autres (Bottone, 1997). L'esculine est un test plus variable, mais s'il est positif, il est également un indicateur du biotype 1A. Pour les souches pathogènes, leur subdivision en cinq biotypes a non seulement un intérêt épidémiologique mais permet également de préjuger de la gravité potentielle de l'infection (Tableau III). Les souches du biotype 1B sont très pathogènes et ont une forte propension à provoquer une infection systémique. Celles du biotype 2 causent également relativement fréquemment des septicémies, mais essentiellement Lorsqu'existe un terrain sous-jacent fragilisé, les souches du biotype 4

sont les plus habituellement isolées de malades, mais elles se limitent le plus souvent au tractus digestif. Le sérotypage, basé sur la variabilité des chaînes latérales du LPS (antigène O), est également utilisé pour subdiviser ces souches de *Y. enterocolitica*. Plus de 75 sérotypes peuvent ainsi être identifiés par séro-agglutination à l'aide de sérums immuns spécifiques (Bottone, 1999).

La sensibilité à des batteries de phages (lysotypage) peut aussi être utilisée pour subdiviser l'espèce *Y. enterocolitica*. Le lysotype est déterminé à l'aide d'une batterie de 28 phages (12 phages de lysogénie et 16 phages d'eaux d'égout). En pratique, ce lysotypage, qui s'applique en routine qu'aux souches du biotype 4. Ces souches étant majoritairement (98 %) du lysotype VIII, un lysotype différent (IXa ou IXb) peut signifier une origine étrangère et une sensibilité aux antibiotiques différente des souches classiques (Pham *et al.*, 1995).

Tableau II : Schéma de biotypage modifié à partir de Wauters et Coll, 1987 (Benoit *et al.*, 1996).

Tests	Biotypes					
	1A	1B	2	3	4	5
Lipase (Tween-estérase).	+	+	-	-	-	-
Salicine (Production d'acide en 24h).	⊕	-	-	-	-	-
Esculine (Hydrolyse en 24h).	⊕/	-	-	-	-	-
Xylose (Production d'acide).	+	+	+	+	-	V
Tréhalose/ NO ₃ (Production d'acide).	+	+	+	+	+	-
Indole (Production).	+	+	V	-	-	-
Pyrazinamidase	⊕*	-	-	-	-	-
Réduction des nitrates	+	+	+	+	+	-

* : Très rares souches négatives. + : Réaction positive, - : Réaction négative, V : Variable.

Entourés sont les caractères qui différencient les *Y. enterocolitica* non pathogènes (1A) des pathogènes (autres biotypes).

Tableau III : Association Biotype/Sérotypage/ Pathogénicité des souches de *Y. enterocolitica* isolées chez l'homme (Cyril et Elisabeth, 2008).

Biotype	Sérotypage associés	Plasmide pYV	Illot HPI	Pathogénicité pour l'homme
1A	Nombreux (O :5, O :7, O :8, O :18, etc.)	-	-	Non pathogène
1B	O :8, O :4, O :7, O :13, O :18, O :21	+	+	Très pathogène (++)
2	O :9, O :5, 27	+	-	Pathogène (+)
3	O :3, O :5, 27	+	-	Pathogène
4	O :3	+	-	Pathogène
5	O :2,3	+	-	Pathogène

+ : Présence, - : Absence

II -2. Autres méthodes de détection

Il apparait clairement que le diagnostic bactériologique classique des *Yersinia* à partir d'échantillons polymicrobiens n'est pas assez performant. Pour cette raison, différentes méthodes moléculaires ont été développées. Des méthodes d'hybridation utilisant des sondes moléculaires ciblant des séquences d'ADN ont été mises au point (Durisin et al., 1997). Elles ne nécessitent pas l'isolement préalable des bactéries mais la présence d'une flore bactérienne secondaire diminue l'efficacité de l'hybridation ADN-ADN. D'autres techniques comme le multilocus sequence typing (MLST) ou l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) ont été développées mais sont plus utiles pour réaliser des études épidémiologiques. Au final, la PCR reste la seule méthode moléculaire utilisée en laboratoire d'analyses médicales pour caractériser les souches après l'isolement mais pas pour le diagnostic des yersiniose (Foley et al., 2009).

Les différentes techniques de PCR peuvent offrir une bonne spécificité et sensibilité pour détecter les *Yersinia* entéropathogènes au sein d'échantillons polymicrobiens biologiques ou alimentaires (Antikainen et al., 2013). Plus récemment, la technique PCR a été utilisée pour réaliser le sérotypage des souches virulentes de *Y. enterocolitica* (Garzetti et al., 2014). Cependant, cette technique ne permet pas de différencier les bactéries mortes des vivantes. De plus, les revers de cette forte sensibilité sont l'apparition de résultats faussement positifs à cause de contaminations croisées pouvant se produire au sein des laboratoires et l'existence d'une grande variabilité des résultats selon l'expérimentateur. Cette technique nécessite également un équipement particulier. De plus, les matrices (alimentaires ou biologiques) peuvent contenir de nombreuses substances inhibitrices de la PCR. Ainsi l'analyse de ces échantillons nécessite la réalisation d'étapes de traitements, notamment par enrichissement, purification de l'ADN ou séparation immunomagnétique. Les techniques de PCR ne peuvent donc pas à l'heure actuelle se substituer à l'isolement et la caractérisation de la souche (Estrada et al., 2012).

Le diagnostic sérologique peut s'avérer utile si la bactérie n'a pas été isolée. La recherche d'anticorps spécifiques des *Yersinia* entéropathogènes peut être réalisée dans le sérum des patients par séro-agglutination, ELISA ou western blot (Chart et Cheasty, 2006). La séroconversion se produit deux à sept jours après le début des symptômes cliniques et peut perdurer jusqu'à douze mois si une complication secondaire de type arthrite se produit (Stahlberg et al., 1989). Il est important de noter qu'il existe une parenté antigénique entre l'antigène O:9 de *Y. enterocolitica* et celui des *Brucella* et de *E. coli* O157, et une parenté entre les antigènes des sérotypes II et IV de *Y. pseudotuberculosis* et des groupes B et D de *Salmonella* (Chart et Cheasty, 2006). Ceci peut mener à fausser l'interprétation d'une sérologie.

Plus récemment, les techniques de spectrométrie de masse avec notamment les instruments de type MALDI-TOF ont été étudiées (Rizzardi et *al.*, 2013). S'il semble que le biotypage et le sérotypage soient possibles, les échantillons nécessitent un traitement et un appareillage conséquent et onéreux.

III - Traitement de yersiniose

Les infections modérées à *Yersinia* entéro-pathogènes sont normalement spontanément résolutive en suivant quelques mesures hygiéno-diététiques simples. Leur traitement doit être avant tout symptomatique car pour les formes modérées et seulement digestives, un traitement antibiotique n'est pas nécessaire (Guarino et *al.*, 2014). Il est au contraire recommandé pour les cas sévères ou prolongés avec complications, et plus particulièrement lors de suspicions d'une septicémie ou chez des sujets immunodéficients. *Y. enterocolitica*, quel que soit le biotype, est toujours sensible aux céphalosporines de 3^e génération, de même qu'aux fluoroquinolones aux aminosides et au cotrimoxazole (Nicolas et *al.*, 2015). Donc les antibiotiques communément utilisés en première intention sont les Céphalosporines de 3^e génération et les Fluoroquinolones (Ciprofloxacine et Ofloxacine). Le Chloramphénicol, la Gentamicine, la Tétracycline et l'association du Triméthoprime avec le Sulfaméthoxazole peuvent également être utilisés (Nauciel et *vildé*, 2005).

Matériels et Méthodes

Notre travail porte sur l'évaluation du milieu CHROMagar *Yersinia enterocolitica* (CAYe) Par rapport au milieu de référence CIN pour la détection systématique de *Y. enterocolitica*, par l'isolement et l'identification de cinquante souches de *Yersinia enterocolitica* isolées de différents prélèvements. Ce travail a été effectué au niveau du Laboratoire des Entérobactéries et Autres Bactéries Apparentées de l'Institut Pasteur d'Algérie qui s'est étalée sur une période allant de 17 Février au 18 Juin 2019.

I- Matériel

I-1. Matériel de laboratoire

La verrerie, les réactifs utilisés et leurs composition, l'appareillage utilisé ainsi que la composition des milieux sont cités en Annexes.

I-2. Souches utilisées

Origine des souches

Les souches *Yersinia enterocolitica*, appartiennent à la collection du laboratoire des Entérobactéries et Autres Bactéries Apparentées de l'Institut Pasteur d'Algérie. Celles-ci ont été isolées en 1991, 1992, 1993 et en 1994. Ces isolats de *Yersinia enterocolitica* proviennent des échantillons de selles humaine, Fiente de volaille et des échantillons d'eaux usées.

II- Méthodes d'étude

II-1. Isolement de *Yersinia enterocolitica*.

L'ensemencement de 50 souches *Yersinia enterocolitica* s'est effectué sur les deux milieux CIN et CAYe.

II-1-1. Préparation du CHROMagar *Yersinia enterocolitica*

Après avoir pesé correctement une quantité de poudre déshydratée correspondant au volume désiré d'eau distillée stérile, l'ensemble a été bien mélangé jusqu'à ce que l'agar se dissolve. Puis il a été porté à l'ébullition (100 °C) avec un mouvement de rotation lent et régulier sur une plaque chauffante avec un agitateur magnétique, ce mélange a été refroidi dans un bain-marie à 47 °C +/- 2 °C. le supplément a été aseptiquement supplémentée au milieu de culture à l'aide d'un filtre à seringue, le milieu est aseptiquement coulé dans des boîtes de pétri.

Les boîtes préparées ont été stockées au réfrigérateur (+4 °C) à l'abri de la lumière. La composition du milieu est donnée en Annexe 02.

II-1-2. Contrôle qualité

Les milieux ont été contrôlés grâce à l'isolation des souches de contrôle de qualité de l'Institut Pasteur sur les deux milieux CIN et CAYe.

- *Yersinia enterocolitica* 4/O :3 Ip 33696
- *Yersinia enterocolitica* 2/O :9 Ip 383
- *Yersinia enterocolitica* 1A/O :5 Ip 33698
- *Yersinia pseudotuberculosis* sérotype I : Ip 32427
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

On a incubé une boîte de Pétri des deux milieux dans les mêmes conditions du travail, pendant 24h à 37 °C et l'examiner pour détecter les contaminants et pour vérifier la stérilité du milieu.

II-1-3. D'autres souches tests isolées sur les deux milieux

D'autres souches tests ont été isolées sur les deux milieux, *Salmonella spp.*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* et une souche de *Listeria monocytogenes*.

II-1-4. Revivification des souches

Avant leurs utilisations, les souches à travailler sont récupérées et subissent une revivification dans du bouillon Mac Conkey. Et sont ensemencées sur géloses : CIN, CAYe et sur gélose nutritif (GN) puis incubé à 30°C pendant 24h puis 48 heures. La composition des milieux de culture est donnée en Annexe 02.

II-1-5. La conservation des souches

La conservation des souches a été réalisée en tubes de conservation a une température ambiante, pour une utilisation ultérieure.

II-2. Identification macro et microscopique des souches

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

II-2.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures sur milieux CIN et CAYe est le premier examen effectué à partir de l'isolement. Après incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures.

L'étude de l'aspect macroscopique des colonies isolées se fait après 24h à 48h d'incubation, elle permet d'effectuer une première caractérisation. La lecture se fait par l'observation des boîtes à l'œil nu. Les éléments d'identification macroscopique sont : La forme des colonies, la taille, la couleur, le chromogène et l'élévation.

II-2.2. Examen microscopique (coloration de Gram)

Les colorations sont effectuées selon les méthodes de Gram classique. Des frottis de colonies de *Yersinia enterocolitica* sont préparés (Une goutte de la suspension bactérienne a été étalée en couche mince et régulière sur la lame. Après fixation du frottis, la coloration de Gram a été réalisée). L'observation sous microscope optique au grossissement X100 nous a permis de déterminer le Gram des bactéries et leurs morphologies (Annexe 05).

II-3. Identification des souches

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

II-3-1. Identification par tests biochimiques

Si les examens précédents répondent aux caractéristiques de *Yersinia enterocolitica*, l'identification est poursuivie par la galerie conventionnelle API20E.

1. Préparation de la suspension bactérienne

La suspension bactérienne de chacune des cinquante souches a été préparée dans de l'eau physiologique stérile avec des colonies prélevées à partir d'une culture sur gélose nutritive.

La préparation de la suspension bactérienne s'effectue par le transfert de quelques colonies bien isolées à l'aide d'une pipette pasteur bien stérile vers un tube d'eau physiologique stérile dans les conditions aseptiques, la suspension est homogénéisée. Cette suspension sert à ensemencher différents milieux permettant ainsi de mettre en évidence les différents caractères biochimiques de chaque souche.

2. Test à l'oxydase

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

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

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

Lecture

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

3. Recherche de nitrate réductase

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

Le bouillon nitrate est un bouillon de culture permettant la recherche de l'utilisation du nitrate par certaines bactéries, notamment par respiration nitrate.

Les bactéries, lorsqu'elles possèdent une nitrate réductase, sont capables de transformer les nitrates (NO_3) en nitrites (NO_2) et éventuellement en azote (N_2).

Un bouillon nitrate est ensemencé avec la suspension bactérienne et incubé pendant 24 à 48 heures à 30°C. Après incubation, quelques gouttes d'une solution d'acide sulfanilique (NR I) et 3 gouttes d'une solution de naphtylamine (NR II) sont ajoutées au bouillon.

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

ne possède pas de nitrate réductase ; Si aucune modification de coloration n'est visible après l'ajout du zinc, alors les nitrates ont été réduits au stade azote.

4. Mise en évidence de la fermentation du glucose, lactose, saccharose, production de gaz et H₂S sur le milieu TSI

Le milieu TSI est utilisé principalement pour orienter l'identification des entérobactéries (bacilles à Gram-). Il permet de permettre en 24 heures la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose, la production d'hydrogène sulfuré (H₂S) et du gaz provenant de la fermentation du glucose.

Ensemencer la pente en stries serrées afin d'avoir une culture en nappe et le culot du milieu par piqûre centrale, avec la souche bactérienne à tester. Ne pas revisser à fond le bouchon du tube pour permettre les échanges gazeux. Incuber à 30°C pendant 24 heures.

Lecture

- ✓ La fermentation du glucose au niveau du culot se traduit par la coloration jaune.
- ✓ La fermentation du lactose et ou saccharose au niveau de la pente se traduit par une coloration jaune.
- ✓ La production d'H₂S sera visualisé par la précipiter noire de sulfure de fer.

La production de gaz sera mise en évidence par des bulles dans la gélose ou un décollement de celle-ci.

5. Utilisation du citrate de Simmons comme seule source de carbone

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

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

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

La pente du milieu estensemencée par des stries à la pipette sur la partie inférieure, en dévissant le bouchon pour permettre les échanges gazeux. Puis, incubé à 30°C, pendant 24 heures.

Lecture

- ✓ Citrate + : pousse avec alcalinisation du milieu → le milieu vert devient bleu.
- ✓ Citrate - : pas de pousse → le milieu reste inchangé (vert).

6. Test de mobilité et de dégradation du mannitol

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

On ensemence le milieu par piqûre centrale à l'aide d'une pipette fermée chargée de la suspension bactérienne, l'incubation se fait à 25°C et à 37°C pendant 24 heures.

Lecture

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

- ✓ Mannitol+ : le milieu rouge devient jaune
- ✓ Mannitol- : le milieu reste rouge

La mobilité du fait de la faible teneur en gélose du milieu (gélose molle), les bactéries peuvent s'y déplacer

- ✓ Mobilité + : les bactéries mobiles troublent le milieu.
- ✓ Mobilité - : les bactéries immobiles persistent près de la piqûre centrale.

7. Recherche de la voie fermentaire

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

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

On ensemence directement le milieu Clarck et Lubs. Après avoir incubé à 25°C et à 37°C pendant 24 heures pour pratiquer le test : VP.

Test VP (Voges-Proskauer)

Ce test permet la mise en évidence de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxy-butanone ou acétyl –méthyl carbynol) au cours de la fermentation butylène glycolique : en présence d'une base forte (soude ou potasse) et d' α -naphtol, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné.

En ajoutant quelques gouttes du reactif VP I et même le volume de reactif VP II Incliner le tube et attende de 10 minutes.

- ✓ Test positif VP+ : coloration rose-rouge.
- ✓ Test négatif VP- : le milieu reste incolore.

8. Recherche de l'uréase, du tryptophane désaminase et de la production d'indole

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

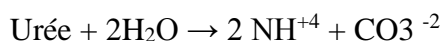
La production de l'indole, l'hydrolyse de l'urée, la désamination du tryptophane par le tryptophane désaminase.

Onensemencer directement le milieu urée-indole avec quelques gouttes de suspension bactérienne, Incubation à 30°C pendant 24 heures. La lecture se fait comme suit :

a. Recherche de l'uréase

Yersinia spp. capables de dégrader l'urée très activement (uréase de 2h), qui est un composé organique et qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase.

La dégradation se fait selon la réaction suivante :

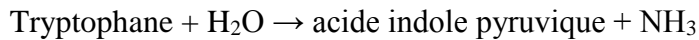


Les ions CO_3^{2-} vont entraîner une forte alcalinisation du milieu qui sera révélée par un virage de l'indicateur de pH (le rouge de phénol) à sa teinte basique (rouge).

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

b. Recherche du tryptophane désaminase

La TDA dégrade le tryptophane selon la réaction suivante :



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

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

c. Recherche de la production d'indole

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

La tryptophanase hydrolyse le tryptophane selon la réaction suivante :



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

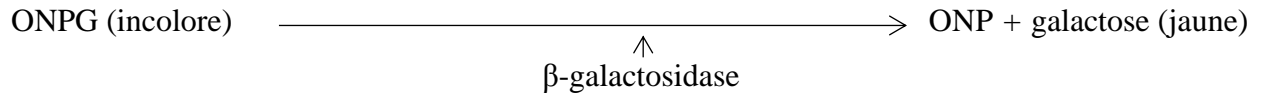
- ✓ Anneau rouge : indole +
- ✓ Anneau jaune : indole -

9. Recherche de la β -galactosidase (test ONPG)

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

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

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



Prélever à l'aide d'une anse une culture bactérienne à partir d'un milieu lactosé gélosé (pente du milieu TSI) et faire une suspension dense dans de l'eau distillée stérile, déposer un disque imprégné d'ONPG, incuber au bain-marie à 25°C et à 37°C pendant 30 minutes ou à l'étuve à 25°C et à 37°C pendant 24 heures.

Lecture

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

10. Production des décarboxylases des acides diamines (ODC, LDC, ADH)

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

- Le premier tube contient de la lysine, pour la mise en évidence de la LDC.
- Le deuxième tube contient de l'ornithine, pour la mise en évidence de l'ODC.
- Le troisième tube contient de l'arginine, pour la mise en évidence de l'ADH.
- Un tube témoin contiendra que du glucose et ne contiendra aucun acide aminé qui sera aussiensemencé pour valider la réaction.

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

A la fin, les trois tubes et le tube témoin ont été incubés à 37°C et à 25°C pendant 18 à 24 heures. Le test individuel peut être effectué sur le milieu de Moeller contenant l'acide aminé étudié (la lysine, l'ornithine, ou l'arginine), du glucose et un indicateur coloré, le bromocrésol pourpre. La réaction s'effectue en deux temps : Lorsque le glucose est fermenté, il y a un virage au jaune du bromocrésol pourpre, lorsque l'acide aminé est décarboxylé, il y a une réalcalinisation du milieu qui vire au violet. Après incubation de 24 heures à 37°C et à 25°C, un milieu violet trouble correspond à une réaction positive.

Cette alcalinisation est due à :

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

11. Galerie API 20 E

L'identification est ensuite complétée pour quelques souches par un ensemencement sur galerie API 20E (Appareillage et Procédé d'Identification) : la galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes qui contiennent chacun un milieu déshydraté différent. On prélève quelques colonies bien isolées sur gélose nutritive et on réalise une suspension homogène dans 5 ml d'eau distillée. On inocule la galerie selon la méthodologie recommandée par la notice technique (Annexe 06). Les réactions produites pendant la période d'incubation (24h à 48h à une température de 25°C) se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. On fait la lecture et on interprète en se référant au catalogue analytique API (Annexe 06).

IV-3-2. Sérotypage

L'antigène somatique O, définissant le sérotype, est contenu dans les lipopolysaccharides présents sur la paroi des bactéries à Gram négative, ces antigènes sont agglutinants en présence d'un immun sérum complémentaire et permettent le sérogroupage définissant un sérotype.

L'identification des antigènes et des biotypes a permis une orientation vers le caractère pathogène ou non des souches de *Y. enterocolitica* isolées. En effet, certains sérotypes ne sont jamais, ou rarement, associés à des maladies tandis que d'autres le sont très fréquemment. L'antisérum *Y. enterocolitica* (sérums anti-O:3 et anti-O:9) est destiné à l'agglutination sur lame.

Principe

La recherche est basée sur la mise en évidence d'une réaction spécifique entre un anticorps présent dans un sérum test et un antigène porté par le microorganisme étudié. Cette réaction est visualisée par une agglutination qui est le résultat macroscopique de la réaction antigène-anticorps.

Méthode

On dépose sur une lame, une goutte d'antisérum *Yersinia enterocolitica* O :3 et une goutte d'antisérum *Yersinia enterocolitica* O :9, on prélève quelques colonies qu'on dépose sur

les lames a côté de chacune des gouttes d'eau physiologique (pour tester l'auto agglutination des souches), de sérum anti-O :3 et de sérum anti-O :9 et on mélange doucement et progressivement les bactéries dans chacune des gouttes en changeant de pipette à chaque fois d'une goutte a une autre, la lame est basculée avec précaution d'avant en arrière et l'agglutination doit apparaître rapidement en quelques seconds.

Lecture

- ✓ Test positif (agglutination) : Formation d'un complexe d'agglutination visible à l'œil nu.
- ✓ Test négatif (pas d'agglutination) : L'absence du complexe d'agglutination visible à l'œil nu.

II-4. Test d'évaluation du CHROMagar *Yersinia enterocolitica*

La performance du milieu CHROMagar *Yersinia enterocolitica* par rapport au milieu de référence CIN est déterminé par la mesure de la spécificité du milieu.

La spécificité

C'est la mesure de l'aptitude d'un test à éliminer les faux positifs.

Plus la spécificité est proche de cent pour cent (100%) moins il y a de faux positif.

Spécificité des deux milieux CHROMagar *Yersinia enterocolitica* et CIN, est calculée de la façon suivante :

Spécificité du milieu CHROMagar *Yersinia enterocolitica*

Le total de souches de *Yersinia enterocolitica* sur le total de souches tests qui poussent sur le milieu CHROMagar *Yersinia enterocolitica*.

Spécificité du milieu CIN

Le total de souches de *Yersinia enterocolitica* sur le total de souches tests qui poussent sur le milieu CIN.

Résultats

I-Résultats

L'ensemble des résultats d'identification macroscopique, biochimique ainsi antigénique sont résumés dans le tableau en Annexe 07.

I-1. Aspects cultureux

I-1-1. Examen macroscopique

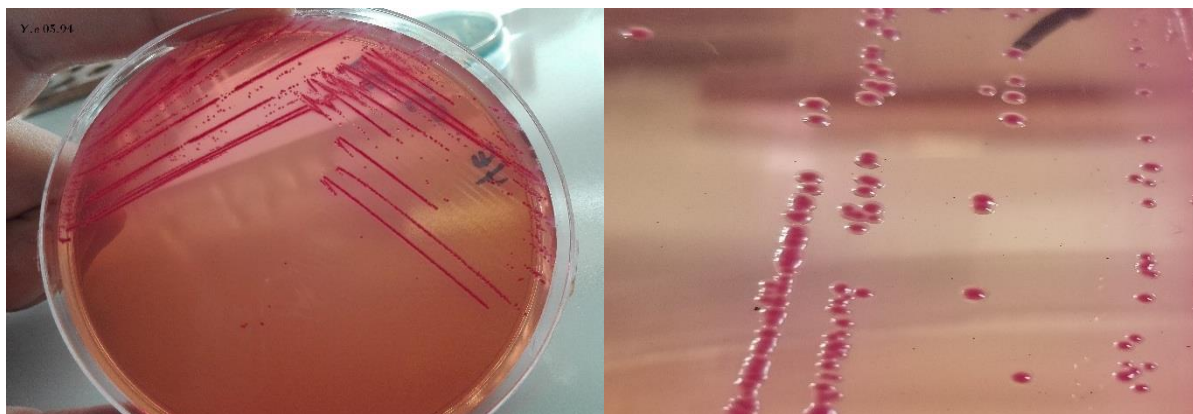
Après ensemencement sur les deux milieux CIN et CAYe, et une incubation à l'étuve à 30°C, nous avons observé au bout de 24 heures la formation des colonies sur les deux milieux.

1. Sur milieu CIN

Après 24h d'incubation à 30°C, les colonies sont très petites (0,5 à 1 mm), lisses, à centre rouge sombre en cocarde occupant la moitié de la colonie, avec un pourtour dégradé du rosâtre à l'incolore, présentant un aspect typique « en œil de bison » (Figure 03).

Après 48h d'incubation à 30°C, les colonies sont plus grandes (2 à 3 mm) et la couleur rouge du centre devient diffuse et les colonies deviennent plates (Figure 04).

Lecture après 24h d'incubation

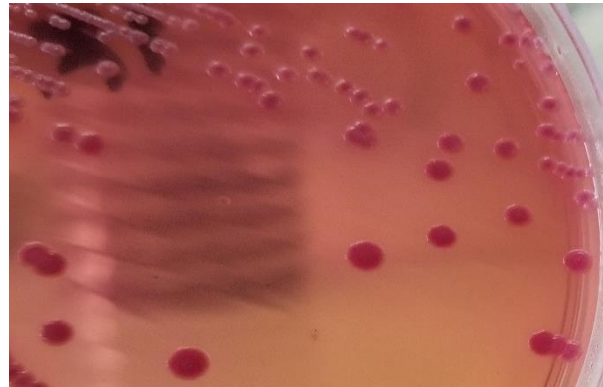


A-Colonies de *Yersinia enterocolitica* « souche 05.94 » Après 24h d'incubation.

B-Colonies de *Yersinia enterocolitica* « souche E64.93 » Après 24h d'incubation.

Figure 03 : Aspect des colonies de *Yersinia enterocolitica* sur milieu CIN après 24h d'incubation à 30°C.

Lecture après 48h d'incubation



A- Colonies de *Yersinia enterocolitica* « souche 75.93 » Après 48h d'incubation.

B-Colonies de *Yersinia enterocolitica* « souche 663.93 » Après 48h d'incubation.

Figure 04 : Aspect des colonies de *Yersinia enterocolitica* sur milieu CIN après 48h d'incubation à 30°C.

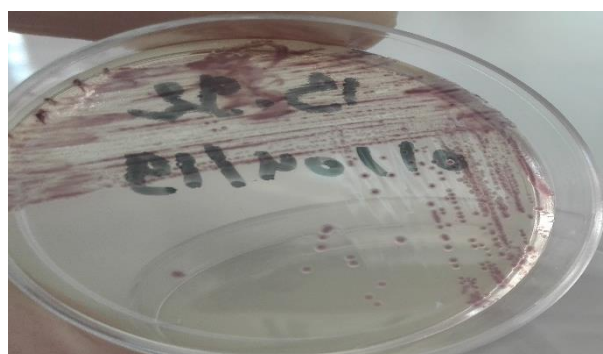
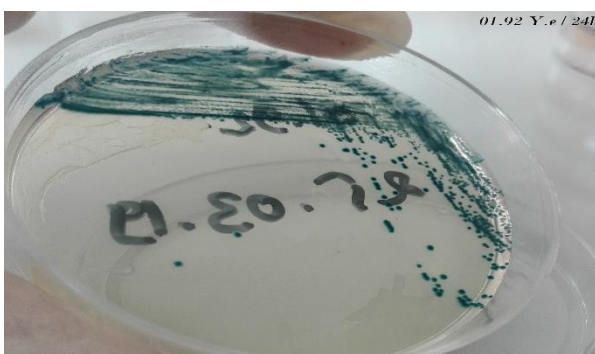
2. Sur milieu CHROMagar *Yersinia enterocolitica*

Les colonies pathogènes de *Y. enterocolitica* Apparaître mauve, tandis que les colonies de *Y. enterocolitica* non pathogènes et les autres espèces de *Yersinia* ont une couleur bleu métallique.

Les colonies ont une taille comprise entre 0.5 à 1 mm de diamètre présentant différents aspects ont été observées après une incubation de 24h à 30°C (Figure 05).

Et après une incubation de 48h à 30°C, les colonies devient plus grandes (2 à 3 mm) (Figure 06).

Lecture après 24h d'incubation

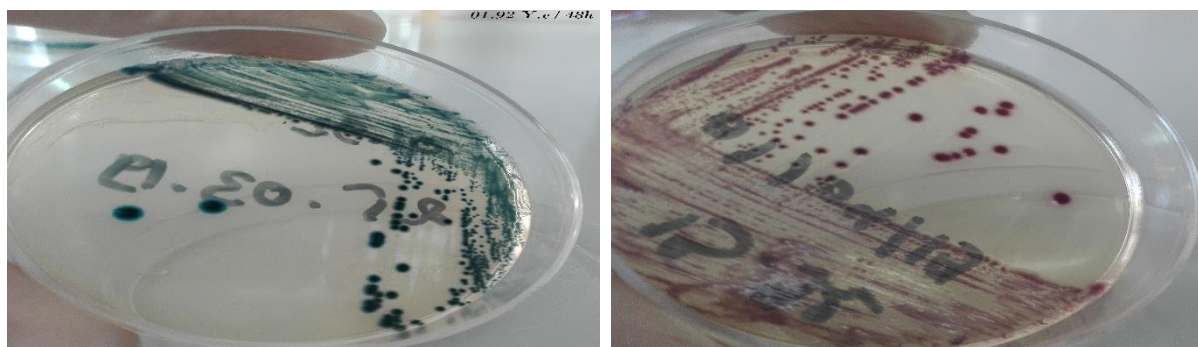


A- Colonies non-pathogènes de *Yersinia enterocolitica* « souche 01.92 » Après 24h d'incubation.

B-Colonies pathogènes de *Yersinia enterocolitica* « souche 13.92 » Après 24h d'incubation.

Figure 05 : Aspect des colonies de *Yersinia enterocolitica* sur milieu CHROMagar *Yersinia enterocolitica* après 24h d'incubation à 30°C.

Lecture après 48h d'incubation



A-Colonies non-pathogènes de *Yersinia enterocolitica* « souche 01.92 » Après 48h d'incubation.

B-Colonies pathogènes de *Yersinia enterocolitica* « souche 13.92 » Après 24h d'incubation.

Figure 06 : Aspect des colonies de *Yersinia enterocolitica* sur milieu CHROMagar *Yersinia enterocolitica* après 48h d'incubation à 30°C.

Les résultats des repiquages des souches sont répartis dans les deux tableaux IV et V.

Tableau IV : Résultats de repiquage des souches tests.

Souches	Nbr. De Souches examinées	CIN	CHROMagar <i>Yersinia enterocolitica</i>		
			Mauve	Bleu métallique	Autres couleurs
<i>Y.enterocolitica</i>	50	50	04	46	-
<i>Salmonella spp.</i>	01	+	-	-	-
<i>Shigilla sonnei</i>	01	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	01	+	+	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	01	-	-	-	-
Total	54	53	05	46	00
	54	53		51	

- : Aucune culture ; + : présence de culture.

Les quatre souches tests de *Y.enterocolitica* qui ont données des colonies mauves typique sont : 13.92, E57.93, E75.93, 09.94, ainsi *Escherichia coli* donné un étalement de colonies mauves.

Salmonella spp. et *Shigilla sonnei* poussent sur le milieu CIN, sur CAYe aucune colonie n'a été poussé.

Listeria monocytogenes n'a pas poussé sur les deux milieux.

Tableau V : Résultats des repiquages des souches de contrôle de qualité.

Souches	Nbr. De Souches examinées	CIN	CHROMagar <i>Yersinia enterocolitica</i>		
			Mauve	Bleu métallique	Autres couleurs
<i>Yersinia enterocolitica</i> 4/O :3 Ip 33696	01	+	+	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 2/O :9 Ip 383	01	+	+	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 1A/O :5 Ip 33698	01	+	-	+	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> sérototype I : Ip 32427	01	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	01	+	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	01	+	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	01	+	-	+	-
Total	07	07		07	

- : Aucune culture ; + : présence de culture.

Les trois souches de référence de *Y. enterocolitica* ainsi la souche *Yersinia pseudotuberculosis* ont poussées sur les deux milieux.

Escherichia coli ATCC 25922 pousse sur milieu CIN, sur milieu CAYe un très fin étalement de colonies de couleur mauve a été détecté.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 poussent sur les deux milieux.

I-1-2. Examen microscopique

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

Aspect microscopique

L'examen microscopique après coloration de Gram, nous a permis d'observer différents aspects de bacilles colorés en rose. Ce sont des bactéries Gram négatif, compatible avec l'aspect microscopique de *Y. enterocolitica*, elle a permis également de vérifier la pureté de la culture (Figure 07).

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

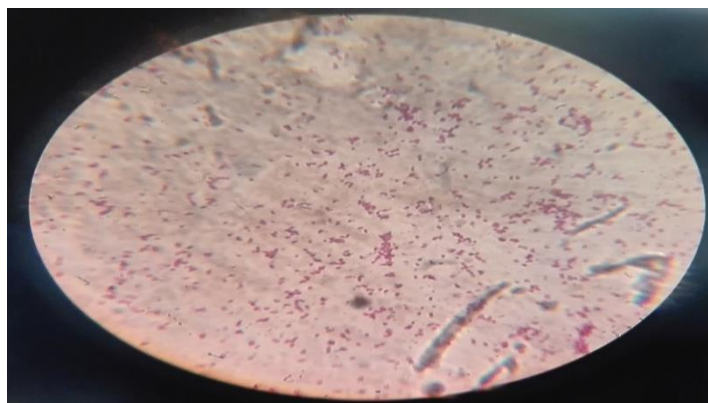


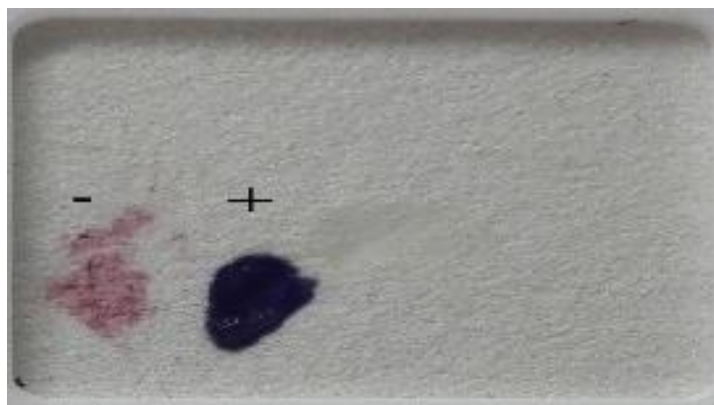
Figure 07 : Aspect microscopique (coloration de Gram) de *Y. enterocolitica* (G \times 100).

I-2. Identification biochimique

L'identification de *Y. enterocolitica* est basée sur l'étude des caractères biochimiques en utilisant la galerie classique, qui nécessite dans un premier temps la réalisation d'une suspension bactérienne est ensuite l'ensemencement des différents milieux d'identification qui constituent la galerie, ce qui nous confirme l'appartenance de ces souches à l'espèce *Y. enterocolitica*.

1. Test à l'oxydase

L'absence de la coloration violette révèle un résultat négatif sur les disques d'oxydase (Figure 08).



A gauche : souche teste

Figure 08 : Révélation du test d'oxydase.

2. Test de nitrate réductase

Après l'ajout des réactifs NR1 et NR2, nous avons pu observer une coloration rouge du milieu (Figure 09).



Figure 09 : Aspect du bouillon nitrate ensemencées par *Yersinia enterocolitica* après incubation de 24h à 25°C et à 37°C et après ajout des 2 réactifs NR1 et NR2.

3. Mise en évidence de la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose, de la production de gaz et de l'H₂S sur milieu TSI

L'utilisation du glucose se traduit par un virage au jaune du culot l'utilisation de lactose et/ou du saccharose se traduit par un virage au jaune de la pente. Une pente rouge désigne la non utilisation du lactose (Figure 10).

Une déformation de la gélose désigne une production de gaz.

La production de H₂S se traduit par un noircissement du milieu.



Figure 10 : Aspect du milieu TSI ensemencées par *Yersinia enterocolitica* après incubation de 24h à 30°C.

Les souches de *Yersinia enterocolitica* étudiées sont : glu+, lac et/ou sac+, gaz- et H₂S-.

4. Utilisation du citrate de Simmons comme seule source de carbone

L'utilisation du citrate se traduit par un virage au bleu du milieu. Nos souches sont citrate- (Figure 11) donc pas d'utilisation du citrate (coloration verte) comme seule source de carbone.



Figure 11 : Aspect du milieu Citrate de simmons ensemencées par *Yersinia enterocolitica* après incubation de 24h à 30°C.

5. Test de mobilité et de dégradation du mannitol

Le virage de l'indicateur coloré rouge de phénol du rouge au jaune témoigne d'une utilisation du mannitol. De plus la mobilité des souches est observée par la formation de voiles autour de la piqûre centrale avec un trouble du milieu (Figure 12).

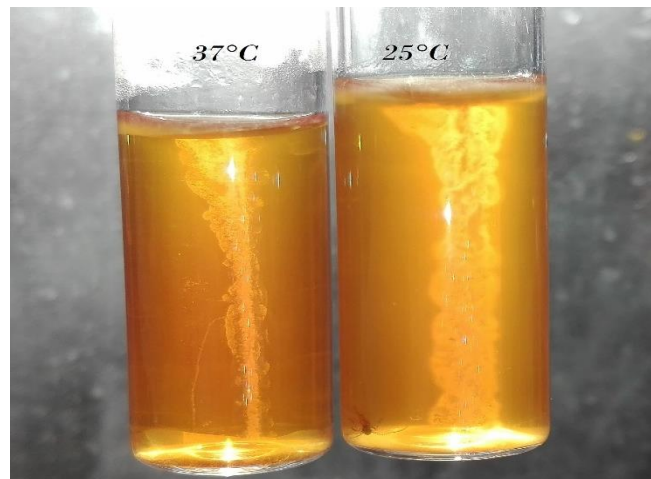


Figure 12 : Aspect du milieu mannitol-mobilité ensemencées par *Yersinia enterocolitica* après incubation de 24h à 25°C et à 37°C.

Les souches de *Y.enterocolitica* utilisées sont :

- ✓ Mannitol (+), mobilité (+) à 25°C pour les 50 souches.
- ✓ Mannitol (+), mobilité (+) à 37°C pour 36 souches.
- ✓ Mannitol (+), mobilité diminuée à 37°C pour 13 souches.
- ✓ Mannitol (+), mobilité (-) à 37°C pour 11 souches.

Les résultats sont résumés dans le tableau en Annexe 07.

6. Recherche de la voie fermentaire

La voie du butylène glycolique est mise en évidence après ajout des réactifs VPI et VPII. Une coloration rouge témoigne d'un VP+ et la réaction négative est révélée par l'absence de la coloration rouge (Figure 13).

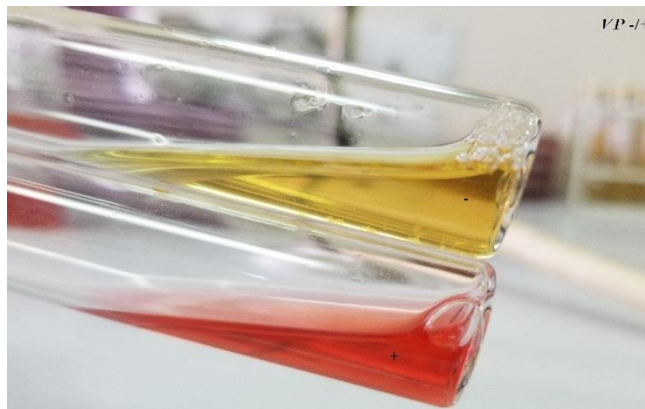


Figure 13 : Aspect du milieu Clark et Lubs ensemencées par *Yersinia enterocolitica* après incubation de 24h à 25°C et à 37°C et après ajout des 2 réactifs VP I et VP II.

- ✓ 21 des souches utilisées sont VP (+) à 25°C.
- ✓ 6 des souches utilisées sont VP (+) à 37°C.

7. Recherche de l'indole et mise en évidence de l'uréase de 2h et de la TDA

La présence de l'uréase se traduit par virage au rose du milieu urée-indole (Figure 14).



Figure 14 : Résultat du test de l'uréase après incubation de 2h à 37°C.

NB : les souches étudiées sont : Uréase (+) après 2h d'incubation à 37°C.

La présence de l'indole est révélée après ajout du réactif de Kovacs dans le milieu urée-indole, la formation d'un anneau rouge témoigne de sa présence et un anneau jaune de son absence (Figure 15).

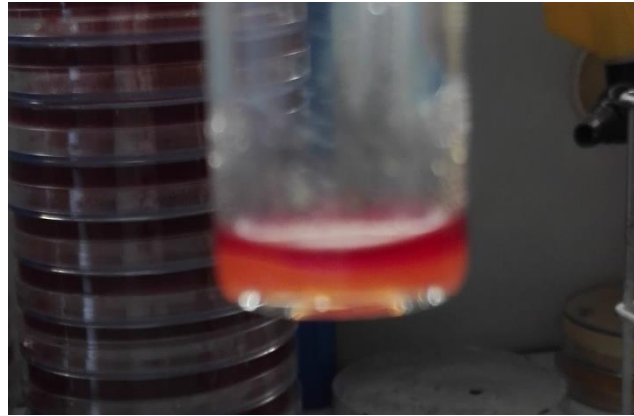


Figure 15 : Résultat du test de l'indole après incubation de 24h à 30°C et après ajout du réactif de Kovacs.

- ✓ 45 souches utilisées sont indole (+) et 5 souches qui sont indole (-).

La TDA est mise en évidence après ajout du réactif de la TDA. Une coloration rouge brun témoigne de la désamination du tryptophane (Figure 16).



Figure 16 : Aspect du test de la TDA après incubation de 24h à 30°C et après ajout du réactif de TDA.

- ✓ les souches étudiées sont : TDA (-).

8. Recherche de la B-galactosidase : Test d'ONPG

Après incubation, les résultats sont négatifs pour les tubes incolores ONPG- et positif pour les tubes jaunes ONPG+ (Figure 17).

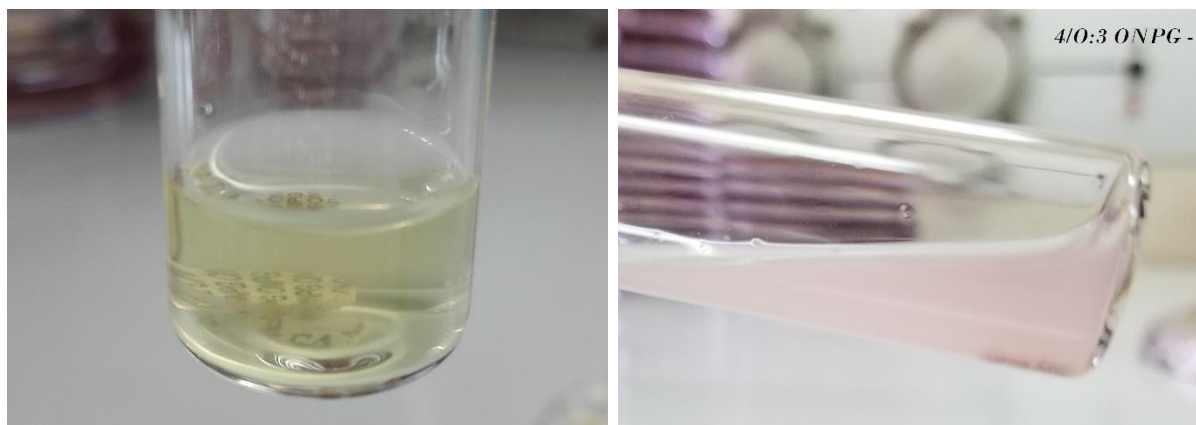


Figure 17 : Résultat du test d'ONPG après incubation de 24h à 25°C et à 37°C.

- ✓ 43 des souches utilisées sont ONPG (+) à 25°C.
- ✓ 32 des souches utilisées sont ONPG (+) à 37°C.

9. Production des décarboxylases des acides diamines (ODC, LDC, ADH)

Les enzymes recherchés sont :

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

Qui catalysent respectivement la décarboxylation de la lysine et de l'ornithine et l'hydrolyse de l'arginine.

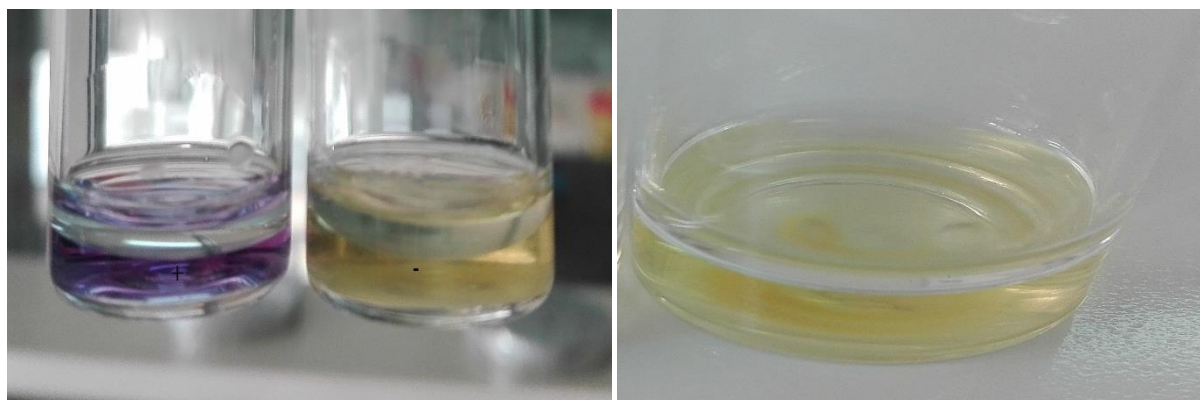


Figure 18 : Aspect du milieu ODC, LDC, ADH ensemencées par *Yersinia enterocolitica* après incubation de 24h à 25°C et à 37°C.

Le témoin a changé de couleur et est devenu jaune car il y a eu acidification du milieu liée à l'utilisation du glucose, pour valider la réaction.

- ✓ Le test à l'ODC est positif pour 48 souches à 25°C, et pour 46 souches à 37°C.

- ✓ LDC est négatif pour 47 souches dans les deux température (à 25°C et à 37°C).
- ✓ ADH est positif pour 42 souches à 25°C, et pour 43 souches à 37°C.

10. Galerie API 20 E

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

Au total 04 souches présomptives ont été retenues, les souches 09.94, 12.94, 01.92 et 08.92.

Les résultats obtenus après incubation sont les suivants :

a. Souche 09.94

Résultats de la galerie API 20 E de la souche 09.94 sont reparties dans le tableau VI et la figure 19.

Tableau VI : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 09.94

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
Résultats	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Tests	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultats	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+

Avec un taux d'identification de 98.4%.



Figure 19 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 09.94 après incubation de 24h à 25°C.

b. Souche 12.94

Résultats de la galerie API 20 E de la souche 12.94 sont reparties dans le tableau VII et la figure 20.

Tableau VII : Résultats de la galerie API 20 E de la souche **12.94**

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
Résultats	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
Tests	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultats	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+

Avec un taux d'identification de 98.4%.

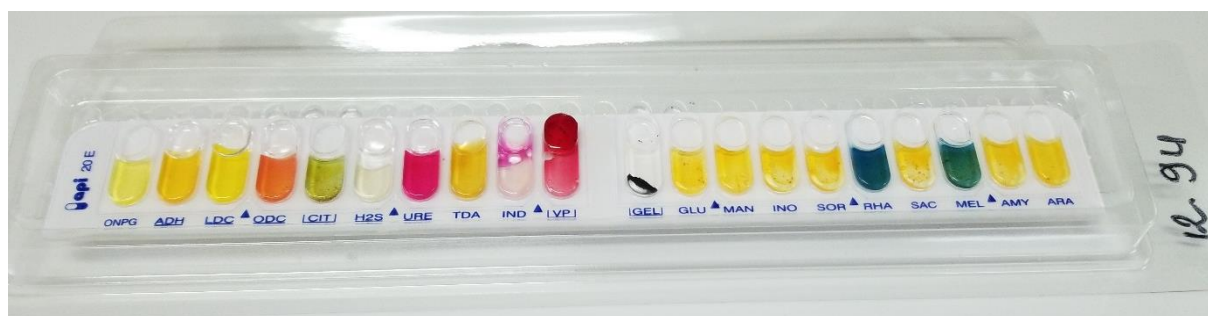


Figure 20 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 12.94 après incubation de 24h à 25°C.

c. Souche 01.92

Résultats de la galerie API 20 E de la souche 01.92 sont reparties dans le tableau VIII et la figure 21.

Tableau VIII : Résultats de la galerie API 20 E de la souche **01.92**.

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
Résultats	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Tests	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultats	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+

Avec un taux d'identification de 93.5%.



Figure 21 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 01.92 après incubation de 24h à 25°C.

d. Souche 08.92

Résultats de la galerie API 20 E de la souche 08.92 sont réparties dans le tableau IX et la figure 22.

Tableau IX : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 08.92.

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
Résultats	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Tests	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultats	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+

Avec un taux d'identification de 81.5%.



Figure 22 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 08.92 après incubation de 24h à 25°C.

I-3. Sérotypage

Les résultats du sérotypage sont présentées dans le tableau X.

Tableau X : Résultat des agglutinations des souches de *Yersinia enterocolitica* avec les anti sérum anti-O : 3 et anti-O :9.

Souches	Auto agglutination	Sérotype O :3	Sérotype O :9
1A/O :5	-	-	-
4/O :3	-	+	-
2/O :9	-	-	+
01.94	-	-	-
02.94	-	-	-
03.94	-	-	-
05.94	-	-	-
06.94	-	-	-
07.94	-	-	-
09.94	-	-	+
E57.93	-	-	-
E75.93	-	-	-
13.92	-	-	+
15.92	-	-	-
16.92	-	-	-
05.91	-	-	-
632.91	-	-	-
Total	00	01	03

Sur les 16 souches analysées 02 souches qui appartiennent au sérotype O :9, avec une souche de référence 2/O :9, Sur les 16 souches analysées aucune souches qui appartiennent au sérotype O :3, sauf la souche de référence 4/O :3.

Aucune souche n'est auto-agglutinable.



+ : agglutination / - : pas d'agglutination.

Figure 23 : sérotypage des souches de *Yersinia enterocolitica* par les deux antisérum O :3 et le O :9.

I-4. Evaluation du CHROMagar *Yersinia enterocolitica*

La spécificité des deux milieux CHROMagar *Yersinia enterocolitica* et CIN est calculée selon la formule suivante :

➤ **Spécificité du milieu CHROMagar *Yersinia enterocolitica***

$$50/51 \times 100 = 98.04\%.$$

➤ **Spécificité du milieu CIN**

$$50/53 \times 100 = 94.34\%.$$

NB : 50 souches de *Yersinia enterocolitica*.

51 souches tests qui ont poussées sur milieu CHROMagar *Yersinia enterocolitica*.

53 souches tests qui ont poussées sur milieu CIN.

Discussion

II- Discussion des résultats

Yersinia enterocolitica est un important agent pathogène d'origine alimentaire responsable de la yersiniose humaine dans le monde entier. L'incidence de la yersiniose est considérablement sous-estimée, cette sous-estimation peut être due au fait que l'infection est spontanément résolutive. La gélose conventionnelle la plus largement utilisée pour l'isolement de ce pathogène dans les échantillons de selles est la gélose à la Cefsulodine-Irgasane-Novobiocine (CIN) (Tan et *al.*, 2014). Dans le but de rechercher un milieu permettant une meilleure identification des colonies de *Y. enterocolitica* pathogènes et non pathogènes des autres espèces bactériennes, la société CHROMagar développe un milieu chromogénique *Y. enterocolitica* incluant un substrat chromogénique pour une enzyme produite par *Y. enterocolitica* et un mix sélectif pour mieux cibler la bactérie.

Cette étude a été menée dans le but d'évaluer la performance du CHROMagar *Yersinia enterocolitica* par rapport au milieu de référence CIN pour la détection systématique de *Y. enterocolitica*, dans un deuxième temps de caractériser les souches de *Y. enterocolitica* sur le plan morphologique, culturelle, biochimique et antigénique.

L'isolement sur ces milieux spécifiques, nous a permis de tester les colonies prélevées sur ces milieux.

Les Entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif dépourvues d'oxydase (Avril et *al.*, 2000 ; Fauchère et Avril, 2002 ; François et *al.* 2011). Donc, le test d'oxydase ainsi le Gram des souches testées, nous orientons vers la famille des *Enterobacteriaceae*, de plus, ne possédant pas de désaminase TDA ce qui exclut les genres *Proteus*, *Morganella* et *Providencia* (Avril et *al.* 1992). La fermentation du mannitol (dans les deux températures 25°C et 37°C), du glucose, du lactose et ou du saccharose et la non-utilisation de citrate comme seule source de carbone avec la non-production de sulfure d'hydrogène et la non-production de gaz, nous orientons vers le genre *Yersinia*. Les enzymes décarboxylases (LDC, ODC) et dihydrolase (ADH) utilisées dans la galerie biochimique réalisée pour l'identification de nos souches testées dans les deux températures 25°C et 37°C, présentent toutes un intérêt taxonomique qui nous orientons vers l'espèce *Y. enterocolitica* (Le Minor et Véron, 1989 ; Abraham et *al.*, 1997). Parmi les propriétés physiologiques générales de *Y. enterocolitica*, le métabolisme thermo dépendant constitue une caractéristique originale et dominante d'autant plus qu'elle est psychrophile (François et *al.* 2011), nos souches donnent des résultats positifs concernant le

test de mobilité à une température de 25°C, qui a été diminué considérablement à une température de 37°C, expliquée par une auxotrophie de la bactérie à cette température (Bercovier et *al.*, 1980). La base d'identification des *Yersinia* est l'activité uréasique (Carniel et *al.*, 2006), avec les souches de *Y. enterocolitica* étudiées, nous avons constaté une réponse à l'urée fortement positive, ce phénomène nous s'explique par le fait que ces souches possèdent une uréase très active « de 2h ». Selon la littérature, les souches de *Y. enterocolitica* sont nitrate réductase positive, indole, ONPG et une voie fermentaire variable (Le Minor et Véron, 1989 ; Abraham et *al.*, 1997), ce qui est concorde parfaitement avec nos résultats.

A travers ces résultats d'identification qui sont en parfait accord avec ceux des auteurs cités précédemment (Le Minor et Véron, 1989 ; Abraham et *al.*, 1997 ; Hart et Paul, 1997 ; Béraud, 2001 ; Guiraud et Philippe, 2004 ; François et *al.* 2011), nous pouvons admettre que nos souches possèdent un profil de *Y. enterocolitica*. En comparant nos résultats avec ceux rapportés par Boulhlib S. et Benrahma M. en 2013 (Boulhlib et Benrahma, 2013) et Boumessrane R. et Rabhi S. en 2018 (Boumessrane et Rabhi, 2018), il est admis que notre identification par rapport à ces caractères biochimiques et microbiologiques est en accord avec les résultats trouvés lors de cette étude.

L'espèce *Y. enterocolitica* est un groupe hétérogène de souches caractérisées par six biotypes et plus de soixante-quinze sérotypes (Savin et *al.*, 2003). Les souches du biosérotipe 2/O :9 et 4/O :3, ont une fréquence très élevée dans le monde entier, Il existe une corrélation entre le biotype et la répartition géographique des souches isolées chez l'homme (Carniel et *al.*, 2006). Des données sur les sérotypes existants en Algérie sont malheureusement absentes.

Parmi les souches pathogènes de *Y. enterocolitica* provoquant la yersiniose humaine. Les souches de *Y. enterocolitica* appartiennent aux biosérotypes 2 / O: 9 et 4 / O: 3 (Savin et *al.*, 2003, Cyril et Elisabeth, 2008). D'autre part les isolats des sérotypes pathogènes rencontrés en pratique clinique ont tous donné des colonies mauves typiques lors de la mise en culture sur CAYe (Renaud et *al.*, 2013), Ce qui en accord avec les résultats trouvés lors de ce sérotypage des deux souches 13.92 et 09.94.

D'autres sérotypes pathogènes rencontrés en pratique clinique, telle que les biosérotypes 1B/O :8, 1B/O :4, 1B/O :7, 1B/O :13, 1B/O :18, 1B/O :21, 2/O :5, 5/O :2 (Cyril et Elisabeth, 2008), qui nous expliquons probablement la non appartenance des deux souches E57.93 et E75.93 au sérotipe O :3 ou au sérotipe O :9.

Sur le plan cultural, le milieu Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin contient plusieurs inhibiteurs de la flore à Gram positif ainsi les bacilles à Gram négatif, autres que *Yersinia enterocolitica*.

La présence de sels biliaires, de cristal violet, d'Irgasan et d'antibiotiques (Cefsulodine et Novobiocine) inhibe le développement des bactéries à Gram positif et de la plupart des bactéries à Gram négatif en sélectionnant les entérobactéries de l'espèce *Y. enterocolitica* (Leclercq, 2003).

Yersinia enterocolitica, fermentant le mannitol, se développe en 24 heures sous forme de petites colonies (1 mm) à centre rouge entouré d'une zone translucide. Après 48 heures d'incubation, les colonies sont plus facilement visibles et peuvent être entourées d'une zone de précipité de sels biliaires (Hart et Paul, 1997).

Concernant le milieu CHROMagar *Yersinia enterocolitica*, Il contient le Mix Sélectif qui inhibe les bactéries à Gram positif ainsi les autres bactéries à Gram négatif à l'exception de *Yersinia*, ainsi un substrat chromogénique dégradable par une enzyme produite par *Yersinia* qui donne par la suite une couleur distinctive pour la bactérie qui nous a permis de différencier entre *Y. enterocolitica* pathogène et non pathogène (Renaud et al., 2012). Bien que la composition de CAYe soit un secret commercial détenu par CHROMagar. Renaud et al. (2013), ont décrit l'utilisation de CHROMagar *Yersinia* (CAY) pour l'isolement de *Y. enterocolitica* à partir de 1 494 échantillons de selles de patients hospitalisés et ont utilisé l'agar CIN comme comparateur, ils suggèrent l'inclusion d'un substrat pour la β -glucosidase afin d'accroître la spécificité. Ils ont même suggéré que la réaction chromogénique cible l'enzyme (β -glucosidase) de *Y. enterocolitica* non pathogène codées de manière chromosomique (Renaud et al., 2013).

Notre étude a porté sur cinquante souches de *Y. enterocolitica*. Sept souches de références ont été testées sur les deux milieux *Yersinia enterocolitica* 4/O :3 Ip 33696 ; 2/O :9 Ip 383 ; 1A/O :5 Ip 33698, *Yersinia pseudotuberculosis* sérotype I : Ip 32427, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Pour s'assurer de la qualité des milieux et des réactifs utilisés.

Ainsi dans notre étude on a inclus quatre autres souches tests pour voir leurs comportements sur les deux milieux, nous avons repiqué les 4 souches suivantes : *Salmonella* spp., *Shigella sonnei* et *Escherichia coli*, ainsi une souche de *Listeria monocytogenes*.

Nous avons évalué la capacité de CAYe, Toutes les 50 souches testées ont poussé sur CAYe, les 04 souches pathogènes ont produit des petites colonies mauves a contour translucide et certains sont incolores après 24 h d'incubation et des colonies mauves a contour translucide (diamètre de 1 à 2 mm) après 48 h d'incubation. En revanche, les 46 souches non pathogènes se sont développées sous forme de colonies bleues métalliques (diamètre de 1 à 3 mm) après 24 et 48 h d'incubation.

Le genre *Yersinia* comprend une autre espèce entéropathogène (*Y. pseudotuberculosis*) (Renaud et al., 2013 ; Nguyen et al., 2016). *Y. pseudotuberculosis* est testée aux tant que souche de référence et développée sur les deux milieux, sur CAYe il a été donné des colonies qui ressemblaient aux colonies pathogènes (Mauve) de *Y. enterocolitica*.

Les deux souches de références de *Yersinia enterocolitica* 4/O :3 Ip 33696 et 2/O :9 Ip 383 ont été données des colonies de couleur mauve tandis que la souche 1A/O :5 Ip 33698 est donnée des colonies de couleur bleu métallique.

Escherichia coli ATCC 25922 pousse sur milieu CIN l'aspect des colonies sur ce milieu ne ressemble pas à celui donné par les colonies de *Yersinia enterocolitica*, sur milieu CAYe un très fin étalement de colonies de couleur mauve a été détecté. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pousse sur les deux milieux. Sur CIN des colonies de couleur jaune verdâtre ont été poussés qui indique la non fermentation du mannitol, sur milieu CAYe des colonies de couleur jaune à l'incolore ont été détectés. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pousse sur les deux milieux, sur milieu CIN de très fines colonies de couleur rose qui ne ressemble pas à celui de *Yersinia enterocolitica* ont poussés, sur CAYe un très fin étalement de colonies de couleur bleue a été détecté.

Les géloses CAYe et CIN ont ensuite été comparées prospectivement par l'isolement des autres souches tests pour voir leurs comportements sur les deux milieux. *Salmonella spp.* et *Shigella sonnei* poussent sur le milieu CIN l'aspect des colonies sur ce milieu ne ressemble pas à celui donné par les colonies de *Yersinia enterocolitica*, sur milieu CAYe aucune colonie n'avait poussé. *Escherichia coli* pousse sur milieu CIN l'aspect des colonies sur ce milieu ne ressemble pas à celui donné par les colonies de *Yersinia enterocolitica*, sur milieu CAYe un très fin étalement de colonies de couleur mauve a été détecté. Ainsi une souche de *Listeria monocytogenes* qui a été isolé sur les deux milieux et elle n'a pas été poussée.

Donc, le milieu CIN, permet une croissance de toutes les bactéries à Gram négatif ainsi les bactéries à Gram positif testées sauf la bactérie *Listeria monocytogenes*.

Le milieu CAYe, mène une sélectivité plus au moins importante par rapport au milieu CIN, il inhibe la majorité des bactéries à Gram négatif, de plus il permet de différencier entre pathogène et non pathogène

Ici, nous avons constaté que le nouveau milieu chromogénique CAYe est bien adapté au dépistage systématique en laboratoire de *Y. enterocolitica* pathogène comprenant une spécificité de (98.04%) était supérieure à celle de CIN (94,34%), proche de celui-ci trouvée par Renaud et *al.*, (2013) qui est de 99% pour le CAYe et de (90.40%) pour le CIN (Renaud et *al.*, 2013). Comparée à CIN, CAYe n'a pas détecté d'isolats non pathogènes, limitant ainsi le risque de prescription inappropriée d'antibiotiques, de plus moins de tests complémentaires pour établir si les isolats de *Y. enterocolitica* sont pathogènes ou non.

Conclusion et perspectives

Parmi le genre *Yersinia*, l'espèce *Yersinia enterocolitica* est l'un des plus fréquents pathogènes alimentaires.

Les milieux de cultures traditionnels, comme le CIN présentant plusieurs inconvénients, d'un part permettent la croissance de biotypes pathogènes et non pathogènes avec le même aspect, d'autre part, l'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques diminue de plus en plus leur sélectivité, ce qui entraîne une importante charge de travail sur des isolats non pertinents (faux positifs).

Avec CHROMagar *Yersinia enterocolitica*, les souches pathogènes sont immédiatement différenciées des autres bactéries par une couleur distinctive. Le laboratoire pourra alors concentrer ses efforts seulement sur les colonies pathogènes.

Comparé à l'utilisation de milieux de culture conventionnels, cela permet souvent de réduire les coûts liés à la réduction du temps de travail et de l'utilisation de réactifs, car moins de tests de confirmation biochimiques et /ou sérologiques sont nécessaires. Cela peut contribuer à une confirmation plus rapide des agents pathogènes et à réduire le temps total nécessaire pour rendre le résultat au clinicien.

Les objectifs de cette étude étaient d'une part l'étude de la performance du milieu CHROMagar *Yersinia enterocolitica* par rapport au milieu CIN, d'autre part l'identification biochimique et microbiologique (caractérisation morphologique et culturale) par des méthodes conventionnelles de 50 souches de *Y. enterocolitica*. La caractérisation repose sur un ensemble de tests biochimiques pour une identification phénotypique classique et une caractérisation des souches par un sérotypage en raison de la différenciation des souches pathogènes des autres non pathogènes. Ces techniques permettent une meilleure identification des souches.

Alors, dans cette étude cinquante souches de *Y. enterocolitica* ont été caractérisé. Les résultats obtenus, nous ont permis de confirmer l'appartenance des souches étudiées à *Yersinia enterocolitica*. La culture est possible sur les deux milieux sélectifs le CIN et le CAYe Après 24h à 48 heures d'incubation à 30°C les souches de *Y. enterocolitica* donnent des colonies typiques.

Après évaluation du milieu, Le CHROMagar *Yersinia enterocolitica* offre plusieurs avantages entre autres une spécificité de (98.04%) qui permettent la reconnaissance spécifique

de *Y. enterocolitica* pathogène. Donc, le milieu CAYe peut être recommandé pour la recherche de *Yersinia enterocolitica* entéropathogène.

Les résultats obtenus ouvrent des perspectives futures : Mener une étude prospective sur le nombre d'infections à *Y. enterocolitica* en Algérie.

Etudier les mécanismes de la multirésistance aux antibiotiques des souches isolées.

Les méthodes phénotypiques restent cependant limitées à un diagnostic présomptif, qui devrait être soutenu par des techniques plus performantes (les techniques moléculaires) qui pourrait mieux contribuer à identifier les souches.

D'inventer de nouveaux milieux chromogéniques qui permettent de différencier entre *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis*.

Références Bibliographiques

A

Abraham M., Pal M., Kang G., Asokan G.V., Magesh S.R., Bhattacharii S., Ramakrishna B.S. (1997). An outbreak of food poisoning in Tamil Nadu associated with *Yersinia enterocolitica*, *Indian J. Med. Res.* **106**: 465-468.

Ackers M.L., Schoenfeld S., Markman J., Smith MG., Nicholson M.A., DeWitt W., Cameron D.N., Griffin P.M., Slutsker L. (2000). An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 infections associated with pasteurized milk. *J. Infect. Dis.* **181**: 1834.

Ahvonon P. (1972). Human yersiniosis in Finland: I. Bacteriology and serology. *Ann. Clin. Res.* **4**: 30-38.

Antikainen J., Kantele A., Pakkanen S.H., Lääveri T., Riutta J., Vaara M., Kirveskari J. (2013). A quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection of 9 pathogens directly from stools of travelers with diarrhea. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **11**: 1300-1307.

Aulisio C.C.G., Mehlman I.J., Sanders A.C. (1980). Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 135-140.

Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Montel H. (1992). Bactériologie clinique. 2^e édition. France. 196-203p.

Avril J., Dabernat H., Denis F., Montel H. (2000). Bactériologie Clinique 3^e édition : ellipses, France. 221p.

B

Barnes P.D., Bergman M.A., Meccas J., Isberg R.R. (2006). *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. *J. Exp. Med.* **203** :1591-1601.

Benoit C., Guiyoule A., Carniel E. (1996). Sérodiagnostic des infections humaines a *Yersinia* pathogènes, *Pres. Med.* **25**: 1627-1630.

Béraud J. (2001). Le technicien d'analyse biologique : guide théorique et pratique, Lavoisier, Paris. 842p.

Bercovier H., Brenner D.J., Ursing J., Steigerwalt A.G., Fanning G.R., Alonso J.M, Carter G.P., Mollaret H.H. (1980). Characterisation of *Yersinia enterocolitica sensu stricto*. *Curr. Microbiol.* **4** : 203.

Bergey's Manuel. (2007). Garrity. G.M.; Lilburn. T.G; Cole. J.R; Harrison. S.H., Euzéby. J; and Tindall. B.J. *In: Part 10: Taxonomic Outline of the Bacteria and Archeae.* Coyright, Michigan State University Board of Trustees.

Bonke R., Wacheck S., Stuber E., Meyer C., Martlbauer E., Fredriksson-Ahomaa M. (2011). Antimicrobial Susceptibility and Distribution of beta-Lactamase A (blaA) and beta-Lactamase B (blaB) Genes in Enteropathogenic *Yersinia* Species. *Microb. Drug Resist.* **17:** 575.

Bottone E.J. (1977). *Yersinia enterocolitica* : à panoramic view of a charismatic microorganism, CRC. *Crit. Rev. Microbiol.* **5:** 211-222.

Bottone E.J. (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* **10** : 257-266.

Bottone E.J. (1999). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microb. Infect.* **1:** 323-333.

Boumessrane R., Rabhi S. (2018). Etude et identification de *Yersinia enterocolitica*. Détermination des profils antibiotypiques et électrophorétiques de l'ADN total. Mémoire master : Microbiologie. Université Mentouri Constantine. 78p.

Boulhlib S., Benrahma M. (2013). Caractérisation et étude de l'antibiorésistance de *Yersinia enterocolitica*. Mémoire master : Microbiologie. Université Mentouri Constantine. 42p.

Bourgeois C. M., Mescle J. F., Zucca J. (1996). Microbiologie alimentaire aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. France. 166p.

Brouqui P., Raoult D. (2001). Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **14:** 177.

C

Carniel E., Autenrieth I., Cornelis G., Fukushima H., Guinet F., Isberg R., Pham J., Prentice M., Simonet M., Skurnik M., Wauters G. Y. (2006). *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*, in : **Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E.** (Eds.), *The Prokaryotes*, Springer, Dworkin, New York, 278 p.

Chart H., Cheasty T. (2006). The serodiagnosis of human infections with *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **47:** 391.

Cyril S., Elisabeth C. (2008). Les diarrhées d'origine bactérienne : le cas de *Yersinia enterocolitica*. Elsevier masson. France. 49.

D

De Boer E. (1992). Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods. *Int. J. Food. Microbiol.* **17**: 75.

Devenish J.A., Schiemann D.A. (1981). An abbreviated scheme for identification of *Yersinia enterocolitica* isolated from food enrichment on CIN (cefsulodin-irgasanovobiocin) agar. *Can. J. Microbiol.* **27**: 937-940.

Doyle M.P. (1985). Food-borne pathogens of recent concern. *Annu. Rev. Nutr.* **5**: 25-30.

Doyle M.P., Hugdahl M.B. (1983). Improved procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from meats. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 127.

Durisin M.D., Ibrahim A., Griffiths M.W. (1997). Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in milk and pork using a DIG-labelled probe targeted against the yst gene. *Int. J. Food. Microbiol.* **37**: 103-108.

E

Eiss J. (1975). Selective culturing of *Yersinia enterocolitica* at a low temperature. *Scand. J. Infect. Dis.* **7**: 249.

Estrada C.S., Velázquez C., Favier G.I., Genaro M.S., Escudero M.E. (2012). Detection of *Yersinia spp.* in meat products by enrichment culture, immunomagnetic separation and nested PCR. *Food. Microbiol.* **30**: 157.

F

Fauchère J. L., Avril J. L. (2002). Bactériologie générale et médicale. France. 189 P.

Foley S.L., Lynne A.M., Nayak R. (2009). Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect. Genet. Evol.* **9**: 430.

François D., Marie-Cécile P., Christian M., Édouard B., Roland Q. (2011). Bactériologie médicale Techniques usuelles. 2^e édition. Paris. 400-403p.

Frederiksen W. (1964). A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria ("*Bacterium enterocoliticum*" and "*pasteurella X*"). NU (ed). 11-50.

Fredriksson-ahomaa M., Korte T., Korkeala H. (2001). Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 to pets via contaminated pork. *Lett. Appl. Microbiol.* **32** (6): 375-378.

Fredriksson-Ahomaa M., Korkeala H., (2003). Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem, *Clin. Microbiol. Rev.* **16**: 220-227.

Fredriksson-Ahomaa M., Carnela N., Hachler H., Stephan R. (2012). *enterocolitica* strains associated with human infections in Switzerland 2001-2010. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**: 1543-1550.

Fukushima H., Shimizu S., Inatsu Y. (2011). *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* detection. *foods. J. Pathog.* 735308. DOI: 10.4061/2011/735308.

Fukushima H. (1987). New selective agar medium for isolation of virulent *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1068 –1073.

G

Galindo C.L., Rosenzweig J.A., Kirtley M.L., Chopra A.K. (2011). Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human *Yersiniosis*. *J. Pathog.* **2011**:182051.

Garzetti D., Susen R., Fruth A., Tietze E., Heesemann J., Rakin A. (2014). A molecular scheme for *Yersinia enterocolitica* patho-serotyping derived from genome-wide analysis. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**: 275.

Guarino A., Ashkenazi S., Gendrel D., Vecchio A.L., Shamir R., Szajewska H. (2014). European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases Evidence-based Guidelines for the Management of Acute Gastroenteritis in Children in Europe: Update 2014. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **34**: 375.

Guinet F., Carniel E., Leclercq A. (2011). Transfusion-transmitted *Yersinia enterocolitica* sepsis. *Clin. Infect. Dis.* **53**: 583-587.

Guiraud J., Philippe J. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire, France 138p.

Guiraud J.P. (2012). Microbiologie alimentaire. Paris. 255p.

H

Hallanvuori S., Peltola J., Heiskanen T., Siitonen A. (2006). Simplified phenotypic scheme evaluated by 16S rRNA sequence for differentiation between *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like species, *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1077-1080.

Hart T., Paul S. (1997). Atlas de Poche de microbiologie : Médecine Sciences Flammarion. Paris. 133p.

J

Jiang G.C., Kang D.H., Fung D.Y. (2000). Enrichment procedures and plating media for isolation of *Yersinia enterocolitica*. *J. Food Prot.* **63**: 1483–1486.

John D., Perry M. (2017). A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. *Clin. Microbiol. Revi.* **30 (2)**: 452.

K

Kaasch A.J., Dinter J., Goeser T., Plum G., Seifert H. (2012). *Yersinia pseudotuberculosis* bloodstream infection and septic arthritis: case report and review of the literature. *Infection* **40**: 185-190.

Kandolo K., Wauters G. (1985). Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms. *J. Clin. Microbiol.* **21**: 980–982.

L

Leclercq A. (2003). Le genre *Yersinia* et son incidence dans le domaine alimentaire, Cours de l'Institut Pasteur de Lille. Institut Pasteur de Lille. 35p.

Letellier A., Messier S., Quessy S. (1999). Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoir. *J. Food Prot.* **62**: 22-25.

Linde H.J., Neubauer H., Meyer H., Aleksic S., Lehn N. (1999). Identification of *Yersinia* species by the Vitek GNI card. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 211.

M

Manafi M. (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic media. *Int. J. Food Microbiol.* **60**: 205.

Marks M.I., Pai C.H., Lafleur L., Lackman L., Hammerberg O. (1980). *Yersinia enterocolitica* gastroenteritis: a prospective study of clinical, bacteriologic, and epidemiologic features. *J. Pediatr.* **96**: 26-31.

Le Minor L., Véron M. (1989). Bactériologie médicale : 2^e édition, Edition Flammarion médecine- science. Paris. 404p.

Moriki S., Nobata A., Shibata H., Nagai A., Minami N., Taketani T., Fukushima H. (2010). Familial outbreak of *Yersinia enterocolitica* serotype O9 biotype 2. *J. Infect. Chemother.* **16**: 56-58.

N

Nauciel C., vildé J.I. (2005). Bactériologie médicale. 2^e édition. Paris. 138p.

Neubauer H., Aleksic S., Hensel A., Finke E., Meyer H., (2000). *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form threehomology groups. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**: 61–64.

Nguyen K.T., Kamrun M., Ryoichi K., Takahide T., Hideki H. (2016). Evaluation of Chromogenic Medium for Selective Isolation of *Yersinia*. *Food Hyg. Saf. Sci.* **57(5)**: 166.

Nicolas X., Le Berre R., Ansart S., Tandé D., Lerch C., Garre M., Pennec Y.L. (2015). Bactériémie et pneumopathie à *Yersinia enterocolitica* sérotype O:3 chez un immunocompétent. Médecine et maladies infectieuses. France. 371p.

Niléhn B. (1969). Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease. *Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl.* **206**: 28.

P

Pham J.N., Bell S.M., Hardy M.J., Martin L., Guiyoule A., Carniel E. (1995). Susceptibility to betalactam agents of *Yersinia enterocolitica* biotype 4, serotype O3 isolated in various parts of the world. *J. Med. Microbiol.* **43**:9-13.

Pham J.N., Bell S.M., Martin L., Carniel E. (2000). The β -lactamases and β -lactam antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica*. *J. Antimicrob. Chem. ther.* **46**: 951.

R

Renaud N., Laetitia L., Rene J. C., Michel S., Oliver G. (2013). CHROMagar *Yersinia*, a new chromogenic agar for screening of potentially *Yersinia enterocolitica* isolates in stools. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 1184–1187.

Renaud N., Lecci L., Courcol R., Simonet M., Gaillot O. (2012). 3896 Microbiology Laboratory, Lille University Hospital. LILLE. France. 1.

Rizzardi K., Wahab T., Jernberg C. (2013). Rapid subtyping of *Yersinia enterocolitica* by matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for diagnostics and surveillance. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 4200-4203.

Rosner B.M., Werber D., Hohle M., Stark K. (2013). Clinical aspects and self-reported symptoms of sequelae of *Yersinia enterocolitica* infections in a population-based study, Germany 2009-2010. *BMC Infect. Dis.* **13**: 236.

S

Savin C., Carniel E. (2008). Les diarrhées d'origine bactérienne : le cas de *Yersinia enterocolitica*. *Revue Francophone des Laboratoires*. **2008**: 49-58.

Savin C., Leclercq A., Laurent E., Carniel E., Vaillant V. (2003). Enquête nationale sur le diagnostic des infections à *Yersinia* entéropathogènes en France métropolitaine en 2003. Institut Pasteur. Unité de recherche *Yersinia*. CNR de la peste et autres yersiniose. Paris. France. 310p.

Savin C., Leclercq A., Carniel E. (2012). Evaluation of a single procedure allowing the isolation of enteropathogenic *Yersinia* along with other bacterial enteropathogens from human stools. *Plos. One*. **7**: 176.

Schleifstein J.I., Coleman M.B. (1939). An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Pasteurella pseudotuberculosis* and pathogenic for man. *NY State. J. Med.* **39**: 1749-1751.

Schleifstein J.I., Coleman M.B. (1943). *Bacterium enterocoliticum*, Annual Report of the Division of Laboratories and Research New York State Department of Health, Albany. NY. 56

Schiemann D.A. (1979). Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can. J. Microbiol.* **25**: 1298.

Schiemann D.A. (1982). Development of a two-step enrichment procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 14-17.

Schiemann D.A. (1983). Comparison of enrichment and plating media for recovery of virulent strains of *Yersinia enterocolitica* from inoculated beef stew. *J. Food Prot.* **46**: 957-964.

Schiemann D.A. (1989). *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In: Doyle MP (Ed.), *Foodborne Bact. Pathog.* Marcel Dekker. New York. **15**: 601-622.

Sieper J., Kingsley G.H., Marker H.E. (1996). Aetiological agents and immune mechanisms in enterogenic reactive arthritis. *Clin. Rheumatol.* **10**: 105.

Sihvonen L.M., Jalkanen K., Huovinen E., Toivonen S., Corander J., Kuusi M., Skurnik M., Siitonen A., Haukka K. (2012). Clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A represent two phylogenetic lineages with differing pathogenicity-related properties. *BMC. Microbiol.* **12**: 208.

Stahlberg T.H., Heesemann J., Granfors K., Toivanen A. (1989). Immunoblot analysis of IgM, IgG, and IgA responses to plasmid encoded released proteins of *Yersinia enterocolitica* in patients with or without *Yersinia* triggered reactive arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **48**: 577.

Références bibliographiques

Tan L.K., Peck T.O., Elisabeth C., Kwai, L.T. (2014). Evaluation of a modified Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin agar for isolation of *Yersinia spp.* *Plos. One.* **9(08):** 01.

W

Wauters G., Goossens V., Janssens M., Vandepitte J. (1988). New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 from pork. *Appl. Environ. Microbiol.* **54:** 851-854.

Wauters G. (1973). Improved methods for the isolation and the recognition of *Yersinia enterocolitica*. *Contr. Microbiol. Immunol.* **2:** 68-70.

Wauters G., Kandolo K., Janssens M. (1987). Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contri. Microbiol. Immunol.* **9:**14-21.

Weagant S.D. (2008). A new chromogenic medium for detection of potentially virulent *Yersinia enterocolitica*. *J. Microbiol. Meth.* **72:**185–190.

Z

Zheng H., Sun Y., Mao Z., Jiang B. (2008). *Y. enterocolitica* infection in diarrheal patients. *Clin. microbiol. inf. dis.* **27:** 741.

ANNEXES

Annexe : 01

Matériel de laboratoire

➤ *Matériel de stérilisation*

Four Pasteur (1)

Bec Bunsen (2)

Autoclave (3)

➤ *Matériel de pesée*

Balance de précision (4)

➤ *Matériel d'incubation*

Etuves à 25°C, 30°C et 37°C (5)

➤ *Matériel divers*

Pipettes Pasteur (6)

Poire (7)

Becher (8)

Boîtes de Pétri (9)

Lames d'agglutination (10)

Flacons (11)

Vortex (12)

Réfrigérateur (13)

Pince (14)

Spatule (15)

Microscope optique (16)

Bain-marie (17)

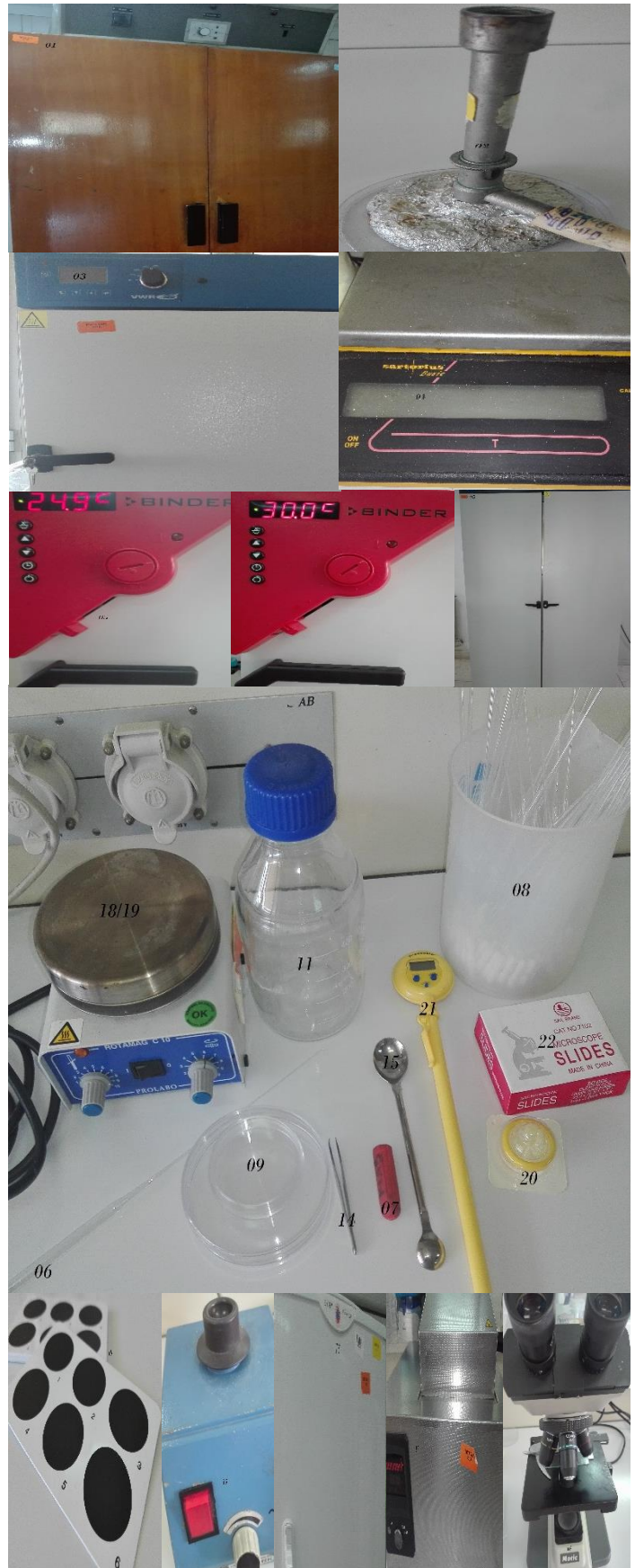
Plaque chauffante (18)

Agitateur magnétique (19)

Filtre à seringue (20)

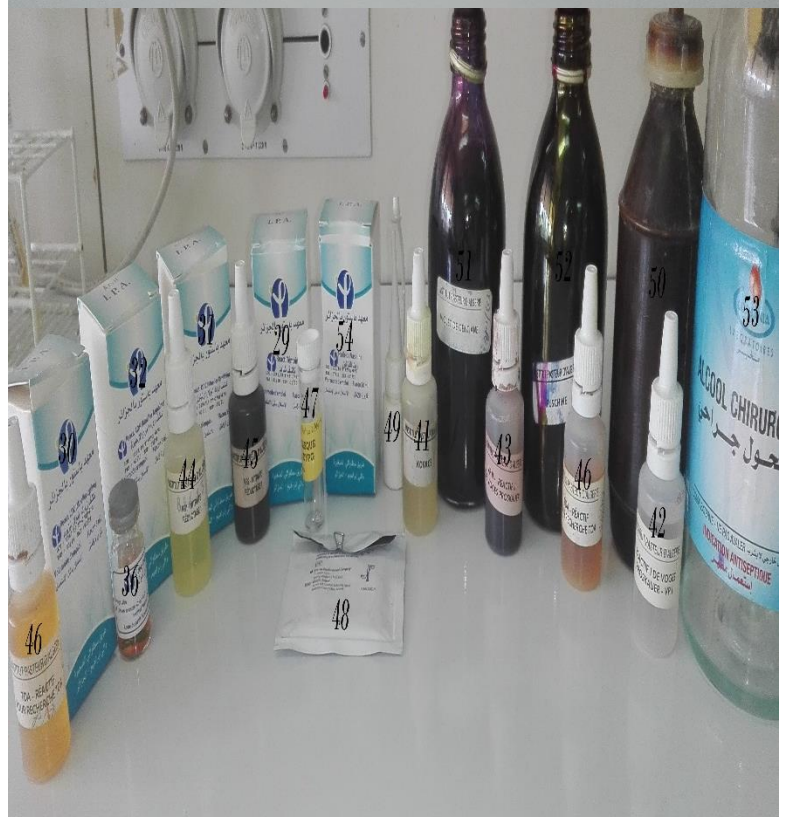
Thermomètre (21)

Lames (22)



➤ *Milieux de cultures et réactifs*

- Gélose Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (23)
- Gélose nutritive ordinaire (24)
- Gélose / Milieu déshydratée / Supplément CHROMagar *Yersinia enterocolitica* (25)
- Bouillon Mac Conkey (26)
- Bouillon infusion Cœur cerveau (BHIB) (27)
- Bouillon nitrate (28)
- Milieu Moeller et Falkow (29)
- Milieu Moeller Lysine (30)
- Milieu Moeller Ornithine (31)
- Milieu Moeller Arginine (32)
- Milieu Triple Sugar Iron Agar (TSI) (33)
- Milieu Mannitol-Mobilité (34)
- Milieu Citrate de Simmons (35)
- Milieu Urée-indole (36)
- Milieu Clarck et Lubs (37)
- Galerie API 20E (38)
- Eau distillé stérile (39)
- Eau physiologique (40)
- Réactif de Kovacs (41)
- Réactif VP I Alpha naphtol à 6% (42)
- Réactif VP II KOH à 40% (43)
- Nitrate réductase I acide sulfanilique (44)
- Nitrate réductase II Naphtylamine (45)
- Réactif TDA (Tryptophane désaminase) (46)
- Disques d'ONPG (47)
- Disques d'oxydase (48)
- Huile a immersion (49)
- Lugol (50)



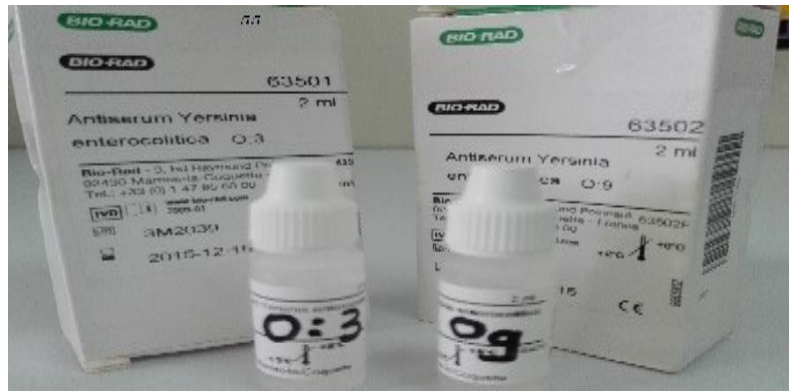
Violet de Gentiane (51)

Fuschine (52)

Alcool (53)

Huile de vaseline (54)

Antisérum *Yersinia enterocolitica* (55)



Annexe : 02

Milieux de Culture

Cefsulodine-Irgasane-Novobiocine (CIN)	
Peptone de viande	17 g/L
Peptone de caséine	3 g/L
Extrait de levure	02 g/L
Mannitol	20 g/L
Pyruvate de sodium	01 g/L
desoxycholate de sodium	0.5 g/L
Sulfate de magnesium	0,01 g/L
Mélange de sels biliaires	1 g/L
Rouge neutre	0,03 g/L
Cristal violet	0,001 g/L
Agar	18g/L
Cefsulodine	15 µg
Irgasan	4 µg
Novobiocine	2,5 µg
CHROMagar <i>Yersinia enterocolitica</i>	
Base (B)	
Agar	15.0 g/L
Peptones	20.0 g/L
Sels	5.0 g/L
Mix Chromogénique	1.3 g/L
Supplément (S)	
Mix Sélectif	0.1 g/L
Milieu Gélose nutritive	
Extrait de viande	1.0 g/l
Extrait de levure	2.5 g/l
Peptone	5.0 g/l
Chlorure de sodium	5.0 g/l
Agar	15.0 g/l
pH	7
Milieu Gélose T S I	
Mélange de peptones	18g/l
Extrait de levure	3 g/l
Extrait de viande	4 g/l
Lactose	10g/l
Saccharose	10g/l
D-glucose	1g/l
Chlorure de sodium	5g/l
Citrate d'ammonium ferrique	0.3g/l
Thiosulfate de sodium	0.3g/l
Rouge de phénol	0.025g/l
Agar	14g/l
Milieu Mannitol-Mobilité	
Peptone	20g/l
Nitrate de Potassium	1g/l
Mannitol	2 g/l
Rouge de Phénol à 1%	4ml
Agar	4 g/l
pH	8, 1

Milieu Citrate de Simmons	
Sulfate de Magnésium	0,2g/l
Phosphate mono ammoniacal	1g/l
Phosphate dipotassique	1g/l
Citrate de Sodium	2g/l
NaCl	5g/l
Bleu de bromothymol	80mg/l
Agar	12g/l
pH	6,8
Milieu Urée-indole	
L-tryptophane	3g/l
Phosphate monopotassique	1g/l
Phosphate bipotassique	1g/l
NaCl	5 g/l
Urée	20 g/l
Alcool 95°	10ml
Rouge de phénol	25ml
pH	6,7
Milieu Clark et Lubs	
Peptone tryptique	5 à 7g/l
Glucose	5g/l
Phosphate bipotassique	5g/l
pH	7
Bouillon Nitraté	
Infusion coeur-cervelle	25g/l
Nitrate de sodium	10 g/l
pH	7,2 g/l
Milieu Mac Conkey	
Peptone	20 g/l
Lactose	10 g/l
Sels biliaires n°3	1.5 g/l
Cristal violet	0.001 g/l
Rouge neutre	0.05 g/l
Chlorure de sodium	05 g/l
pH	7.1
Milieu Moeller	
Peptone	05 g/l
Extrait de viande	05 g/l
BCP	0.1 g/l
Rouge de crésol	05mg
Pyridoxal	05mg
pH	6

Annexe : 03

Réactifs utilisés

Réactif de Kovacs	
P-dimethyl aminobenzaldéhyde	7g/l
Alcool amylique	75ml
Acide chlorhydrique concentré	20ml
Réactif de Voges-Proskauer	
VP I	
Hydroxyde de Potassium	40g/l
Eau	100ml
VP II	
α -naphtol	6 g/l
Ethanol	100ml
Réactif TDA	
Perchlorure de fer	3,4g/l
Eau distillée stérile	100ml
Réactif pour la recherche de la Nitrate réductase (NR)	
Réactif I	
Acide sulfanilique	0,8g/l
Acide Acétique 5N	100ml
Réactif II	
Naphtylamine	0,5 g/l
Acide acétique 5N	100ml
Lugol	
Iode	01g
Iodure de potassium	02g
Eau distillée	300ml
Disque ONPG	
Disque de papier filtre stérile imprégné de tampon et de l'ortho-nitro-phényl-galactoside	
Réactif de la recherche d'oxydase	
Disque imprégné d'une solution à 1% de chlorhydrate de Tetraméthylparaphénylène-diamine.	

Annexe : 04

Colorants

Violet de Gentiane	
Violet de Gentiane	01g
Ethanol a 90%	10ml
Phénol	0.2g
Eau distillée	100ml
Fuschine	
Fuschine basique	01g
Alcool éthylique à 90°	10ml
Phénol	05g
Eau distillée	10ml

Annexe : 05
Coloration de Gram

Prélèvement

-A partir d'une culture liquide : prélever un aliquote de suspension à l'anse (ou à la pipette stérile) après avoir homogénéisée 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)

2. Réalisation du frottis

Etaler sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame. Le frottis réalisé doit être :

- Mince et homogène, étendu sur la lame sans toucher les bords
- Réalisé sur une lame propre et dégraissée, une goutte d'eau déposée en surface doit s'y étaler complètement.

3. Séchage

- à la température du laboratoire, si possible
- ou bien à chaleur douce : platine chauffante à 37° ou au-dessus de la veilleuse du bec bunsen, à hauteur suffisante.

NB : Ne jamais chauffer brutalement

4. Fixation

But : tuer les bactéries, fixer leur structure cytotologique, et les faire adhérer à la lame. Fixation par la chaleur :

- à utiliser seulement pour les frottis effectués à partir de **cultures bactériennes**
- passer la lame-**frottis situé sur le dessus** dans la flamme chauffante, lentement et 3 à 4 fois de suite (attention de bien tenir la lame avec une pince) et laisser refroidir.

Fixation par l'alcool : employé **quel que soit le produit traité**. Recouvrir la lame pendant 5 min avec de l'alcool puis rincer à l'eau déminéralisé et égoutter le frottis avant coloration.

5. Coloration

Principe : La coloration permet de distinguer les bactéries Gram + des Gram – grâce à leurs différences de nature de paroi.

Tableau I : Etapes et principe de la coloration de Gram.

Étapes	Mode opératoire	Temps	Principe
Coloration primaire	- Recouvrir la lame de crystal violet ou violet de gentiane - Rincer à l'eau distillée	1 minute	Le colorant violet pénètre dans les cellules bactériennes
Mordantage	- Recouvrir de Lugol - Rincer à l'eau distillée et l'égoutter	1 minute	Il se forme un complexe chimique entre le violet et le Lugol qui fixe le violet et colore le cytoplasme de toutes les bactéries en violet.
Décoloration	-Tenir la lame inclinée et faire couler pendant quelques secondes de l'alcool à 95° jusqu'à écoulement incolore. - Rincer immédiatement à l'eau distillée et égoutter	30 seconds	L'alcool dissout le violet de gentiane, si la paroi bactérienne est perméable à l'alcool (les lipides sont dissous par l'alcool), celui-ci pénètre dans les bactéries et décolore leur cytoplasme : les bactéries deviennent incolores. Si les bactéries ont une paroi imperméable à l'alcool (épaisse et sans lipides), elles restent colorées en violet et elles sont dites Gram +.
Coloration secondaire	- Recouvrir la lame de fuschine - Rincer à l'eau distillée	1 minute	La fuschine recolore en rose les bactéries précédemment décolorées : les bactéries Gram -.
Séchage	- Egoutter entre 2 morceaux de papier filtre et laisser sécher		

Observation microscopique

Observer à l'objectif x 100, en immersion.

Annexe : 06
Galerie API 20 E

Tableau II : Tableau d'identification de la galerie API 20 E.

Tubes	Réaction		Commentaires
	Positif	Négatif	
ONPG	Jaune	Incolore	Une teinte jaune pâle est souvent obtenue, la considérer comme une réaction négative
ADH	Rouge	Jaune	
LDC	Rouge	Jaune	
ODC	Rouge	Jaune	
CIT	Turquoise ou bleu foncé	Vert pâle ou jaune	La lecture se fait dans la partie supérieure de la cupule (en aérobie)
H₂S	Dépôt noir	Aucun dépôt noir	
URE	Rouge ou rose	Jaune	
TDA	Brun-rouge	Jaune	Ajouter 1 goutte de chlorure de fer a 10%. Lire immédiatement la réaction
IND	Anneau rouge	Jaune	Ajouter 1 goutte du réactif de covaks, lire la réaction immédiatement
VP	Rose foncé ou rouge	Incolore ou rose pale	Ajouter 1 goutte de KOH a 40% puis 1 goutte d'alpha-naphtol a 6%. Lire la réaction après 10 minutes.
GEL	Diffuse du pigment	Aucune diffusion. Incolore	La répartition des particules solides à travers la cupule doit être considérée comme une réaction négative
GLU	Jaune	Bleu ou bleu-vert	La fermentation des sucres commence dans la partie la plus anaérobique du microtube (partie inferieur). Il faut lire ces réactions à partir de la base de la cupule vers le haut. Une couleur jaune au fond indique une réaction positive.
MAN			
INO			
SOR			
RHA			
SAC			
MEL			
AMY			
ARA			

Annexe : 07

Résultats d'identification

N° d'ordre	N° de souche	Souche	CIN		CHROMagar		Uréa (2h)	Indol	TDA	GLY	Sacch	Lac	H2S	CO2	CS	NR	Man		Mob		Oxydase	Vp		ADH		LDC		ODC		ONPG		Sérotypage								
			24h	48h	24h	48h											25°C	37°C	25°C	37°C		25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	O:3	O:9	Auto-Ag								
Témoin (boite vide)		<i>Y. entérocolitica</i>	Stérile		Stérile																																			
Y.E. Biotype 2/O:9 TP 383		<i>Y. entérocolitica</i>	A. typiques B.lisses 1mm	plat, rose , b.lisses, pas de conteur 2mm	C, Mauve, c, translucide, b. lisses 0,8mm	C, Mauve, c translucide, b. lisses, légèrement bombées 1,5mm	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-					
Y.P. Sérotype I TP 32427		<i>Y. pseudotuberculosis</i>	A. typiques B.lisses 0,8mm	légèrement bombées, rose centre foncés, b.légèrement régulières, pas de conteur 1,5-2mm	C, bleues-Mauve, b.lisses, c. translucide 0,5mm	C. bleues-Mauve, b.lisses, c translucide, légèrement bombées 0,8mm	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Y.E. Biotype 1A/O:5 TP 33698		<i>Y. entérocolitica</i>	A. typiques B.lisses 1mm	Plat, rose pale, b.lisses, pas de conteur 2mm	C, bleu vert 0,5mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c translucide, légèrement bombées 0,1mm	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	±	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Y.E. Biotype 4/O:3 TP 33696		<i>Y. entérocolitica</i>	A. typiques B.ligèrement régulières 1mm	plat, rose pale, b.légèrement régulières, pas de conteur 2mm	C, Mauve 0,8mm	C, Mauve, conteur translucide, b lisses 1,5	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
1	01.94	<i>Y. entérocolitica</i>	A. typiques B.lisses 1mm	légèrement bombées, rose pale, b.lisses, pas de conteur 2mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide 1mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide, légèrement bombées 1mm	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-			
2	02.94	<i>Y. entérocolitica</i>	A. typiques B.lisses 0,5mm	légèrement bombées, rose pale, b.lisses, pas de conteur 0,8mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide 1mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide, légèrement bombées 1mm	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
3	03.94	<i>Y. entérocolitica</i>	A. typiques B.lisses 0,8mm	légèrement bombées, rose foncées, b.régulières, pas de conteur 2mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide 1mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide, légèrement bombées 1,5mm	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
4	05.94	<i>Y. entérocolitica</i>	A. typiques B.lisses 1mm	légèrement bombées, rose pale, b.lisses, pas de conteur 1,5	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide 1mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide 1mm	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
5	06.94	<i>Y. entérocolitica</i>	A. typiques B.lisses 0,5mm	légèrement bombées, rose, b.lisses, pas de conteur 1mm	C. bleues métalliques, c. translucide 0,3mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide 1mm	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
6	07.94	<i>Y. entérocolitica</i>	A. typiques B.lisses 0,9mm	légèrement bombées, rose pale, b.lisses, pas de conteur 1mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide 1mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide 1mm	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
7	08.94	<i>Y. entérocolitica</i>	A. typiques B.lisses 0,9mm	légèrement bombées, rose foncées, b.lisses, pas de conteur 1,5mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide 1mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. bleu vert 1,5mm	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	±	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
8	09.94	<i>Y. entérocolitica</i>	A. typiques B.lisses 1mm	légèrement bombées, rose, b.régulières, pas de conteur 1mm	Colonies Mauve, c. translucide, b. lisses 0,8mm	C, Mauve a centre foncé, c. translucide, b. régulières, plat 2,5mm	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-		
9	10.94	<i>Y. entérocolitica</i>	A. typiques B.lisses 0,7mm	légèrement bombées, rose, b.lisses, pas de conteur 0,9mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide 1mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. bleu vert 1mm	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
10	11.94	<i>Y. entérocolitica</i>	A. typiques B.lisses 1,5mm	c, bleu metaliques, b.lisses, c translucide 0,5mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide 1mm, légèrement bombées	C. bleues métalliques, b. régulières, c. translucide 0,5mm	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-			
11	12.94	<i>Y. entérocolitica</i>	A. typiques B.lisses 1,5mm	légèrement bombées, rose, b.lisses, pas de conteur 2- 2,5mm	C. bleues métalliques, c. translucide QQ c; transparentes 0,5mm	C. bleues métalliques, b.lisses, c. translucide 1mm	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	±	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-			

Résumés

Résumé

Les biotypes de *Yersinia enterocolitica* entéropathogènes sont responsables chaque année dans le monde de nombreux cas d'infections intestinales. La recherche de *Yersinia enterocolitica* lors d'une coproculture peut être difficile à mettre en œuvre.

Nous proposons ici un milieu chromogénique, le CHROMagar *Yersinia enterocolitica* (CAYe) qui permettrait de faciliter la détection des souches entérovirulentes, Les isolats des sérotypes pathogènes ont donné des colonies mauves typiques, contrairement au isolats avirulents testés qui poussaient sous forme de colonies bleues.

Ce travail vise à caractériser cinquante souches de *Y.enterocolitica* sur le plan morphologique, physiologique et sérologique ainsi en comparant le milieu CAYe au milieu le plus couramment utilisé dans les laboratoires pour la recherche en routine de *Yersinia enterocolitica*, le milieu Cefsulodine-Irgarasan-Novobiocine (CIN). Les 50 souches testées ont été poussé aussi bien sur les deux milieux. Ainsi, en se basant sur la spécificité du milieu CAYe qui est de (98.04%) qui est supérieure à celle de CIN (94,34%).

Donc, le milieu CAYe peut être recommandé pour la recherche de *Yersinia enterocolitica* entéropathogène.

Mots clés : *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica* pathogène, CHROMagar *Yersinia enterocolitica*, CIN.

Abstract

The biotypes of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* are responsible for many cases of intestinal infections every year in the world. The search for *Yersinia enterocolitica* during a stool culture may be difficult to implement.

Here we propose a chromogenic medium, CHROMagar *Yersinia enterocolitica* (CAYe), which would facilitate the detection of enterovirus strains. Isolates of the pathogenic sérotypes gave typical purple colonies, in contrast to the tested isolates that grew as blue colonies.

This work aims to characterize fifty strains of *Y. enterocolitica* morphologically, physiologically and serologically and comparing CAYe medium to the medium most commonly used in laboratories for the routine research of *Yersinia enterocolitica*, the Cefsulodine-Irgarasan-Novobiocin medium. (CIN). The 50 strains tested were grown on both media as well. Thus, based on the specificity of CAYe medium which is (98.04%) which is higher than that of CIN (94.34%).

Therefore, CAYe medium may be recommended for research of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica*.

Key words : *Yersinia enterocolitica*, pathogenic *Yersinia enterocolitica*, CHROMagar *Yersinia enterocolitica*, CIN.

ملخص

تعتبر الأنماط الحيوية ليرسينيا القولون الضارة مسؤولة عن العديد من حالات العدوى المعوية كل عام في العالم. قد يكون من الصعب البحث عن يرسينيا القولون في عينات البراز.

نقترح هنا الوسط (CAYe) *CHROMagar Yersinia enterocolitica* الذي من شأنه تسهيل الكشف عن السلالات الضارة. الأنماط المصلية المسببة للأمراض أعطت مستعمرات بنفسجية اللون، على عكس الأنماط المصلية الغير مسببة للأمراض أعطت مستعمرات زرقاء اللون.

يهدف هذا العمل إلى تمييز خمسين سلالة من يرسينيا القولون من الناحية الشكلية، الفيزيولوجية والمصلية، وكذلك مقارنة الوسط CAYe والوسط الأكثر شيوعا في المخابر السفزيليودين-الإرغازان-التوفوبايوسين (CIN) بهدف البحث الروتيني عن يرسينيا القولون. الخمسين سلالة التي تم اختبارها نمت على كلا الوسطين. ونركز كذلك على خصوصية الوسط CAYe التي تقدر بـ: (98.04%) والتي هي اعلى من خصوصية الوسط CIN (94.34%).

لذلك، قد يوصى باستخدام الوسط CAYe للبحث عن التهاب الأمعاء المعوي الناجم عن يرسينيا القولون.

الكلمات المفتاحية: يرسينيا القولون، يرسينيا القولون المسببة للأمراض، *CHROMagar Yersinia enterocolitica*، CIN.