

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

**Université Mouloud Mammeri, Tizi -Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**

Département de Biochimie-Microbiologie



Mémoire de Fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en sciences biologiques.
Spécialité: Microbiologie Appliquée.

Thème

Prévalence et caractérisation phénotypique (facteurs de virulence et antibiorésistance) des souches d'*Enterococcus* spp. isolées du portage intestinal chez la volaille

Réalisé par

M^{lle} AGRANE LYDIA

M^{lle} AKHEMOUM CHANEZ

M^{me} AKHMOUM NADIA

Soutenu le 06/07/2023 devant le jury composé de :

Présidente : Dr . MGUENNI . N..... Maitre de conférences A (UMMTO).

Promoteur : Dr . TITOUCHE . Y.....Maitre de conférences A (UMMTO).

Examinatrice : Dr. ASMANI . K.....Maitre de conférences A (UMMTO).

Année universitaire : 2022/2023.

Remerciement



MERCI DIEU TOUT PUISSANT

Celui qui nous a donné courage, patience et détermination pour pouvoir accomplir cet humble travail.

A NOTRE ENCADREUR Dr. YACINE TITOUCHE

Travailler sous votre supervision a été un grand plaisir. Nous exprimons notre gratitude et notre appréciation à travers ce travail pour l'attention, la patience et l'engagement dont vous avez fait preuve.

AUX MEMBRES DE JURY

On remercie la présidente du jury Dr. MGUENNI NASSIMA et notre examinatrice Dr. ASMANI KATIA pour l'effort fourni afin d'évaluer notre travail.

AUX PERSONNES SPECIALES

Nos remerciements s'adressent également à Mr MESSADI SAMIR manager d'abattoir «AIN SAR » d'Azazga l'un des abattoirs que nous avons visités, on le remercie énormément pour son accueil chaleureux et son orientation vers d'autres abattoirs, on remercie ainsi Mr CHIKH BRAHIM de nous avoir ouvrir son centre d'élevage et sans oublier le personnel de « SARL DisLab » pour certains consommables de labo et à tous les vétérinaires et à toute personne qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

GRAND MERCI

Dédicaces



J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail

A Ma chère maman

Pour son amour, ses conseils, ses encouragements et ses sacrifices.

A mon père

Pour son soutien, ses efforts, son affection et la confiance qu'il m'a accordée.

A la mémoire de ma chère grand-mère.

A tous les membres de ma famille

Pour l'amour et l'affection qui nous attachent.

A mes deux binômes

Nadia et Chanez

A tous mes amis

De m'avoir toujours accompagné.

Et tous ceux qui m'aiment....

Lydia

Dédicaces

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE

Tu m'as comblé de ta gentillesse et de ton affection dès mon plus jeune âge, tu n'as jamais cessé de m'encourager, que le Tout Puissant donne santé, bonheur et longévité.

A MON TRÈS CHER PÈRE

Signe de fierté et d'honneur. Que ce travail témoigne de mon respect, ma profonde gratitude pour toutes ces années de sacrifice pour moi et de mon grand amour pour toi.

A TOUTE MA BELLE FAMILLE

*Qui m'entoure de tout son amour et sur qui je peux compter à tout moment, je dédie mon travail à ma sœur Sarah, à ma cousine Nabila Mesoud qui m'a vraiment aidé pendant la réalisation de ce travail et à ma chère binôme *Nadia Akhroum* qui fait partie de ma famille.*

A MES AMIS DE MA SECTION TOUS

A MA BENOME

Lydia

Merci pour tous les beaux inoubliables moments qu'on a passé ensemble à la fac.

Chanez

Dédicaces



A mon cher Père et ma chère Maman

*Les deux qui ont été toujours à
mes côtés pour me soutenir et me donner le courage pour
terminer mes études et qui ont nourrit en moi l'amour du savoir.*

A mon cher mari

*Je te dédie ce modeste
travail en guise de gratitude et de reconnaissance, ta présence à mes côtés m'a souvent
été
une source de force et de courage.*

A mes adorables enfants

***YAMINA, AMAR, AYLAMAS** et mon petit **SYPHAX**. Je vous souhaite beaucoup
de bonheur et de réussite. Que dieu vous garde et vous protège pour moi.*

A mes deux spéciales

*Ma cousine **Chanez** et ma binôme **Lydia***

*Travailler avec vous été un grand plaisir, j'espère que vous resterez toujours aussi
positives et bonnes vivantes. Que dieu vous bénisse et vous accorde paix et sérénité.*

Nadia

Résumé

L'objectif de ce travail est l'isolement des souches d'*Enterococcus* spp du portage intestinal chez la volaille et la caractérisation phénotypique des souches isolées. Pour cela, 175 prélèvements rectaux ont été effectués chez trois espèces de la volaille (poulet de chair, dinde et poule pondeuse), issues de différents abattoirs et centres d'élevage de la wilaya de Tizi-Ouzou.

L'isolement des souches d'*Enterococcus* spp a été réalisé sur la gélose bile esculine azide et ceci après un enrichissement sur le bouillon Mueller-Hinton additionné de NaCl. L'étude de la résistance des souches aux antibiotiques a été réalisée selon la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur la gélose Mueller Hinton. L'hémolyse et la gélatinase sont mises en évidence sur la gélose au sang de mouton et la gélose BHA+3% de gélatine. Les résultats obtenus montrent un taux d'isolement d'*Enterococcus* spp de l'ordre de 67,42%. De fortes résistances vis-à-vis de la tétracycline (90,67%) et de l'érythromycine (83,05%) ont été observées. Par ailleurs, des résistances relativement élevées vis-à-vis de la ciprofloxacine (47,45%), de la pénicilline G (37,28%). De faibles résistances à l'encontre des autres antibiotiques, avec des valeurs de 18,64%, 8,47% et 7,62% contre le chloramphénicol, l'association triméthoprim/sulfaméthoxazole et l'ampicilline, respectivement. Aucune résistance vis-à-vis de la vancomycine n'a été enregistrée.

Concernant les facteurs de virulences, vingt souches (16,52%) avaient la capacité de dégrader la gélatinase et uniquement sept souches (5,93%) étaient β -hémolytiques. La présente étude montre bien le risque sanitaire associé à la présence d'*Enterococcus* chez les animaux de rente. Pour cela, une politique basée sur l'application de règles de biosécurité et les bonnes pratiques d'hygiène tout le long de la chaîne de production est nécessaire.

Mots clés : *Enterococcus*, volaille, antibiorésistance, facteurs de virulences, Tizi-Ouzou.

Abstract

The objectives of this study are the isolation of *Enterococcus* strains from intestinal carriage of poultry and their phenotypic characterization. For this, 175 rectal samples were taken from three species of poultry, from different slaughterhouses and breeding centers in the wilaya of Tizi-Ouzou.

The study of the resistance of the strains to antibiotics was carried out according to the method of diffusion of discs on Mueller Hinton agar. Out of, 175 rectal samples, 118 (67.42%) were positives with *Enterococcus* spp. A high resistance to tetracycline (90.67%) and erythromycin (83.05%) were observed. Furthermore, relatively high resistances were observed to penicillin and ciprofloxacin, with values of 47.45% and 37.28%, respectively.

Low resistance against other antibiotics: chloramphenicol (18.64), the combination of trimethoprim-sulfamethoxazole (8.47%) and ampicillin (7.62%). On the other hand, our results show the absence of Vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE).

Concerning the virulence factors, twenty strains (16.52%) had the ability to degrade the gelatinase and only seven strains (5.93%) were β -hemolytic. This study shows clearly the health risk associated with the presence of *Enterococcus* in animal production. For this, a policy based on the application of rules and good hygiene practices throughout the production chain is necessary.

Keywords : *Enterococcus*, poultry, antibiotic resistance, virulence factors, Tizi-Ouzou.

Liste des figures

Figure 1 : Morphologie en microscopie électronique à balayage d'une souche d' <i>Enterococcus faecalis</i>	8
Figure 2 : Ensemble de protéines extracellulaire exprimées en surface d'une souche bactérienne à Gram négative.....	17
Figure 3 : Association des acides aminés pour former des peptides de type entéroccine.....	19
Figure 4 : Production de la toxine Cytolysine à partir d'une souche bactérienne.....	20
Figure 5 : Processus de création des trous par des cytolysines dans la membrane de la cellule cible.....	20
Figure 6 : Structure chimique de facteur de virulence bactérien l'hyaluronidase.....	21
Figure 7 : Souches bactériennes productrices de la gélatinase en microscope photonique.....	22
Figure 8 : Cycle de vie du biofilm à l'interface solide-liquide.....	24
Figure 9 : Production du biofilm par une souche d' <i>E. faecalis</i> dans un tissu valvulaire au fil du temps. Image obtenue par comptage sur plaque en microscopie électronique à balayage à haute résolution (FESEM).....	25
Figure 10 : Cible des antibiotiques et mécanismes de résistance bactérienne.....	41
Figure 11 : Structure de la paroi bactérienne.....	42
Figure 12 : Inactivation des antibiotiques par des β -lactamases.....	42
Figure 13 : Prélèvement rectal chez le poulet de chair	53
Figure 14 : Enrichissement de l'échantillon dans un bouillon MH + NaCl	53
Figure 15 : Purification d'une souche d'entérocoque.....	54
Figure 16 : Test de la gélatinase	57
Figure 17 : Test de l'hémolyse	58
Figure 18 : Réalisation d'un antibiogramme. (A) Ecouvillonnage en stries serrés. (B) Dépôt de disques d'antibiotiques	59
Figure 19 : Conservation des souches d' <i>Enterococcus</i>	60

Figure 20 : Bouillons positifs après enrichissement.....	63
Figure 21 : Bouillons positifs après test de tolérance à la salinité (6.5% de NaCl) et à 45°C....	63
Figure 22 : Souche d' <i>Enterococcus</i> spp pure.....	63
Figure 23 : Résultats positifs de test de la gélatinase pour les deux souches (E23/31) et (E23/32) provenant de la dinde et de poulet de chair respectivement.....	64
Figure 24 : Résultat positif du test d'hémolyse pour la souche (E23/104) provenant de la dinde.....	64
Figure 25 : Représentation graphique de la résistance des <i>Enterococcus</i> spp aux neuf molécules d'antibiotiques.....	67
Figure 26 : Profil de résistance de la souche <i>Enterococcus</i> spp provenant du poulet de chair (E23/106).....	68
Figure 27 : Profil de résistance de la souche <i>Enterococcus</i> spp provenant de la poule pondeuse (E23/06).....	68
Figure 28 : Profil de résistance de la souche <i>Enterococcus</i> spp provenant de la dinde (E23/115).....	68

Liste des tableaux

Tableau I : Principales sources d' <i>Enterococcus</i> spp dans les aliments.....	13
Tableau II : Classes et premières années d'utilisation des principaux antibiotiques.....	28
Tableau III : Résistance intrinsèque aux antimicrobiens chez les entérocoques.....	39
Tableau IV : Différents phénotypes de résistance des entérocoques.....	44
Tableau V : Matériels utilisés lors de la partie expérimentale.....	49
Tableau VI : Répartition des prélèvements effectués dans différentes régions dans le cadre de la réalisation de cette étude.....	51
Tableau VII : Taille, âge et origine des différents élevages.....	52
Tableau VIII : Liste des molécules d'antibiotiques testés.....	59
Tableau IX : Nombre et prévalence des prélèvements positifs par les entérocoques dans les différentes espèces animales étudiées.....	62
Tableau X : Résultat et prévalences de test de la gélatinase.....	63
Tableau XI : Résultats et prévalences de test de l'hémolyse.....	64
Tableau XII : Résultat de l'antibiogramme pour les souches d'entérocoques de poulet de chair.....	65
Tableau XIII : Résultat de l'antibiogramme pour les souches d'entérocoques de dinde.....	66
Tableau XIV : Résultat de l'antibiogramme pour les souches d'entérocoques de poule pondeuse.....	67
Tableau XV : Résultats et prévalences des profils de multirésistance selon l'espèce animale.....	69

Liste des abréviations

Ace : Protéine de liaison au collagène

ADNe : ADN extracellulaire

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ARNr 16S : Acide Ribonucléique Ribosomique 16S

ARNt : Acide Ribonucléique de transfert

BEA : Bile Esculine Azide

BH : Hyaluronidase Bactérienne

BHI : Brain Heart Infusion

BHIB : Bouillon cœur-cervelle

C : Cytosine

CASFM : Comité française de microbiologie

CLSI: Clinical and laboratory standards institute

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

D-Ala-D-Ala : D-alanine-D-alanine

D-Ala-D-Ser : D-alanine-D-serine

ERV : Entérocoque Résistant à la Vancomycine

ESP : Protéines de Surface Extracellulaire

KDa : Kilo Dalton

LAB : Bactérie lactique

LPS : Lipopolysaccharide

MALDI TOF MS : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight

MEC : Matrice Extracellulaire

MH : Muller-Hinton

MLS : Macrolides-Lincosamide-Streptogramine

MLSB : Macrolides-Lincosamide-Streptogramine B

OIE : Office International des Épizooties

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OMSA : Organisation Mondiale de la Santé des Animaux

pb : Paire de Base

Pbp5 : Penicillin-Binding Protein 5

PCR : Polymerase Chain Reaction

DPA : N-diméthyl-paraphénylène diamine

PFGE : Electrophorèse sur gel en champ pulsé

PLP : Protéines liant la pénicilline

P/V : Poids sur le volume

SA : Substance d'agrégation

SARL : Société à Responsabilité Limitée

UFC : Unité formant colonie

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction générale.....1

CHAPITRE I : Généralités sur les entérocoques

1. Historique.....4
2. Habitat.....5
3. Classification et taxonomie.....7
4. Caractéristiques bactériologiques.....7
5. Epidémiologie et pathogénicité des entérocoques.....9
6. Rôles et applications des entérocoques 11

CHAPITRE II : Facteurs de virulences des *Enterococcus*

1. Définition d'un facteur de virulence.....15
2. Facteurs de virulence des entérocoques.....15

CHAPITRE III : Résistance des *Enterococcus* aux antibiotiques

1. Historique.....27
2. Définition d'un antibiotique 28
3. Fonctionnement de l'antibiotique.....29
4. Principaux paramètres influençant l'activité de l'antibiotique.....30
5. Critères de classification des antibiotiques.....30
6. Classification et mode d'action des antibiotiques.....32
7. Modes d'utilisation des antibiotiques.....36
8. Emergence et propagation des résistances aux antibiotiques.....37
9. Notion de la résistance bactérienne aux antibiotiques.....37
10. Antibiorésistance chez les entérocoques.....37

11. Types de résistance des entérocoques aux antibiotiques.....	38
12. Mécanismes moléculaires de la résistance des entérocoques aux antibiotiques.....	40

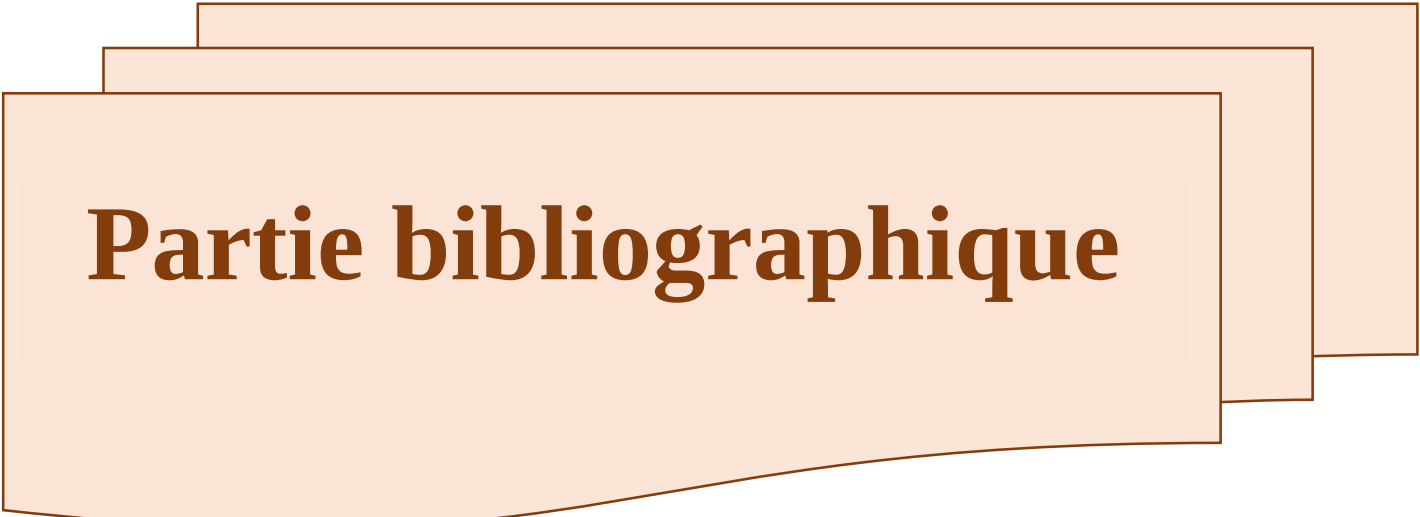
PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : Matériel et Méthodes

1. Objectifs de l'étude.....	49
2. Matériel.....	49
3. Milieux de culture et réactifs.....	50
4. Collecte des prélèvements.....	51
5. Analyses microbiologique des prélèvements	53
6. Caractérisation phénotypique des souches isolées.....	57
7. Antibiorésistance des souches isolées.....	58
8. Conservation des souches.....	60

CHAPITRE II : Résultats et discussion

Résultats.....	62
1. Prévalence des <i>Enterococcus</i> spp dans les différents prélèvements.....	62
2. Mise en évidence des facteurs de virulence.....	63
3. Résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques.....	65
4. Phénotypes de multirésistance	69
Discussion.....	70
Conclusion générale et perspectives.....	74
Références bibliographiques.....	76
Annexes	



Partie bibliographique

+

Introduction générale

Introduction générale

Les bactéries intestinales jouent d'importants rôles dans la santé humaine et animale, elles sont pour la plupart bénéfiques ou symbiotiques pour l'hôte. Plusieurs études montrent le côté sinistre des bactéries intestinales, telles que les entérocoques (SALYERS et *al.*, 2004).

Les entérocoques sont des bactéries lactiques utilisées depuis des siècles dans l'agroalimentaire (GALVEZ et *al.*, 2012 ; HUDSON et *al.*, 2017). Ce sont des anaérobies facultatifs, ubiquitaires, possèdent une excellente capacité de croissance et de développement dans des conditions environnementales hostiles (froid et chaud, pH et salinité extrêmes) (ARIAS et *al.*, 2012 ; GALVEZ et *al.*, 2012).

Les entérocoques sont le plus souvent considérés comme des composants du microbiote intestinal humain et animal à sang chaud (NOWAKIEWICZ et *al.*, 2016 ; ÇARDAK et *al.*, 2021). Ils agissent comme des agents pathogènes opportunistes (NOWAKIEWICZ et *al.*, 2016).

Les entérocoques sont devenus des agents pathogènes les plus courants dans le monde (MONTICELLI et *al.*, 2018). Ils viennent juste après les staphylocoques (SELLECK et *al.*, 2019). Ce sont des marqueurs de contamination fécale associée à des épidémies dites : « nososome ». Ils provoquent de nombreux types d'infections chez les animaux telles que la mammite bovine, la diarrhée, plusieurs maladies chez les porcs et les vaches et la septicémie de la volaille. De plus, les infections de voies urinaires, des infections de plaies, des bactériémies et des endocardites infectieuses humaines sont causées principalement par deux espèces d'entérocoques : *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* (GARCIA et *al.*, 2019). Leur omniprésence et leur capacité d'adaptation à des conditions de vie difficiles sont des facteurs qui contribuent à leur croissance et à leur émergence (GALVEZ et *al.*, 2012).

Aujourd'hui, les infections à entérocoques posent un sérieux problème de santé publique en raison de la capacité inhérente de ces bactéries à résister à divers antibiotiques, en particulier les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (SAKKA et *al.*, 2008), mais aussi, grâce à la présence de différents facteurs de virulence qui peuvent renforcer leur pathogénicité en permettant la colonisation et l'invasion des tissus de l'hôte, la translocation à travers les cellules épithéliales et l'évasion de la réponse immunitaire de l'hôte. Ces facteurs de virulence putatifs tels que les substances d'agrégation, les adhésines, l'hémolysine, la hyaluronidase et la gélatinase, jouent un rôle important dans l'établissement de l'infection (RAMOS et *al.*, 2020).

Cette étude avait pour but l'isolement des entérocoques à partir du portage intestinal chez la volaille (poulet de chair, dinde et poule pondeuse) et la caractérisation phénotypique des isolats,

Introduction générale

via la détermination des profils de résistance aux antibiotiques des souches isolées et la mise en évidence de deux facteurs de virulence (l'hémolyse et la gélatinase).

Chapitre I : Généralités sur les entérocoques

1. Historique

En tant que genre, les entérocoques ont une histoire relativement courte mais intéressante, dont la plupart est liée à celle des autres cocci à Gram positif, en particulier les streptocoques (PILET et *al.*, 2005).

Les streptocoques sont des germes très proches des entérocoques qui ressemblent à la plupart des espèces du groupe sérologique D, ce qui a fait l'association de ces germes auparavant aux streptocoques fécaux (PILET et *al.*, 2005 ; CARIP et *al.*, 2015).

Les termes « streptocoques » et « entérocoques » sont apparus pour la première fois à l'âge d'or de la microbiologie (REHMAN et *al.*, 2018). Le terme « *Streptococcus* » a été employé pour la première fois en 1874, par « BILLROTH » un contemporain de LOUIS PASTEUR pour décrire les cocci en chaînes qu'il observait dans les plaies. Une décennie plus tard, les streptocoques ont été décrits comme un genre dans l'ouvrage « ROSENBACH » sur les bactéries des plaies. Tandis que, la première mention du terme « entérocoque » a eu lieu moins de 20 ans plus tard, lorsque THIERCELLIN et OUHAUD ont rapporté avoir isolé des cocci saprophytes potentiellement pathogènes à partir des intestins humains (LE MINOR et VERON, 1982). Ces nouveaux cocci étaient alors considérés comme faisant partie du genre *Streptococcus* (REHMAN et *al.*, 2018).

Les entérocoques ont été extraits du groupe de streptocoques D pour être regroupés dans une classe appartenant dans la famille des *Enterococcaceae* avec les autres genres *Melissococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* dans l'ordre des lactobacillales (GARRITY et HOLT, 2001 ; DELARRAS, 2007 ; AGUILAR-GALVEZ et *al.*, 2012 ; CARIP et *al.*, 2015).

Les *Enterococcus* ont été découverts par THIERCELLIN en 1899, mais c'est qu'en 1906 que le nom *Streptococcus faecalis* est écrit par ANDREWS et HORDER comme pathogène potentiel chez les patients atteints d'endocardite (DEVRIESE et *al.*, 2006).

En 1933, LANCEFIELD décrit les sérogroupes de streptocoques et classe les entérocoques dans la catégorie des streptocoques sérologiques du groupe D (*Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus* ainsi que *Streptococcus suis*) (GOURNIER-CHATEAU et LARPENT, 1994 ; KLEIN, 2003).

En 1937, SCHERMAN a classé les streptocoques en quatre groupes, « Entérocoques », « *Streptococcus lactis* », « Viridan » et « *Streptococcus pyogenes* » les termes « viridan » et « entérocoques » ont été changés en streptocoques oraux et fécaux.

Plusieurs années plus tard, le genre *Streptococcus* a été divisé en trois genres apparentés: *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* et c'est en 1970 que KALINA a proposé que *Streptococcus faecalis* et *Streptococcus faecium* devrait être transférés au genre *Enterococcus* (SCHLEIFER et KILPPER-BALZ, 1984 ; SCHLEIFER et KILPPER-BALZ, 1987).

En 1984 et avec l'apparition et le développement de la biologie moléculaire et avec la détermination du pourcentage G+C (Guanine et Cytosine), le séquençage de l'ARNr 16S et l'hybridation ADN-ADN, SCHLEIFER et ses collaborateurs ont reclassé respectivement les bactéries *Streptococcus faecalis* et *Streptococcus faecium* comme *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* (AGUILAR-GALVEZ et al., 2012 ; DEVRIESE et al., 2006).

MONSTEIN et al. (1998) ont proposé de subdiviser le genre *Enterococcus* en groupe d'espèces. En 2011, 35 espèces ont été déterminées sur la base d'ARNr 16S (AGUILAR-GALVEZ et al., 2012 ; DESTAIN et al., 2012).

2. Habitat

Le genre *Enterococcus* appartient au groupe de micro-organismes connus sous le nom de bactéries lactiques (LAB) (HANACHI, 2018). Ils sont caractérisés par des propriétés uniques et intrinsèques qui leur permettent de se répandre presque un peu partout dans la nature (KLEIN, 2003). Ce sont des micro-organismes omniprésents, mais leur habitat prédominant est le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux à sang chaud (GALVEZ et al., 2012). Ils sont largement répartis entre les plantes, les aliments, le sol et l'eau (KLEIN, 2003), en raison de leur dissémination à partir de sources fécales et de leur tolérance naturelle aux conditions environnementales défavorables (GIRAFFA, 2002 ; ROBERTS et al., 2016).

Les entérocoques appartiennent au microbiote commensal humain et animal en abondance chez les bovins, les porcs et les volailles (BAGER et al., 1997 ; DEVRIESE et al., 1992 ; MANERO et al., 2002). Les ovins, les caprins, les chiens, les chevaux, les lapins (DEVRIESE et al., 1987; WHEELER et al., 2002) et les oiseaux sauvages (POETA, 2005). Par conséquent, la viande est la plus susceptible d'être contaminée pendant la période d'abattage (Franz et al., 2004). Dans une étude sur les entérocoques provenant de produits de viande crue, *E. faecalis* et *E. faecium* sont révélés être les isolats prédominants dans la viande crue de carcasses de bœuf et de porc et *E. faecalis* était l'isolat le plus fréquent parmi les cocci à Gram positif trouvés dans une étude sur la volaille (WERNER et al., 2013).

La capacité d'adaptation des entérocoques à différents écosystèmes a permis de trouver plusieurs espèces de ce genre dans les fèces humaines (GELSOMINO et al., 2002). Les espèces

d'entérocoques les plus courants isolés des matières fécales humaines sont *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans* avec une concentration de 10^5 à 10^7 UFC/g (KAYSE, 2003).

Les espèces *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. hirae* se trouvent essentiellement dans le contenu intestinal de la plupart des animaux (DEVRIERS et al., 1987). Tandis que, des sources environnementales ont montré la présence de plusieurs autres espèces comme ; *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. raffinosus* et *E. gallinarum* (ROBERTS et al., 2016).

Certaines espèces d'entérocoques sont également associées aux végétaux particulièrement les échantillons de plantes d'ensilage et de pâturage, ce sont *E. munditii*, *E. sulfureus* et *E. casseliflavus* (LECLERC et al., 1996 ; Müller et al., 2001). Certaines d'autres sont associées aux olives vertes fraîches et fermentée comme *E. faecium* et *E. faecalis* (FERNANDEZ, 1983).

Dans les produits alimentaires fabriqués à partir de matières premières, principalement dans les produits laitiers, les espèces d'entérocoques les plus dominantes sont *E. faecium*, *E. faecalis* et *E. durans*, dont elles prennent une partie importante du microbiote des aliments fermentés, en particulier les fromages fermentés et les saucisses (GIRAFFA, 2003 ; FRANZ et al., 2003). Ces dernières sont généralement fabriquées sans l'ajout de ferments lactiques et donc la microflore de ces produits provient de la contamination naturelle de la viande crue lors de l'abattage et de la fabrication (FRANZ et al., 2003 ; TALON et al., 2007).

Cinq d'autres espèces du genre « *Enterococcus* » ont été isolées à partir des produits carnés (essentiellement poulet) sont *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* et *E. gilvus*, qui ont résistées malgré le traitement thermique (PIMENTA et al., 2007).

BIROLLO et al. (2001) ont montré que les entérocoques avaient peu de valeur en tant qu'indicateurs d'hygiène dans la transformation industrielle des aliments car les entérocoques ne sont pas seulement associés aux animaux à sang chaud, mais ils sont également présents dans le sol, les eaux de surface et sur les plantes, les légumes et les insectes.

3. Classification et taxonomie

Le terme « entérocoques » a été considéré comme un terme générique pour les cocci à Gram positif isolés de l'intestin/des matières fécales, plutôt qu'un groupe monophylétique (DEVERIESE, 2009).

Les membres du genre *Streptococcus* anciennement regroupés sous le nom de « streptocoques fécaux ou streptocoques du groupe D de LANCEFIELD », ont été classés en trois genres différents : *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*, basé sur les dernières techniques de classification et études sérologiques (FRANZ et al., 2003).

Selon le BERGEY's manuel de la bactériologie systématique (2009), le genre *Enterococcus* est classé comme suit :

- Domaine : Bacteria ou Eubacteria
- Phylum XIII : Firmicutes
- Classe : Bacilli
- Ordre : Lactobacillales
- Famille : Enterococcaceae
- Genre : *Enterococcus*

Dans ce genre, On trouve 34 espèces qui sont officiellement identifiées et classées. Actuellement, plus d'une cinquantaine d'espèces sont décrites (BOUSSOUAR, 2017).

Selon leurs propriétés biochimiques, physiologiques, antigéniques et génétiques, les entérocoques sont séparés en groupes aux traits communs qui permettent leur discrimination et rendent cette séparation entre espèces d'un même groupe plus difficile qu'entre les groupes classés (DEVRIESE et al., 2006).

4. Caractéristiques bactériologiques

4.1 Caractères morphologiques

Les entérocoques sont des bactéries lactiques qui se développent bien sur des milieux ordinaires (HANACHI, 2018). Les colonies d'entérocoques sont assez larges de 0,5 à 1,5 mm, légèrement arrondies et bombées, d'une couleur blanche ou grise-blanc. Ces colonies deviennent noires sur des milieux à base de bile esculine d'azide et de sodium (HIGASHIDE et al., 2005 ; DENIS et al., 2007).

Les entérocoques sont caractérisés par des cellules ovoïdes isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes. Ils ont une taille comprise entre 0,6 et 2 μm (PAULSEN, 2003 ; DENIS et al., 2007).

Ce sont des micro-organismes fermentatifs obligatoires, non sporulants généralement immobiles mais peuvent être mobiles par des flagelles comme : *E. casseliflavus* et *E. gallinarum* et acapsulés (LEBRETON et *al.*, 2014) (Figure 1).

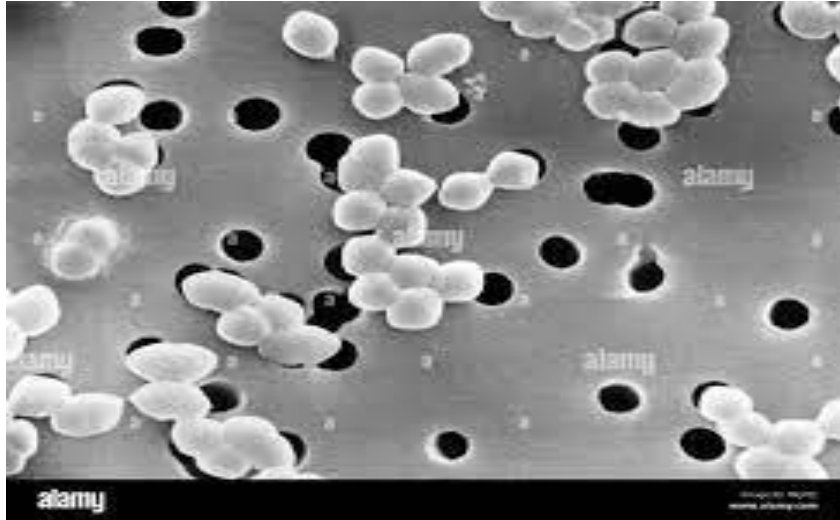


Figure 1 : Morphologie en microscopie électronique à balayage d'une souche d'*Enterococcus faecalis* (SINGLETON, 2005).

4.2 Caractères physiologiques et cultureux

L'évaluation des entérocoques est effectuée en utilisant la culture ou le sérodiagnostic (CARIP et *al.*, 2015). Certaines souches d'*Enterococcus* sont hémolytiques sur gélose au sang, tandis que d'autres ne le sont pas lorsqu'elles sont cultivées. Ils ont la capacité d'hydrolyser l'esculine en "esculétine" lorsque la concentration de sels biliaires atteint 40 %, ce qui donne un noircissement du milieu "bile esculine azide" ou "BEA" (AGUILAR-GALVEZ, 2012).

Tous les entérocoques poussent sans exception sur des milieux sélectifs et dans des conditions hostile suivantes :

- Forte salinité à 6,5 % de NaCl ;
- A une température extrême de 60 ° C pendant 30 minutes ;
- Dans des concentrations de sels biliaires de 40 % ;
- Micro-organismes mésophiles capables de se développer à des températures allant de 10 jusqu'à 45 °C ;
- Capacité d'hydrolyser l'esculine en esculétine (noircissement du milieu) ;
- Tolérance d'une gamme de pH comprise entre 4,4 et 9,6 (FOULQUIE et *al.*, 2006 ; FLAHAUT et *al.*, 2011 ; AGUILAR-GALVEZ, 2012).

4.3 Caractères biochimiques

Les entérocoques sont des micro-organismes aérobies facultatifs à Gram positif qui font partie de la flore intestinale normale, avec des concentrations variant de 10^5 à 10^8 UFC/g de contenu intestinal (LE BLANC, 2006).

De nombreux caractères biochimiques des entérocoques ont été décrits pour le diagnostic des entérocoques. Ces bactéries sont :

- Chimio-organotrophes ;
- Aéro-anaérobies facultatives ;
- Catalase négative (mais certaines espèces présentent une activité pseudo-catalase) ;
- Oxydase négative ;
- Facteurs de croissance obligatoires pour leur développement ;
- Pas de production d'indole et de sulfure d'hydrogène ;
- Réaction positive à VOGES-PROSKAUER ;
- Organismes homofermentaires : production en grande partie de l'acide lactique, ainsi que de faibles quantités d'acétate et d'éthanol. En absence d'oxygène, l'acide lactique est le principal résultat de la fermentation des glucides. Tandis qu'en présence d'oxygène, les produits métaboliques sont l'acétate et le dioxyde de carbone (SCHLEIFER et *al.*, 1984 ; LE BLANC, 2006).

5. Épidémiologie et pathogénicité des Entérocoques

L'épidémiologie des entérocoques a été étudiée à l'aide de diverses techniques moléculaires, avec des conclusions et résultats différents et souvent contradictoires, selon la méthode utilisée (DEVRIESE et *al.*, 2006). Ces études ont porté sur l'épidémiologie hospitalière et la propagation potentielle de souches résistantes de l'animal à l'homme (FRANZ et *al.*, 2003 ; DEVRIESE et *al.*, 2006).

La sélectivité la plus élevée a été obtenue avec la technique PFGE (électrophorèse sur gel en champ pulsé), étant donné que les caractéristiques biochimiques ne permettent pas de distinguer les souches d'entérocoques des différentes espèces d'hôtes. Cette technique

permet la division sans ambiguïté des espèces d'entérocoques en différents clones (DEVRIESE et *al.*, 2006).

Traditionnellement, les infections à entérocoques étaient considérées comme endogènes, provenant de la propre flore du patient. Cependant, des preuves récentes indiquent que la transmission se propage d'un patient à l'autre (DEVRIESE et *al.*, 2006 ; REHMAN et *al.*, 2018). Il a été démontré aussi que certaines souches multirésistantes de ce genre pourraient se propager au sein d'un hôpital et même entre les hôpitaux et provoquer un grand nombre d'infections nosocomiales (REHMAN et *al.*, 2018).

Des infections chirurgicales, des infections des voies urinaires, des infections intra-abdominales, les bactériémies nosocomiales, les endocardites et des rares méningites sont les principales pathologies causées par le genre *Enterococcus* (FRANZ et *al.*, 2003 ; DEVRIESE et *al.*, 2006 ;). La bactériémie à entérocoques est associée à l'endocardite dans une minorité de cas, et d'autres infections telles que l'infection des voies urinaires qui est beaucoup plus fréquentes (DEVRIESE et *al.*, 2006).

L'épidémiologie hospitalière des entérocoques est moins connue chez les animaux car ces derniers sont rarement hospitalisés, à l'exception de certains animaux de compagnie et même ces derniers sont beaucoup moins souvent hospitalisés que les humains (DEVRIESE et *al.*, 2006). Les animaux affaiblis et âgés sont aussi moins souvent traités, c'est pourquoi la pathologie entérococcique typique à l'homme est pratiquement inconnue chez l'animal (DEVRIESE et *al.*, 2006). Néanmoins, certaines pathologies associées aux entérocoques ont été documentées et le plus souvent chez les oiseaux (DEVRIESE et *al.*, 2006).

Des souches d'*E. hirae* ont été mises en cause dans des septicémies et des nécroses cérébrales focales animales. D'autres souches de type *E. durans* se sont révélées adhérer aux villosités intestinales des nourrissons de plusieurs espèces de mammifères et peuvent provoquer une entérite relativement bénigne (DEVRIESE et *al.*, 2006).

Malgré la disponibilité de certains rapports, l'épidémiologie clinique de la majorité des espèces d'entérocoques reste partiellement inconnue. La colonisation et l'infection par la plupart des espèces d'entérocoque sont moins fréquentes que d'autres espèces bien connues comme : *E. faecalis*, *E. faecium*. Mais selon les tendances existantes, leur fréquence pourrait augmenter dans le monde entier (MONTICELLI et *al.*, 2018).

6. Rôles et Applications des entérocoques

Les entérocoques sont des bactéries lactiques ubiquitaires qui jouent plusieurs rôles dans différents domaines d'application (alimentaire, santé, environnement etc.) (HANACHI, 2018).

6.1 Indicateurs de contamination fécale

En raison de leur omniprésence dans les excréments humains et de leur aptitude à supporter les diverses conditions physicochimiques et à persister dans les conditions hostiles de l'environnement, les entérocoques ont été adoptés comme indicateurs de contamination fécale humaine, l'eau potable et des denrées alimentaires. Toutefois, l'usage des entérocoques en tant qu'indicateurs de pollution ou de contamination d'origine humaine peut s'avérer délicat, étant donné que ces bactéries se trouvent également dans les matières fécales des animaux, dans les sols ainsi que sur les végétaux (DEVRIESE et *al.*, 2006)

6.2 Utilisation des entérocoques comme probiotiques

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants (bactéries, levures...) ajoutés à certains produits alimentaires où ils peuvent être définis comme étant « une préparation ou un produit contenant une culture simple ou mixte des microorganismes viables, en concentration définie et suffisante » ayant un effet bénéfique sur la santé de l'hôte lorsqu'ils sont consommés en quantité suffisante et adéquate. (DE VUYST et *al.*, 2004 ; BRAIEK et *al.*, 2019). Les probiotiques sont des additifs qui tirent bénéfice chez les animaux et les humains en améliorant l'équilibre de la fonction de barrière intestinale, la réduction des troubles gastro-intestinaux, la modulation de l'immunité, la perception de la douleur et l'amélioration de la valeur nutritionnelle. (ZIGGERS, 2001 ; BRAIEK et *al.*, 2019).

Les bactéries lactiques sont les plus couramment employées en tant que probiotiques, ces derniers incluent les genres bactériens suivants : *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* ainsi que des levures telles que *Saccharomyces*, ces deux espèces *E. faecium* et *E. faecalis* sont utilisées dans les préparations probiotiques humaines. Tandis que, *E. faecalis* est couramment utilisé comme complément alimentaires (CHAMPAGNE et *al.*, 2008).

En effet, les entérocoques ont été employés comme probiotiques pour diverses finalités, notamment dans les domaines pharmaceutique, médical (tant pour les humains que les animaux) et alimentaire, car certains types de ces bactéries pourraient être utiles dans la

fabrication d'aliments aux propriétés fonctionnelles (CHAMPAGNE et *al.*, 2008 ; BRAIEK et *al.*, 2019).

6.3 Applications des entérocoques dans les aliments

Les entérocoques peuvent avoir un effet bénéfique ou nuisible sur les aliments. Ils peuvent causer une détérioration ou participer au processus de maturation et d'aromatisation de certains aliments (SEMEDO et *al.*, 2003 ; DEVRIESE et *al.*, 2006). De ce fait, selon AGUILAR et *al.*, (2012) il existe plusieurs objectifs à l'ajout de ces micro-organismes dans les aliments tels que :

- Prolongation de la durée de vie des aliments ;
- Diversité de produits par la modification de la matière première ;
- Inhibition des pathogènes permettant d'améliorer la sécurité alimentaire ;
- La contribution au développement de la saveur des aliments ;
- Impact bénéfique sur la microflore intestinale.

Des recherches sur la microflore des aliments traditionnels ont révélé que les entérocoques ont une fonction cruciale dans la fermentation et la maturation de certains produits, en contribuant à l'émergence de qualités organoleptiques telles que le goût et l'arôme (BRAIEK et *al.*, 2019). Certains de ces produits sont résumés dans le tableau 1.

Tableau I : Principales sources d'*Enterococcus* spp. dans les aliments (AGUILAR-GALVEZ et *al.*, 2012).

Groupe d'aliments	Produits alimentaires
Produits laitiers	Lait cru de vache, chèvre et brebis Fromages traditionnels pâte mi-dure.
Viandes et poissons	Saucisses Produits carnés traditionnels fermentés Poissons fermentés Carcasses de porc Poulets Muscles de poisson Fruits de Mer
Produits végétaux	Olives vertes Ensilages d'herbes Légumes fermentés : sorgho, soja Chicorée fraîche Gaine de soja

Chapitre II : Facteurs de virulence des entérocoques

Les entérocoques sont des germes naturels de la flore intestinale de nombreux organismes (WOZNIAK-BIEL et *al.*, 2019). En tant que pathogènes opportunistes, ils peuvent provoquer des infections mortelles chez l'homme telles que les infections nosocomiales, qui sont difficiles à traiter, en raison des taux de survie élevés des bactéries dans le milieu hospitalier, de la résistance inhérente à de nombreuses antimicrobiens et de leur étonnante capacité à acquérir des mécanismes de résistance aux antibiotiques et de divers facteurs de virulence (STRATEVA et *al.*, 2016).

A l'exception d'*E. faecium* et d'*E. faecalis*, les entérocoques sont peu identifiés comme des agents pathogènes chez les individus (AGUILAR-GALVEZ et *al.*, 2012). En effet, ils ne sont pas très virulents de nature par rapport aux autres bactéries telles que les staphylocoques, les pneumocoques et d'autres bactéries à Gram positif, leur dose létale est souvent très élevée. Pour qu'ils soient pathogènes, ils doivent manifester et exprimer des caractéristiques de virulence associées à l'adhésion, la translocation et à la disparition de la réponse immunitaire (AGUILAR-GALVEZ et *al.*, 2012 ; STUCKI et *al.*, 2014).

1. Définition d'un facteur de virulence

Un facteur de virulence est défini comme toute substance, protéine, glycoprotéine ou lipide, exprimée ou sécrétée par la bactérie, capable d'accroître la capacité à provoquer certaines pathologies données. Sa présence n'est pas toujours obligatoire car il n'est pas indispensable à la survie de la bactérie, mais il réduit le potentiel virulent lorsqu'il n'est pas présent (CASADEVALL et PIROFSKI, 2001). Les facteurs de virulences jouent un rôle essentiel dans la pathogénicité des souches d'entérocoques (BRAIK et *al.*, 2019).

2. Facteurs de virulence des entérocoques

A présent, il est largement admis que la virulence d'un organisme est déterminée par les gènes qui le codent, situés dans des régions spécifiques du génome appelées « îlots de pathogénicité » (UPADHAYAYA et *al.*, 2009).

Les entérocoques adhèrent aux cellules hôtes en raison d'un certain nombre de facteurs qui permettent la colonisation, l'invasion des tissus, et la modulation de système immunitaire causant des dommages et des lésions par des toxines entérocoquiques (FIORE et *al.*, 2018).

Deux groupes majeurs de facteurs de virulence ont été isolés et caractérisés, le premier type est caractérisé essentiellement par des facteurs de virulence provoquant et favorisant la

colonisation de la surface des cellules de l'hôte. Tandis que, le deuxième type comprend les agents sécrétés par les entérocoques qui endommagent les tissus cellulaires (SAVA et *al.*, 2010 ; BOUSSOUAR, 2017).

2.1 Facteurs de virulence favorisant la colonisation des cellules

Les entérocoques sont des organismes commensaux du tractus gastro-intestinal qui ont une forte capacité d'adhésion aux différentes cellules de l'organisme grâce à des protéines appelées « adhésines bactériennes ». Ces dernières sont considérées comme des antigènes qui se situent à la surface des entérocoques et qui permettent l'adhésion aux membranes et aux parois cellulaires. Chez l'homme, elles sont très actives sur les valves cardiaques gauches et sur les cellules épithéliales rénales. C'est pourquoi, elles sont considérées comme des facteurs potentiels de virulence des souches d'entérocoques (BERGMANN et *al.*, 2004 ; CARIP et *al.*, 2015).

2.1.1 Protéines de surface extracellulaire « ESP »

C'est une protéine associée à la paroi cellulaire de la bactérie du genre « *Enterococcus* », identifiée par la première fois chez une souche très virulente d'*E. faecalis* résistante à la gentamicine, isolée à partir d'une bactériémie. Elle est considérée comme la plus grande protéine entérococcique identifiée d'un poids moléculaire de 200 kDa. Elle a des caractéristiques structurales analogues à celles des protéines de surface des autres bactéries à Gram positives (CHAJECKA-WIERZCHOUSKA et *al.*, 2017).

La protéine de surface extracellulaire est codée par le gène « *esp* » situé sur l'îlot de pathogénicité appelé « PAI », qui possède une taille de 5622 pb commun chez les isolats cliniques qui sont à l'origine des infections. Des études ont également démontré que le transfert de ce gène est possible entre différentes souches d'*E. faecium* grâce à la conjugaison plasmidique, ainsi qu'entre les souches d'*E. faecalis* via le chromosome de transposition. Cette protéine contribue également à la formation du biofilm bactérien, ce qui pourrait conduire à une résistance au stress extérieur de l'environnement (BORGSMANN et *al.*, 2004).

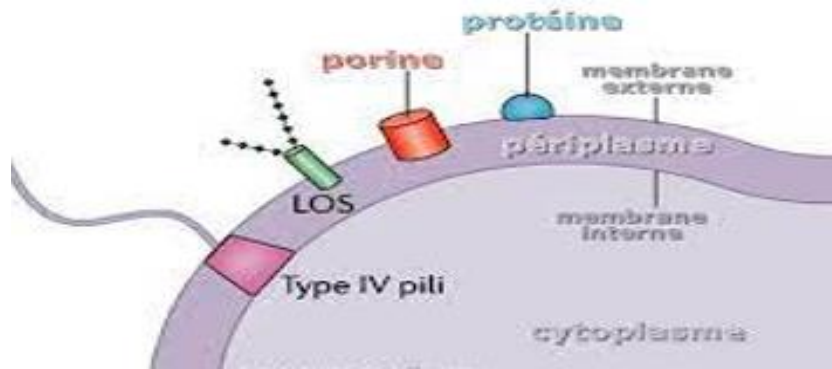


Figure 2 : Ensemble de protéines extracellulaire exprimées en surface d'une souche bactérienne à Gram négative (ACHARYA, 2021)

2.1.2 Substance d'agrégation « SA »

Les substances d'agrégation sont des adhésines de nature glycoprotéique positionnées sur la surface des cellules, codées par des gènes transportés par des plasmides conjugatifs et régulées par des phéromones sexuelles. Elles ont un poids moléculaire de 137 kDa et une structure bouclée en épingles de cheveux (FOULQUIE MORENO et *al.*, 2006).

Les substances d'agrégation sont considérées comme des facteurs de virulence très importants car elles permettent de transférer les gènes de résistances aux antibiotiques (DRAMSI et *al.*, 2005). L'agrégation est formée lors de la conjugaison bactérienne afin de permettre le transfert des plasmides qui portent les gènes qui codent pour les substances agrégatives (BERGMANN et *al.*, 2004). Ce sont des protéines glycosylées qui se lient aux récepteurs présents à la surface des cellules eucaryotes et jouent un rôle primordial dans la colonisation de l'hôte en modifiant le transfert des plasmides. De plus, l'adhésion des bactéries du genre « *Enterococcus* » aux cellules de l'hôte est une étape cruciale dans le processus d'infection, et la présence de ces éléments d'agrégation dans ces souches peut augmenter la capacité de colonisation (AGUILAR-GALVEZ et *al.*, 2012).

2.1.3 Protéine de liaison au collagène « Ace »

La protéine de liaison au collagène est une protéine de surface ayant des caractéristiques adhésives, présentant un poids moléculaire d'environ 74 kDa. Cette protéine a été isolée à partir des souches d'*E. faecalis* provenant à la fois des individus sains et de personnes atteintes d'infections entérocoquiques (NALLAPAREDDY et *al.*, 2003).

Plusieurs tests ont démontré la capacité de certaines espèces d'*Enterococcus* isolées à adhérer et cliver diverses protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène, la laminine, le fibrinogène, la fibronectine, la lactoferrine et plusieurs d'autres particules (RIC, 1999).

Des recherches sur des gènes codants pour des adhésines potentielles, ont conduit à la découverte de l'adhésine « Ace » : Adhésine du collagène d'*E. faecalis*. Les gènes d'adhésion au collagène « ace » et « acm » des bactéries « *E. faecalis* » et « *E. faecium* » respectivement, se lient aux souches de collagène de types 1 et 4, ce qui augmente leur virulence. Tandis que, le gène « acm » a la capacité de se lier à la laminine. L'Ace est considéré comme important dans les premiers stades de l'infection, du moment qu'elle peut se lier aux composants de la matrice extracellulaire de l'hôte « MEC » (NALLAPAREDDY et al., 2003).

2.1.4 Antigène spécifique de l'endocardite « EfaA »

L'EfaA est connu sous le nom de l'antigène spécifique de l'endocardite. Il s'agit d'une protéine adhésive de poids moléculaire d'environ 34 kDa, codée par les gènes « *efAfs* » et « *efArm* » dans les souches d'*E. faecalis* et *E. faecium*, respectivement (SAVA et al., 2010). Cet antigène a été identifié pour la première fois en employant des échantillons sanguins prélevés à partir des malades souffrant d'endocardite causée par *E. faecalis*. Des techniques génétiques ont prouvé la présence de gènes similaires à « efaA » dans les souches d'*E. avium*, *E. asini*, *E. durans* et *E. solitarius* (SEMEDO et al., 2003).

La protéine « EfaA » est similaire aux adhésines trouvées dans les parois cellulaires des streptocoques. Elle présente une ressemblance avec la protéine « FimA » synthétisée par *Streptococcus parasanguis*, la protéine « ScaA » synthétisée par *S. gorgonii*, la protéine « PsaA » de *S. pneumoniae* et à la protéine « SsaB » de *S. sanguis* (ARCHIMBAUD et al., 2002).

2.2 Facteurs de virulence affectant les tissus

Les entérocoques sont des commensaux gastro-intestinaux ayant un fort pouvoir adhésif sur les tissus de l'hôte. Cela se fait par l'intervention des substances toxiques produites spécialement par les souches pathogènes d'*Enterococcus* spp. (CARIP et al., 2015). Les facteurs de virulence sécrétés par les entérocoques incluent :

2.2.1 Entérochine

Le genre *Enterococcus* produit des bactériocines appelées « entéroquinas ». Ces dernières sont des peptides cationiques et amphiphiles de faible poids moléculaire contenant entre 20 à

60 acides aminés produits par certaines espèces entérocoquiques (AGUILAR-GALVEZ, 2010). Généralement, les entérocinines sont constituées de deux domaines structuraux : un domaine hydrophile et cationique en position N-terminale dont la longueur minimale est de 14 résidus et qui peut atteindre 30 résidus, la seconde région en position C-terminale est hydrophobe et/ou amphiphile.

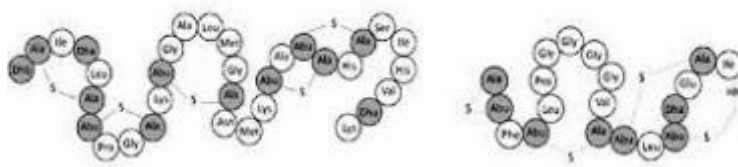


Figure 3 : Association des acides aminés pour former des peptides de type entérocin (DIEP et *al.*, 2007).

Les entérocinines, tout comme la plupart des bactériocines, ont pour cible principale la membrane cytoplasmique. Elles créent des pores dans la membrane cellulaire, ce qui épuise les potentiels transmembranaires et/ou le gradient de pH, entraînant ainsi la libération de molécules intracellulaires essentielles (AGUILAR-GALVEZ et *al.*, 2012). Elles sont considérées comme des agents de contrôle biologique dans les aliments cuits et non cuits en conservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles. Les caractéristiques physicochimiques des entérocinines permettent de donner des indications sur leur nature et leur structure, ainsi que leurs domaines d'utilisation. Ils constituent ainsi une alternative à l'utilisation d'additifs chimiques ou à celle de traitements physico-chimiques employés dans la conservation des produits alimentaires (AGUILAR-GALVEZ, 2010).

2.2.2 Cytolysine « β -hémolysine »

La Cytolysine appelée aussi « β -hémolysine » est une exotoxine de type bactériocine produite par des souches d'*E. faecalis* bêta-hémolytiques. C'est une toxine bactérienne qui a des propriétés β -hémolytiques chez l'homme et des propriétés bactéricides contre d'autres bactéries à Gram-positives (HALLGREN et *al.*, 2008).

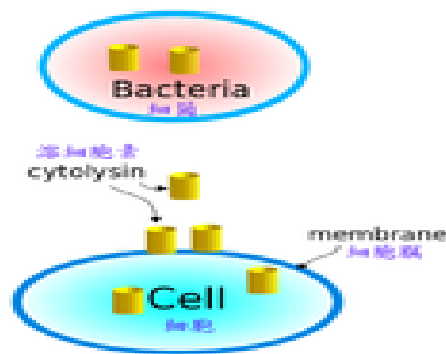


Figure 4 : Production de la toxine Cytolysine à partir d'une souche bactérienne (SKALS et *al.*, 2013).

C'est le facteur de virulence le plus étudié chez les entérocoques car la production de cytolysine semble être un facteur de risque important lié aux entérocoques pathogènes. C'est une toxine de nature peptidique, elle a la capacité de lyser les tissus humains et animaux en générant des pores au niveau de la membrane cellulaire qu'elle affecte (LE BLANC, 2006).

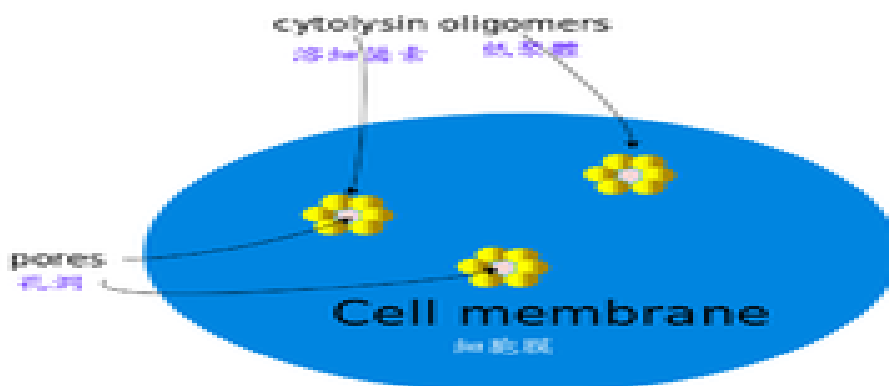


Figure 5 : Processus de création des trous par des cytolysines dans la membrane de la cellule cible (SKALS et *al.*, 2013).

Les gènes de cytolysine sont souvent portés par des plasmides et régulés par des phéromones, ils ont été trouvés chez les espèces suivantes : *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. malodoratus* et *E. raffinosus* (SEMEDO et al., 2003 ; AGUILAR GALVEZ et al., 2012).

Récemment, une étude montre que le taux de mortalité provoqué par une contamination entérococcique β -hémolytique est cinq fois plus élevé que celui constaté lors d'une

contamination par des entérocoques non β -hémolytiques. Une autre recherche a révélé que l'association de l'hémolysine et de la substance d'agrégation entraîne une augmentation de la mortalité dans les cas d'endocardite causés essentiellement par *E. faecalis* (LE BLANC, 2006).

2.2.3 Hyaluronidase

Les entérocoques ont la capacité de synthétiser une enzyme hydrolytique appelée « hyaluronidase ». Les hyaluronidases bactériennes (BH) font partie des facteurs de diffusion libérés par certaines bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Il s'agit d'une protéine du génome d'entérocoque avec un poids moléculaire d'environ 45 kDa, codée par le gène « *hyl* » (ARCHIMBAUD et al., 2002). Bien qu'elle n'ait pas été détectée dans l'ADN chromosomique, des souches d'*E. faecalis*, elle a été identifiée dans d'autres espèces isolées de la nourriture telles que *E. casseliflavus*, *E. mundtii* et *E. durans*.

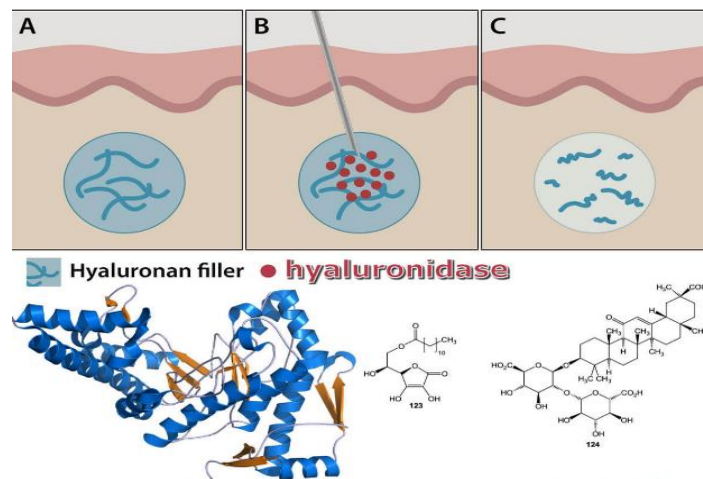


Figure 6 : Structure chimique de facteur de virulence bactérien l'hyaluronidase (RUHAL et KATARIA, 2021)

L'hyaluronidase a pour fonction de dégrader l'acide hyaluronique « l'hyaluronate », c'est un élément important de la matrice extracellulaire (KAYA OGLU et al., 2004). Comme elle peut fragmenter la fraction mucopolysaccharidique des tissus conjonctifs, ce qui favorise la propagation des entérocoques et de leurs toxines dans les tissus de l'hôte. Cependant, il n'existe aucune preuve directe du rôle de cette enzyme dans les infections causées par ces bactéries (JETT et al., 1994 ; KAYA OGLU et al., 2004).

Il a été suggéré que l'hyaluronidase d'*E. faecium* dégrade l'acide hyaluronique de l'hôte en composants plus simples qui sont ensuite transportés et métabolisés dans la cellule bactérienne, fournissant ainsi à la bactérie des éléments nutritifs. Le gène « *hyl* » est présent sur le chromosome, il est composé de 1659 pb qui codent pour une protéine putative de 533 acides

aminés. Cette protéine affiche une identité de 42% et une similarité de 60% avec l'hyaluronidase de *S. pyogenes* (RICE et *al.*, 2003).

2.2.4 Gélatinase

La gélatinase est une protéase produite par les entérocoques. Il s'agit d'une succession de petits peptides hydrophobes de sept à huit acides aminés (NASCIMENTO et *al.*, 2019). C'est une Zinc-métalloprotéase extracellulaire, dépendante du zinc, ayant un poids moléculaire d'environ 30kDa et codée par le gène « *gelE* ». Elle agit spécifiquement sur une variété de substrats tels que la chaîne β de l'insuline, le collagène des tissus, ainsi que des phéromones sexuelles et leurs peptides inhibiteurs (CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et *al.*, 2017).

Il a été démontré que la gélatinase clive les protéines de surface mal repliées d'*E. faecalis* ainsi que la fibrine, pour réduire les taux de phéromones chez cette espèce par l'activation d'une substance appelée « autolysine ».

Un milieu de gélatine à 3 % a été utilisé pour détecter l'activité protéinase. La gélatinase contribue au processus de formation de biofilm, ce qui peut accroître la capacité des entérocoques à coloniser les tissus et à persister dans les sites d'infection (DEL PAPA et *al.*, 2007).

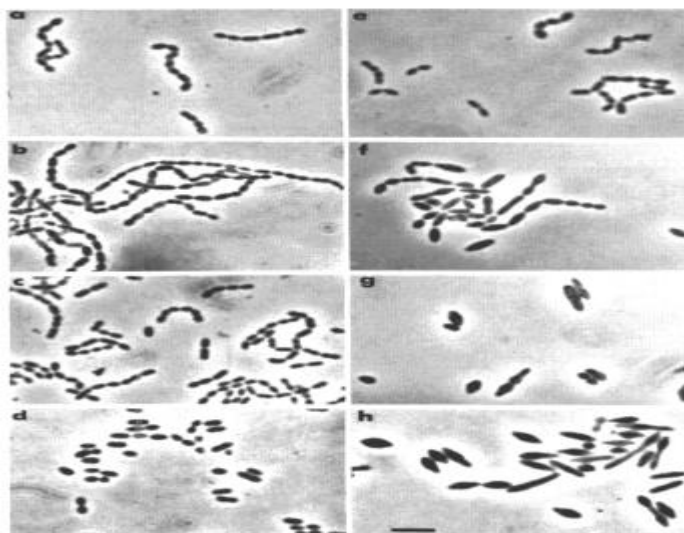


Figure 7 : Souches bactériennes productrices de la gélatinase en microscope photonique (ROSELYN, 1973)

2.2.5 Phéromones sexuelles

La phéromone est un ensemble d'acides aminés qui forment un peptide ayant comme rôle principale le transfert des plasmides lors de la conjugaison bactérienne. Elle se définit comme un facteur d'agrégation conjugalif (CHANDLER et *al.*, 2005).

Une souche d'entérocoque sécrète généralement plusieurs types de phéromones différentes, ces derniers non seulement ils induisent l'expression des opérons conjugatifs des plasmides bactériens mais ils transduisent et induisent le gène de la substance d'agrégation, ils peuvent être chimiquement attirant pour les neutrophiles, induisent aussi la production des substances mutagènes et initier des circonstances inflammatoires (BHARDWAJ et *al.*, 2008).

2.2.6 Formation de biofilm bactérien

Les biofilms peuvent être définis comme des populations bactériennes incorporées dans une matrice adhérant à une surface ou entre elles. Les biofilms bactériens sont plus résistants au stress environnemental que leurs homologues vivants libres et leur fixation aux produits alimentaires ou aux surfaces en contact avec les aliments accélèrent la détérioration, compliquent le nettoyage et facilitent la transmission des maladies (JAHAN et HOLLEY, 2014).

Les biofilms sont considérés comme un bio-encrassement dans le contexte de surfaces industrielles artificielles et ils ont été impliqués dans des infections bactériennes chroniques (KOO et *al.*, 2017). De plus, de nombreuses bactéries pathogènes utilisent des biofilms pour survivre dans des environnements externes difficiles, c'est pourquoi les cellules bactériennes entérocoquiques au sein des biofilms sont plus résistantes à la présence de toute condition de stress ou système immunitaire de l'hôte (RAHIMI et *al.*, 2018).

La formation de biofilm est un processus séquentiel qui commence par l'adhésion des cellules aux surfaces et se termine par des infections graves associées généralement aux dispositifs médicaux dans le corps (par ex. cathéters, prothèses articulaires), associées ainsi aux valves endocardiques et en particulier les plaies ouvertes et les plaies dentaires. Les composants de la matrice du biofilm, et précisément dans les biofilms bactériens à Gram positifs comprennent les protéines matricielles, les polysaccharides, l'ADNe (ADN extracellulaire) et les vésicules membranaires (RUHAL et KATARIA, 2021).

Ce processus est rapide et il se produit en plusieurs étapes. Les bactéries doivent dans un premier temps adhérer à une surface biotique ou abiotique. Puis, les cellules bactériennes vont s'agglutiner, se multiplier et former des micro-colonies. Lors de l'étape de maturation du biofilm, les bactéries synthétisent un exopolysaccharide et d'autres constituants de la matrice polymérique (RICHARDS et *al.*, 2007).

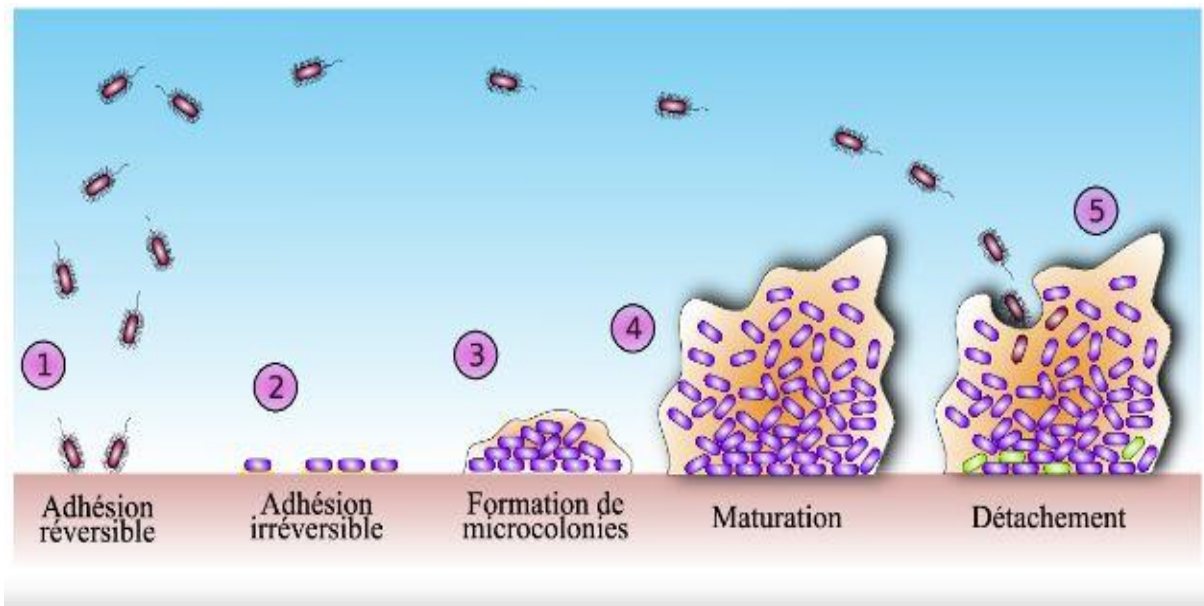


Figure 8 : Cycle de vie du biofilm à l'interface solide-liquide (DOUARCHE et *al.*, 2018)

Les surfaces humides en permanence, les installations de l'industrie alimentaire favorisent souvent l'adhérence et la colonisation des bactéries avec la formation ultérieure d'un biofilm. Les bactéries du genre *Enterococcus* dans les structures de biofilms ont plus résistantes non seulement aux détergents mais aussi au dessèchement que les cellules planctoniques. C'est pour cela, la formation de biofilms dans l'industrie alimentaire représente un sérieux problème (RUHAL et KATARIA, 2021).

NECIDOVA et *al.* (2009) ont montré que la capacité de la formation de biofilm chez les souches d'*Enterococcus faecium* est beaucoup plus grande que les souches d'*Enterococcus faecalis*.

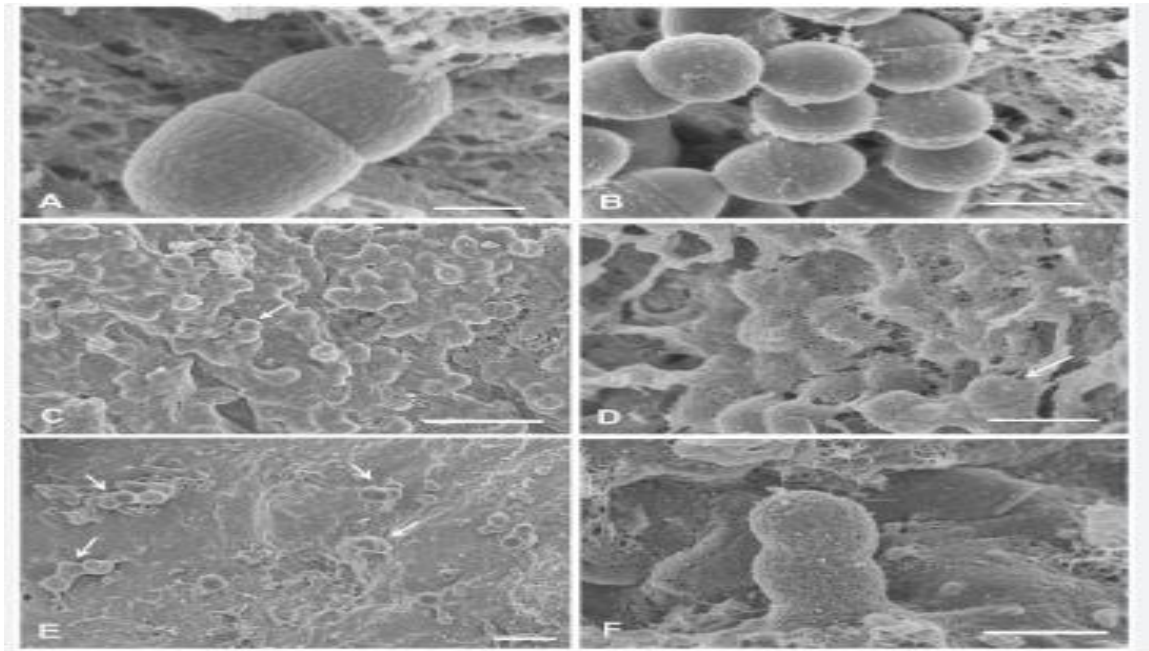


Figure 9 : Production du biofilm par une souche d'*E. faecalis* dans un tissu valvulaire au fil du temps. Image obtenue par comptage sur plaque en microscopie électronique à balayage à haute résolution (FESEM) (CHUANG-SMITH et *al.*, 2010)

Chapitre III: Résistance des entérocoques aux antibiotiques

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

Comme commensaux normaux du tractus gastro-intestinal humain, les entérocoques présentent une résistance significative à une grande variété d'agents antimicrobiens. Cette résistance est presque pertinente dans la plupart des contextes écologiques naturels, occupés par les entérocoques. Ces derniers sont régulièrement exposés à une myriade d'antibiotiques au cours des soins médicaux et la résistance des entérocoques joue un rôle clé dans la dynamique écologique qui se produit pendant et après un traitement aux antibiotiques. En outre, leur résistance a mis en échec les efforts déployés par la médecine moderne pour faire face aux infections causées par les entérocoques (ANDLEEB et *al.*, 2020).

1. Historique

Indubitablement, les antimicrobiens sont actuellement l'un des groupes de médicaments les plus fréquemment utilisés en médecine. Leur utilisation clinique, dès la fin de la moitié du XX^{ème} siècle, a profondément modifié le pronostic des maladies infectieuses causées par des bactéries (DE BRIYNE et *al.*, 2020).

« ERNEST DUCHESNE », étudiant en thèse à Lyon, en 1897 a mis en évidence un effet antagoniste entre les champignons et les bactéries, lorsqu'ils sont injectés à des cobayes, ceux-ci mourant moins de l'infection bactérienne. Plus tard, en 1928, «ALEXANDER FLEMING », médecin biologiste à Londres, a observé une inhibition de la poussée bactérienne d'une culture de staphylocoques en présence d'une culture de « *Penicillium notatum* ». Il a isolé la molécule produite par ce champignon et l'a nommé « pénicilline G ». Cette substance est capable d'agir contre *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*, et elle est pratiquement dépourvue de toxicité (DEBRIYNE et *al.*, 2020).

Plusieurs années plus tard, de nombreuses recherches ont été nécessaires pour optimiser les conditions de production de la pénicilline, et permettre son utilisation à grande échelle pendant la seconde guerre mondiale.

De 1932 à 1937, les premiers sulfamides, les plus toxiques que la pénicilline, sont également découverts par «GERHARD DOMAGK», ainsi que la streptomycine en 1944 par « SELMANWAKSMAN », qui ont valu à chacun de ces chercheurs un prix Nobel (EMILIE CARDOT MARTIN et *al.*, 2019).

Ces découvertes médicales majeures marquent le début de la découverte de nombreuses familles d'antibiotiques, qui peuvent être soit naturels (produits par des micro-organismes), soit synthétiques (produits chimiquement, sans l'intervention de micro-organismes),

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

soit semi- synthétiques (antibiotiques naturels modifiés chimiquement afin d'en changer leurs propriétés). Plusieurs travaux ont été réalisés plus tard, pour comprendre les mécanismes moléculaires de la résistance des entérocoques (EMILIE CARDOT MARTIN et *al.*, 2019).

Tableau II : Classes et premières années d'utilisation des principaux antibiotiques (EMILIE CARDOT MARTIN et *al.*, 2019).

Antibiotique	Classe	Première année d'utilisation en santé humaine
P-aminophénylsulfamide	Sulfamides	1937
Pénicilline	β -lactamines	1943
Streptomycine	Aminosides	1947
Tétracycline	Cyclines	1952
Méticilline	β -lactamines	1960
Acide nalidixique	Quinolones	1964
Gentamicine	Aminosides	1967
Vancomycine	Glycopeptides	1972
Céfotaxime	β -lactamines	1981
Linézolide	Oxazolidinones	2000
Daptomycine	Lipopeptides	2003
Ceftolozane-tazobactam	β -lactamines	2017

2. Définition d'un antibiotique

Le mot « antibiotique » dérive du terme « antibiose » crée en 1889 par « VUILLEMIN » pour désigner les phénomènes d'antagonisme entre les micro-organismes vivants. L'antibiotique en grec signifie : « anti = contre » et « bios = la vie », c'est une substance de nature chimique produite naturellement par des microorganismes (capable d'être bactériostatique qui inhibe la prolifération bactérienne ou bien bactéricide responsable de la destruction de la souche) ou synthétisée chimiquement au laboratoire (DENIS et *al.*, 2016).

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

3. Fonctionnement de l'antibiotique

Les antibiotiques sont des molécules qui agissent sur des endroits précis, appelés «sites d'actions des bactéries », afin de détruire ou ralentir leurs multiplications en déséquilibrant leur biosynthèse. Elles peuvent alors jouer le rôle de bactéricides ou de bactériostatiques (PLESIAT, 2012).

Ces agents antibactériens doivent se lier à des cibles bien spécifiques sur la cellule bactérienne pour exercer leurs actions sans nuire à l'organisme hôte (BRYSKIER, 1999). Ils ciblent les bactéries en inhibant des fonctions physiologiques spécifiques telles que la synthèse de la paroi cellulaire, la transcription, la réplication de l'ADN, la synthèse de protéines et la respiration cellulaire (PLESIAT, 2012).

Un grand nombre des antibiotiques existants sont constitués de molécules naturelles, fabriquées par des microorganismes (champignons ou d'autres bactéries). Ces dernières les produisent généralement pour éliminer les bactéries concurrentes avec lesquelles elles sont en compétition dans leur biotope. Cependant, seul un petit nombre d'antibiotiques naturels est utilisable en thérapeutique humaine, pour des raisons de disponibilité dans l'organisme ou d'effets indésirables (PLESIAT, 2012).

L'emploi excessif d'agents antibactériens représente le facteur prédominant favorisant la croissance de la résistance aux antibiotiques, ce qui a entraîné l'apparition et la propagation des souches bactériennes résistantes, ainsi que des gènes de résistance tant chez les animaux que chez les êtres humains (LUKASOVA et SUSTACKOVA, 2003).

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la résistance aux antibiotiques désigne la capacité des bactéries à survivre à l'effet des agents antimicrobiens, qui ont normalement un effet inhibiteur sur leur croissance. Cependant, un grand nombre de molécules disponible aujourd'hui sur le marché sont des molécules de synthèse, dérivées ou non d'antibiotiques naturels, en particulier pour contourner les problèmes de résistance (LOCHMANN, 1994).

4. Principaux paramètres influençant l'activité de l'antibiotique

L'efficacité d'un antibiotique dépend de deux facteurs principaux.

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

4.1 La CMI « Concentration Minimale Inhibitrice »

La CMI désigne la concentration la plus faible d'antibiotique, qui est capable d'empêcher la croissance des bactéries, autrement dit c'est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible après 18 heures de culture à 37°C.

La concentration minimale inhibitrice peut être influencée par la taille de l'inoculum bactérien, l'état du milieu (solide ou liquide) et son pH.

4.2 La CMB « concentration minimale bactéricide »

Elle correspond à la concentration minimale qui tue 99% de la population bactérienne après 18 heures de culture à 37 °C (SINGLETON, 2005).

→ Lorsque le rapport **CMB/CMI** est égal à 1, on dit que l'activité de l'antibiotique est **bactéricide**, toutefois si le même rapport est supérieur à 1, on note que l'antibiotique est **bactériostatique** (SINGLETON, 2005).

5. Critères de classification des antibiotiques

5.1 Origine

Selon GAUDY et BUXERAUD (2005), cette classification est basée sur la source de l'apparition de l'antibiotique. Cette substance a trois origines essentielles :

- **Naturelle**

L'antibiotique est produit par des micro-organismes, soit par des champignons (*Penicillium*, *Cephalosporium*) ou bien par des bactéries (*Streptomyces griseus*) où le microorganisme contient des gènes nécessaires à la synthèse de l'antibiotique.

- **Synthétique**

Les antibiotiques sont obtenus par voie chimique, tels que la pénicilline qui est un antibiotique synthétisé (fabriqué au laboratoire), les sulfamides et les acides nalidixiques.

- **Semi-synthétique**

Les antibiotiques sont obtenus par un radical chimique greffé sur une fraction moléculaire naturelle (ex. méticilline).

5.2 Spectre d'activité

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

Selon GAUDY et BUXERAUD (2005), on trouve :

- **Les antibiotiques à large spectre**

Les antibiotiques à large spectre sont actifs sur la majorité des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

- **Les antibiotiques à spectre limité**

Les antibiotiques à spectre limité sont actifs sur les bactéries à Gram positif et sur quelques bactéries à Gram négatif.

- **Les antibiotiques étroits**

Les antibiotiques étroits sont actifs uniquement sur certaines bactéries à Gram positif ou à Gram négatif.

5.3 Mode d'action d'un antibiotique

Les antibiotiques agissent sur des cibles bactériennes bien précises. Certains inhibent la formation de leur paroi et désorganisent leur membrane, d'autre inhibent les différentes étapes de la synthèse protéique ou d'acide nucléique. Selon GAUDY et BUXERAUD(2005), l'antibiotique exerce deux types d'action :

- **Bactériostatique**

Ce sont des antibiotiques qui inhibent la croissance et la prolifération bactérienne.

- **Bactéricide**

Ce sont des antibiotiques qui provoquent définitivement la mort de la bactérie.

6. Classification et mode d'action des antibiotiques

La classification des antibiotiques en familles et sous familles est devenue indispensable, cela est dû à l'abondance de ces molécules après des années de la découverte de la pénicilline (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

Les antibiotiques sont classés en fonction de leur structure chimique et de leur mode d'action.

6.1 Antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne

6.1.1 Bêtalactamines

Les bêtalactamines forment une famille très complexe, dont la structure du noyau de base contenant toujours le cycle « bêtalactame ». Ce dernier est un cycle hétérocyclique tétragonal

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

commun à toutes les molécules désignées de cette famille. Ce noyau est crucial pour leur activité biologique car il gouverne toute la chimie de cette catégorie d'antibiotiques. En outre, toute rupture de ce cycle entraîne une désactivation biologique de la molécule (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

Parmi les antibiotiques de cette classe se trouve : les pénicillines, les céphalosporines, les céphamycines, les carbapénèmes, les clavâmes et les monobactames (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

Les bêta-lactamines doivent traverser la membrane externe de la bactérie pour atteindre les PLP cibles. Cette membrane agit comme une barrière hydrophobe et les bêta-lactamines qui sont, le plus souvent, des molécules hydrophiles vont traverser cette barrière essentiellement par la voie des porines. Après avoir traversé la membrane externe, les bêta-lactamines diffusent facilement à travers le peptidoglycane car le noyau bêta-lactame présente une analogie de structure avec le dipeptide terminal D-alanine-D-alanine (D-Ala-D-Ala) du pentapeptide constitutif du peptidoglycane. De ce fait, les bêta-lactamines se comportent comme des substrats suicides transpeptidases. Elles se lient spécifiquement aux sites actifs de ces enzymes appelés « PLP » (protéines liants la pénicilline) (SINGLETON, 2002 ; GAUDY et BUXERAUD, 2005).

Quand ces transpeptidases se fixent à la pénicilline, elles perdent leur activité catalytique, mais la paroi cellulaire continue à être formée. Cependant, la paroi nouvellement synthétisée n'est plus réticulée et perd ainsi son rôle de structure. En outre, le complexe [antibiotique-PLP] stimule la production d'autolysines qui digèrent la paroi cellulaire. Le résultat de ces mécanismes est une paroi cellulaire affaiblie et s'autodégradée. Cela amène, dans des conditions normales à la lyse de la cellule due à la différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la bactérie (SINGLETON, 2002 ; GAUDY et BUXERAUD, 2005).

6.1.2 Les glycopeptides

Les glycopeptides appelés aussi « lypoglycopeptides » sont des macromolécules de haut poids moléculaires. Ils sont constitués d'un squelette peptidique de sept acides aminés. Ils forment une famille unique d'antibiotiques d'une valeur thérapeutique importante.

Les deux principaux représentants de cette famille sont : la vancomycine et la téicoplanine dont le poids moléculaire est respectivement de 1.45 kDa et 1.89 kDa (GAUDY et BRUXERAUD, 2005). Les glycopeptides et leurs dérivés les plus récents sont utilisés pour traiter les infections graves dues aux bactéries à Gram positif résistantes. Ce sont des antibiotiques agissant principalement sur la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Ils se fixent de manière non covalente sur la partie D-Ala-D-Ala terminale des peptides impliqués dans la phase

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

de polymérisation du peptidoglycane. De ce fait, la polymérisation est inhibée (MILLER et *al.*, 2014).

6.1.3 Fosfomycine

La fosfomycine est un antibiotique bactéricide à l'origine produit par des bactéries, en particulier celles appartenant au genre *Streptomyces*. C'est un dérivé de l'acide phosphonique, plus précisément de l'acide « L-cis1-2-époxy-propyl-phosphonique » (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

Elle possède un large spectre d'activité, elle agit en tant qu'inhibiteur de la synthèse de peptidoglycane, en ciblant la «phosphoénolpyruvate transférase», qui est la première enzyme impliquée dans la synthèse de peptidoglycane (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

6.2 Antibiotiques entraînant la destruction de la membrane cytoplasmique

6.2.1 Daptomycines

La daptomycine est un antibiotique lipopeptidique, qui possède une forte action bactéricide contre les bactéries à Gram-positif (MILLER et *al.*, 2014).

Cet antibiotique réagit par l'altération de l'homéostasie de l'enveloppe bactérienne qui veut dire la perturbation de l'équilibre de l'enveloppe bactérienne. La daptomycine s'insère à la membrane plasmique sur la face externe et forme par la suite des groupes d'oligomères qui vont empêcher la synthèse protéique des acides nucléiques (REISSIER, 2016).

6.3 Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

6.3.1 Les aminosides ou aminoglycosides

Ce sont des hétérosides naturels ou d'hémi-synthèse, à large spectre d'activité, produits à partir d'actinomycètes ou de *Bacillus* (GAUDY et BUXERAUD, 2005). Ils incluent l'amikacine, la gentamicine, la kanamycine, la néomycine et la streptomycine (SINGLETON, 2002). Les aminoglycosides ont été les antibiotiques de choix et les plus importants, dans le traitement des infections aiguës dues aux entérocoques, en raison de leur activité bactéricide, et active bien sur les bactéries à Gram positif, que sur les bactéries à Gram négatif (GAUDY et BUXERAUD, 2005). Les aminosides agissent sur diverses fonctions bactériennes, mais leur effet principal vient de leur fixation à la sous unité 30S du ribosome, où ils interfèrent avec la synthèse des protéines en perturbant la lecture du code génétique menant à l'inhibition de toutes les étapes de la synthèse protéique (ASLANGUL et *al.*, 2006).

6.3.2 Les macrolides

Les macrolides sont employés pour traiter les infections chez l'homme. Ce sont des composés possédant des propriétés qui peuvent être bactériostatiques (JENSEN et al, 1999).

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

Ces composés sont constitués d'un grand cycle lactone, avec plus de 12 atomes, substitués par un ou plusieurs sucres ou sucres aminés, et ils sont très efficaces contre les bactéries à Gram positives (SINGLETON, 2002). Ils se lient à la cible ARN ribosomique 23S de la sous-unité 50S du ribosome, ce qui entraîne l'inhibition de la synthèse protéique (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

6.3.3 Chloramphénicol

Le chloramphénicol est un antibiotique élaboré par *Streptomyces venezuelae*, à large spectre qui agit comme agent bactériostatique, mais son utilisation est restreinte en raison de sa conformité, qui a une incidence sur les ribosomes mitochondriaux présents dans les cellules des mammifères (SINGLETON, 2002).

Cette petite molécule inhibe la peptidyltransférase. Il est possible qu'il empêche la liaison normale de l'aminoacyl-ARNt au site « ribosomique A ». Ceci a pour conséquence une inhibition de la synthèse des protéines (SINGLETON, 2005).

6.3.4 Tétracyclines

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques, à large spectre d'activité (SINGLETON, 2002). Ils sont de nombre de sept, ils possèdent tous un noyau à quatre cycles de type «naphtacène carboxamide» sur lequel divers radicaux viennent se substituer sur les carbones du système cyclique (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

Le mode d'action des tétracyclines est basé sur l'inhibition de la synthèse des protéines, en se liant sur la sous-unité 30S du ribosome (site A), et en inhibant la fixation des aminoacyl-ARNt sur le site ribosomal spécifique (SINGLETON, 2005).

Ces molécules sont employées pour traiter des affections humaines et animales, causées particulièrement par *Brucella*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* et *Rickettsia* (SINGLETON, 2005).

6.3.5 Oxazolidines

L'antibiotique représentatif dans ce groupe est le linézolide, il démontre une forte action antimicrobienne contre les bactéries à Gram positif (DIEKEMA, 2001).

La substance en question est une molécule synthétique. Elle agit en inhibant la synthèse des protéines chez les bactéries, en se liant au site « P » de la sous-unité 50 S, ce qui empêche son union à la sous-unité 30 S. Cette dernière est associée à l'ARNm et à l'ARNt portant la méthionine, qui est le premier acide aminé. En conséquence, la formation du ribosome 70 S est altérée. L'initiation de la synthèse des protéines chez les bactéries est interrompue (DUTRONC et al, 2005).

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

6.4 Antibiotiques inhibant le fonctionnement de l'acide désoxyribonucléique (ADN)

6.4.1 Quinolones

Les quinolones ont une structure générale dérivant de l'acide « dihydro1,4 oxo 4 quinoléine carboxylique ». Les quinolones sont des bactéricides obtenus par voie synthétique, à large spectre d'action. Toutefois, en raison de leur usage fréquent, il est essentiel de les utiliser de manière rationnelle pour éviter l'émergence de souches résistantes (SINGLETON, 2005).

Les quinolones inhibent la croissance des bactéries en interférant avec la réplication de l'ADN, en particulier en se liant aux topoisomérases de type II qui régulent l'enroulement de l'ADN (ADN gyrase et ADN topoisomérase IV), et en inhibant leur fonction, conduisant ainsi à des ruptures mortelles du double brin de l'ADN (KRISTICH et *al.*, 2014).

Les quinolones de la première génération (cinoxacine, acide nalidixique, acide oxolinique et acide pipémidique) sont principalement efficaces contre les bactéries à Gram négatif, bien qu'elles ne soient pas efficaces spécialement contre *Pseudomonas aeruginosa* (SINGLETON, 2005).

6.4.2 Imidasolés

Les antibiotiques de cette famille agissent sur la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN), ce qui modifie le message génétique. Ces composés ne ciblent que les anaérobies stricts et certains parasites protozoaires chez l'homme (GAUDY et BUXERAUD, 2005). Actuellement, il y a quatre molécules disponibles : Metronidazole, Tinidazole, Ornidazole et Secnidazole (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

7. Modes d'utilisation des antibiotiques

Au début du 20^{ème} siècle, et après la 2^{ème} guerre mondiale, le monde a souffert des épidémies et particulièrement de la pénurie alimentaires, l'agricole ne satisfait pas la demande. De forte pression a été exercée sur les agriculteurs, afin d'accélérer l'utilisation des antibiotiques pour améliorer la production animale (DEBRIYNE et al, 2020).

Les antimicrobiens ont divers modes d'utilisation :

- **Le mode prophylactique**

C'est un traitement préventif par administration d'antibiotiques à plusieurs groupes d'animaux, afin de prévenir une maladie ou une infection. Il s'applique généralement avant que les signes cliniques apparaissent, il est utilisé lorsqu'un risque de contamination existe au mélange des animaux, au moment de transport et même au moment de sevrage. Cette utilisation est actuellement controversée à causes des résistances aux antibiotiques très alarmantes.

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

Cependant, ces différentes applications d'antibiotiques, peuvent être remplacées par des mesures préventives plus sanitaires (hygiène, bonne nutrition, biosécurité...) afin de faire preuve d'une élimination progressive des antibiotiques (DEBRIYNE et *al*, 2020).

- **Mode métaphylaxique**

C'est un traitement de contrôle, par administration d'antibiotique à un seul groupe d'animaux, la ou les signes cliniques ont été déjà établis pour une petite partie de groupe, afin de traiter l'infection, et contrôler sa propagation aux autres groupes qui risquent d'être atteints mais sans présence de signes cliniques (DEBRIYNE et *al*, 2020).

- **Mode curatif**

C'est un traitement thérapeutique donné, pour un animal ou un groupe atteint, dont le diagnostic est posé (DEBRIYNE et *al*, 2020).

- **Promoteurs de croissance**

C'est l'utilisation des antimicrobiens en absence d'infection, pendant une longue durée et à une faible dose dans l'alimentation animale, afin d'améliorer les performances de croissance et de rendement. Cette utilisation a incité aussi des résistances aux antibiotiques, montrés par une étude faite au Danemark, Finlande et Norvège, chez *Enterococcus faecium*, réalisée particulièrement chez le porc et le poulet de chair. En 2006 et selon le règlement sur les additifs alimentaires, l'union européenne a interdit l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissances, la même réglementation est mise en évidence aux Etats-Unis en 2017. Selon l'enquête faite par l'organisation mondiale de la santé des animaux (OMSA), des listes des antibiotiques interdites et autorisés ont été faites et suivit par l'ensemble des pays membres de l'OIE (DEBRIYNE et *al*, 2020).

8. Emergence et propagation des résistances aux antibiotiques

L'utilisation non contrôlée des antibiotiques, a fait naître la résistance aux antimicrobiens des entéropathogènes zoonotiques (*Salmonella*, *Yersinia* ...), et de la flore normale symbiote (*E. coli* et *Enterococcus*). La propagation de cette résistance est fort possible entre les animaux et homme. Elle peut être directe, par contact avec les agents infectés par la souche résistante. Indirectement, via la chaîne alimentaire, l'eau contaminée et l'épandage des déchets sur les terres agricoles. Il existe aussi la propagation de la résistance, pour donner suite

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

à la transmission des gènes codant à la résistance. Cela se fait par le transfert horizontal des éléments transposables (plasmides), par conjugaison bactérienne (ANDLEEB et *al*, 2020).

9. Notion de la résistance bactérienne aux antibiotiques

- Lorsqu'une souche bactérienne est capable de tolérer des doses d'antibiotiques plus élevées, que celles qui suffisent à empêcher la croissance de la plupart des autres souches de la même espèce, la souche est qualifiée de « souche résistante » (MAC GOVAN et WISE, 2001).
- Lorsqu'une souche de bactérie n'est plus sensible, qu'à un petit nombre d'antibiotiques, qui veut dire qu'elle est résistante à plusieurs familles d'antibiotiques, la bactérie est appelée « bactérie multirésistante » (STING et *al.*, 2013).

10. Antibiorésistance chez les entérocoques

Les antibiotiques exercent une pression de sélection naturelle sur les populations bactériennes, à l'origine de l'émergence de plus en plus fréquente de bactéries résistantes. Ce problème majeur de santé publique est fortement lié au mésusage, et à la surconsommation des antibiotiques en santé humaine et animale, accentués par la diffusion des antibiotiques et les différentes bactéries résistantes dans l'environnement telles que les entérocoques (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

Les entérocoques sont des bactéries lactiques responsables d'infection hospitalières graves. Parmi une vingtaine d'espèces d'*Enterococcus*, *E. faecalis* et *E. faecium* représentent plus de 95% des isolats cliniques. *E. faecalis* était l'espèce nettement prédominante avec plus de 80% des souches isolées. L'émergence des entérocoques, en particulier en situation nosocomiale, est attribuée à l'existence chez ces bactéries des résistances naturelles multiples aux antibiotiques dont les aminosides (à bas niveau), les céphalosporines (à haute niveau), les lincosamides et la clindamycine (pour *E. faecalis*). A côté de cette résistance naturelle, il y'a eu l'apparition d'une résistance acquise aux trois grandes classes d'antibiotiques, utilisées dans le traitement des infections à entérocoques, qui sont les pénicillines, les glycopeptides et les aminosides (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

11. Types de résistance des entérocoques aux antibiotiques

Comme indiqué précédemment, l'importance clinique du genre *Enterococcus* est directement liée à sa résistance aux antibiotiques, ce qui contribue au risque de colonisation et d'infection. Les espèces cliniquement plus importantes sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Bien que les caractéristiques de résistance des espèces d'*Enterococcus*

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

soient différentes de façon importante, ils sont soit intrinsèquement résistants, ou ils possèdent des déterminants de résistance acquise (extrinsèque) (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

11.1 Résistance naturelle « intrinsèque »

La résistance intrinsèque est une résistance naturelle codée dans le génome de certains membres de micro-organisme. Les gènes de résistance intrinsèque se trouvent particulièrement dans le chromosome, elle diffère puissamment de la résistance acquise (MUNDY et *al.*, 2000).

La résistance intrinsèque des entérocoques à plusieurs agents antimicrobiens, peut être avantageusement utilisés, pour assurer l'acquisition ultérieure de gènes codant pour une résistance à haut niveau, et à plusieurs molécules d'antibiotiques, telles que les aminoglycosides, les pénicillines, la tétracycline, le chloramphénicol, le sulfamide, la vancomycine et aux faibles concentrations de clindamycine. Ceci permet à l'organisme de survivre dans un environnement dans lequel les agents antimicrobiens sont utilisés (MUNDY et *al.*, 2000).

La résistance intrinsèque modérée est une résistance qui réfère à une tolérance de la bactérie face à un antibiotique (exemple : CMI/CMB bêtalactamines ≥ 32 µg/ml chez l'espèce *E. faecium*). Cette résistance intrinsèque à plusieurs antibiotiques peut engendrer un avantage cumulatif des entérocoques, dans l'acquisition de gènes codant pour une résistance à de fortes concentrations envers d'autres antimicrobiens. Cependant, ce n'est pas toutes les espèces d'*Enterococcus* qui ont des résistances intrinsèques (ex. : *E. durans*) (TANNOCK et COOK, 2002).

La résistance naturelle peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique (faible affinité), ou à l'absence totale de cette cible. Cette résistance est transmissible à la descendance lors de la division cellulaire (transmission verticale) (WILLEMS et BONTEN, 2008).

Le tableau suivant montre les différents mécanismes utilisés par les entérocoques pour résister aux antibiotiques.

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

Tableau III: Résistance intrinsèque aux antimicrobiens chez les entérocoques (TREMBLAY, 2012).

Antimicrobiens	Mécanisme de résistance intrinsèque
Bêtalactamines	Surproduction de PLP de faible affinité et/ou diminution d'affinité pour la liaison des bêtalactamines
Aminoglycosides	Membrane cellulaire imperméable, faible entrée, et manque d'une chaîne de transport d'électrons
Clindamycine et lincomycine (<i>E. faecalis</i>)	Faible entrée et faible perméabilité
Quinolones	Faible perméabilité, entrée réduite et environnement anaérobie
Triméthoprim- sulfaméthoxazole	Résistance in vivo par l'utilisation de folates exogènes
Streptogramines A (<i>E. faecalis</i>)	Entrée réduite par transporteur ABC
Glycopeptides (<i>E. gallinarum</i> et <i>E. casseliflavus</i>)	Présence d'une ligase D-Ala-D-Ser (phénotype VanC)

11.2 La résistance acquise « extrinsèque »

La résistance extrinsèque est une résistance acquise, résulte soit d'une mutation dans l'ADN existant, ou bien d'une acquisition d'un nouveau gène via le transfert de plasmides et de transposons, vu qu'ils possèdent des déterminants de résistance (MUNDY et *al.*, 2000). En revanche, cette dernière est présente seulement chez quelques membres d'espèce bactérienne, et elle est obtenue par le transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles, ou même via une sélection lors de l'exposition aux antibiotiques (TEIXEIRA et *al.*, 2011).

La résistance acquise comprend la résistance au chloramphénicol, à l'érythromycine, à des concentrations élevées de clindamycine et d'aminoglycosides, à la tétracycline, à des concentrations élevées de β -lactamines, aux fluoroquinolones et aux glycopeptides tels que la vancomycine (WILLEMS et BONTEN, 2008).

La reconnaissance de ces résistances acquises définit les phénotypes de résistance (WILLEMS et BONTEN, 2008).

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

12. Mécanismes moléculaires de la résistance des entérocoques aux antibiotiques

La recherche de nouvelles molécules s'avère nécessaire car, dès le début de l'ère de l'antibiothérapie, les bactéries ont montré qu'elles pouvaient devenir résistantes aux différents types d'antibiotiques. Cette capacité est liée directement à un ou plusieurs mécanismes biochimiques, ce qui implique l'étude des interactions entre l'antibiotique et les voies métaboliques de la bactérie (BERCHE *et al.*, 1988).

Beaucoup d'efforts ont été consacrés à la compréhension de ces mécanismes moléculaires de la résistance des entérocoques.

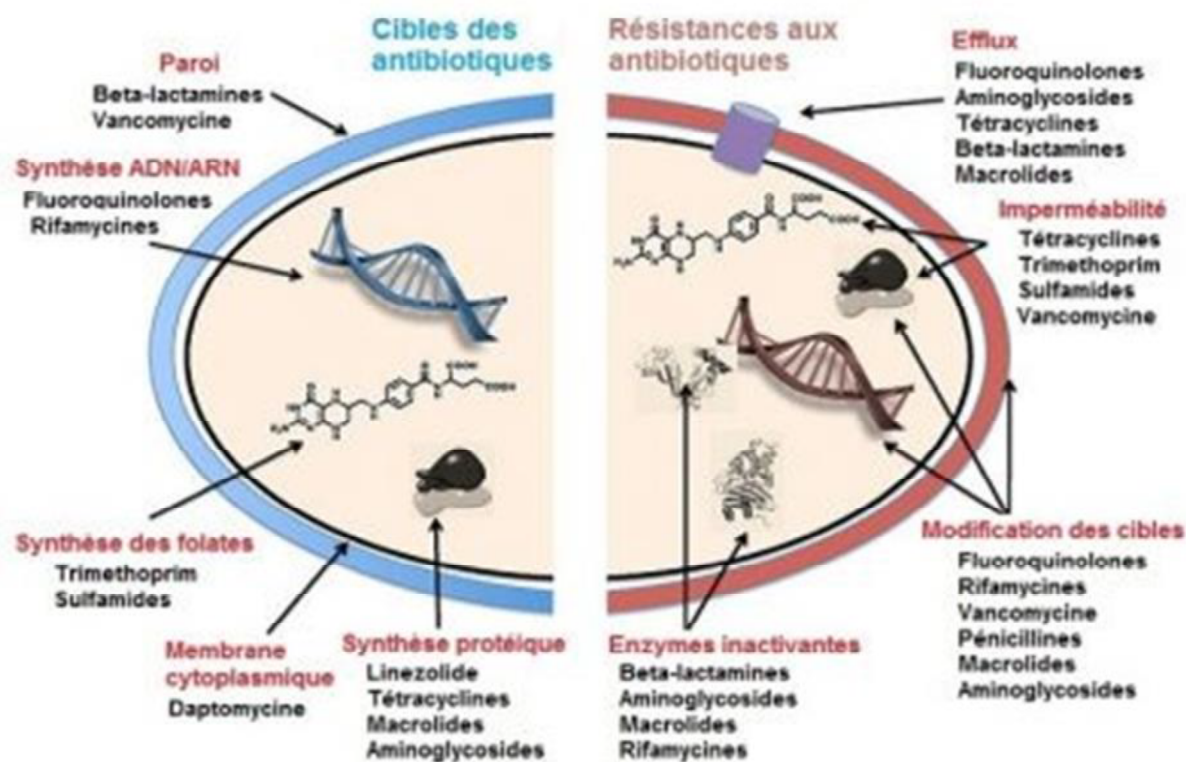


Figure 10 : Cible des antibiotiques et mécanismes de résistance bactérienne (MAURIN MAX *et al.*, 2018)

12.1 Résistance des entérocoques vis-à-vis les β -lactamines

Les entérocoques sont beaucoup plus résistants de façon intrinsèque, envers les antimicrobiens que d'autres bactéries à Gram-positif cliniquement importantes. Bien que la raison de cette observation soit encore mal connue, mais cela est probablement dû à leur besoin de survie, et de persistance dans des écosystèmes hautement compétitifs et potentiellement défavorable, tels que le tractus gastro-intestinal (TANNOCK et COOK, 2002).

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

• Résistance naturelle « intrinsèque »

Les entérocoques présentent une résistance intrinsèque aux céphalosporines, et une sensibilité étendue (FONTANA et *al*, 1994). En revanche, la résistance à la pénicilline est principalement liée à des mutations ou à la surproduction de la *pbp5*, qui est une protéine liant la pénicilline (ARIAS et MURRAY, 2012).

• Résistance acquise « extrinsèque »

Les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines inhibent la croissance des bactéries, en servant de substrat de suicide pour la D-transpeptidase (également connu sous le nom de protéine de liaison à la pénicilline ou PLP), qui catalysent la réticulation des chaînes peptidiques latérales du peptidoglycane au cours de la synthèse de ce dernier. Une fois modifiés par un antibiotique du type bêta-lactame, les PLPs sont inactivées, ce qui empêche la synthèse continue de la paroi cellulaire (SHEPARD et GILMORE, 2002)

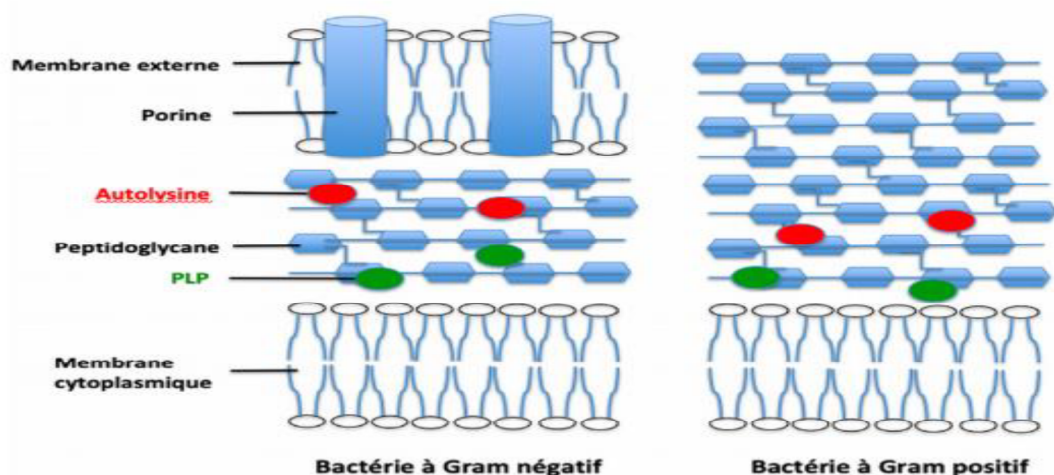


Figure 11 : Structure de la paroi bactérienne (EMILIE CARDOT MARTIN et *al.*, 2019)

La résistance aux β lactamines est dû à la modification de la protéine de liaison à la pénicillines (PLP5) (LEE et *al*, 2009). L'enzyme β lactamase inactive l'antibiotique en clivent le cycle β -lactame qui a été décrit à la fois chez *E. faecalis* et *E. faecium* (CONDRON et *al*, 1992). En diminuant l'affinité pour les β lactamines, ces mutations proches du site catalytique seraient responsables de l'augmentation des valeurs de CMI (RICE et *al*, 2004).

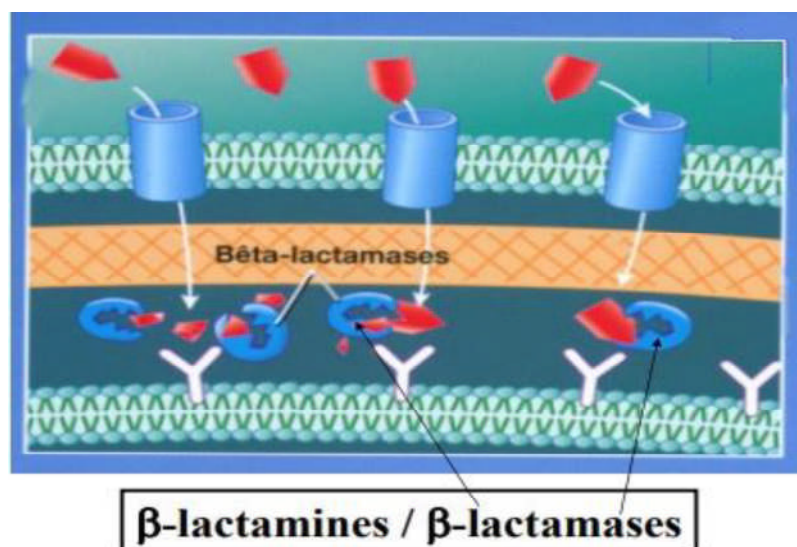


Figure 12 : Inactivation des antibiotiques par des β -lactamases (LAVIGNE, 2007)

12.2 Résistance des entérocoques vis-à-vis les glycopeptides

Les glycopeptides tels que la vancomycine, la téicoplanine et leurs dérivés les plus récents, sont utilisés pour traiter les infections graves dues aux bactéries à Gram positif résistantes (BOUSSOUAR, 2017).

La vancomycine est un glycopeptide interférant avec la production de la paroi cellulaire. Elle est active contre la plupart des bactéries à Gram positif, tandis qu'il peut y'avoir une résistance chez la majorité des bactéries à Gram négatif (FRENCH, 2006). Ceci se déroule par l'association de cinq liaisons d'hydrogène aux « D-Ala-D-Ala » terminaux des précurseurs pentapeptidiques avec une haute affinité, en bloquant l'addition des précurseurs par transglycosylation à la chaîne de peptidoglycane, prévenant ainsi les étapes ultérieures de polymérisation catalysée par des D-transpeptidases. Ce qui, aboutira à l'accumulation cytoplasmique de précurseurs (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

Chez les patients hospitalisés, l'utilisation intensive de la vancomycine, de céphalosporines de troisième génération et les lactames similaires, présentent le facteur de risque le plus important pour l'apparition de l'ERV « Entérocoques Résistants à la Vancomycine » (EDMOND et *al.*, 1995). Il est communément admis aussi que l'utilisation de certains antibiotiques, tels que « l'Avoparcine » en tant que promoteur de croissance chez les animaux de rente a été impliqué dans l'émergence des entérocoques résistants à la vancomycine (WERNER, 2012).

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

A présent, il existe neuf groupes de gènes conférant une résistance aux glycopeptides (*Van A*, *Van B*, *Van C*, *Van D*, *Van E*, *Van F*, *Van G*, *Van L*, *Van M*, *Van N*), ont été décrits chez la plupart des espèces des entérocoques (WERNER, 2012). Huit résultent d'une résistance acquise (*VanA*, *B*, *D*, *E*, *G*, *L*, *M* et *N*) et un résulte (*Van C*), c'est une résistance intrinsèque chez *E. gallinarum* et *E. casseliflavus* (COURVALIN et LECLERCQ, 2012).

Le type le prédominant de la résistance est « *Van A* », il est hautement transférable à d'autres pathogènes, il fait partie du dérivé de transposon « Tn3 », qui a été trouvé dans des plasmides conjugatif de différentes familles (FRIETAS et *al.*, 2013).

Tableau IV: Différents phénotypes de résistance des entérocoques (BRYSKIER, 1999).

	<i>Van A</i>	<i>Van B</i>	<i>Van C-1</i>	<i>Van C-2</i>
Phénotype	<i>Van A</i>	<i>Van B</i>	<i>Van C</i>	<i>Van C</i>
CMI (mg/l) Vancomycine	64 >1000	4-1000	2-32	2-32
CMI (mg/l) Téicoplanine	16-512	0.5-1	0.5-1	0.5-1
Support génétique	Plasmidique	Chromosomique	Chromosomique	Chromosomique
Expression	Inductible	Inductible	Constitutive	Constitutive
Transférabilité	+	+	-	-
Espèces	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. avium</i> <i>E. durans</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. munditii</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>

12.3 Résistance des entérocoques vis-à-vis les tétracyclines

La résistance à la tétracycline chez les entérocoques peut être conférée par divers gènes, et divers mécanismes moléculaires, y compris les mécanismes d'efflux actif qui sont codés par les deux gènes « *tet(K)* » et « *tet(L)* », le mécanisme de la protection ribosomale codée

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

essentiellement par le gène « *tet (M)* », « *tet (O)* » et « *tet(S)* », ainsi qu'un autre mécanisme reste pour l'instant inconnu codé par le gène « *tet(U)* » (CHOPRA et ROBERTS, 2001). Le gène « *tet (M)* » est souvent associé au « Tn916-Tn1545 », c'est une famille de transposons conjugatifs (CLEWELL et *al.*, 2000). Ces transposons sont très abondants chez les entérocoques d'origine alimentaire, c'est pourquoi, la résistance à la tétracycline chez les entérocoques est fréquemment liée à la présence du gène « *tet(M)* », qui confère une grande protection ribosomale (HAACK et ANDRWES, 2000). D'autres gènes apparentés offrant une protection ribosomale, ont également été décrits. Certains d'eux codent pour des protéines, qui se lient au ribosome et modifie la conformation de ce dernier, et empêche la fixation de la tétracycline (LECLERCQ, 1997).

12.4 Résistance des entérocoques vis-à-vis la daptomycine

Le mécanisme de résistance décrit chez l'espèce *E. faecalis*, consiste en une modification du site de fixation de la daptomycine. Contrairement aux souches sensibles, la daptomycine est incapable de se fixer au niveau du septum (site de fixation préférentiel), sur les souches résistantes. La fixation se fait alors en périphérie de la bactérie, rendant la daptomycine inefficace (TRAN et *al.*, 2013). Tandis que, la résistance à la daptomycine chez *E. faecium*, entraîne un épaissement de la membrane bactérienne, une augmentation de la charge et une diminution de la dépolarisation de la membrane au contact de la daptomycine (REISSIER et *al.*, 2016).

CHAPITRE III : Résistance des entérocoques aux antibiotiques

12.5 Résistance des entérocoques vis-à-vis les macrolides–lincosamide-streptogramine (MLS)

Les antibiotiques MLS constituent un traitement alternatif pour le traitement des infections entérocoque insidieuses (PORTILLO et *al.*, 2000).

- **Mécanisme de modification**

C'est un mécanisme qui modifie une cible donnée, il se fait par une altération de l'ARNr 23S en conférant une large résistance croisée aux antibiotiques macrolides-lincosamide-streptogramine B (MLSB).

- **Mécanisme d'inactivation**

C'est un mécanisme qui confère une résistance spéciale aux antibiotiques (MLS) structurellement apparentés.

- **Mécanismes d'efflux actif**

Les gènes « *mefA* », « *mefE* », « *msrA* » et « *mreA* » ont été impliqués dans l'efflux actif des macrolides chez les bactéries à Gram positives. Les gènes « *mef* » et « *mreA* » ont été associés à la résistance aux macrolides, et le gène « *msrA* » a été associé à la résistance aux macrolides et à la streptogramine B. La résistance à l'érythromycine par les méthylases *erm* de la classe d'hybridation *ermB ermA* a été décrite dans des isolats d'*Enterococcus*. Cependant, même si certains rapports indiquent la présence d'une pompe d'efflux d'érythromycine putative dans ce genre bactérien (LECLERQ et COURVALIN, 1993 ; BERRYMAN et *al.*, 1995 ; JENSEN et *al.*, 1999).

Les lincosamides inhibent la synthèse protéique, en se fixant au ribosome bactérien. Certaines espèces de bactéries à Gram positif, présentent une résistance naturelle aux lincosamides, c'est le cas d'*Enterococcus faecalis*, cette résistance naturelle est associée au gène « *lsa* » qui code pour une protéine apparentée à une pompe d'efflux de type « ABC transporteur ». Ce type de résistance naturelle est également observé pour d'autres espèces d'entérocoques comme *E. avium*, *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*.



Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

1. Objectifs de l'étude

Les objectifs principaux de cette étude sont l'isolement et l'identification d'*Enterococcus* spp du portage intestinal de la volaille (poulet de chair, dinde et poule pondeuse), ainsi que la recherche de leur résistance à une myriade de molécules d'antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire et humaine, dans le but de déceler les souches résistantes aux antibiotiques. En outre, cette étude vise à mettre en évidence quelques facteurs de virulence tels que l'hémolyse et la gélatinase.

2. Matériels

Le tableau ci-dessous présente le matériel employé durant la partie expérimentale au sein du laboratoire.

Tableau V : Matériels utilisés lors de la partie expérimentale

Appareils	Verreries	Outils	Matériels biologiques
- Autoclave (pbi international, Italie) - Balance électronique (Denver Instrument, Etats unis) - Bain Marie (Memmert, Allemagne) - Vortex (Heidolph, Allemagne) - Etuves (Memmert, Allemagne) - Spectrophotomètre (Medline, Grande Bretagne) - Séchoir (Gerhardt, Germany) -Réfrigérateur (Maxi power, Algérie)	- Pipettes Pasteur - Flacons - Lames - Pipettes graduées - Bécher - Tubes à essai	- Micropipette (1000 µl). - Embouts stériles - Anse à boucle - Boîtes de Pétri - Cryotubes - Ecouillons - Pince métallique - Spatule - Seringue - Cuve spectrophotomètre UV - Portoirs - Bec bunsen	- Souche de référence : « <i>Enterococcus faecalis</i> » WDCM00009

3. Milieux de culture et réactifs

- Gélose BEA (Biokar, France)
- Gélose MH (Muller-Hinton) (Biokar diagnostics, France)
- Gélose au sang
- Bouillon BHIB (Bouillon cœur-cerveille) (Biokar diagnostics, France)
- Bouillon BHIB+ 6,5% NaCl (Bouillon cœur-cerveille) (Biokar diagnostics, France)
- Bouillon MH + 6,5% NaCl (Biokar diagnostics, France)
- Gélose BHA + gélatine (Biokar, France)
- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Scharlau, Espagne)
- Eau physiologique stérile
- Glycérol
- Huile d'immersion
- Violet de Gentiane, Lugol, alcool, fuschine
- Disques oxydase (HIMEDIA, Inde) et disques d'antibiotique (Liofilchem, Italie)

4. Collecte des prélèvements

Au cours de cette étude, nous avons effectué 175 prélèvements rectaux du portage intestinal du poulet de chair, de la dinde et de la poule pondeuse. Ces prélèvements ont été réalisés au niveau de deux abattoirs et trois centres d'élevages différents situés à la wilaya de Tizi-Ouzou.

L'étude a été effectuée pendant une période de deux mois et demi, allant du mois de février au mois d'avril. Les différents prélèvements ont été acheminés dans une glacière vers le laboratoire de recherche en Biochimie analytique et en Biotechnologie (LABAB) de l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Tableau VI : Répartition des prélèvements effectués dans les différentes régions de Tizi Ouzou.

Volaille	Centre de prélèvement	Lieu de prélèvement	Elevage	Nombre de prélèvement	Période de réalisation	Nombre total
Poulet de chair	Abattoir Carr- Avic	Taboukirt, Oued Aissi	01	15	Février 2023 à 09H00	89
	Abattoir SARL AINSAR	Tachrouft, Azazga	02	15	Février 2023 à 11H00	
			03	15	Février 2023 à 11H30	
			04	12	Mars 2023 à 12H00	
			05	12	Mars 2023 à 12H30	
	Centre d'élevage	Fliki, Azazga	06	20	Avril 2023 à 10H00	
Dinde	Abattoir SARL AINSAR	Tachrouft, Azazga	07	15	Février 2023 à 14H00	42
			08	12	Mars 2023 à 14H30	
			09	15	Avril 2023 à 13H00	
Poule pondeuse	Centre d'élevage	Kahra, Freha	10	10	Mars 2023 à 9H00	44
			11	10	Mars 2023 à 9H30	
		Ait bouada, Azazga	12	24	Avril 2023 à 8H00	
Total des prélèvements						175

Les prélèvements proviennent de plusieurs élevages de taille différente, dont l'âge et l'origine des poussins sont indiqués dans le tableau 7.

Tableau VII : Taille, âge et origine des différents élevages.

La volaille	Elevage	Critères d'élevage		
		Taille d'élevage	Origine des poussins	Age des individus
Poulet de chair	01	3000	Carr-Avic, Oued aissi	60 J
	02	1200	Kahra, Freha	50 J
	03	2000	Alger	56 J
	04	6000	Ait bouada, Azazga	53 J
	05	1400	Dellys, Boumerdes	42
	06	2000	Taourga, Boumerdes	50 J
Dinde	07	350	Bouira	5 mois
	08	50	Bouira	5 mois et demi
	09	50	Bouira	5 mois
Poule pondeuse	10	3000	Charatti, Alger	15 semaines
	11	2500	Charatti, Alger	18 semaines
	12	4000	Sétif	09 mois

Le prélèvement est effectué à l'aide d'un écouvillon stérile, en introduisant 2 à 4 cm de cet écouvillon dans le sphincter anale (anus de la volaille), suivi par des mouvements de rotations contre la muqueuse rectale, afin de retirer une quantité importante de matière fécale.



Figure 13 : Prélèvement rectal chez le poulet de chair (photo personnelle prise à l'abattoir avicole de SARL AIN SAR)

5. Analyses microbiologique des prélèvements

5.1 Enrichissement des prélèvements

Le prélèvement rectal est ensuite mis dans le bouillon Mueller-Hinton additionné d'une concentration de 6,5% en NaCl, suivi d'une incubation à 45°C pendant 24 heures. Les tubes présentant un trouble bactérien feront l'objet d'un isolement sur la gélose sélective BEA.



Figure 14 : Mise du prélèvement dans un bouillon MH + NaCl (photo personnelle prise à l'abattoir avicole de SARL AIN SAR).

5.2 Isolement des entérocoques sur la gélose bile esculine azide (BEA)

L'isolement des entérocoques est réalisé sur une gélose sélective dite «gélose BEA ». C'est un milieu qui permet la sélection des entérocoques grâce à la présence de deux agents sélectifs, l'azoture de sodium et la bile de bœuf. En effet, le premier agent inhibe la croissance de certaines bactéries à Gram négatifs. Tandis que, le deuxième inhibe la croissance de certains groupes de bactéries à Gram positif.

Un ensemencement de ce milieu est réalisé à partir des bouillons MH présumés positifs. Après l'incubation des boîtes à 37°C pendant 24 heures, les colonies caractéristiques d'entérocoques apparaissent sous forme de petites colonies translucides, noires ou grisâtres entourées d'un noircissement du milieu.

5.3 Purification des souches isolées

La purification des souches d'entérocoques est réalisée sur le même milieu BEA par des repiquages successifs jusqu'à l'obtention de culture pure.



Figure 15 : Purification d'une souche d'entérocoque (photo personnelle prise au laboratoire LABAB).

5.4 Identification des isolats

Le principe de l'identification repose sur une identification macro et microscopique suivie d'une identification biochimique des isolats.

5.4.1 Identification microscopique (Coloration de Gram)

Le principe de la coloration de Gram est de différencier entre deux grands groupes bactériens : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Ce **test** consiste préalablement à la réalisation d'un frottis bactérien, qu'est préparé à partir des colonies obtenues en culture pures, puis fixé et coloré selon la méthode de coloration de Gram suivante:

- 1-Préparation d'un frottis bactérien avec une souche d'entérocoque pure ;
- 2- Recouvrir le frottis bactérien avec le colorant primaire : le violet de gentiane et le laisser agir une minute ;
- 3- Fixation du colorant avec le Lugol deux fois à 45s ;
- 4- Décoloration à l'alcool pendant 30s et rincer immédiatement à l'eau courante ;
- 5- Recouvrir le frottis bactérien avec la fuschine et laisser agir 1 minute ;
- 6- Laver et sécher la lame ;
- 7- Observation au microscope photonique à l'immersion ($G \times 1000$).

L'observation au microscope a révélé des cocci à Gram positif colorés en violet en forme de diplocoque ou de petites chainettes de cocci.

5.4.2 Identifications biochimique des isolats

L'identification biochimique est toujours accompagnée par un témoin positif qui est une souche de référence *Enterococcus faecalis* WDCM00009.

- **Test de la catalase**

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et aéroanaérobies facultatives. La fonction principale de la catalase dans les cellules bactériennes est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé au cours des réactions d'oxydation.

Le test de la catalase est réalisé par le dépôt d'une goutte d'eau oxygénée en contact avec quelques colonies d'entérocoques, préalablement déposées sur une lame.

Le résultat négatif du test se traduit par l'absence de bulles d'oxygène (effervescence).

- **Test de l'oxydase**

Le cytochrome oxydase est une enzyme qui permet à la bactérie d'utiliser l'oxygène pour assurer sa croissance. Le test consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie à oxyder un disque qui contient un incolore « le N-diméthyl-paraphénylène diamine (PDA) » en un dérivé rose violacé. Ce test est essentiel pour orienter l'identification des bacilles à Gram négatif. Le disque oxydase est mis en contact avec quelques colonies d'*Enterococcus*, puis imbibé avec une gouttelette d'eau distillée stérile. Le résultat positif se traduit par un changement de la couleur du disque et la formation d'une couleur violacée. La souche est considérée comme oxydase positive.

- **Capacité de croissance à 6,5% en NaCl et à une température de 45°C**

Ce test nous permet de confirmer le genre bactérien « *Enterococcus* ». En effet, les entérocoques sont capables de croître à une concentration de 6,5% de chlorure de sodium et à une température de 45°C. Pour la réalisation de ce test, il suffit de repiquer quelques colonies caractéristiques d'*Enterococcus* dans un bouillon BHIB additionné d'une concentration de 6,5% du NaCl. L'incubation est réalisée à 45°C pendant 24 heures. L'apparition d'un trouble bactérien après cette période d'incubation est le résultat de la croissance.

- **Test de la thermorésistance**

Les entérocoques sont des bactéries capables de résister à la chaleur. Ce test repose sur la préparation d'une suspension bactérienne dans un bouillon BHIB. Cette dernière est placée dans un bain Marie, réglé à 60°C, pendant 30min. Après ce traitement thermique, la suspension bactérienne est incubée de nouveau à 37°C pendant 24H. L'apparition d'un trouble bactérien est le résultat de la croissance des entérocoques.

- **Dégradation de l'esculine**

L'hydrolyse de l'esculine est l'un des critères de l'identification au sein de nombreux groupes bactériens. L'esculine est un composé hétéroside qui est décomposé par une β -glucosidase et une esculinase, libérant du glucose et de l'esculétine (l'aglycone). L'esculétine réagit ensuite avec les ions de fer (Fe^{+3}) pour former un précipité noir dans le milieu. Le milieu utilisé est la gélose à l'esculine (BEA), sur laquelle un ensemencement en surface a été réalisé. Après 24 à 48 heures d'incubation à 37°C, une dégradation de l'esculine par les souches d'entérocoques se manifeste par un noircissement de la gélose.

6. Caractérisation phénotypique des souches isolées

6.1 Recherche de la gélatinase

La gélatinase est une enzyme qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides. Ce test est réalisé sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose BHA+ Gélatine (3% P/V), en réalisant un simple ensemencement en stries sur la surface de cette gélose, suivi d'une incubation à 37°C pendant 24 à 48H. Après cette période d'incubation, les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 4 heures. Le résultat positif de ce test se traduit par l'apparition d'une zone claire autour de la strie.



Figure 16 : Test de la gélatinase (photo personnelle prise au laboratoire LABAB)

6.2 Test de l'hémolyse

L'une des caractéristiques des entérocoques est la dégradation des composants du sang. Pour la réalisation de ce test nous avons utilisé la gélose au sang frais, et ceci par un repiquage de la souche à tester sur la surface de cette gélose. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24H. L'apparition d'une zone claire autour des colonies est un signe direct de l'hémolyse.



Figure 17 : Test de l'hémolyse (photo personnelle prise au laboratoire LABAB)

7. Antibiorésistance des souches isolées

L'antibiogramme est une technique de laboratoire qui a pour but de déterminer le profil de sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques qui appartiennent à des familles différentes. Ce test est réalisé par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur la gélose Mueller-Hinton, selon les recommandations du CLSI (2020).

Les souches d'entérocoques isolées et purifiées, ont été soumises à une liste de molécules d'antibiotiques (neuf molécules d'antibiotique appartenant à des familles différentes), et l'interprétation des résultats a été faite selon le manuel du CLSI (2020)/ CASFM (2020).

Les souches isolées d'entérocoque sont repiquées sur la gélose BEA, et incubées pendant 18 heures à 37°C, pour avoir des cultures jeunes. Des suspensions bactériennes ont été préparées dans de l'eau physiologique. La densité optique de la suspension bactérienne est comprise entre 0.08 et 0.1 à une longueur d'onde $\lambda=625\text{nm}$. L'antibiogramme est réalisé par l'ensemencement de la suspension bactérienne sur les boîtes contenant de la gélose Muller-Hinton par des écouvillons stériles, en appliquant des stries serrées sur toute la surface de la gélose. Par la suite, des disques d'antibiotiques sont appliqués sur la surface de la gélose Mueller-Hinton, préalablement ensemencée. L'incubation des boîtes est réalisée à 37°C/24h. La lecture de l'antibiogramme se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne, qui a été formée autour des disques d'antibiotiques. Les souches sont ensuite classées en sensibles, intermédiaires ou résistantes selon le CLSI (2020).

Tableau VIII: Liste des molécules d'antibiotiques testés

Famille d'antibiotique	Antibiotique	Abréviation d'antibiotique	Charge de disque (µg)	Marque d'antibiotique
B-lactamines	Pénicilline G	P	10	Liofilchem, Italie
	Ampicilline	AMP	10	Liofilchem, Italie
Glycopeptides	Vancomycine	VA	30	Liofilchem, Italie
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30	Liofilchem, Italie
Phénicols	Chloramphénicol	C	30	Liofilchem, Italie
Aminoglycosides	Gentamicine	GN	120	Liofilchem, Italie
Macrolides	Erythromycine	E	15	Liofilchem, Italie
Quinolones	Ciprofloxacine	CIP	5	Liofilchem, Italie
Inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique	Triméthoprim	SXT	25	Liofilchem, Italie
	Sulfaméthoxazole			

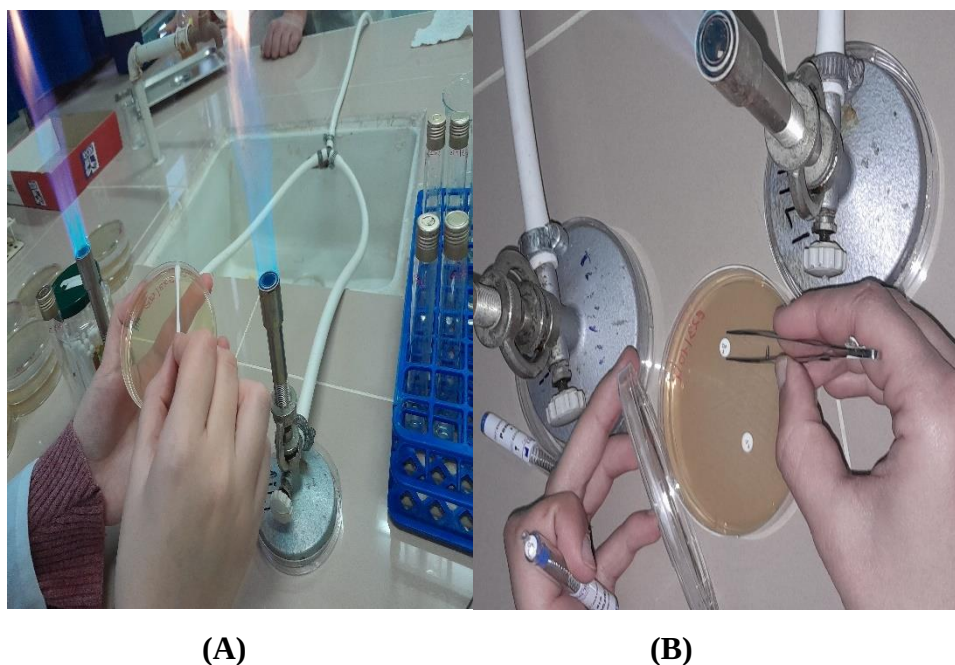


Figure 18 : Réalisation d'un antibiogramme. **(A)** Ecouvillonnage en stries serrées. **(B)** Dépôt de disques d'antibiotiques (photos personnelles prise au laboratoire LABAB)

8. Conservation des souches

Après avoir été identifiés et codifiés, les souches d'entérocoques sont conservées en les repiquant toutes sur des bouillons cœur cerveau (BHIB). Ces bouillons sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 heures. Par la suite, un volume de la suspension bactérienne est mélangé à deux volumes de glycérol dans des cryotubes qui seront stockés à -20°C pour une conservation à long terme.



Figure 19: Conservation des souches d'*Enterococcus* (photo personnelle prise au laboratoire LABAB).

Chapitre II : Résultats et discussion

Résultats

1. Prévalence des *Enterococcus* spp. dans les différents prélèvements

Durant la période s'étalant du mois de février au mois d'avril 2023, 175 prélèvements rectaux ont été prélevés au niveau de deux abattoirs et trois centres d'élevages différents de la wilaya de Tizi Ouzou. Ces prélèvements comprennent le poulet de chair, la dinde et la poule pondeuse.

Tableau IX : Prévalence des prélèvements positifs par les entérocoques dans les différentes espèces animales étudiées

Type d'espèce animale	Nombre de prélèvements analysés	Nombre de prélèvements positifs après enrichissement	Nombre de prélèvements positifs après isolement	Nombre de prélèvements positifs par « <i>Enterococcus</i> spp. »	Prévalence de prélèvements Positifs par « <i>Enterococcus</i> spp. »
Poulet de chair	89	85	84	77	86.51%
Dinde	42	32	30	22	54.76%
Poule pondeuse	44	29	28	19	43.18%
Total	175	146	142	118	67.42%

Sur la totalité des prélèvements analysés, 142 prélèvements contenaient des colonies caractéristiques d'*Enterococcus* spp. Tandis que, 33 prélèvements étaient négatifs. Après plusieurs étapes de purification et d'identification des isolats (figure 20, 21, 22), 118 prélèvements sont confirmés positifs par le genre *Enterococcus* spp. soit une prévalence de 69.14%. La prévalence d'*Enterococcus* spp. est variable selon l'espèce animale étudiée. Elle est de 86.51% chez le poulet de chair, 52.38% chez la dinde et 43.18% chez la poule pondeuse (Tableau IX).

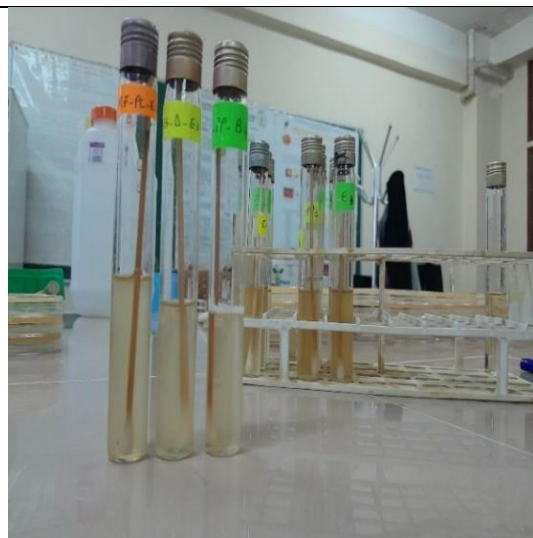


Figure 20 : Bouillons positifs après enrichissement



Figure 21 : Bouillons positifs après le test de tolérance à la salinité (6.5% de NaCl) et à 45°C



Figure 22 : Souche d'*Enterococcus* spp. pure

2. Mise en évidence des facteurs de virulence

2.1 Recherche de la gélatinase

Sur la totalité des souches d'*Enterococcus* spp. isolées, 16.52% sont gélatinases positives, avec un pourcentage nul pour les souches isolées chez la poule pondeuse, 22.72% pour les souches isolées chez la dinde et 19.48% pour les souches isolées chez le poulet de chair (Tableau X).

Tableau X : Prévalence des souches d'*Enterococcus* spp. gélatinases positives

Type d'espèce animale	Nombre de souches testées	Nombre de souches gélatinases positives	Prévalence
Poulet de chair	77	15	19.48%
Dinde	22	05	22.72%
Poule pondeuse	19	00	0%
Total	118	20	16.94%

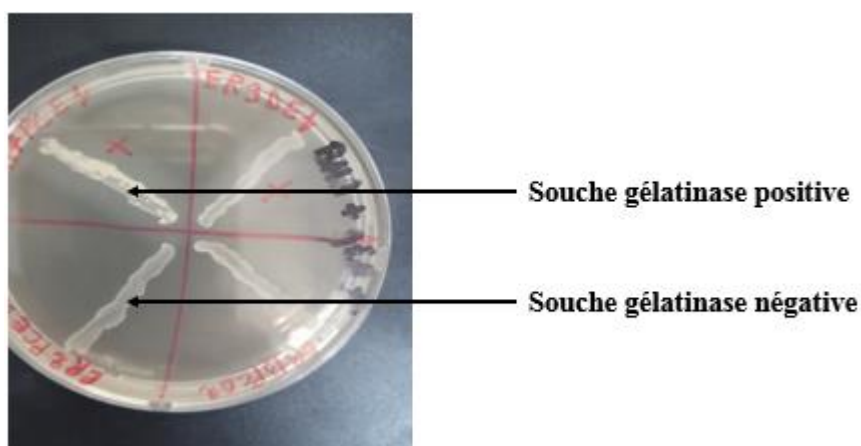


Figure 23 : Souches d'*Enterococcus* spp. gélatinase positive et gélatinase négative

2.2 Recherche de l'hémolyse

Sur la totalité des souches d'*Enterococcus* spp. isolées, 5.93% sont β -hémolytiques, avec un pourcentage nul pour les souches provenant de la poule pondeuse et de poulet de chair et 31.81% pour les souches isolées de la dinde.

Tableau XI : Prévalence des souches d'*Enterococcus* spp. β -hémolytiques

Type d'espèce animale	Nombre de souches testées	Nombre de souches hémolytiques	Prévalence
Poulet de chair	77	00	0%
Dinde	22	07	31.81%
Poule pondeuse	19	00	0%
Total	118	07	5.93%

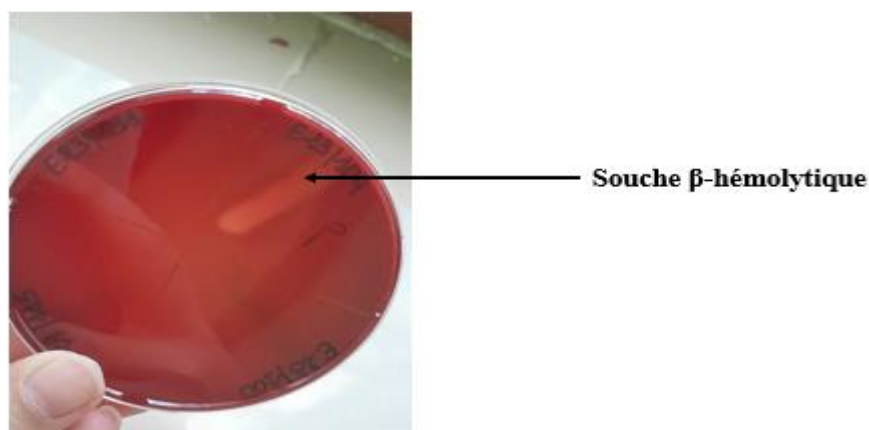


Figure 24 : Souche d'*Enterococcus* spp. β -hémolytique (E23-104) isolée chez la dinde

3. Résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques

Après l'identification des souches pures d'*Enterococcus* spp. isolées à partir de poulet de chair, de la dinde et de la poule pondeuse, nous avons testé leurs sensibilités à neuf molécules d'antibiotiques de différentes familles. Les résultats obtenus montrent l'existence de résistances, avec des taux variables, selon la molécule d'antibiotique testée et l'espèce animale étudiée (Tableau XII, XIII, XIV).

L'analyse des résultats obtenus chez le poulet de chair a montré de fortes résistances vis-à-vis de la tétracycline (90.90%) et de l'érythromycine (84.41%). Des résistances relativement faibles sont enregistrées à l'encontre de l'association triméthoprine/sulfaméthoxazole, de l'ampicilline, du chloramphénicol, de la gentamicine avec des taux de 14.28%, 11.68%, 5.19%, 1.63%, respectivement. En revanche, aucune souche résistante à la vancomycine n'est observée (Tableau XII).

Tableau XII : Taux de résistance et de sensibilité des souches d'*Enterococcus* spp. isolées du poulet de chair (n=77)

Espèce animal	Antibiotique	Souches Sensibles		Souches Résistantes	
		Nombre	Taux	Nombre	Taux
Poulet de chair	TE	06	7.79%	70	90.90%
	VAN	77	100%	00	0%
	CIP	17	22.02%	38	49.35%
	SXT	67	87.01%	10	12.98%
	C	70	90.90%	04	5.19%
	E	10	12.98%	65	84.41%
	CN	60	98.36%	01	1.63%
	P	40	51.94%	37	48.05%
	AMP	68	88.31%	09	11.68%

L'analyse des résultats obtenus chez la dinde a montré de fortes résistances vis-à-vis de la tétracycline (95.45%) et de l'érythromycine (77.27%). Une résistance relativement faible est enregistrée à l'encontre de la ciprofloxacine, avec un taux de 27.27%. En revanche, aucune

souche résistante à la vancomycine, à la pénicilline, à l'ampicilline, à l'association triméthoprim/sulfaméthoxazole et à la gentamicine n'est observée (Tableau XIII).

Tableau XIII : Taux de résistance et de sensibilité des souches d'*Enterococcus* spp. isolées de la dinde (n=22)

Espèce animal	Antibiotique	Souches Sensibles		Souches Résistantes	
		Nombre	Taux	Nombre	Taux
	TE	01	4.54%	21	95.45%
	VAN	22	100%	00	0%
Dinde	CIP	09	40.90%	06	27.27%
	SXT	22	100%	00	0%
	C	12	54.54%	10	45.45%
	E	00	0%	17	77.27%
	CN	16	100%	00	0%
	P	22	100%	00	0%
	AMP	22	100%	00	0%

L'analyse des résultats obtenus chez la poule pondeuse a montré des fortes résistances vis-à-vis de la tétracycline, de l'érythromycine (84.21%), de la ciprofloxacine (63.15%) et du chloramphénicol (42.10%). Des résistances relativement faibles sont enregistrées à l'encontre de l'ampicilline (7.62%). En revanche, aucune souche résistante à la vancomycine, à la gentamicine et à l'association triméthoprim/sulfaméthoxazole n'est observée (Tableau XIV).

Tableau XIV : Taux de résistance et de sensibilité des souches d'*Enterococcus* spp. isolées chez la poule pondeuse (n=19)

Espèce animal	Antibiotique	Souches Sensibles		Souches Résistantes	
		Nombre	Taux	Nombre	Taux
Poule Pondeuse	TE	03	15.78%	16	84.21%
	VAN	18	94.73%	00	0%
	CIP	05	26.31%	12	63.15%
	SXT	19	100%	00	0%
	C	11	57.89%	08	42.10%
	E	03	15.78%	16	84.21%
	CN	17	100%	00	0%
	P	12	63.15%	07	36.84%
	AMP	19	100%	00	7.62%

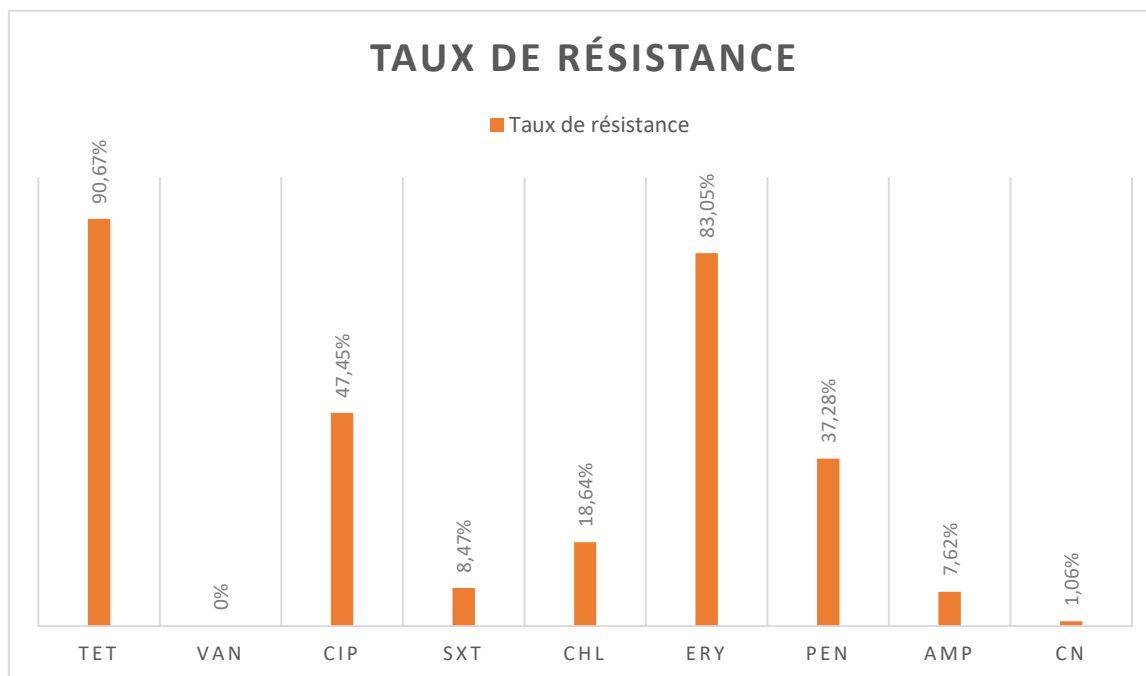


Figure 25 : Taux de résistances des *Enterococcus* spp. aux neuf molécules d'antibiotiques (n=118)

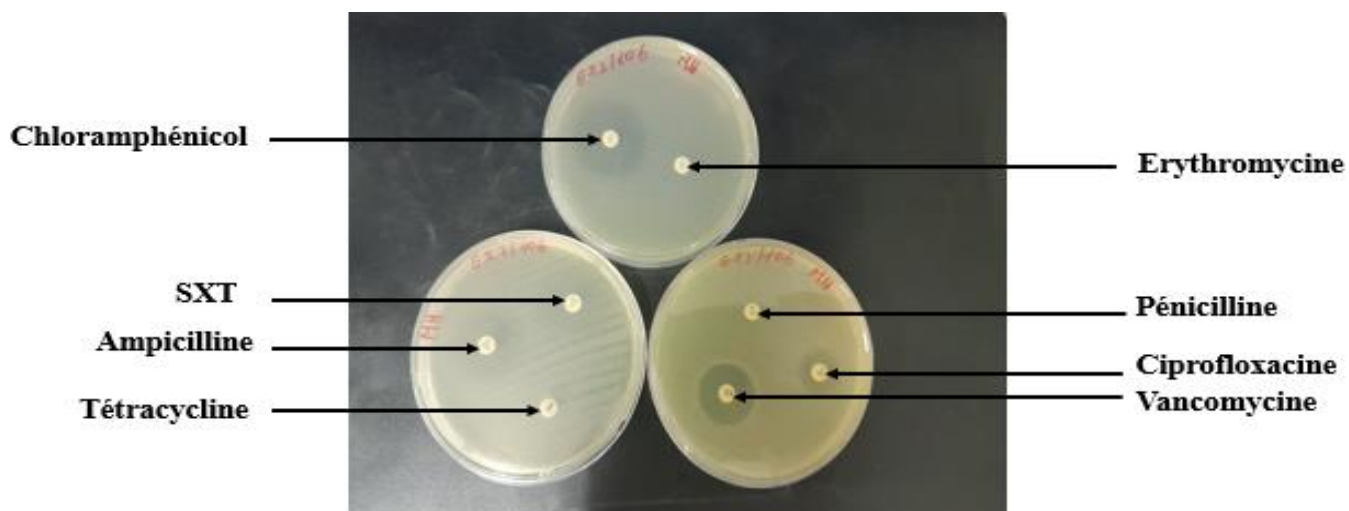


Figure 26 : Profil de résistance de la souche d'*Enterococcus* spp. (E23/106).

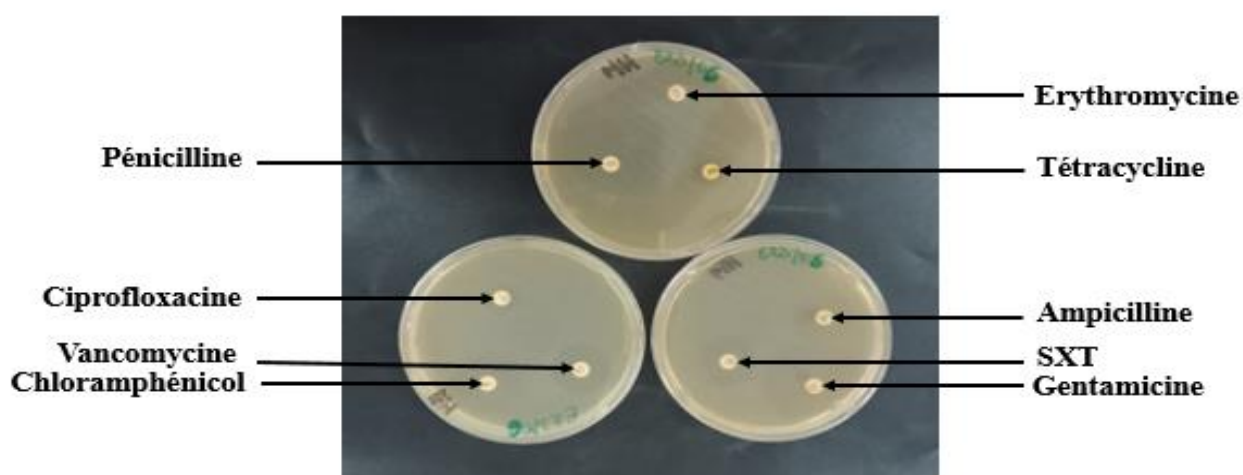


Figure 27 : Profil de résistance de la souche *Enterococcus* spp. (E23/06).

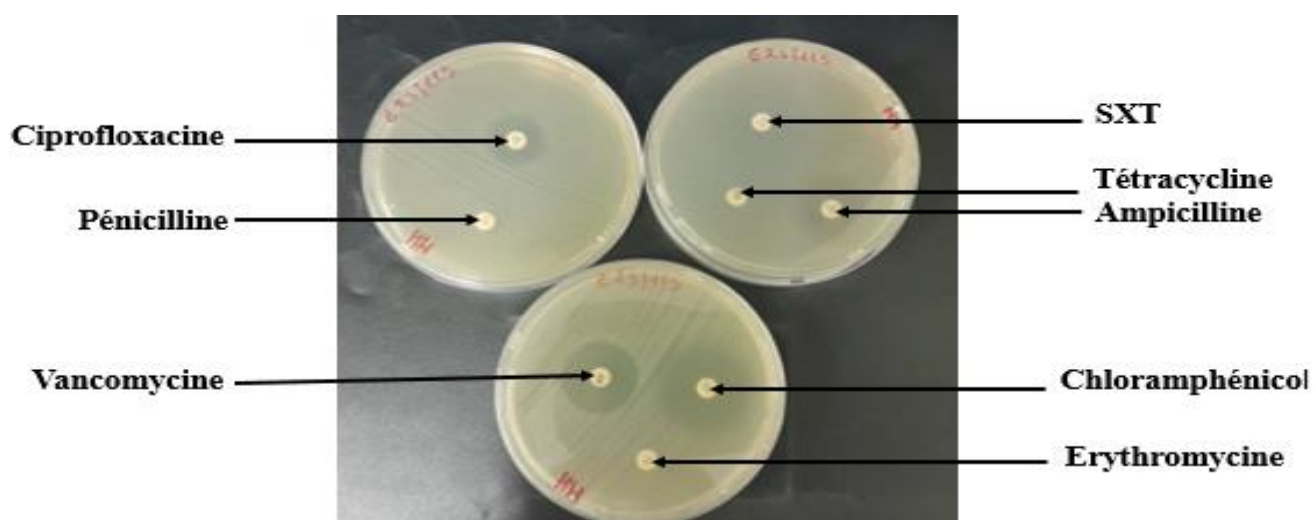


Figure 28 : Profil de résistance de la souche *Enterococcus* spp. (E23/115).

4. Phénotypes de multirésistances

Afin de déterminer les phénotypes de multirésistance des souches d'*Enterococcus* spp. isolées de différentes espèces animales étudiées. Nous avons déterminé d'abord le profil de résistance de chaque souche isolée. Les résultats des phénotypes de multirésistance sont illustrés (Tableau XV).

Sur 118 souches d'*Enterococcus* spp. testées, nous avons obtenu 62,71% des souches multirésistantes, incluant 68.91% de souches chez le poulet de chair, 14.21% de souches chez la dinde et 16.21% des souches chez la poule pondeuse.

Tableau XV : Phénotypes de multi-résistance des souches d'*Enterococcus* spp. isolées chez les différentes espèces animales

Phénotypes de multi-résistance		Nombre de souches d' <i>Enterococcus</i> spp.		
		Nombre de souches isolées chez le poulet de chair	Nombre de souches isolées chez la dinde	Nombre de souches isolées chez la poule pondeuse
01	TE-CIP-SXT-C-E-P-AMP	01	00	00
02	TE-CIP-SXT-E-P-AMP	03	00	00
03	TE-CIP-SXT-E-P	01	00	00
04	TE-CIP-E-P-AMP	03	00	00
05	TE-CIP-C-E-P	01	00	02
06	TE-CIP-C-E	02	04	06
07	TE-CIP-E-P	09	00	04
08	TE-CIP-E-CN	01	00	00
09	TE-CIP-C	00	01	00
10	TE-CIP-E	13	01	00
11	TE-SXT-E-P	03	00	00
12	TE-C-E	00	05	00
13	TE-E-P-AMP	02	00	00
14	TE-E-P	11	00	00
15	CIP-E-P	01	00	00
Nombre total de souches multirésistantes		51 (68,91%)	11 (14,86 %)	12 (16,21%)
		74 (62,71 %)		

Discussion

La prévalence des entérocoques dans nos échantillons analysés est relativement élevée. Néanmoins, les fréquences d'isolement sont variables selon le type d'espèce animale. En effet, sur 175 prélèvements testés, 67.42% sont confirmés positifs par le genre *Enterococcus* spp., dont la fréquence d'isolement est de 86.51% chez le poulet de chair, 54.76% chez la dinde et 43.18% chez la poule pondeuse.

Une étude menée au Nigeria a montré une prévalence moyenne de 49% de souches d'*Enterococcus* spp. isolées à partir de fèces de poulet de chair (NGBEDE et al 2017), une valeur faible aux résultats obtenus. KASIMOGLU-DOGRU et al (2010), ont également obtenu une fréquence de 78% sur la peau des coux de poulet de chair, qui est une valeur légèrement inférieur à la nôtre. La même fréquence (79%) est aussi observée par DIARRA et al (2010). Quant à la poule pondeuse, MUDENDA et al (2022) ont obtenu une prévalence de 84.4%, sur un total de 365 prélèvements cloacaux collectés à travers 77 élevages de poules pondeuses, ce résultat est très supérieur par rapport à notre résultat.

Ces divergences dans les fréquences d'isolement d'*Enterococcus* spp. à partir des prélèvements fécaux chez la volaille, dans différentes zones pourraient s'expliquer par des différences dans les méthodes d'isolement, les conditions géographiques, les pratiques d'élevage et la densité des troupeaux (JACKSON et al., 2005).

La caractérisation phénotypique des souches d'*Enterococcus* spp. nous a permis d'identifier certains facteurs de virulence chez les souches isolées. Uniquement 7/118 (5.93%) des souches sont β -hémolytiques. Toutes ces souches sont isolées chez la dinde. Nos résultats concordent avec ceux de plusieurs auteurs, qui ont rapporté un faible taux de souches hémolytiques chez le poulet de chair (AOUINE et al., 2022). En revanche, NGBEDE et al (2016) ont observé un taux nettement élevé de souches β -hémolytiques chez des souches d'*Enterococcus* spp. isolées de la volaille et de bétail, qui est de l'ordre de 21.3%. SAFFARI et al (2017) ont rapporté un taux élevé de souches hémolytiques (40.8%).

Sur les 118 souches d'*Enterococcus* spp. isolées, uniquement 20 (16.94%) sont gélatinases positives, incluant 15 (19.48%) souches isolées du poulet de chair et 5 (22.72%) souches isolées de la dinde. Nos résultats rejoignent ceux de NGBEDE et al (2017), qui ont rapporté un taux faible, qui est de l'ordre de 10.6%. En revanche, FRANZ et al (2001) et SAFFARI et al (2017) ont détecté des fréquences relativement élevées, qui sont de de l'ordre

de 26% et 34%. Nos résultats ne rejoignent pas ceux de plusieurs auteurs, qui ont signalé des taux élevés de souches gélatinases positives (ASLANTAS, 2019 ; OSMAN et al., 2019).

La résistance aux antibiotiques est un problème de santé publique, il peut provoquer l'échec de traitement thérapeutique en cas d'infection entérococcique (KAYSER, 2003). Les entérocoques sont considérés comme des germes ayant une résistance spécifique aux différentes familles d'antibiotiques, en particulier les antibiotiques appartenant à la famille des β -lactames (KAK et CHOW, 2002). Cependant, les souches isolées dans cette étude étaient sensibles à deux antibiotiques appartenant à la famille des β -lactames, la pénicilline (62.72%) et à l'ampicilline (92.37%). Nos résultats rejoignent ceux d'ASLANTAS (2019) et KASIMOGLU-DOGRU et al (2010), qui ont rapporté des faibles résistances vis-à-vis de l'ampicilline et de la pénicilline. En revanche, de fortes résistances vis-à-vis de l'ampicilline ont été observées par certains auteurs (NGBEDE et al, 2017 ; MOLECHAN et al, 2019 ; OSMAN et al., 2019).

D'autres sensibilités sont observées chez d'autres familles d'antibiotiques avec des taux importants de l'ordre de 99.15% (vancomycine), 98.93% (gentamicine), 91.52% (triméthoprine-Sulfaméthoxazole), 78.81% (chloramphénicol) chez la volaille.

De fortes résistances ont été observées vis-à-vis de la tétracycline (90.67%) et de l'érythromycine (83.05%). Nos résultats corroborent avec ceux de plusieurs auteurs (NGBEDE et al., 2016 ; KIM et al., 2019 ; OSMAN et al., 2019 ; AOUINE et al., 2022 ; MUDENDA et al., 2022). Ces fortes résistances pourraient s'expliquer généralement par l'utilisation excessive et incontrôlée de ces antimicrobiens en production animale, ce qui favorise la sélection et l'émergence des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. Les tétracyclines et les macrolides sont les antibiotiques les plus utilisées. En effet, ils font un bon marché, facilement utilisables en production animale, et parfois sans aucune consultation des vétérinaires praticiens (NGBEDE et al, 2017). D'après MUDENDA et al (2022), l'érythromycine est utilisée largement pour traiter les infections des voies respiratoires chez la volaille et l'homme et la présence de telles résistances pourra poser un problème de santé publique.

Quant aux autres molécules d'antibiotiques, de faibles taux de résistance sont enregistrés, à savoir 18.64% vis-à-vis du chloramphénicol, 8.47% vis-à-vis de l'association triméthoprine/sulfaméthoxazole et 7.62% vis-à-vis de l'ampicilline. Nos résultats rejoignent ceux de plusieurs auteurs (TREMBLAY et al., 2011 ; KILONZO-NTHENGE et al., 2015 ; MUDENDA et al., 2022).

Les résultats de notre étude montrent l'absence de souche d'*Enterococcus* spp. résistantes aux glycopeptides (vancomycine). Nos résultats ne rejoignent pas ceux de plusieurs

auteurs, qui ont signalé la présence de souches d'*Enterococcus* spp. résistant à la vancomycine (STING et al., 2013 ; STEPIEŃ-PYŚNIAK et al., 2016 ; KIM et al., 2019 ; OSMAN et al., 2019 ; MUDENDA et al., 2022). Bien que l'avoparcine n'a jamais été utilisé en Algérie (BOURAFÀ et al., 2016), la colonisation par les entérocoques résistants à la vancomycine a été rapportée chez des personnes hospitalisées (DJAHMI et al., 2012 ; BOURAFÀ et al., 2016 ; BENAMROUCHE et al., 2021 ; ZERROUKI et al., 2021).

La résistance à la vancomycine est un sujet préoccupant car elle peut être transférée à des microorganismes plus pathogènes (PAVIA et al., 2000). L'association entre l'utilisation d'avoparcine comme facteur de croissance et la présence d'ERV chez des animaux destinés à la consommation a été documentée dans une étude épidémiologique sur des élevages de volailles (BAGER et al., 1997). Pour réduire l'exposition des êtres humains aux ERV, l'avoparcine a été interdite au Danemark et en Norvège en 1995, en Allemagne en 1996 et dans tous les pays de l'Union européenne en 1997 (BAGER et al., 1997).

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Notre étude, avait comme objectifs essentiels de réaliser des isollements d'entérocoques à partir du portage intestinal chez la volaille (poulet de chair, dinde et poule pondeuse), de caractériser phénotypiquement les isolats obtenus via la mise en évidence de deux facteurs de virulences, l'hémolyse et la gélatinase, et de la détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques.

Les résultats de cette étude révèlent une forte prévalence des entérocoques, qui est de l'ordre de 67.42%, ce taux d'isolement est variable selon l'espèce étudiée. Il est de 86.51% chez le poulet de chair, 54.76% chez la dinde et 43.18% chez la poule pondeuse. Des souches β -hémolytiques et productrices de gélatinase ont été observées dans notre étude, avec un taux de 5.93% et 16.52%, respectivement.

Les résultats de cette étude ont révélé aussi l'existence de fortes résistances vis-à-vis de la tétracycline (90.67%) et de l'érythromycine (83.05%). Des résistances relativement élevées vis-à-vis de la ciprofloxacine (47.45%) et de la pénicilline G (37.28%) sont également enregistrées. De faibles résistances à l'encontre des autres antibiotiques : le chloramphénicol (18.64), l'association de triméthoprim-sulfaméthoxazole (8.47%) et l'ampicilline (7.62%) ont été observées. En revanche, nos résultats montrent l'absence de souches d'*Enterococcus* spp. résistant aux glycopeptides.

La caractérisation phénotypique des isolats nous a permis de mettre en évidence la présence de deux facteurs de virulence, à savoir l'hémolyse et la gélatinase chez 5.93% et 16.52% des souches, respectivement. Ce travail indique la nécessité d'un contrôle continu de l'utilisation des antibiotiques au sein de la production animale, compte tenu du rôle que ces molécules exercent dans la sélection de bactéries multirésistantes. Pour cela, des efforts doivent être fournis à fin de gérer l'utilisation des antibiotiques.

Les orientations futures des recherches doivent se concentrer sur de nouvelles stratégies, visant le contrôle des différentes infections bactériennes et la gestion de l'utilisation des antibiotiques en production animale. Cette étude pourra avoir comme perspective :

- L'identification des souches isolées par le biais de PCR ou de technique rapide telle que le MALDI TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) ;
- Recherche des gènes de résistances par des PCRs ;
- Mise en évidence du pouvoir antagoniste des souches isolées contre certaines bactéries pathogènes.

Références bibliographique

(A)

- **ACHARYA, T. (2021).** *Nesseria gonorrheae (Gonococcus)*. Bacteriology, 20, 223.
- **AGUILAR-GALVES, A., DUBOIS-DAUPHIN, R., DESTIN, J., CAMPOS, D., THONART, P. (2012).** Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). Biotechnologie, agronomie, société et environnement, 16 (1), 67-76.
- **ALI, S.A., HASAN BIN ASIF, H., ABBASI, A. (2014).** Environmental *Enterococci*: Prevalence of virulence, antibiotic resistance and species distribution in poultry and its related environment in Karachi, Pakistan. Letters in Applied Microbiology, 58(5), 423-432.
- **ANDLEEB, S., JAMAL, M., BUKHARI, S., SARDAR, S., MADJID, M. (2020).** Trends in antimicrobial use in food animals, aquaculture, and hospital waste. In emerging and associated treatment technologies, p, 95-138.
- **ARCHIMBAUD, C., SHANKAR, N., FORESTIER, C., BAGHDAYAN, A., GILMORE, M. S., CHARBONNE, F. (2002).** *In vitro* adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. Research in Microbiology, 153, 75-80.
- **ARIAS, C. A., MURRAY, B. E. (2012).** The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. Nature Reviews Microbiology, 10 (4), 266-278.
- **ASLANGUL, K. (2006).** Acquired gentamicin resistance by permeability impairment in *Enterococcus faecalis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50, (11), 3615–3621.

(B)

- **BASARANI, B., TJADERHANE, L., SANTOS, J.M., PASCON, E., GRAD, H., LAWRENCE, H.P., FRIEDMAN, S. (2003).** Efficacy of Chlorhexidine and Calcium hydroxide containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. Oral Surgery, Medical, Pathology, Radiology, Endocrinology, 96, 618 – 624.
- **BEN OMAR, N., CASTRO, A., LUCAS, R., ABRIOUEL, H., YOUSIF NUHA, M. K., FRANZ, C.M. A. P., HOLZAPFEL, W. H., PÉREZ-PULIDO, R., MARTÍNEZ-CANAMERO, M., GÁLVEZ, A. (2004).** Functional and safety aspects of *Enterococci* isolated from different Spanish foods. System Application Microbiology, 27, 118-130.
- **BERCHE, P., GAILLARD, J., SIMONET, ET M., (1988).** Bactériologie: Bactérie des infections humaines. Paris: Flammarion, 188, 576-592.

Références bibliographique

- **BERGMANN, S., ROHDE, M., CHHATWAL, G. S., HAMMERSCHMIDT, S. (2004).** Characterization of plasmid oen binding to *Streptococcus pneumoniae*. Indian Journal Medicine Residency Supply, 119, 29-32.
- **BOUSSOUAR, N. (2017).** Technologique sanitaire des entérocoques isolés à partir de lait de chamelle. Thèse de doctorat, en microbiologie, université Abou Bekr BELKAID, Tlemcen, p, 18.
- **BRAIEK, O. B., SMAOUI, S. (2019).** Entérocoques : entre pathogènes émergents et probiotiques potentiels. BioMed Research International, 1-13.
- **BRYSKIER, A. (1999).** Antibiotiques et agents antibactériens. Antibactériens et anti fongiques. Ellipses, Paris, p, 1190.

(C)

- **CARDAK, M., TOGAY, S. O., AY, M., KARAALIOGLU, O., EROL, O., BAGCI, U. (2021).** Gènes de résistances et de virulence aux antibiotiques chez les espèces d'*Enterococcus* isolées à partir de fruits de mer crus et transformés. Journal des Sciences et Technologie Alimentaires, 59, 2884-2893.
- **CARIP, C., SALAVERT, H., TANDEAU, A. (2015).** Microbiologie, hygiène et droit alimentaire, manuel, 2^{ème} édition, Lavoisier, 323, 107-109.
- **CASADEVALL, A., PIROFSKI, L. (2001).** Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. Journal Infection Disease, 184, 337-344.
- **CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, W., ZADERNOWSKA, A., ŁANIEWSKI, A., TROKENHEIM, L. (2017).** Virulence factors of *Enterococcus* spp. Presented in food. LWT Food Science and Technology, 75, 670-676.
- **CHAMPAGNE, C., MOLLGAARD, H. (2018).** Production of probiotic cultures and addition in fermented foods. Fermented functional foods, 2nd edition, p, 71-88.
- **CHANDLER, J.R., HIRT, H., DUNNY, G.M. (2005).** A Paracrine Peptide Sex Pheromone Also Acts as an autocrine signal to induce plasmid transfer and virulence factor expression *in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102, 43.
- **CHUANG-SMITH, O. N., WELLS, C. L., HENRY-STANLEY, M. J., DUNNY, G. M. (2010).** Acceleration of *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation by Aggregation Substance Expression in an Ex Vivo Model of Cardiac Valve Colonization. Public Library of Science one, 5 (12), 157.

Références bibliographique

- **CHOPRA, I., ROBERTS, M. (2001).** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology Molecular Biology*, 65, 232–260.
- **CLEWELL, D.B., AN, F. Y., FLANNAGAN, S. E., ANTIPOORTA, M., AND DUNN, G. M. (2000).** Enterococcal sex pheromone precursors are part of signal sequences for surface lipoproteins. *Molecular Microbiology*, 35(1), p. 246.
- **COURVALIN ET LECLERCQ. (2012).** AntibioGramme. 3eme édition. Paris : ESKA, 2012, P, 157-159,247-257, 327-340.

(D)

- **DE BRIYNE, N., IATRIDOU, D., VANDERHAEGHEN, W., IGNATE, K. (2020).** Use of antimicrobials in practice, targeted on cattle, pigs, poultry, horses. Springer ebooks, p, 43-79.
- **DELLARAS, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Lavoisier, paris, p, 476.
- **DEL PAPA, M., HANCOCK, L., THOMAS, V., PEREGO, M. (2007).** Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *Journal Bacteriology*, 189 (24), 8835-8843.
- **DEVRIESE, L., BAELE, M., BUTAYE, P. (2006).** Le genre *Enterococcus*. Livres électronique Springer, p, 163-174.
- **DE VUYST, L., AVONTS, L., MAKRAS, E. (2004).** Probiotics and gut health. Functional foods ageing and degenerative disease, p, 416-482.
- **DIEKEMA, D. J., JONES, R. N. (2001).** Oxazolidinone antibiotics. *Lancet*, 358, 1975-1982.
- **DOUARCHE, C., BAILLEUX, V., EVEN, C., ALLAIN, J., REGEARD, C., RASPAUD, E. (2018).** La mécanique des biofilms à la surface de liquides. *Reflète de la Physique*, 77, 114-115.
- **DRAMSI, S., TRIEU-CUOT, P., BIERNE, H. (2005).** Sorting Sortases: A nomenclature proposal for the various sortases of Gram positive bacteria. *Research in Microbiology*, 156, 289-297.

Références bibliographique

- DUTRONC, H., BOCQUENTIN, F., GALPERINE, T., LA FARIE-CASTET, S., DUPON, M. (2005). Linézolide, Premier antibiotique de la famille des oxazolidinones. Médecine et Maladies Infectieuses, 35(9), 427-434.

(E)

- EATON, T. J., GASSON, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Applied of Environmental Microbiology, 67, 1628-1635.
- EMILIE C. M. (2019). La résistance aux Antibiotiques. Planet et Vie, 20, 14.

(F)

- FIORE, E., VAN TYNE, D., GILMORE, M. S. (2019). Pathogenicity of *Enterococci*. Microbiology Spectrum, 7, 4.
- FLAHAUT, S., BOUTIBONNEN, P., AUFRAY, Y. (1997). Les entérocoques dans l'environnement proche de l'homme. Canada Journal Microbiologie, 43, 699-708.
- FONTANA, R., ALDEGHERI, M., LIGOZZI, M., LOPEZ, H., SUCARI, A., SATTA, G. (1994). Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrobiens Agents chemother, 38:1980-1983.
- FOULQUI MORENO, M. R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L. (2006). The role and application *Enterococci* in food and health. International of Food Microbiology, 106, 1-24.
- FRANZ, C. M. A. P., STILES, M. E., SCHLEIFER, K., HOLZAPFEL, W. H. (2003). Les entérocoques dans les aliments, une énigme pour la sécurité alimentaire. Tourillon International de Microbiologie Alimentaire, 88 (2-3), 105-122.
- FRANZ, C. M. A. P., HOLZAPFEL, W. (2004). The genus *Enterococcus*: biotechnological and safety issues, lactic acid bacteria, microbiological and functional aspects, p, 199-248.
- FRANZ, C. M. A. P., HUCH, M., ABRIQUEL, H., HOLZAPFEL, W., GALVEZ, A. (2011). *Enterococci* as probiotics and their implication in food safety. International Journal of Food Microbiology, 151 (2), 125-140.
- FRENCH, G. (2006). Review of new guidelines for prophylaxis and treatment of MRSA infections. Hospital Med LAND, 67, 482-6.

(G)

- **GARCIA-SOLACHE, M., RICE, L. B. (2009).** The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clinical microbiology reviews*, 32 (2).
- **GAUDY, C et BUXERAUDN, J. (2005).** Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique, Collection PHARM, Edition Lavoisier, Paris, p, 269.
- **GELSOMINO, R. (2002).** Source of *Enterococci* in a farmhouse raw-milk cheese. *Application Environment Microbiology*, 68 (7), 3560-3565.
- **GIRAFFE, G. (2003).** Functionality of *Enterococci* in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 215-222.
- **GUYON, R. L. (1960).** Précis de bactériologie. P, 245-247.

(H)

- **HALLGREN, O., AITS, S., BREST, P., GUSTAFSSON, L., MOSSBERG, A.K., WULLT, B., SVANBORG, C. (2008).** Apoptosis and tumor cell death in response to HAMLET. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 606, 217–240.
- **HUYCKE, M., SPIEGEL, C., GILMORE, M. (1991).** Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin, resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobiens Agents Chemother*, 35, (8), 1626-1634.
- **HAACK, B. J., ANDREWS, R. E. J. (2000).** Isolation of Tn916-like conjugal elements from swine lot effluent. *Canada Journal Microbiology*, 46, 542–549.
- **HANCHI, H., MOTTAWEA, W., SEBEI, K., HAMMANI, R. (2018).** The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1791.
- **HUDSON, J., FREWER, U., JONES, G. E., BRERETON, P., WHITTINGHAM, M. J., STEWART, G. B. (2017).** La chaine agroalimentaire et la résistance aux antimicrobiens: un bilan. *Tendance des Sciences et Technologies Alimentaires*, 69, 131-147.

(J)

- JACKSON, C. R., FEDORKA CRAY, P.J., JACKSON-HALL, M. C., HIOTT, L. M. (2005). Effect of media temperature and culture condition on the species population and antibiotic resistance of *Enterococci* from broiler chickens. Letters in Applied Microbiology, 41, 262-268.
- JAHAN, M., HOLLEY, R. A. (2014). Incidence des facteurs de virulence chez les entérocoques de la viande crue et fermentée et capacité de formation de biofilm à 25°C et 37°C. Tourillon International de Microbiologie Alimentaire, 170, 65-69.
- JENSEN, L. B., FRIMODT-MOLLER, N., AARESTRUP, F.M. (1999). Presence of *Erm* Gene Classes in Gram positive bacteria of animal and human origin in Denmark. Federation European Microbiology Societies Microbiology Letters, 170, 151–158.
- JETT, B., HUYCKE, M., GILMORE, M. (1994). Virulence of *enterococci*. Clinic Microbiology Review, 7 (4), 462-478.

(K)

- KALINA, A. P. (1970). The position of *Enterococci* in system of microorganisms. Zhurnal microbiologii epidemiologii immunologii biologii, 47, 20-21.
- KAYAOGU, G., QRSTAVIK, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Critical Reviews Oral Biology Medicine, 15, (5), 308-320.
- KAYSER, F. (2003). Safety aspects of *Enterococci* from the medical point of view, International Journal Food Microbiology, 88, 255-262
- KLEIN, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of *Enterococci* from food and the gastro-intestinal tract. International Journal of Food Microbiology, 88, 123-131.
- KOO, H., ALLAN, R. N., HOWLIN, R. P., STOODLEY, P., HALL-STOODLEY, L. (2017). Ciblage microbien biofilms: Stratégies thérapeutiques actuelles et prospectives. Nature Review Microbiology, 15 (12), 740-755.
- KRISTICH, C. J., RICE L. B., ARIAS, C. A. (2014). : From Commensals to leading causes of drug resistant infection enterococcal infection - Treatment and antibiotic resistance molecular mechanisms of antibiotic Resistance in *Enterococci*, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 6, 1-31.

(L)

- **LAVINGE (2007)**: Antibiotiques et résistance. Bactériologie. Faculté de médecine de Montpellier.
- **LEBLANC, D. (2006)**. *Enterococcus*. Prokaryotes, 4, 175-204.
- **LEBRETON, F., WILLEMS, R. J. L., GILMORE M. S. (2014)**. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization *faecalis* endocarditis antigen: Homology with adhesins from some oral *streptococci*. Infection Immunology, 63, 703–706.
- **LECLERCQ, R., COURVALIN, P. (1993)**. Mechanisms of resistance to macrolides and functionally related antibiotics. Macrolides-chemistry, Pharmacology and Clinical Users, p, 125-141.
- **LECLERCQ, R. (1997)**. *Enterococci* acquire new kinds of resistance. Clinical Infectious Diseases, 24 (1), 80-84.
- **LE MINOR, L., VERON, M. (1982)**. Bactériologie médicale. 1^{ère} édition, paris, Flammarion, p, 528-529.
- **LECLERC, H., DEVRIESE, L., MOSSEL, D. (1996)**. Taxonomical changes in intestinal faecal *Enterococci* and *streptococci*: consequences on their use indicators of *faecal* contamination in drinking water. Journal Application Bacteriology, 81, 459-466.
- **LUKASOVA, J., SUSTACKOV, A. A. (2003)**. *Enterococci* and antibiotic resistance. Acta Veterinaria Brno, 72, 315-323.
- **LOWE, A. M., LAMBERT, P. A., ET SMITH, A. W., (1995)**. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen, homology with adhesins from some oral Streptococci. Infection Immunology, 63 (2), 703-704.

(M)

- **MAC GOVAN A.P, WISE R, (2001)**. Establishing MIC Break point and The Interpretation of In vitro Susceptibility Tests. Journal Antimicrobien Chemother, 48, (1), 17-28.
- **MAURIN, M. (2018)**. Antibiotiques, antibiorésistance et environnement, Encyclopédie de l'Environnement, P, 5-7.
- **MILLER WR, MUNITA JM, AND ARIAS CA. (2014)**. Mechanisms of antibiotic resistance in *enterococci*. Expert Review Anti Infection Therapy. 12(10), 1221–1236.
- **MONTICELLI, J., KNEZEVICH, A., LUZZATI, R., DI BELLA, S. (2018)**. Clinical management of non- *faecium* non- *faecalis* vancomycin resistant *enterococci* infection. Focus

Références bibliographique

on *Enterococcus gallinarum*, *casseliflavus* and *flavescens*. Journal of Infection and Chemotherapy, 24(4), 237-246.

- MUNDY, L.M., SAHM, D.F., GILMORE, M. (2000). Relationships between Enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Review, 13, 513 – 522.

(N)

- NOWAKIEWICZ, A., ZIOLKOWSKA, G., TROSCIANCZYK, A., ZIEBA, P., GNAT, S. (2016). Détermination des gènes de résistance et de virulence chez les souches d'*Enterococcus faecalis* et *E. faecium* isolées de volailles et leurs caractérisation génotypiques. Sciences de la Volaille, 96 (4), 986-996.

(O)

- OSMAN, K. M., ORABI, A., ELBEHIRY, A., SAAD, A., IBRAHIM, M. D. S., ANARY, M. H. (2019). La volaille en tant que vecteur d'*Enterococcus* spp. multirésistance, émergence : premier signalement de gènes de résistance à la vancomycine (van) et au chloramphénicol-florfénicol (cat-fex-erf) dans les excréments de pigeon et de canard. Pathogénèse microbienne, 128, 195-205.

(P)

- PAULSEN, T., BANERJEE, L., MYERS, G. S. A., NELSON, K. E., SESHADRI, R., READ, T. D., FOUTS, D. E., EISEN, J. A., GILL. (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*. Science, 299, 2071-2074.

- PAVIA, M., NOBILE, C.G.A., SALPIETRO, L., ANGELILLO, I.F (2000). Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of *enterococci* in raw meat. Journal Food Protection, 63, 912-915.

- PILET, M. F., MAGRAS, C., FEDERIGHI, M. (2005). Bactéries lactiques. Bactériologie alimentaire compendium d'hygiène des aliments, 2^{ème} édition, economica, p, 292.

- PIMENTA, S., SCHEIDEGGER E. M., DOS SANTOS, P. F., LEITE P. C., TEIXEIRA L. M. (2007). Antimicrobial resistance profiles of *enterococci* isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. Memorias Instituto Oswaldo Cruz, 102 (7), 853-859.

Références bibliographique

- PLESIAT, P. (2012). CHAPITRE 02 : biochimie de la résistance. In: COURVALIN, R et LECLERCQ, R., AntibioGramme. », 3eme Edition, Eska. Paris, p35.
- POPOVIC, N.T., DINIC, M., TOLINACKI, M., MIHAJLOVIC, S., TERZIC-VIDOJEVIC, A., BOJIC, S., DJOKIC, J., GOLIC, N., VELJOVIC, K. (2018). New insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of *Enterococcus* spp, dairy isolates. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-2.
- PORTILLO, A., RUIZ-LARREA, F., ZARAZAGA, M., ALONSO, A., MARTINEZ, J. L., TORRES, C. (2000). Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrobiens Agents Chemother*, 44(4), 967–971.

(R)

- RAHIMI, N., POURSIANA, F., GHAZIASGAR, F.S., SEPEHRPOR, S., HASSANZADEH, A. (2018). Présence de gènes de facteurs de virulence (*gelE* et *esp*) et formation de biofilms chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* cliniques isolées d'une infection des voies urinaires à Ispahan, Iran. *Rapports génétiques*, 13, 72-75.
- RAMOS, S., SILVA, V., DAPKEVICIUS, M. L. E., IGREJAS, G., POETA, P. (2020). *Enterococci*, from harmless bacteria to a pathogen, *Microorganisms*. 8, 1118.
- REHMAN, M. Z. U., YIN, X., ZAHEER, R., GOJI, N., AMOAKO, K. K., MC ALLISTER, T. A., PRITCHARD, J., TOPP, E., DIARRA, M. S. (2018). Genotypes and phenotypes of *Enterococcus* isolated from broiler chickens. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, p, 2.
- REISSIER, S. (2016). Daptomycine et infections sévères à entérocoques. *Journal des Anti-infectieux*, 18, 177-181.
- RICE, A., (2004). Impact of specific *pbp5* mutations on expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobiens Agents Chemother*, 48, 3028-3032.
- RICE, L. B., CARIAS, L., RUDIN, S., VAEL, C., GOOSSENS, H., KONSTABEL, C. (2003). A potential virulence gene, *hylefm*, predominates in *Enterococcus Faecium* of Clinical Origin. *The Journal of Infectious Diseases*, 187 (3), 508–512.
- RICE, L. B. (2012). Antimicrobial resistance in Gram positive bacteria. *American Journal Infection Control*, 34, S11-S19.
- RICH, R. L., KREIKEMEYER, B., OWENS, R. T., LABRENZ, S., NARAYANA, S. V., ETWEINSTOCK, G.M. (1999). Ace is a collagen binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *Journal of Biological Chemistry*, 274, (38), 26939–26945.

Références bibliographique

- **ROBERTS, M. C., NO, D., MARZLUFF, J. M., DELAP, J. H., TURNER, R. (2016).** *Enterococcus* spp résistant à la vancomycine. Des corbeaux et de leur environnement dans l'état métropolitain de Washington, Etats-Unis: existe-t-il une corrélation entre les corbeaux porteurs d'ERV et l'environnement ? Microbiologie Vétérinaire, 194, 48-54.
- **RUHAL, R., KATARIA, R. (2021).** Modèles de biofilm chez les bactéries Gram positives et Gram négatives. Recherche Microbiologique, 251, 126-829.

(S)

- **SAFFARI, F., DALFARDI, M. S., MANSOURI, S., AHMADRAJABI, R. (2017).** Enquête sur la corrélation entre la formation de biofilms et les déterminants de la virulence dans une collection d'isolats pathogènes et fécaux d'*Enterococcus faecalis*. Infection Chimiothérapie, 49 (3), 176.
- **SAKKA, V. S., TSIODRAS, L., GALANI, A., ANTONIADOU, M., SOULI, L., GALANI, M., PANTELAKI, N., SIAFAKAS, L., ZERYA, H., GIAMARELLOU, H. (2008).** Risk-factors and predictors of mortality in patients colonized with vancomycin resistant *enterococci*. Clinique Microbiology Infection, 14(1), 14-21.
- **SALYERS, A. A., GUPTA, A., WANG, Y. (2004).** Les bactéries intestinales humaines comme réservoirs de gènes de résistance aux antibiotiques. Tendances en microbiologie, 12 (9), 412-416.
- **SAVA, I. G., HEIKENS, E., HUEBNER, J. (2010).** Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. Clinical Microbiology and Infection, 16, 533-540.
- **SCHAFER, E., BOSSMANN, K. (2001).** Antimicrobial efficacy of chloroxylenol and chlorhexidine in the treatment of infected root canals. American Journal of Dentistry, 14, SP-233, EP-7.
- **SCHLEIFER, K. H., KILPPERBALZ, R. (1984).** Transfer of *streptococcus faecalis* and *streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* as *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. System Evolution Microbiology, 34 (1), 31-34.
- **SCOTT, K. M., SYDNEY, M., MUSSO, M., KAUNDA, Y., PATRICK, K., GODFREY, S., GEOFFREY, M., MERCY, M., FLAVIEN, N. B., ROBERT, M., JOHN, B. M. (2022).** Prévalences et schémas de résistance aux antimicrobiens des espèces d'*Enterococcus* de poules pondeuses dans les provinces de Lusaka et de Copperbelt en Zambie : un appel à la

Références bibliographique

surveillance de la résistance aux antimicrobiens dans le secteur de la volaille. *Jac-antimicrobial resistance*, 4(6), 126.

- SELLECK, E.M. D. V., TYNE, M. S., GILMORE. (2019). Pathogenicity of *Enterococci*. *Microbiology Spectrum Journal*, 7 (4).

- SEMEDO, T., SANTOS, M. A., LOPES, M. F., MARQUE, J. J. F., CRESPO, M. T., TENREIRO, R. (2003). Virulence factors in food, clinical and reference *enterococci*: a common trait in the genus? *Systematic and applied Microbiology*, 26, 13-22.

- SHEPARD, B. D., GILMORE, M. S. (2002). Antibiotic-resistant *Enterococci*: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection*, 4, (2), 215–224.

- SINGLETON, P. (2005). *Bactériologie*, 6^{ème} édition, DUNOD, p, 115-125.

- SKALS, M., PRAETORIUS, H. A. (2013). Mechanisms of cytolysin induced cell damage a role for auto and paracrine signalling. *Acta Physiologica*, 209 (2), 95-113.

- STRATEVA, T., ATANASOVA, D., SAVOV, E., PETROVA, G., MITOV, I. (2016). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *Brazilian Journal Infectious Diseases*, 20 (2), 127–133.

- STUCKI, K., HARBARTH, S., NENDAZ, M. (2014). Infections à entérocoques: du plus simple au plus complexe. *Revue Médicale Suisse*, volume 10, 1918-1923.

- SVEC, P., DEVRIESE, L. A. (2009). The genus *Enterococcus*: BERGEY's manual of systematic bacteriology, 2nd edition, volume 3, p, 594-623.

- STING, R., RICHTER, A., POPP, C., HAFEZ, H. M. (2013). Occurrence of vancomycin resistant *enterococci* in turkey flocks. *Poultry Science*, 11, 58.

(T)

- TANNOCK, G. W., COOK, G. (2002). *Enterococci* as members of the intestinal microflora of humans. *The Enterococci: Pathogenesis molecular biology and antibiotic resistance*, 15, pp, 101-132.

- TERKURAN, M., TURHAN, E. U., ERGINKAYA, Z. (2019). Le risque d'infections à entérocoques résistants à la vancomycine dans l'industrie alimentaire. Dans Springer eBooks, p 513-535.

Références bibliographique

- **TRAN, T.T., PANESSO, D., MISHRA, N.N, MILEYKOVSKAYA, E., GUAN, Z., MUNITA, J. M. (2013).** Daptomycin resistant *Enterococcus faecalis* diverts the antibiotic molecule from the division septum and remodels cell membrane phospholipids. Microbiology, 4, 4.

- **TREMBLAY, C. L., LETELLIER, A., QUESSY, S., BOULLIANNE, M., DAIGNAULT, D., ARCHAMBAULT, M. (2011).** Multiple antibiotic resistances of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from cecal contents in broiler chicken in Turkey and flocks slaughtered in Canada and plasmid colonization of *tetO* and *ermB* genes. Journal of Food Protection, 75(10), 1639-1649.

(U)

- **UPADHAYAYA, P. M. G., RAVIKUMAR, K., UMAPATHY, B. L. (2009).** Revue des facteurs de virulence des entérocoques : un pathogène nosocomial émergent. Journal Indien de Microbiologie Médicale, 27(4), 301-305.

(W)

- **WERNER, G., COQUE, T. M., FRANZ, C. M., GROHMANN, E., HEGSTAD, K., JENSEN, L. J., VAN SCHAIK, W., WEAVER, K. A. (2013).** Entérocoques résistance aux antibiotiques. Histories d'un trafiquant de gènes de résistances aux médicaments. Journal International de Microbiologie Médicale, 303 (6-7), 360-379.

- **WILLEMS, R. J., BONTEN, M. J. (2008).** Glycopeptides resistant *Enterococci*: deciphering virulence, resistance and epidemiology city. Curry Opine Infection District, 20, 384-90.

- **WOZNIAK-BIEL, A., BUGLA-PLOSKONSKA, G., BURDZY, J., KORZEKWA, K., PLOCH, S., WIELICZKO, A. (2019).** Résistance aux antimicrobiens et formation de biofilms chez *Enterococcus* spp. Isolé des humains et des dindes en Pologne. Résistance Microbienne aux Médicaments, 25(2), 277-286.

Annexes

Annexe 1 : Composition et préparation des milieux de culture utilisés

Milieu BEA :

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone	17g
- Peptone pepsique de viande	3g
- Extrait autolytique de levure	5g
- Bile de bœuf bactériologique	10g
- Chlorure de sodium	5g
- Esculine	1g
- Citrate ferrique ammoniacal	0.5g
- Azide de sodium	0.15g
- Agar agar bactériologique	13g

Préparation : 56,7g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C / 15 min.

Gélose Muller-Hilton :

- Hydrolysât acide de caséine	17.5g
- Infusion de viande	2g
- Amidon soluble	1.5g
- Agar bactériologique	17g

Préparation : 38g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C / 15 min.

Bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth) :

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait cœur-cerveille	17.5g
- Peptone pancréatique de gélatine	10g
- Chlorure de sodium	5g
- Phosphate disodique	2.5g
- Glucose	2g

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C / 15 min.

Gélose au sang :

-Mélange spécial de peptones.....	23g
-Amidon	1g
-Chlorure de sodium	5g

Annexes

-Agar 10g

-Sang humain / brebis 50Ml

Préparation : 40g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C / 15 min.

Annexe 2 : Résultats des tests biochimiques et caractérisation phénotypiques sur l'ensemble des souches d'*Enterococcus* spp. isolées.

Souche	Code	Test biochimique				Test phénotypique	
		Catalase	Oxydase	Tolérance à 45°C	Tolérance à 6.5% de NaCl	Gélatinase	Hémolyse
ER1-PC-E2	E23/01	-	-	+	+	-	-
ER11-PC-E3	E23/02	-	-	+	+	-	-
ER12-PC-E3	E23/03	-	-	+	+	+	-
ER4-PC-E3	E23/04	-	-	+	+	+	-
ER10-PC-E3	E23/05	-	-	+	+	-	-
ER15-PC-E3	E23/06	-	-	+	+	+	-
ER9-PC-E3	E23/07	-	-	+	+	-	-
ER7-PC-E3	E23/08	-	-	+	+	-	-
ER2-PC-E2	E23/09	-	-	+	+	-	-
ER8-D-E1	E23/10	-	-	+	+	+	+
ER8-PC-E1	E23/11	-	-	+	+	-	-
ER11-PC-E2	E23/12	-	-	+	+	-	-
ER8-PC-E2	E23/13	-	-	+	+	-	-
ER5-D-E1	E23/14	-	-	+	+	-	-
ER6-PC-E1	E23/15	-	-	+	+	-	-

Annexes

ER3-PC-E2	E23/16	-	-	+	+	-	-
ER6-PC-E3	E23/17	-	-	+	+	-	-
ER2-PC-E3	E23/18	-	-	+	+	-	-
ER1-PC-E3	E23/19	-	-	+	+	+	-
ER13-PC-E3	E23/20	-	-	+	+	+	-
ER6-PC-E2	E23/21	-	-	+	+	-	-
ER15-PC-E1	E23/22	-	-	+	+	+	-
ER8-PC-E3	E23/23	-	-	+	+	-	-
ER11-PC-E1	E23/25	-	-	+	+	-	-
ER1-D-E1	E23/26	-	-	+	+	+	+
ER14-PC-E2	E23/27	-	-	+	+	-	-
ER1-PC-E1	E23/28	-	-	+	+	-	-
ER13-D-E1	E23/29	-	-	+	+	-	-
ER15-PC-E2	E23/30	-	-	+	+	-	-
ER9-D-E1	E23/31	-	-	+	+	+	+
ER7-PC-E1	E23/32	-	-	+	+	+	-
ER7-PC-E2	E23/33	-	-	+	+	-	-
ER14-PC-E1	E23/34	-	-	+	+	+	-
ER5-PC-E1	E23/35	-	-	+	+	+	-
ER4-D-E1	E23/36	-	-	+	+	-	-
ER10-D-E1	E23/37	-	-	+	+	+	+
ER9-PC-E1	E23/38	-	-	+	+	+	-
ER13-PC-E1	E23/39	-	-	+	+	-	-

Annexes

ER10-PC-E1	E23/40	-	-	+	+	+	-
ER6-D-E1	E23/41	-	-	+	+	-	-
ER14-PC-E3	E23/42	-	-	+	+	+	-
ER3-PC-E1	E23/43	-	-	+	+	-	-
ER9-PC-E2	E23/44	-	-	+	+	-	-
ER4-PC-E2	E23/45	-	-	+	+	-	-
ER10-PC-E2	E23/46	-	-	+	+	-	-
ER13-PC-E2	E23/47	-	-	+	+	+	-
ER5-PC-E2	E23/48	-	-	+	+	-	-
ER12-PC-E2	E23/49	-	-	+	+	-	-
ER5-PC-E3	E23/50	-	-	+	+	-	-
ER6-D-E2	E23/51	-	-	+	+	-	-
ER8-PC-E5	E23/52	-	-	+	+	-	-
ER4-PP-B1	E23/53	-	-	+	+	-	-
ER5-D-E2	E23/54	-	-	+	+	+	-
ER8-D-E2	E23/55	-	-	+	+	-	-
ER10-PP-B2	E23/56	-	-	+	+	-	-
ER3-PP-B1	E23/57	-	-	+	+	-	-
ER2-PP-B2	E23/58	-	-	+	+	-	-
ER10-PP-B1	E23/59	-	-	+	+	-	-
ER10-PC-E5	E23/60	-	-	+	+	-	-
ER9-PC-E4	E23/61	-	-	+	+	-	-
ER10-PC-E4	E23/62	-	-	+	+	-	-

Annexes

ER6-PP-B2	E23/63	-	-	+	+	-	-
ER9-D-E2	E23/64	-	-	+	+	-	-
ER6-PC-E4	E23/65	-	-	+	+	+	-
ER5-PC-E5	E23/66	-	-	+	+	-	-
ER7-PC-E5	E23/67	-	-	+	+	-	-
ER3-PC-E4	E23/68	-	-	+	+	-	-
ER12-PC-E4	E23/69	-	-	+	+	-	-
ER8-PC-E4	E23/70	-	-	+	+	-	-
ER4-PC-E4	E23/71	-	-	+	+	-	-
ER12-PC-E5	E23/72	-	-	+	+	-	-
ER6-PP-B1	E23/73	-	-	+	+	-	-
ER8-PP-B1	E23/74	-	-	+	+	-	-
ER5-PP-B2	E23/75	-	-	+	+	-	-
ER9-PP-B2	E23/76	-	-	+	+	-	-
ER7-PP-B2	E23/77	-	-	+	+	-	-
ER5-PC-E4	E23/78	-	-	+	+	-	-
ER12-D-E2	E23/79	-	-	+	+	-	-
ER7-PC-E4	E23/80	-	-	+	+	-	-
ER11-D-E2	E23/81	-	-	+	+	-	-
ER5-PP-B1	E23/82	-	-	+	+	-	-
ER11-PC-E5	E23/83	-	-	+	+	-	-
ER1-D-E2	E23/84	-	-	+	+	-	-
ER3-PC-E5	E23/85	-	-	+	+	-	-

Annexes

ER2-PC-E4	E23/86	-	-	+	+	-	-
ER1-PP-B2	E23/87	-	-	+	+	-	-
ER3-PP-B2	E23/88	-	-	+	+	-	-
ER1-PC-E5	E23/89	-	-	+	+	-	-
ER9-PC-E5	E23/90	-	-	+	+	+	-
ER9-PP-B1	E23/91	-	-	+	+	-	-
ER8-PP-B2	E23/92	-	-	+	+	-	-
ER2-D-E2	E23/93	-	-	+	+	-	-
ER-4-PC-E6	E23/94	-	-	+	+	-	-
ER-10-PC-E6	E23/95	-	-	+	+	-	-
ER-7-PC-E6	E23/96	-	-	+	+	-	-
ER-5-D-E3	E23/97	-	-	+	+	-	+
ER17-PC-E6	E23/98	-	-	+	+	-	-
ER1-PP-B3	E23/99	-	-	+	+	-	-
ER4-D-E3	E23/100	-	-	+	+	-	+
ER3-PC-E6	E23/101	-	-	+	+	-	-
ER5-PC-E6	E23/102	-	-	+	+	-	-
ER8-PC-E6	E23/103	-	-	+	+	-	-
ER7-D-E3	E23/104	-	-	+	+	-	-
ER19-PC-E6	E23/105	-	-	+	+	-	-
ER18-PC-E6	E23/106	-	-	+	+	-	-
ER1-D-E3	E23/107	-	-	+	+	-	-
ER12-PC-E6	E23/108	-	-	+	+	-	-

Annexes

ER11-PC-E6	E23/109	-	-	+	+	-	-
ER15-PP-B3	E23/110	-	-	+	+	-	-
ER20-PC-E6	E23/111	-	-	+	+	-	-
ER16-PP-B3	E23/112	-	-	+	+	-	-
ER2-D-E3	E23/113	-	-	+	+	-	+
ER16-PC-E6	E23/114	-	-	+	+	-	-
ER2-PC-E6	E23/115	-	-	+	+	-	-
ER9-PC-E6	E23/116	-	-	+	+	-	-
ER15-PC-E6	E23/117	-	-	+	+	-	-
ER1-PC-E6	E23/118	-	-	+	+	-	-
(+) : Test positif				(-) : Test négatif			
ER : Ecouvillonnage Rectal		E : élevage		B : bâtiment			
PC : Poulet de chair		D : dinde		PP : poule pondeuse			
E23 : <i>Enterococcus</i> spp. isolé en 2023							

Annexe 3 : Valeurs des diamètres de zone d'inhibition.

Famille	Antibiotique	Charge de disque (µg)	Diamètre critique			Référence
			Sensible	Intermédiaire	Résistante	
β lactamines	Ampicilline	10 µg	≥ 17	-	≤ 16	CLSI 2020
	Pénicilline	10 µg	≥ 15	-	≤ 14	CLSI 2020
Glycopeptides	Vancomycine	30 µg	≥ 17	15-16	≤ 14	CLSI 2020

Annexes

Tétracyclines	Tétracycline	30 µg	≥ 19	5-18	≤ 14	CLSI 2020
Macrolides	Erythromycine	15 µg	≥ 23	14-22	≤ 13	CLSI 2020
Phénicol	Chloramphénicol	30 µg	≥ 18	13-17	≤ 12	CLSI 2020
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	CLSI 2020
Inhibiteurs de synthèse de l'acide folique	Triméthoprim - Sulfaméthoxazole	25 µg (1,25-23,75)	≥ 16	-	≤ 10	CASFM 2012
Aminosides	Gentamycine (HLG)	120 µg	≥ 10	7-9	≤ 6	CASFM / EUCAST 2020

Annexe 4 : Résultat de l'antibiogramme pour chaque souche d'*Enterococcus* spp. isolée.
(Diamètre d'inhibition en mm).

Souche	Code	TET	VAN	CIP	SXT	CHL	ERY	PEN	AMP	GEN
ER1-PC-E2	E23/01	12	20	13	33	11	06	23	30	22
ER11-PC-E3	E23/02	12	26	21	06	28	11	06	24	30
ER12-PC-E3	E23/03	11	22	12	35	26	06	28	31	23
ER4-PC-E3	E23/04	11	20	08	06	22	06	09	22	20
ER10-PC-E3	E23/05	12	25	12	06	26	06	06	06	26
ER15-PC-E3	E23/06	12	21	09	35	23	06	09	20	19
ER9-PC-E3	E23/07	13	25	06	38	27	06	21	29	06
ER7-PC-E3	E23/08	11	24	12	06	25	06	06	06	25
ER2-PC-E2	E23/09	11	22	14	32	25	06	24	29	26
ER8-D-E1	E23/10	13	25	20	34	25	06	23	30	29
ER8-PC-E1	E23/11	15	24	16	34	20	06	10	29	28
ER11-PC-E2	E23/12	11	21	13	32	15	06	27	30	25

Annexes

ER8-PC-E2	E23/13	10	23	11	06	06	06	06	06	24
ER5-D-E1	E23/14	13	21	06	22	09	21	20	29	21
ER6-PC-E1	E23/15	13	24	14	11	20	22	18	25	21
ER3-PC-E2	E23/16	11	20	30	37	25	06	22	19	23
ER6-PC-E3	E23/17	06	21	14	34	15	06	21	31	27
ER2-PC-E3	E23/18	09	24	30	35	28	06	29	31	24
ER1-PC-E3	E23/19	12	21	06	32	25	06	06	27	23
ER13-PC-E3	E23/20	30	20	12	25	34	31	20	24	20
ER6-PC-E2	E23/21	13	23	15	25	15	06	25	30	24
ER15-PC-E1	E23/22	11	19	24	32	20	06	20	29	22
ER8-PC-E3	E23/23	09	25	15	35	25	06	29	30	24
ER12-D-E1	E23/24	08	18	06	27	09	06	18	25	20
ER11-PC-E1	E23/25	10	19	20	29	20	06	24	27	19
ER1-D-E1	E23/26	06	21	25	28	25	18	24	33	29
ER14-PC-E2	E23/27	10	21	06	29	24	06	22	28	27
ER1-PC-E1	E23/28	10	19	20	26	20	06	22	27	19
ER13-D-E1	E23/29	10	17	06	28	10	06	23	27	19
ER15-PC-E2	E23/30	13	27	14	27	29	06	16	28	27
ER9-D-E1	E23/31	12	22	25	33	23	06	28	37	28
ER7-PC-E1	E23/32	06	21	23	27	28	06	19	28	21
ER7-PC-E2	E23/33	10	21	11	23	28	06	10	06	21
ER14-PC-E1	E23/34	10	18	14	25	20	06	20	29	19
ER5-PC-E1	E23/35	10	19	20	28	22	06	23	29	19
ER4-D-E1	E23/36	11	18	06	32	09	06	23	27	19
ER10-D-E1	E23/37	12	22	26	34	25	06	24	32	25
ER9-PC-E1	E23/38	10	20	22	24	24	09	25	27	19
ER13-PC-E1	E23/39	22	19	22	29	19	06	20	28	17
ER10-PC-E1	E23/40	10	18	16	25	21	10	26	22	21
ER6-D-E1	E23/41	09	23	15	34	28	06	24	24	28

Annexes

ER14-PC-E3	E23/42	06	24	20	35	29	06	12	27	23
ER3-PC-E1	E23/43	06	24	19	28	30	06	06	23	21
ER9-PC-E2	E23/44	06	25	18	28	30	06	06	18	26
ER4-PC-E2	E23/45	06	24	10	28	30	06	06	06	24
ER10-PC-E2	E23/46	06	19	12	28	11	06	19	24	23
ER13-PC-E2	E23/47	06	21	22	28	23	16	24	27	20
ER5-PC-E2	E23/48	06	22	17	28	28	06	06	06	24
ER12-PC-E2	E23/49	06	23	24	34	27	06	06	06	23
ER5-PC-E3	E23/50	06	24	14	06	29	06	06	06	23
ER6-D-E2	E23/51	06	21	16	25	12	06	26	25	21
ER8-PC-E5	E23/52	06	20	12	31	22	06	23	27	20
ER4-PP-B1	E23/53	06	22	22	29	24	13	28	25	23
ER5-D-E2	E23/54	06	20	22	30	21	06	15	26	17
ER8-D-E2	E23/55	06	20	19	28	12	06	25	28	24
ER10-PP-B2	E23/56	06	18	06	26	10	12	18	30	18
ER3-PP-B1	E23/57	30	16	28	37	28	26	20	26	30
ER2-PP-B2	E23/58	06	25	14	31	27	06	06	27	25
ER10-PP-B1	E23/59	06	17	11	26	09	11	18	29	18
ER10-PC-E5	E23/60	06	18	19	28	25	12	21	25	18
ER9-PC-E4	E23/61	31	22	11	44	24	37	54	42	19
ER10-PC-E4	E23/62	06	29	13	30	30	06	10	24	23
ER6-PP-B2	E23/63	06	25	10	24	25	06	10	22	19
ER9-D-E2	E23/64	06	18	22	29	19	06	20	22	20
ER6-PC-E4	E23/65	06	21	06	30	10	06	06	22	22
ER5-PC-E5	E23/66	22	22	22	29	28	10	21	27	20
ER7-PC-E5	E23/67	06	24	14	25	22	06	22	28	20
ER3-PC-E4	E23/68	06	22	12	06	25	06	06	06	22
ER12-PC-E4	E23/69	06	26	13	30	27	06	12	23	28
ER8-PC-E4	E23/70	06	27	15	31	29	06	09	24	24

Annexes

ER4-PC-E4	E23/71	06	24	11	22	25	06	06	22	24
ER12-PC-E5	E23/72	27	25	26	30	25	28	18	23	22
ER6-PP-B1	E23/73	06	20	06	32	08	06	22	27	20
ER8-PP-B1	E23/74	06	17	06	29	09	06	22	28	18
ER5-PP-B2	E23/75	06	22	10	34	09	06	06	19	21
ER9-PP-B2	E23/76	06	22	06	39	10	06	06	22	22
ER7-PP-B2	E23/77	06	21	15	37	25	06	06	23	23
ER5-PC-E4	E23/78	06	30	14	33	30	06	06	25	29
ER12-D-E2	E23/79	06	21	15	28	09	13	19	23	21
ER7-PC-E4	E23/80	06	20	12	28	30	06	27	31	24
ER11-D-E2	E23/81	06	23	16	27	06	06	19	25	22
ER5-PP-B1	E23/82	25	21	16	23	22	10	14	23	18
ER11-PC-E5	E23/83	06	18	21	25	25	07	18	28	17
ER1-D-E2	E23/84	06	18	19	28	12	06	19	27	24
ER3-PC-E5	E23/85	06	24	13	28	26	06	06	21	28
ER2-PC-E4	E23/86	06	25	15	06	25	06	06	21	28
ER1-PP-B2	E23/87	06	21	11	29	21	06	06	20	24
ER3-PP-B2	E23/88	06	19	08	30	08	06	18	26	18
ER1-PC-E5	E23/89	06	20	10	21	22	06	22	27	20
ER9-PC-E5	E23/90	06	19	21	23	20	06	18	25	19
ER9-PP-B1	E23/91	06	19	10	34	09	06	19	29	19
ER8-PP-B2	E23/92	06	27	16	35	32	06	26	32	25
ER2-D-E2	E23/93	06	21	18	33	10	06	29	34	19
ER4-PC-E6	E23/94	06	24	20	26	28	06	10	25	-
ER10-PC-E6	E23/95	06	23	19	25	28	06	06	19	23
ER7-PC-E6	E23/96	06	23	22	32	33	38	09	21	-
ER5-D-E3	E23/97	23	22	27	28	31	09	20	29	-
ER17-PC-E6	E23/98	07	23	21	36	33	35	20	29	-
ER1-PP-B3	E23/99	06	25	22	36	35	29	21	27	25

Annexes

ER4-D-E3	E23/100	06	19	22	28	23	18	19	29	-
ER3-PC-E6	E23/101	06	23	17	06	30	06	06	30	-
ER5-PC-E6	E23/102	06	21	17	29	23	06	06	23	-
ER8-PC-E6	E23/103	06	23	20	31	36	28	12	30	-
ER7-D-E3	E23/104	06	19	18	29	24	17	21	30	-
ER19-PC-E6	E23/105	06	23	20	06	36	30	23	22	-
ER18-PC-E6	E23/106	06	25	20	34	28	06	06	25	-
ER1-D-E3	E23/107	06	19	27	30	21	22	21	30	-
ER12-PC-E6	E23/108	06	23	20	33	32	38	21	25	-
ER11-PC-E6	E23/109	34	24	35	30	28	31	22	33	-
ER15-PP-B3	E23/110	06	25	32	45	35	06	28	38	-
ER20-PC-E6	E23/111	06	23	17	06	25	06	06	27	-
ER16-PP-B3	E23/112	30	20	31	31	29	23	33	36	-
ER2-D-E3	E23/113	06	20	21	32	25	06	20	30	-
ER16-PC-E6	E23/114	06	23	21	29	22	11	11	24	-
ER2-PC-E6	E23/115	06	26	18	30	30	06	06	21	-
ER9-PC-E6	E23/116	06	24	17	27	23	06	06	27	-
ER15-PC-E6	E23/117	06	25	17	31	30	06	06	22	-
ER1-PC-E6	E23/118	06	25	19	25	25	19	23	28	-

Annexe 5 : Profil de multirésistance des souches testées d'*Enterococcus* spp.

Souche	Code	Profil de multirésistance
ER1-PC-E2	E23/01	TET-CIP-CHL-ERY
ER11-PC-E3	E23/02	TET-SXT-ERY-PEN
ER12-PC-E3	E23/03	TET-CIP-ERY
ER4-PC-E3	E23/04	TET-CIP-SXT-ERY-PEN
ER10-PC-E3	E23/05	TET-CIP-SXT-ERY-PEN-AMP
ER15-PC-E3	E23/06	TET-CIP-ERY-PEN

ER9-PC-E3	E23/07	TET-CIP-ERY-GEN
ER7-PC-E3	E23/08	TET-CIP-SXT-ERY-PEN-AMP
ER2-PC-E2	E23/09	TET-CIP-ERY
ER8-PC-E1	E23/11	CIP-ERY-PEN
ER11-PC-E2	E23/12	TET-CIP-ERY
ER8-PC-E2	E23/13	TET-CIP-SXT-CHL-ERY-PEN-AMP
ER5-D-E1	E23/14	TET-CIP-CHL
ER6-PC-E3	E23/17	TET-CIP-ERY
ER1-PC-E3	E23/19	TET-CIP-ERY-PEN
ER6-PC-E2	E23/21	TET-CIP-ERY
ER8-PC-E3	E23/23	TET-CIP-ERY
ER12-D-E1	E23/24	TET-CIP-CHL-ERY
ER14-PC-E2	E23/27	TET-CIP-ERY
ER13-D-E1	E23/29	TET-CIP-CHL-ERY
ER15-PC-E2	E23/30	TET-CIP-ERY
ER7-PC-E2	E23/33	TET-CIP-ERY-PEN-AMP
ER14-PC-E1	E23/34	TET-CIP-ERY
ER4-D-E1	E23/36	TET-CIP-CHL-ERY
ER6-D-E1	E23/41	TET-CIP-ERY
ER14-PC-E3	E23/42	TET-ERY-PEN
ER3-PC-E1	E23/43	TET-ERY-PEN
ER9-PC-E2	E23/44	TET-ERY-PEN
ER4-PC-E2	E23/45	TET-CIP-ERY-PEN-AMP
ER10-PC-E2	E23/46	TET-CIP-CHL-ERY
ER5-PC-E2	E23/48	TET-ERY-PEN-AMP
ER12-PC-E2	E23/49	TET-ERY-PEN-AMP
ER5-PC-E3	E23/50	TET-CIP-SXT-ERY-PEN-AMP
ER6-D-E2	E23/51	TET-CHL-ERY
ER8-PC-E5	E23/52	TET-CIP-ERY

ER8-D-E2	E23/55	TET-CHL-ERY
ER10-PP-B2	E23/56	TET-CIP-CHL-ERY
ER2-PP-B2	E23/58	TET-CIP-ERY-PEN
ER10-PP-B1	E23/59	TET-CIP-CHL-ERY
ER10-PC-E4	E23/62	TET-CIP-ERY-PEN
ER6-PP-B2	E23/63	TET-CIP-ERY-PEN
ER6-PC-E4	E23/65	TET-CIP-CHL-ERY-PEN
ER7-PC-E5	E23/67	TET-CIP-ERY
ER3-PC-E4	E23/68	TET-CIP-ERY-PEN-AMP
ER12-PC-E4	E23/69	TET-CIP-ERY-PEN
ER8-PC-E4	E23/70	TET- CIP-ERY-PEN
ER4-PC-E4	E23/71	TET- CIP-ERY-PEN
ER6-PP-B1	E23/73	TET-CIP-CHL-ERY
ER8-PP-B1	E23/74	TET- CIP-CHL-ERY
ER5-PP-B2	E23/75	TET-CIP-CHL-ERY-PEN
ER9-PP-B2	E23/76	TET- CIP-CHL-ERY-PEN
ER7-PP-B2	E23/77	TET-CIP-ERY-PEN
ER5-PC-E4	E23/78	TET- CIP-ERY-PEN
ER12-D-E2	E23/79	TET-CIP-CHL-ERY
ER7-PC-E4	E23/80	TET-CIP-ERY
ER-11-D-E2	E23/81	TET-CHL-ERY
ER-D-E2	E23/84	TET- CHL-ERY
ER3-PC-E5	E23/85	TET-CIP-ERY-PEN
ER2-PC-E4	E23/86	TET- CIP-ERY-PEN
ER1-PP-B2	E23/87	TET- CIP-ERY-PEN
ER3-PP-B2	E23/88	TET-CIP-CHL-ERY
ER1-PC-E5	E23/89	TET-CIP-ERY
ER9-PP-B1	E23/91	TET-CIP-CHL-ERY
ER2-D-E2	E23/93	TET-CHL-ERY

ER4-PC-E6	E23/94	TET-ERY-PEN
ER10-PC-E6	E23/95	TET- ERY-PEN
ER3-PC-E6	E23/101	TET-SXT-ERY-PEN
ER5-PC-E6	E23/102	TET-ERY-PEN
ER18-PC-E6	E23/106	TET- ERY-PEN
ER20-PC-E6	E23/111	TET-SXT-ERY-PEN
ER16-PC-E6	E23/114	TET-ERY-PEN
ER2-PC-E6	E23/115	TET-ERY-PEN
ER9-PC-E6	E23/116	TET-ERY-PEN
ER15-PC-E6	E23/117	TET-ERY-PEN

Annexe 6 : Caractères phénotypiques des souches d'*Enterococcus* spp. multirésistantes et virulentes

Souche	Code	Profil de multirésistance	Hémolyse	Gélatinase	Etat de virulence	Espèce animal
ER12-PC-E3	E23/03	TET-CIP-ERY	+	-	Virulente	PC
ER4-PC-E3	E23/04	TET-CIP-SXT-ERY-PEN	+	-	Virulente	PC
ER15-PC-E3	E23/06	TET-CIP-ERY-PEN	+	-	Virulente	PC
ER1-PC-E3	E23/19	TET-CIP-ERY-PEN	+	-	Virulente	PC
ER14-PC-E1	E23/34	TET-CIP-ERY	+	-	Virulente	PC
ER14-PC-E3	E23/42	TET-ERY-PEN	+	-	Virulente	PC
ER6-PC-E4	E23/65	TET-CIP-CHL-ERY-PEN	+	-	Virulente	PC

Annexe 7 : Etapes de la préparation du milieu de culture (gélose au sang).

