

LA LYSOTYPYIE D'UNE IMPORTANTE COLLECTION DE SOUCHES DE YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Dr. Pierre Nicolle

INTRODUCTION

Les résultats que nous mentionnons ici se rapportent aux recherches effectuées depuis 1964 jusqu'au 1er juillet 1974 à l'Institut Pasteur de Paris par trois équipes travaillant en étroite liaison: celle du Professeur L. Le Minor, chef du Service des Entérobactéries, pour la préparation des nombreux sérums spécifiques des antigènes somatiques et flagellaires de l'espèce bactérienne encore peu connue *Yersinia enterocolitica*; celle du Professeur agrégé H.H. Mollaret, directeur de Centre National de la Peste, de la Pseudotuberculose et de la Tularemie et ses collaborateurs scientifiques et techniques (par ordre alphabétique: les Drs Jean-Michel Alonso, Jacques Bejot et Hervé Bercovier, Mmes Jacqueline Brossollet, Arlette Francois et Renée Nicolas), pour l'isolement, la purification, l'étude des caractères biochimiques et sérologiques les souches isolées: au laboratoire à partir des prélèvements biologiques, ou la confirmation du diagnostic des souches recues de l'extérieur, la bibliographie et le secrétariat; enfin celle que nous formons, Mme Jacqueline Brault et moi pour toutes les questions concernant les Bactériophages actifs sur l'espèce bactérienne en question: isolement de ces phages à partir des souches lysogènes de la même espèce et de l'eau d'égout.

La comparaison des lysotypes et des sous-types ainsi reconnus avec d'une part les provenances géographiques et zoologiques des souches et d'autre part les résultats de leur analyse biochimique et sérologique, a révélé, dans plusieurs cas, des subdivisions particulièrement précieuses pour les recherches épidémiologiques des infections humaines et animales à *Y. enterocolitica*.

* Conférence prononcée le 14 octobre 1974 à l'Institut Pasteur de Teheran par le Docteur Pierre NICOLLE, ancien Chef du Service des Bactériophages de l'Institut Pasteur de Paris, fondateur du Centre National français de la Lysotypie Enterique et secrétaire de la Fédération Internationale pour la Lysotypie Enterique. Cette conférence était traduite en iranien, au fur et à mesure, par le Professeur Abdollah HABIBI.

PLACE DE L'ESPECE *Y. ENTEROCOLITICA* DANS LA CLASSIFICATION BACTERIOLOGIQUE

L'ancien genre *Pasteurella* de la famille des *Parvobacteriaceae*, a été scindé, il y a peu de temps, en trois groupes: le premier, qui seul a gardé le nom primitif, comprend une dizaine d'espèces parmi lesquelles *P. multocida* (syn. *septica*), *P. pneumotropica*, *P. haemolytica*, *P. ureae*, *P. anatipestifer* et quelques autres; le second groupe a été nommé *Yersinia* suivant une proposition déjà ancienne de J.J. Van Loghem. Il comprend *Y. pestis* (agent de la peste, antérieurement appelé *Pasteurella pestis*), *Y. pseudotuberculosis*, ou bacille de Malassez et Vignal (agent de la pseudotuberculose) et *Y. enterocolitica*; c'est cette dernière qui fait l'objet principal de ce travail. La tendance actuelle est de la détacher des *Parvobactériacées* et de l'inclure dans les *Entérobactériacées*. Le troisième groupe porte aujourd'hui le nom de *Francisella*. On ne lui compte encore qu'une seule espèce: *F. tularensis*, agent de la tularémie.

LA YERSINIOSE ENTEROCOLITIQUE, ZOONOSE D'AVENTIR (*)

"De connaissance récente puisque son apparition, réellement explosive dans le monde animal puis en pathologie humaine, ne remonte qu'à 1958, l'infection à *Y. enterocolitica* n'a cessé depuis lors de s'étendre d'une façon impressionnante *(12).

L'attention avait été attirée d'abord sur ce germe par les bactériologistes vétérinaires, à la suite de nombreux cas épars chez le Lièvre, puis de graves épizooties survenues en plusieurs points du monde dans des élevages de chinchillas. On l'a trouvée aussi chez d'autres animaux plus ou moins sensibles à l'infection. Le porc, notamment, chez lequel les manifestations morbides sont extrêmement discrètes, pour ne pas dire nulles, n'est souvent qu'un porteur de germes.

Depuis une douzaine d'années, les bactériologistes médecins ont pris la relève des vétérinaires, car on a découvert que l'infection humaine n'était pas rare dans certaines régions: les Pays Scandinaves, la Hollande et surtout la Belgique qui a battu de loin tous les records pour le nombre de souches envoyées au laboratoire d'Henri Mollaret. Elle existe aussi en France, en Tchécoslovaquie, en Hongrie, en Roumanie, en Pologne, au Japon, au Canada et en Afrique du Sud. Si elle paraît moins fréquente en Allemagne, aux États-Unis et en U.R.S.S., c'est probablement parce qu'on ne l'a pas activement recherchée dans ces pays.

SYMPTOMATOLOGIE DE L'INFECTION A *Y. ENTEROCOLITICA* ET ISOLEMENT DE L'AGENT ETIOLOGIQUE

Chez les animaux, l'infection à *Y. enterocolitica* est, dans son ensemble, comparable à l'infection à *Y. pseudotuberculosis*.

Chez l'Homme, certains aspects de la maladie rappellent aussi les manifestations observées dans l'infection humaine par ce dernier germe: adénite mésentérique simulant parfois la crise d'appendicite aigue, sans altération anatomopathologique de l'appendice, érythème noueux à prédominance féminine, septicémie des sujets physiologiquement déficients ou tarés.

D'autres aspects cliniques quoique pouvant relever de l'une ou de l'autre étiologie sont, par prédilection, l'apanage de l'infection a *Y. enterocolitica*: entéocolite aigue (diarrhée, douleurs abdominales, vomissements, hyperthermie), iléite aigue terminale, polyarthrite aiguë (doigts, genoux, chevilles, orteils) souvent symétrique, avec épanchement intraarticulaire stérile, vitesse de sédimentation accélérée, leucocytose.

Le germe responsable a pu être isolé du sang dans les septicémies, des ganglions mésentériques lorsque l'occasion s'est présentée de les prélever et des selles dans beaucoup d'autres manifestations, y compris les polyarthrites. Il a la possibilité de se maintenir dans la flore intestinalé à distance de l'épisode infectieux.

LE SERODIAGNOSTIC

La séroagglutination constitue une excellente méthode de diagnostic, à condition de ne retenir comme significatifs que des titres supérieurs à 1/100 et surtout de suivre l'évolution des anticorps par deux examens au moins, pratiqués à une semaine d'intervalle. Les anticorps sont habituellement présents à la phase aiguë de l'infection et persistent pendant trois à quatre mois en moyenne. Cette réaction est très spécifique, mais il faut cependant connaître l'existence de relations antigéniques entre le groupe sérologique 0:9 de *Y. enterocolitica* et *Brucella abortus* (H. Mollaret).

LA BACTERIOLOGIE DE *Y. ENTEROCOLITICA*

Comme *Y. pseudotuberculosis* dont elle est morphologiquement très proche, *Y. enterocolitica* se présente sous la forme d'un coccobacille Gram négatif, mobile au-dessous de 29°C et complètement immobile à 37°C et douée d'une activité uréasique importante.

Mais plusieurs autres caractères biochimiques permettent de distinguer l'une de l'autre ces deux espèces: contrairement à *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* fait fermenter le saccharose, possède le plus souvent une ornithine-décarboxylase et n'exerce aucune action sur le rhamnose ni sur l'esculine, bien que nombre de souches soient esculine +.

Y. pseudotuberculosis en principe ne produit pas d'indole. Pour la majorité des souches de Y. enterocolitica, isolées de l'Homme, du Porc, du Lièvre ou du Chinchilla, qui sont sensibles aux phages de lysogénie, la recherche de l'indole est aussi négative. Au contraire certaines souches, principalement humaines et porcines, insensibles à ces phages, donc appartenant, comme nous le verrons plus loin, au groupe X, sont indole positives.

LA FREQUENCE DE LA LYSOGENIE DANS L'ESPECE Y. ENTEROCOLITICA

On sait qu'une bactérie lysogène est capable de perpétuer génétiquement un "prophage" et souvent même plusieurs prophages distincts et de libérer des bactériophages correspondants dans le milieu de culture où elle se multiplie. Quelquefois cette libération n'a pas lieu parce que le milieu n'est pas favorable (milieu synthétique pour B. megatorium lysogène, A. Lwoff et coll. ⁽⁹⁾ ou parce que la bactérie est défective dans sa propriété lysogène. "Dans d'autres cas, les "lysions" libérés (noms que nous avons proposé de donner aux corpuscules élémentaires de la bactériophagie) sont si peu nombreux que la lysogénie risque de passer inaperçue. On peut la rendre plus manifeste en soumettant les cultures à l' "induction" par les rayons ultra-violetts ou par l'addition d'une petite quantité d'eau oxygénée" ^(9,10). La quantité de lysions obtenus par ce traitement peut

être 10 fois, 100 fois, 1000 fois supérieure suivant le degré d'inductibilité des bactéries.

Il faut, pour mettre en évidence la propriété lysogène, disposer aussi, bien entendu, de souches sensibles aux phages libérés.

Nous avons été les premiers ^(11,13,14,16) à signaler que la lysogénie était fréquente parmi les souches de Y. enterocolitica, tandis que divers auteurs et nous-mêmes n'avons jamais réussi, du moins jusqu'à présent, à mettre en évidence la libération de bactériophage par les deux autres espèces du même genre, Y. pestis et Y. pseudotuberculosis.

Ces faits, s'ils sont confirmés par la suite, établiraient une distinction très importante entre ces deux dernières espèces d'une part et la première d'autre part. Cette connaissance pourrait donc aider à confirmer le diagnostic dans certains cas douteux.

Sur un total de 1252 souches de Y. enterocolitica étudiées pour leurs propriétés lysogènes éventuelles, en prenant comme souches révélatrices un échantillon du lysotype IXa, qui jusqu'à maintenant a toujours été dépourvu de ce caractère, 1082 d'entre elles libéraient, avec ou sans induction préalable par l'eau oxygénée, une quantité importante de lysions, ce qui donne le pourcentage très élevé de lysogénie positive de 86.4.

Les variations de fréquence de cette propriété sont modérées suivant les provenances zoologiques des souches (de 70 à 90 %), isolées principalement de l'Homme, du Lièvre, du Chinchilla d'élevage, du Porc et du Singe. En revanche elles sont beaucoup plus amples suivant les origines géographiques des souches. Ainsi en Afrique du Sud, le pourcentage de lysogénie dépasse à peine 0, tandis qu'en Belgique il atteint 90. Nous verrons plus loin que ces variations géographiques de la lysogénie sont directement en relation avec la distribution des lysotypes suivant les régions: certains lysotypes n'étant pas lysogènes, d'autres au contraire l'étant toujours.

GENERALITES SUR LES METHODES DE LYSOTYPES

On sait qu'au moyen de bacteriophages judicieusement choisis, adaptés et dilués, il est souvent possible de reconnaître des variétés nettes et stables parmi les souches d'une même espèce bacterienne. Ce sont les lysotypes.

L'intérêt des différentes méthodes de lysotypie, dont celle de Graigie et - Yen pour le bacille typhique est l'exemple le plus remarquable, est multiple.

— Pratique d'abord en épidémiologie de nombreuses espèces bactériennes hautement pathogènes et contagieuses ces méthodes permettent de dépister avec précision la source ou les sources multiples d'un foyer d'infection; elles permettent de les neutraliser les unes et les autres, quel que soit leur nombre; elles fournissent ainsi les moyens de lutter efficacement contre l'extension de la maladie et, si l'on veut vraiment s'en donner la peine, de parvenir à son éradication complète dans la région considérée.

Elles contribuent de plus, en raison de la spécificité souvent très étroite des bacteriophages utilisés, à confirmer ou à infirmer le diagnostic bactériologique des germes isolés.

Fondamental ensuite: elles renseignent sur les relations qui peuvent exister entre la sensibilité d'un lysotype donné à un phage ou à un groupe de phages et l'affinité de ceux-ci pour celui-là. Dans ce domaine de recherche, le champ des investigations déjà faites, et surtout qui restent à faire, est immense.

— Enfin il est d'une importance certaine, tant du point de vue fondamental que du point de vue pratique, d'établir la liste des lysotypes présents dans un pays et de calculer leurs fréquences respectives pour être en mesure de les comparer à la liste et aux fréquences observées dans les autres régions du monde. Ainsi parviendra-t-on à mieux suivre la marche des épidémies, l'évolution de chacune d'elles, leurs intrications et leurs interférences. La lysotypie apparaît donc comme un nouveau moyen d'étudier ce que Charles NICOLLE a appelé, dans son livre le plus célèbre, le "Destin des Maladies infectieuses".

LA LYSOTYPIE DE *Y. ENTEROCOLITICA*

1^o – Demonstration de la diversité d'action des phages de lysogénie de *Y. enterocolitica* et de la diversité de sensibilité des souches du même germe à ces phages.

Technique: on dépose des gouttes des filtrats des cultures de *Y. enterocolitica* sur des plaques de gélose ensemencées au préalable par étalement de quelques gouttes des cultures à étudier sur toute leur surface. Après incubation de 24 h. à 26-27°C au maximum, la culture s'est développée en formant une mince couche homogène au niveau de laquelle apparaissent, dans l'aire occupée par certaines gouttes de filtrats, de "plages" ou "taches vierges" (en anglais "plaques") c'est-à-dire des trous arrondis, de dimensions et d'aspects très variables d'un phage à l'autre, mais à peu près identiques pour un même phage. Parfois elles sont plus ou moins voilées par une culture secondaire; celle-ci est due à la présence de germes sélectionnés par les phages en raison de leur insensibilité initiale ou devenues résistantes par la lysogenisation.

- a) un filtrat, s'il ne contient qu'une seule variété de phage, n'agit pas sur la souche qui l'a fournie.
- b) le même filtrat peut agir sur un grand nombre d'autres souches, ou seulement sur quelques unes, voire même sur une seule. Les phages des filtrats produisent donc divers spectres d'activité.
- c) en corollaire, les souches présentent divers spectres de sensibilité. Chacun d'entre eux-ci, s'il se répète un certain nombre de fois dans l'étude d'une collection importante, pourra être considéré comme un lysotype.

Ces faits autorisent à penser qu'une lysotypie de *Y. enterocolitica* par les phages de lysogénie est possible. Le tableau I montre les réactions lysogéniques obtenues avec les filtrats des souches lysogènes sur les souches correspondantes.

TABLEAU I

Il s'agit, en quelque sorte, d'une lysotypie par "spécificité négative", dans laquelle le phage correspondant à la souche qui l'a fourni est inactif, comme c'est la règle tant que le phage n'a pas subi d'enrichissement par propagations successives.

2^o – Enrichissement des phages de lysogénie par propagation sur des souches sensibles.

On comprend facilement que les filtrats de souches lysogènes ne peuvent pas être employés pour la lysotypie de nombreuses souches, d'une part parce que leurs volumes s'épuisent rapidement, d'autre part parce qu'elles sont relativement pauvres en phages et que leur conservation, même au réfrigérateur, risque de les appauvrir davantage assez vite. Il est donc nécessaire de les enrichir en les propageant sur les souches sensibles, de telle façon que chacun d'eux fournisse sur la souche correspondante la lyse confluyente (LC) ou au moins un nombre de plages assez grand pour former une lyse semi-confluyente (LC ou LSC).

Les images des actions lytiques acquièrent alors la valeur d'une lysotypie par "spécificité positive", dans laquelle, contrairement au cas précédent, la souche est spécifiquement sensible à l'un des phages employés.

Cependant, la propagation de certains phages, surtout si elle est reproduite plusieurs fois, modifie incontestablement le spectre d'activité de quelques uns d'entre eux, très vraisemblablement en favorisant la prolifération par sélection des éléments les plus actifs (mutants virulents donnant des plages claires) au détriment des formes sauvages dont les plages sont voilées par une nappe plus ou moins épaisse de culture secondaire.

Une suspension de bactériophage n'est pas, en effet, toujours rigoureusement homogène dans ses propriétés, même si elle est pure de toute contamination par un phage étranger. Il ne faut donc pas s'étonner de constater la présence de plages, heureusement peu nombreuses en général, là où théoriquement il ne devrait pas y en avoir, en vertu de la règle admise en principe qui veut qu'un phage de lysogénie aurait été toujours inactif sur la souche dont on l'a extrait. B. Nilehn et C. Ericson (21) ont noté cette action, en apparence paradoxale, de certains phages de lysogénie sur des souches productrices de ces phages.

3^o - Mise au point de la lysotypie de *Y. enterocolitica* au moyen des phages de lysogénie de l'espèce (premier jeu).

Des que nous avons constaté que la lysogénie était fréquente parmi les souches de *Y. enterocolitica* et que les phages isolés des souches lysogènes présentaient des spectres d'activité variés sur les souches de cette espèce, nous avons cherché à mettre au point une lysotypie (11, 13, 14, 16); (tableau II).

TABLEAU II

Nous utilisons actuellement 12 phages de lysogénie qui forment le premier jeu de notre lysotypie. Ils sont désignés par les lettres de a à l. Ces phages sont enrichis par propagation sur des souches sensibles comme il vient d'être dit. Ils sont employés généralement sans dilution préalable, ou peu dilués.

Grâce à eux, notre collection de souches a pu être subdivisée en 11 lysotypes numérotés en chiffres romains de I à VIII, puis IXa (1), IX a(2) et IXb

mier jeu de phages. Chacun de ces 11 lysotypes est, en principe, caractérisé par son image de réactions lytiques. Notons cependant que la stabilité des lysotypes de I à VII (97 souches provenant principalement du Lièvre et du Chinchilla, est assez peu satisfaisante. De plus, un nombre important de souches (857) n'était pas lysotypable par les phages du premier jeu. Nous verrons au paragraphe 3^{ème}, sur ce total, nous avons réussi à en lysotyper 346 par une lysotypie complémentaire.

Souches non lysotypables par le premier jeu de phages

1^o) Souches non caractérisables bien que sensibles aux phages du premier jeu. Nous les avons réunies provisoirement sous les dénominations de groupe IXz (parce qu'elles ressemblent plus ou moins aux lysotypes IXa ou IXb, sans leur être exactement identiques) et de groupe XI, lequel est formé de souches inclassables en raison des multiples images de réaction aux phages, ne correspondant à aucune des images précédemment décrites.

2^o) Souches insensibles aux 12 phages de lysogenie du premier jeu. Ce groupe, très important, se distingue des autres lysotypes et groupes déjà mentionnés non seulement par son insensibilité aux phages du premier jeu, mais aussi par son aptitude à produire de l'indole.

En raison du caractère lysotypique négatif qui réunissait ces souches, son hétérogénéité était fort probable. Nous avons donc cherché à le subdiviser, au moyen d'une série de phages étrangers à la lysogénie de l'espèce *Y. enterocolitica*. Ces phages forment la lysotypie complémentaire du groupe X et constituent le deuxième jeu de la lysotypie.

4^o – Lysotypie complémentaire du groupe X par un deuxième jeu de phages

Nous nous sommes adressés, dans cette intention, à une source extrêmement riche en phages actifs sur de nombreuses espèces bactériennes, l'eau d'égout. À partir d'un seul échantillon prélevé dans le collecteur de Clichy, l'un des principaux égouts parisiens, nous avons isolé une douzaine de phages au moyen desquels nous sommes parvenus à subdiviser le groupe X en 10 sous-groupes (tableau III). Il est évident que ces phages sont moins spécifiques de l'espèce *Yersinia enterocolitica* que les phages extraits des souches lysogènes de cette espèce.

TABLEAU III

Le sous-groupe X₃ (Lysotype X₃)

L'un d'entre ces sous-groupes le X₃, a réuni 346 souches qui possèdent 3 propriétés communes et exclusives: lysotypiques, antigéniques et biochimiques.

Dans ces conditions, bien que ce sous groupe ne soit pas sensible aux phages de lysogénie du premier jeu, nous sommes en droit de le considérer comme un véritable lysotype.

5^o – Considerations sur notre methode de lysotypie de *Y. enterocolitica*

Note méthode de lysotypie de *Y. entérocolitica* n'est certainement pas parfaite dans son état actuel. Nous nous efforcerons de l'améliorer. Mais nous ne dissimulons pas que nous allons au devant de grandes difficultés car, contrastant avec la stabilité très remarquable de la plupart des souches isolées de l'Homme, du Porc, du Singe et du Chien, qui donnent les réactions caractéristiques des lysotypes VIII, IXa, IXb, et X₃, d'autres souches notamment celles qui ont été fournies par le Lièvre et le Chinchilla et dont les réactions sont celles des lysotypes de I à VII, IX_o, IX_z et XI, sont particulièrement instables dans leurs sensibilités aux phages, c'est-à-dire dans leurs caractères lysotypiques. Il est intéressant de noter que cette instabilité va de pair avec une instabilité équivalente dans leurs caractères biochimiques. Cependant, telle qu'elle est, notre méthode a donné, comme on va le voir, des résultats incontestablement intéressants, tant du point de vue bactériologique (en raison de la concordance constatée entre certains lysotypes et leurs caractères biochimiques) que serologique (concordance de certains lysotypes et de certains caractères serologiques) et épidémiologique (concordance entre plusieurs lysotypes et leurs provenances géographique et zoologiques).

C'est pourquoi il nous a paru nécessaire, malgré bien des questions restées obscures, de faire dès maintenant le point des faits acquis avant de poursuivre nos recherches dans de nouvelles directions et en utilisant d'autres techniques.

VARIATION DE FREQUENCE DE LA LYSOGENIE SELON LES ORIGINES ZOOLOGIQUES ET GEOGRAPHIQUES DES SOUCHES DE *Y. ENTEROCOLITICA*

Nous l'avons dit plus haut, sur les 1252 souches de *Y. enterocolitica* étudiées pour ce caractère, 86,4 % ont été reconnues lysogènes. Quoique très élevée, cette proportion est certainement inférieure à la réalité, la lysogénie d'un certain nombre de souches ayant pu passer inaperçue par suite de modifications quelquefois incontrôlables des conditions d'expérimentation (milieux, bougies, ou membranes, température d'incubation etc).

a) Variation de la lysogénie selon les espèces zoologiques

En limitant notre exposé aux résultats obtenus avec les 4 espèces zoologiques les mieux représentées, nous avons constaté que le taux de lysogénie