

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie- Microbiologie

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques

Option : Microbiologie appliquée

THEME

Caractérisation phénotypique des souches d'entérocoques isolées à partir des produits alimentaires

Réalisé par : KACIMI AMAL

OUAZZI THIZIRI

Devant le Jury composé de :

Présidente : M^{me} HELLAL Z.

Maitre assistante A

Examineur : Mr. SEBBANE H.

Maitre assistant A

Examinatrice : M^{elle} ASMANI K.

Maitre de Conférences B

Promoteur : Mr. TITOUCHE Y.

Maitre assistant A

Année universitaire : 2017/ 2018

Remerciement

Au terme de ce travail nous remercions :

En premier lieu DIEU, le tout puissant de nous avoir donné le privilège et la chance d'étudier, qui nous a guider pour la réalisation de ce modeste travail.

Nous tenons avant tous à remercier notre promoteur, monsieur TITOUCHE. Y, qui a accepté de nous encadrer, qui nous a guidés par ses précieux conseils et suggestions pertinentes et nous à bien expliquer les étapes de ce travail. Quoi que nous disions, les mots ne sauraient exprimer nos profondes gratitude pour avoir dirigé ce mémoire. Nous le remercie vivement d'avoir suivi et orienter ce travail.

Nous tenons également à remercier les membres de Jury d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Nos remerciements vont à tous le personnel de laboratoire,

En fin, nous remercions tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail, trouvent ainsi l'expression de nos profondes gratitude et respects.

Dédicace

Je dédie ce mémoire qui est le fruit de tout un long chemin d'étude

✚ A la mémoire de mon cher grand père.

✚ A ma grande mère qui a été toujours à mes côtés pour me soutenir et me donner le courage pour terminer mes études.

✚ A ma mère et mon père.

A mon petit frère adorable Takfa, mes sœurs, et toute la famille surtout ma tante.

*✚ A tous mes amis spécialement ma binôme la choupinette
mamel*

✚ Ainsi à toutes personnes qui m'ont soutenu tout au long de la réalisation de ce travail.

✚ A mes amis rencontré durant cette période Mouhand et Madjid sans oublier mes copines Razika et Hanane.

✚ A ceux qui ont pris une place dans mon cœur et je n'ai pas cité bien sûre ne croyez pas que je vous ai oublié je vous porte toujours dans mon cœur.

Thiziri

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

✚ *A mon cher Papa et ma chère Maman qui ont été toujours à mes côtés pour me soutenir et me donner le courage pour terminer mes études.*

✚ *A mes sœur Siham et Celia et mon frère Chabane, je vous aime beaucoup.*

✚ *A toute ma famille surtout ma grande mère Djedjiga.*

✚ *A ma copine et binôme Ziri avec qui j'ai partagé mes meilleurs moments de fac, je te souhaite le meilleur.*

✚ *A toutes mes amies sans exception*

✚ *A ceux qui ont pris une place dans mon cœur et je n'ai pas cité, ne croyez pas que je vous ai oublié je vous porte toujours dans mon cœur.*

Amal

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

RESUME

INTRODUCTION..... 01

Partie théorique

CHAPITRE I : Généralités sur les entérocoques

I.1. Historique.....	05
I.2. Habitat	05
I.3. Classification	06
I.4. Caractère bactériologique.....	06
I.5. Importance des entérocoques dans l'alimentation	08
I.6. Entérocoques (bactériocines des entérocoques)	09
I.7. Utilisation des entérocoques comme probiotiques.....	10

CHAPITRE II : Facteurs de virulence

II.1. Risque des entérocoques	13
II.2.-Facteurs contribuant à la pathogénèse des entérocoques	13
II.2.1. Facteurs de virulence sécrétés.....	13
II.2.2. Facteurs de virulence liés à la membrane	15
II.3.Importance clinique des entérocoques	16

CHAPITRE III : Résistance aux antibiotiques

III.1.Historique	20
III.2.Définition	20
III.3. Critères de classification des antibiotiques	21
III.4. Antibiorésistance chez les entérocoques	25
III.5. Support génétique de la résistance bactérienne.....	25
III.6. Mécanismes moléculaires de la résistance des entérocoques aux antibiotiques	26

Partie expérimental

CHAPITRE I : Matériels et Méthode

I.1. Isolement des entérocoques.....	36
I.2. Identification des isolats	37
I.2.1. L'étude microscopique	37
I.2.2. Identifications biochimiques	37
I.2.3. Caractérisation phénotypique des souches isolées.....	39
I.4. Antibiorésistance des souches isolées	39
I.5. activité antagoniste des entérocoques	40
I.6. Conservation des souches.....	41

CHAPITRE II : Résultats et discussions

II.1. Résultats	43
II.1.1 Prévalence des entérocoques	43
II.1.2. Résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques.....	44
II.1.3. Phénotypes de multirésistance	46
II.1.4. Caractérisation phénotypique des entérocoques.....	47
II.1.5. Activité antagoniste des souches d'entérocoques	48
II.2. Discussions.....	49

CONCLUSION

Conclusion.....	54
------------------------	-----------

Références bibliographiques	55
--	-----------

Annexes

Liste des figures

Figure 01 : Morphologie en microscopie électronique à balayage d'une souche d' <i>Enterococcus faecalis</i>	07
Figure 02 : Les mécanismes essentiels de la résistance des entérocoques aux antibiotiques	27
Figure 03 : Inactivation des antibiotiques par des β -lactamases	28
Figure 04 : Structure des systèmes d'efflux actif.....	31
Figure 05 : Profil de résistance de la souche d' <i>Enterococcus faecalis</i> (E6)	45
Figure 06 : Profil de résistance de la souche d' <i>Enterococcus faecalis</i> (E14)	46
Figure 07 : Résultat de test d'hydrolyse de la gélatine	47
Figure 08 : Résultat de l'hydrolyse de l'ADN	47
Figure 09 : Activité antagoniste des souches d'entérocoques contre les souches pathogènes.....	48

Liste des tableaux

Tableau I : Caractères principaux des entérocoques.....	8
Tableau II : Résistance intrinsèque aux antimicrobiens chez les entérocoques.	26
Tableau III : Phénotype de résistance des entérocoques	30
Tableau IV : Liste des antibiotiques testés.	40
Tableau V : Prévalence des souches d'entérocoques selon le type de produit.	43
Tableau VI : Fréquence des espèces d' <i>Enterococcus</i> dans les aliments analysés	44
Tableau VII : Résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques testés.....	45
Tableau VIII : Phénotype de résistance des souches d'entérocoques isolées.	46

Liste des abréviations

E: <i>Enterococcus</i>	UFC : Unité formant colonie
ADN : Acide désoxyribonucléique	ARN: Acide ribonucléique
°C : Degrés Celsius	pH: Potentiel d'hydrogène
G+C: Le ratio guanine+ cytosine	L: <i>Lactobacillus</i>
ESP : Protéine de surface d'entérocoque	SA : Substances d'agrégation
CMI : Concentration minimale inhibitrice	MEC : Matrice extracellulaire
B : <i>Bifidobactéries</i>	ALT : Acide lipotéichoïque
ACE : L'adhésine au collagène d' <i>E. faecalis</i>	PB : Paire de base
KDA : kilo dalton	ERV : Entérocoque résistant à la vancomycine
EFAA : Antigène A d' <i>E. faecalis</i>	CLSI : Clinical and laboratory standards institute
LPS : Lipopolysaccharide	S : Svedberg
EI : Endocardite infectieuse	CASFM : Comité française de microbiologie
PLP : Protéines liant la pénicilline	MET : Méthionine
OMS : Organisation mondiale de la santé	AMD : Amidon
ARN_t : Acide ribonucléique de transport	MANI : Mannitol
ALA : Alanine	RIB: Ribose
ARB: Arabinose	RAF : Raffinose
LAC: Lactose	TRIH: Tréhalose
SOR: Sorbitol	MIL: Milebiose

RESUME

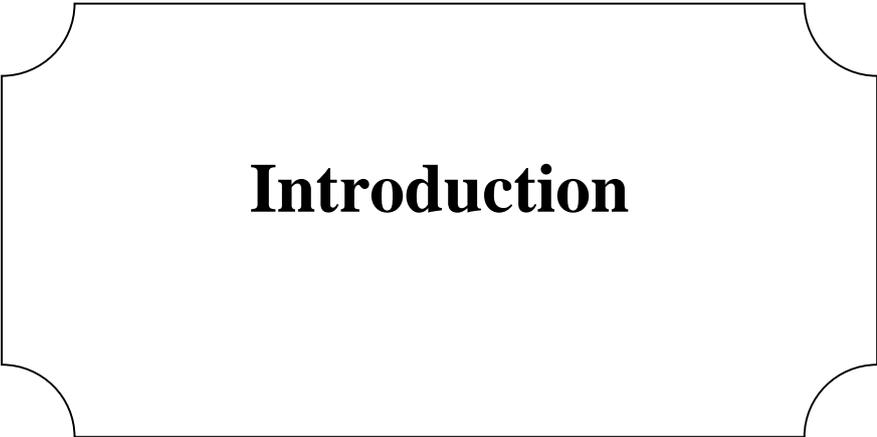
Les entérocoques sont des bactéries utilisées depuis des siècles dans la transformation des aliments. Cependant, ce sont des marqueurs de contamination fécale, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* sont les espèces les plus rencontrées.

L'objectif de cette étude est la caractérisation phénotypique des souches d'*Enterococcus* isolées à partir des produits alimentaires (viande hachée, fromage, pâtisserie et beurre) et ceci pour étudier la prévalence de ce germe et sa résistance vis-à-vis quelque molécules d'antibiotiques. Pour cela, 116 échantillons sont prélevés et soumis à la recherche des souches d'*Enterococcus*. Les souches isolées ont été soumises à l'étude de leur résistance aux antibiotiques par la méthode de diffusion des disques sur gélose Mueller-Hinton. Ensuite, l'activité antagoniste vis-à-vis quelques souches pathogènes est déterminée.

Sur les 116 échantillons analysés, 36 (31.03%) ont été contaminés et 36 souches ont été isolées. Néanmoins, l'identification biochimique des isolats a permis de confirmer 26 souches d'*Enterococcus*. L'espèce dominante est *E. faecalis* (50%), suivie par *E. faecium* (11.53%). De fortes résistances vis-à-vis la gentamicine et la tétracycline ont été enregistrées, avec des valeurs de 88.46% et 73.07%, respectivement. Des résistances relativement faibles ont été observées vis-à-vis les autres molécules. Aucune résistance à l'encontre des glycopeptides n'est révélée. Aucune souche n'exprime une activité bactériocinogène.

Les résultats de cette étude montrent bien le risque sanitaire associé à la consommation de denrées alimentaires contaminées par les entérocoques. Pour cela, l'installation de bonnes pratiques d'hygiène s'avère nécessaire pour réduire le risque microbien et améliorer la sécurité sanitaire des aliments.

Mots clés :, activité antagoniste, *Enterococcus*, produits alimentaires, résistance aux antibiotiques, risque microbien.



Introduction

Introduction

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif, anaérobies facultatifs, très répandus dans l'intestin des animaux et des humains. En plus, ils sont présents dans plusieurs types d'aliments, incluant une variété de viandes fermentées et de produits laitiers, comme culture de départ sans affecter la santé humaine (Foulquie Moreno et al, 2006). En revanche, ils peuvent se retrouver dans le sol, dans les eaux de surface, sur les plantes et les végétaux, en raison de leur capacité à croître et à se développer sous des conditions environnementales hostiles (Franz et al, 2002). Cette résistance aux diverses conditions environnementales (faibles et hautes températures, pH extrêmes et salinité) peut expliquer la capacité des entérocoques à coloniser différentes niches écologiques. Ils présentent une grande capacité de propagation à l'intérieure de la chaîne alimentaire et ceci à travers les animaux et les aliments contaminés (Bradely et Fraise, 1996 ; Foulquie Moreno et al, 2006).

Certaines souches d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium* sont utilisées dans la technologie alimentaire, en raison de leur capacité à produire des bactériocines inhibant la multiplication des autres bactéries pathogènes, comme *Listeria monocytogenes* (Izquierdo et al, 2009) et d'agir comme initiateurs dans la fermentation d'une large gamme de produits. L'utilisation des entérocoques comme probiotiques est une question controversée, compte tenu de l'incidence croissante de maladies entérococciques et l'émergence des souches d'entérocoques multi-résistantes. En effet, *Enterococcus* spp est capable de transférer des gènes de résistance à son espèce propre, à d'autres pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* et *Listeria* spp et aux bactéries non pathogènes. Ces bactéries présentes dans le tractus intestinal humain ou animal, dans l'environnement et dans les aliments (Courvailin, 1994 ; Sparo et al, 2011), ce qui pourra contribuer à la dissémination et à la persistance de la résistance aux antimicrobiens (Pesavento et al, 2014).

L'émergence de la résistance à la vancomycine des entérocoques est attribuée à un développement double qui comprenait une surutilisation clinique des antibiotiques et à des résistances croisées, suite à l'utilisation agricole de l'avoparcine, un promoteur glycopeptidique de croissance des animaux (Koluman et al, 2009). Plusieurs auteurs ont confirmé la présence des souches d'entérocoques résistants à la vancomycine dans les aliments (Valenzuela et al, 2008 ; Koluman et al, 2009 ; Hammad et al, 2015 ; Yilmaz et al, 2016). En revanche, peu de données sont disponibles sur le profil de résistance des souches d'*Enterococcus* d'origine alimentaire en Algérie. C'est dans ce contexte, que s'inscrit cette étude dont les objectifs sont :

- Isoler et caractériser les souches d'*Enterococcus* spp à partir de quelques denrées alimentaires.
- Etudier la résistance des isolats aux antibiotiques, dans le but de prévoir l'existence de souches d'entérocoques résistantes à la vancomycine (ERV).
- Etudier le pouvoir antagoniste de quelques souches d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* vis-à-vis quelques souches pathogènes.

Partie théorique

Chapitre I :
Généralités sur les entérocoques

I.1. Historique

Le nom de *Streptococcus* (streptus, flexible; coccus, grain) fut pour la première fois attribué par Billoth et Ehrlich (1877) à des cocci formant des chainettes, observés dans les blessures infectées. Fehleisen (1883) décrit un coccus similaire comme agent de l'érysipèle. Rosenbach (1884) donna le nom *Streptococcus pyogenes* à des cocci groupées en chainettes et isolés de lésions suppuratives chez l'homme.

Pasteur, Chamberland et Roux (1881) rendirent compte d'une infection septicémique obtenue chez des lapins inoculés avec de la salive humaine. Cette expérience est considérée comme la première référence sur *streptococcus pneumoniae*; la description de cette espèce fut réalisée par Freankel et Weichselbaum (1886). Nocard et Mollerceau (1887) décrivent une mastite provoquée chez une vache et une chèvre après avoir inoculé dans leurs mamelles un *streptococcus* isolé dans le lait d'une vache atteinte de cette maladie. Schütz (1887) et Schütz (1888) décrivaient des streptocoques isolés de lésions de pneumonie et de gourme chez les chevaux. Les différentes maladies streptococciques étaient considérées provoquées par une espèce donnée de streptocoque, mais actuellement il est connu qu'une même espèce de ce genre peut être responsable d'un nombre de ces maladies (LeMinor et Véron, 1982). Avec l'évènement de la biologie moléculaire le genre *Enterococcus* a été séparé du genre *Streptococcus* (Destain et al., 2012).

I.2. Habitat

Les entérocoques sont des germes ubiquistes (Delarras, 2007). Ils sont caractérisés par des propriétés intrinsèques qui leur permettent de se répondre un peu partout dans la nature. Ils sont largement répartis entre le tube digestif de l'homme, les autres mammifères, les oiseaux, les plantes, le sol et l'eau (Klein, 2003).

Les entérocoques appartiennent à la microflore commensale du tractus gastro-intestinal des animaux. De ce fait, il existe de fortes probabilités qu'ils contaminent la viande au cours de l'abattage (Franz et al., 2004). Leur adaptabilité à différents écosystèmes a permis de retrouver trois clones d'*E. faecalis* et d'*E. casseliflavus* dans du lait, dans du fromage ou dans des matières fécales humaines (Gelsomino et al., 2002), avec une concentration de 10^5 à 10^7 ufc/g (Kayser, 2003). Les entérocoques les plus fréquemment isolés dans les fèces de l'homme sont *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans* (Murray, 1990 ; Leclerc et al., 1996).

I.3. Classification

Pendant très longtemps, les entérocoques ont été classés au sein du genre *Streptococcus*. En 1970, Kalina a proposé que ces microorganismes doivent être placés dans un nouveau genre, entérocoque. Cela a été largement accepté lorsque les études moléculaires et chimio-taxinomiques confirment les différences par rapport aux autres streptocoques (Schleifer et Kilpper-Balz, 1984).

Le genre *Enterococcus* a été séparé du genre *Streptococcus*. Dans ce contexte, plusieurs espèces appartenant antérieurement au genre *Streptococcus* ont été transférées vers le genre *Enterococcus* sur la base de la biologie moléculaire et de nouvelles techniques, telles que la détermination des pourcentages C+G, le séquençage de l'ARN 16S (Ludwig et al., 1985; Schleifer et Kilpper-Balz, 1987) et l'hybridation ADN-ADN (Schleifer et Kilpper-Bälz, 1984). Schleifer et al (1984) ont reclassé les bactéries *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis* comme *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* respectivement (Destain et al., 2010). Selon le Bergey's manuel de la bactériologie systématique (2009), le genre *Enterococcus* est classé comme suit: (Svec et Devriese, 2009)

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

Dans ce genre, On compte 34 espèces officiellement identifiées et classées. Actuellement, une cinquantaine d'espèces sont décrites (Bousour, 2017).

I.4. Caractère bactériologique

I.4.1. Caractère morphologique

Les entérocoques sont des cocci à Gram positifs. Les cellules sont ovoïdes et se présentent sous forme de cellules isolées, par paire ou encore sous forme de chaînette (Schleifer et al., 1984). Généralement, les entérocoques produisent des colonies de couleur blanche. Toutefois, quelques-unes sont de couleur jaune comme *E. mundtii*, *E. casseliflavus* et *E. sulfureus* (Higashide et al., 2005), non sporulantes, généralement immobiles (sauf pour *Ecasseliflavus*, *E gallinarum*) et sans capsule (Kalina, 1970).

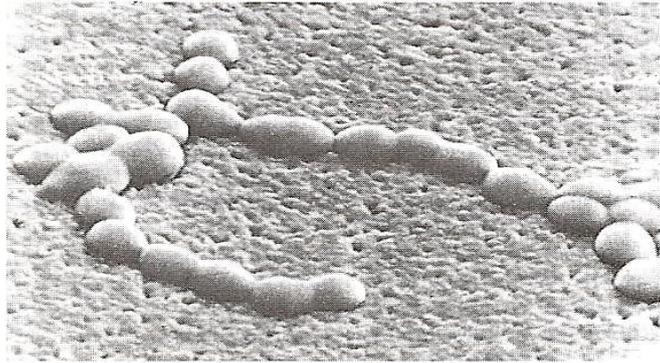


Figure 01 : Morphologie en microscopie électronique à balayage d'une souche d'*Enterococcus faecalis* (Singleton, 2005).

I.4.2. Caractères cultureux

Les entérocoques poussent sur milieu ordinaire, mais plus facilement sur gélose au sang (24h à 37°C) (Berche et al., 1988) en raison de ces exigences nutritives. Ils donnent des colonies de 1 à 2 mm, opaques, grisâtres, bombées et à bord régulier (Le Minor et Veron, 1982). Ils sont anaérobies facultatifs (Schleifer et al., 1984).

Ces bactéries sont aptes à survivre dans des conditions hostiles, sont des microorganismes mésophiles qui se développent dans une gamme de température allant de 10 à 45°C avec un optimum de 35 à 37°C (Higashid et al., 2005). Certaines espèces ont une grande résistance aux facteurs environnementaux, en particulier la température (30 min, à 60°C). Ils peuvent également hydrolyser l'esculine en présence de 40% de bile par une bêta-Glucosidase, qui se traduit par l'apparition d'un halo noir autour des colonies sur gélose bile esculine. En revanche, la croissance en bouillon nutritif peut donner un trouble homogène avec ou sans dépôt. Ils se développent à pH alcalin de 9,6 et dans une solution contenant 6,5% de NaCl (CEAEQ, 2000; Facklam *et al.*, 1999; Hancock et Gilmore, 2000).

I.4.3. Caractères biochimiques

De nombreuses réactions biochimiques ont été décrites pour le diagnostic des entérocoques, généralement sont catalase négative (Schleifer et al., 1984), dépourvus de cytochromes oxydases, de nitrate réductase, exigeants en facteur de croissance. De plus, la majorité des entérocoques ne produisent pas d'indole, ni d'hydrogène sulfureux. Ils sont positifs au test de voges-proskauer (Schleifer et al., 1984 ; Le Blanc, 2006).

Les entérocoques sont homofermentaire, ils produisent essentiellement de l'acide lactique et en quantité moindre, de l'acétate, et de l'éthanol. Les produits finaux du métabolisme peuvent

changer en fonction de la présence ou non de l'oxygène. En anaérobiose, le lactate est le principal produit du métabolisme du glucose. Tandis qu'en condition d'aérobiose, les produits du métabolisme sont l'acétate et le CO₂. Ils sont capables de métaboliser divers types de sucres comme le lactose, le ribose, le tréhalose, le glucose et le maltose (Schleifer et al., 1984 ; Le Blanc, 2006).

Tableau I : Caractères principaux des entérocoques (Delarras, 2007).

Caractères principaux- milieux de culture	
Morphologie	Cocci de 0.6 à 1 µm en moyenne, ovalaires, isolés, en diplocoques, chaînettes ou chaînes.
Coloration de Gram	Gram+
Mobilité	Immobilés
Type respiratoire	Anaérobies facultatifs
Catalase	-
Conditions de culture	-Température générale : de +10 à +43°C -Température optimal : 37°C -pH optimal : de 7.2 à 7.4 ; croissance à pH 9.6 -Croissance dans des milieux hostiles à 6.5% de NaCl ou à 40% de bile
Milieux de culture d'usage courant	Gélose nutritive, gélose trypticase soja...

I.5. Importance des entérocoques dans l'alimentation

➤ Produits laitiers

Les entérocoques les plus couramment présents dans les fromages sont *E. faecium*, *E. faecalis* et *E. durans* (Giraffa, 2003). Ils sont présents aussi bien dans les fromages à base de lait cru que de lait pasteurisé, provenant de chèvre, de brebis ou de vache ; on retrouve moins souvent *E. casseliflavus* (Burdychova et al., 2007). Les entérocoques ont un rôle important dans la maturation de plusieurs variétés de fromages, probablement en raison de leur activité protéolytique, lipolytique, de leur capacité de production du diacétyle et d'autres composants volatils contribuant à l'aromatisation, la flaveur et au goût caractéristique (Franz et al., 1999).

➤ Viandes et poissons

E. faecium et *E. faecalis* sont les espèces prédominantes dans les produits carnés. Tandis que, *E. hirae* et *E. durans* (Franz et al., 2004) s'y retrouvent en moindre proportion. Pimenta et al. (2007) ont isolé différentes espèces d'entérocoques à partir des échantillons de viande de poulet, avec des proportions suivantes : *E. faecalis* (50,9 %), *E. casseliflavus* (26,3 %), *E. gallinarum* (4,2 %) et *E. gilvus* (4,2 %).

I.6. Entérocoques (bactériocines des entérocoques)

Le genre *Enterococcus* produit une grande variété de bactériocines, nommées entérocoques. Ces bactériocines sont des peptides de faible poids moléculaire constitués de 20 à 60 acides aminés. Cependant, le spectre d'activité, le mode d'action, la structure, la thermostabilité et le pH d'activité varient d'un type de bactériocine à l'autre (Van Belkum et al., 2000 ; Chen et al., 2003 ; Dortu et al., 2009). Les bactériocines sont synthétisées par voie ribosomale, présentant un antagonisme principalement contre des bactéries à Gram positif (Jack et al., 1995). Elles sont dans la plus part de temps thermostable (Klaenhammer, 1988 ; Klaenhammer, 1993 ; Cotter et al., 2005).

Beaucoup de souches d'entérocoques, principalement *E. faecalis* et *E. faecium*, peuvent produire une variété de bactériocines actives contre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (Ogier et Serror, 2008). Ces entérocoques peuvent être appliquées comme conservateur dans les produits laitiers et les viandes de fermentation (Franz et al., 2007).

I.6.1. Biosynthèse

La synthèse des bactériocines est associée à la croissance : elle se déroule pendant toute la phase de croissance et s'arrête à la fin de la phase exponentielle (Parente et al., 1997 ; Lejeune et al., 1998). Le mécanisme de biosynthèse des bactériocines est relativement simple, car les peptides antibactériens sont des métabolites primaires (Rodney et al., 2015).

Chez les bactéries lactiques productrices de bactériocine, l'immunité est assurée par un mécanisme spécifique qui leur confère une protection contre la toxicité de leur propre bactériocine (Tagg et al., 1976 ; Klaenhammer, 1993 ; Jack et al., 1995). Selon Nes et al (1996), ce mécanisme dépend d'une protéine d'immunité spécifique exprimée en même temps que la bactériocine. D'autres auteurs suggèrent que l'immunité peut être assurée par des protéases intracellulaires qui dégradent la bactériocine (Abee, 1995 ; Jack et al., 1995, Allison et Klaenhammer, 1996).

I.6.2. Mode d'action

Les entérocoques ont la membrane cytoplasmique comme cible principale, comme la plus part des bactériocines, où elles forment des pores, appauvrissant ainsi le potentiel transmembranaire, ce qui entraîne la mort cellulaire (Cleveland et al., 2001).

Divers mécanismes ont été proposés pour décrire l'action bactéricide des bactériocines. La formation de pores est le mécanisme le mieux décrit. Le spectre d'action relativement faible de certaines bactériocines suggère la présence de récepteurs moléculaires dans la membrane de la cellule cible, même si cela n'a pas été démontré (Van Belkum et Stiles, 2000).

I.6.3. Entérocoques et leur spectre d'action

Certaines bactériocines ne tuent que les bactéries appartenant à la même espèce que la bactérie productrice. Tandis que, d'autres bactériocines tuent un large éventail de bactéries à Gram positif (Conventry et al., 1997; Ennahar et al., 2000; Mc Auliffe et al., Garneau et al., 2002). Sous des conditions normales, les bactéries à Gram négatif sont insensibles à l'activité inhibitrice des bactériocines des bactéries lactiques (Mustapha et al., 2002).

Le spectre antibactérien inclut fréquemment des organismes d'altération et des bactéries pathogènes d'origine alimentaire telles que *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (De Vuyst et Leroy, 2007). Une activité contre les bactéries à Gram négatif telles que *E.coli* et *Salmonella* a été observée, mais uniquement lorsque l'intégrité de la membrane externe a été compromise, par exemple après un choc osmotique ou un traitement à faible pH, en présence d'un agent détergent ou chélatant, ou après traitement avec un champ électrique pulsé ou sous haute pression (Stevens et al., 1991).

L'hétérogénéité dans les spectres antimicrobiens des bactériocines a permis de les classer en trois groupes en fonction de leur activité (Cintas et al., 2001 ; Chen et al., 2003 ; Cotter et al., 2005).

a) Bactériocines à spectre d'action réduit : comprend des bactériocines qui inhibent la croissance des bactéries appartenant au même genre.

b) Bactériocines à spectre d'action intermédiaire : comprend des bactériocines qui inhibent également d'autres genres de bactéries lactiques et d'autres bactéries à Gram positif, y compris les agents pathogènes présents dans les aliments (*L.monocytogenes*, *S.aureus*, *C.botulinum*).

c) Bactériocines à large spectre d'action : comprend des bactériocines qui agissent contre ceux-ci et d'autres (*Propionibacterium sp* et *Bacillus sp*).

I.7. Utilisation des entérocoques comme probiotiques

Les probiotiques sont définis comme des préparations de micro-organismes viables en quantités suffisantes qui peuvent moduler la flore de l'organisme de l'hôte, exerçant ainsi des effets bénéfiques pour la santé (FAO/WHO, 2006). La plupart des souches utilisées comme probiotiques sont des bactéries lactiques provenant du tractus gastro-intestinal humain (Champagne et al., 2008).

L'emploi des entérocoques comme probiotiques est potentiellement possible puisqu'ils appartiennent aux bactéries lactiques et font partie intégrante de la flore commensale de l'homme et des animaux. En Suisse, l'efficacité clinique d'*E. faecium* SF68 a été démontrée dans la prévention de diarrhées associées aux antibiotiques chez l'adulte et dans le traitement de diarrhées chez l'enfant (Bellomo et al., 1980). Cette souche a été également testée pour traiter des diarrhées aiguës, et lors d'essais cliniques en Belgique, un raccourcissement de ces diarrhées de 1 à 3 jours a été observé (Buydens et al., 1996). Parmi les souches qui ont été proposées comme probiotiques se trouvent *E. faecium* EF9296 possédant une activité antimicrobienne contre *Listeria* spp. (Marcinakova et al., 2004) et *E. mundtii* ST4V (Todorov et al., 2009).

Chapitre II :
Facteurs de virulences

II.1. Risque lié aux entérocoques

Les entérocoques appartiennent à un genre bactérien très largement présent au contact de l'homme. Le côlon est peuplé de concentration d'entérocoques de l'ordre de 5 à 6 log₁₀ ufc/g de contenu (Drasar et Hill, 1974). Ils ne sont pas des bactéries très virulentes par rapport aux *Staphylococcus* ou aux *Pneumococcus*. Pour devenir pathogènes, les entérocoques ont besoin d'exprimer des caractéristiques de virulence associées à l'adhésion et à la disparition de la réponse immunitaire (Jett et al., 1994 ; Ben Omar et al., 2004).

II.2.-Facteurs contribuant à la pathogénèse des entérocoques

Les facteurs de virulence permettent la colonisation et l'invasion des tissus ainsi que la perméabilisation des cellules épithéliales contournant ainsi les défenses immunitaires de l'hôte (Franz et al., 2004).

Ces facteurs de virulence peuvent être divisés en facteurs sécrétés (cytolysine / hémolysine, gélatinase) et des protéines ou des adhésines liées à la membrane et à la paroi cellulaire (substance d'agrégation, la protéine de surface d'entérocoque (Esp), l'adhésine au collagène d'*E. faecalis* (Ace), et les polysaccharides) (Boussouar, 2017).

II.2.1. Facteurs de virulence sécrétés

II.2.1.1. Cytolysine

La Cytolysine, ou β -hémolysine (Bactériocine), est une toxine bactérienne, a des propriétés β -hémolytiques chez l'homme, et est bactéricide contre d'autres bactéries Gram positives (Hallgren et al., 2008). Cette toxine peptidique lyse les cellules animales en générant des pores dans la membrane cellulaire. La production de Cytolysine semble être un facteur de risque important lié aux entérocoques pathogènes (Le Blanc, 2006). Les gènes permettant sa production sont localisés sur des plasmides répondant aux phéromones ou sur un îlot de pathogénicité présent dans le chromosome (Hallgren et al., 2008). La fréquence de mortalité causée par une infection à entérocoques β -hémolytique est cinq fois supérieure à celle observée par une infection à entérocoques non- β -hémolytiques (Huycke et al., 1991). Une étude suggère que la combinaison d'hémolysine et de la substance d'agrégation entraîne une mortalité accrue dans l'endocardite due à *E. faecalis* (Chow et al., 1993).

II.2.1.2. Gélatinase

La gélatinase est l'un des facteurs de virulence largement étudié chez *E. faecalis* (Del Papa et al., 2007). Il s'agit d'une Zn-métalloprotéase, capable d'hydrolyser la β -insuline, la gélatine, le collagène, la caséine, l'hémoglobine (Jett et al., 1994 ; Fisher et al., 2009). En outre, 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). En plus de leur fonction dans la formation de biofilm, le rôle principal de la gélatinase dans la pathogénicité des entérocoques serait de fournir des éléments nutritifs aux bactéries en dégradant le tissu de l'hôte (Gilmore, 2002 ; Mohamed et Huang, 2007).

Le gène codant pour la gélatinase (*gelE*) se trouve dans un opéron avec un gène (*sprE*) codant pour une sérine-protéase (Qin et al., 2000). En effet, cette protéase sécrétée peut endommager les tissus de l'hôte permettant ainsi la migration et la dissémination de la bactérie (Thomas et al., 2009).

II.2.1.3. Hyaluronidase

L'hyaluronidase est une enzyme qui dégrade l'acide hyaluronique, constituant majeur de la matrice extracellulaire des cellules animales (Kayser, 2003). L'enzyme dépolymérise la fraction mucopolysaccharidique des tissus conjonctifs, facilitant par le fait même la dissémination des entérocoques, ainsi que leurs toxines, à travers les tissus de l'hôte. Cependant, il n'y a aucune preuve directe pour le rôle de l'hyaluronidase dans les infections causées par des entérocoques (Jett et al., 1994 ; Rice et al., 2003 ; Kayaoglu et al., 2004).

II.2.1.4. Pheromones sexuelles

Les phéromones sont de petits peptides de 7 à 8 acides aminés, qui facilitent le transfert conjugatif de plasmides entre les cellules (Chandler et Dunny, 2004). Une souche sécrète généralement plusieurs phéromones différentes.

Les phéromones sécrétées par les receveurs sont spécifiques aux donneurs et induisent l'expression des opérons conjugatifs de son plasmide. Quand les phéromones se lient aux récepteurs à la surface des cellules du donneur, ce signal est transduit et induit le gène de la substance d'agrégation (Clewell, 1993; Dunny et al., 1995). Cependant, ce n'est pas le seul rôle des phéromones; ils peuvent aussi être chimiquement attractifs pour les neutrophiles humains et induire la production de superoxydes (substances mutagènes) et initier des conditions inflammatoires (Bhardwaj, Malik, et Chauhan, 2008).

II.2.2. Facteurs de virulence liés à la membrane

II.2.2.1. Substances agrégatives

Les substances d'agrégation (SA) sont des adhésines glycoprotéiques ancrées dans la surface cellulaire et codées par des gènes portés sur des plasmides conjugatifs répondants aux phéromones. Cette protéine a un poids moléculaire de 137 kDa et une structure en épingle à cheveux. La substance d'agrégation comprend une gamme d'adhésines hautement homologues, codées sur de grands plasmides conjugatifs transférés dans une conjugaison dite système facilitée, médiée par les phéromones sexuelles (Strzelecki et al., 2011). La formation d'agrégats au cours de la conjugaison, facilitant ainsi le transfert des plasmides sur lesquelles les gènes des substances agrégatives sont localisés, ainsi que l'adhérence aux surfaces des cellules eucaryotes (Koch et al., 2004).

II.2.2.2. Protéines de liaison au collagène

L'attachement des bactéries aux composantes tissulaires et cellulaires de l'hôte, telles que la matrice extracellulaire (MEC), est une première étape importante du processus d'infection. Plusieurs études ont rapporté la capacité de certains *E. faecalis* isolés à adhérer à un certain nombre des protéines de la matrice extracellulaire (MEC), tels que le collagène, la laminine, le fibrinogène, la fibronectine, la lactoferrine, la vitronectine et la thrombospondine. La plupart de ces études sont en accord que l'adhésion à ces protéines in vitro n'est relativement présente que chez peu d'isolats. Des recherches ultérieures sur des gènes qui codent pour des adhésines potentiels, ont conduit à la découverte de l'adhésine Ace (adhésine du collagène d'*E. faecalis*), ayant été décrite chez les entérocoques, et permet la liaison au collagène de type I et IV, à la laminine et à la dentine (Rich et al, 1999 ; Nallapareddy et al., 2003).

Ace est une protéine de surface avec des propriétés adhésives, avec un poids moléculaire d'environ 74 kDa (Rich et al., 1999). La protéine a été isolée à partir de souches d'*E. faecalis* provenant à la fois de porteurs sains et de personnes souffrant d'infections entérocoquiques, qui a suggéré que cette fonctionnalité peut être utilisée pour identifier l'espèce (Murray et al., 2001).

II.2.2.3. Antigène A d'*E. faecalis* (EfaA)

Antigène spécifique de l'endocardite - EfaA (antigène endocardique) est une protéine avec un poids moléculaire d'environ 34 kDa codée par le gène efaA dans les souches *E. faecalis*, et par efaA chez *E. faecium* (Eaton et Gasson, 2001; Sava et al., 2010). Il a été identifié en utilisant des sérums provenant des patients atteints d'endocardite provoquée par *E.*

faecalis (Lowe et al., 1995). Il a été démontré par des méthodes génétiques que les gènes homologues à *efaA* sont présents dans les souches d'*E. avium*, *E. Asini*, *E. durans* et d'*E. solitarius* (Jim Enez et al., 2013, Semedo et al. 2003).

II.2.2.4. Protéines de surface extracellulaire

La protéine de surface d'entérocoque (*Esp*) a été identifiée initialement chez une souche d'*E. faecalis* très virulente, résistante à la gentamicine, isolée à partir d'une bactériémie. Ce sont des protéines attachées à la paroi cellulaire possédant des caractéristiques structurales similaires à celles des protéines de surface des autres bactéries à Gram positif, et sont codées par le gène *esp* qui possède une taille de 5622 pb et qui est très fréquent chez les isolats cliniques qui sont à l'origine des infections. Il est supposé que la présence de ce gène *esp* promouvoit l'adhérence, la colonisation et l'invasion du système immunitaire, et de jouer un rôle dans la résistance aux antibiotiques (Foulquié Moreno et al., 2006). Cette protéine contribue également à la formation du biofilm par les entérocoques, ce qui pourrait conduire à une résistance au stress environnementale et l'adhésion aux cellules eucaryotes telles que celles du tractus urinaire (Bergmann et al., 2004).

II.2.2.5. Formation de biofilm

Les biofilms sont un facteur important dans la pathogenèse des infections à entérocoques (Creti et al., 2004). Environ 80% des infections bactériennes persistantes aux Etats- Unis se retrouvaient associées aux biofilms (Janssens et al., 2008). *E. faecalis* a la faculté de former du biofilm (Naber et al., 2000), ce qui lui permet de survivre dans un environnement hostile, particulièrement en présence d'antibiotiques.

II.3. Importance clinique des entérocoques

Les entérocoques ne sont pas considérés comme des organismes hautement pathogènes, ils sont parmi les organismes les plus communs rencontrés dans les infections nosocomiales. Ces bactéries sont responsables d'infections telles que l'endocardite, les infections des voies urinaires (Lukasova et Sustackova, 2003).

Les infections des voies respiratoires dues aux entérocoques sont extrêmement inhabituelles (Moellering, 2000).

II. 3.1. Infections nosocomiales

Les infections nosocomiales des entérocoques sont fréquemment observées chez les patients gravement malades dans les unités de soins intensifs. Le problème de l'infection nosocomiale à entérocoques est aggravé par la résistance émergente aux antibiotiques (Gilmore et al., 1998). Différentes études décrivent une plus longue durée du séjour à l'hôpital et l'augmentation de la mortalité due à la résistance à la vancomycine (Bach, 2002). Les entérocoques peuvent causer une bactériémie, infections chirurgicale, infections des voies urinaires et endocardite (Gilmore al., 1998 ; Mayhall al., 2000). Ils sont responsables d'environ 10% des infections des voies urinaires (Schaberg et al., 1991). Ils sont souvent isolés des infections des plaies de la région abdominale ainsi que ceux des blessures écrasantes (Wise et al., 1997). Les entérocoques sont également responsables de 5 à 20% des cas d'endocardite bactérienne (Megran, 1992).

II.3.2. Endocardite et bactériémie des entérocoques

Parmi les diverses infections causées par les entérocoques, l'endocardite infectieuse (EI) est l'un des plus difficiles sur le plan thérapeutique. Ils représentent 5 à 20% des cas de valve native d'EI, et 6 à 7% de l'endocardite de la valve prothétique. Ces infections surviennent souvent chez des malades présentant des lésions valvulaires préexistantes, à la suite d'une bactériémie, une avulsion dentaire, ou une infection cutanée banale (Le Minoret veron, 1982). Comme pour les autres infections à entérocoques, la plupart des isolats sont *E. faecalis*. Cependant, d'autres espèces peuvent également causer cette maladie. Par contre la bactériémie entérococcique est beaucoup plus fréquente que l'endocardite entérococcique (Megran, 1992). Les facteurs de risque pour la mortalité associée à la bactériémie entérococcique comprend la gravité de la maladie, l'âge des patients, et l'utilisation d'antibiotiques à large spectre, tels que la troisième génération céphalosporines ou métronidazole (Green et al., 1995).

Les portails d'entrée pour la bactériémie entérococcique comprennent les voies urinaires, intra-abdominales / infections pelviennes, plaies, cathéters intraveineux ou intra-artériels infectés (Malani et al., 2002). Les taux de mortalité d'une bactériémie entérococcique se situe entre 12 et 75% (Flannagan et al., 2003).

II.3.3. Infections cutanéomuqueuses

Il s'agit souvent d'infections nosocomiales où les entérocoques de la flore buccale ou fécale, souvent sélectionnés par une antibiothérapie, infectent des lésions cutanéomuqueuses préexistantes. Ces infections sont souvent polymicrobiennes et c'est l'espèce d'*E. faecalis* qui

est le plus souvent rencontrée. Ainsi, les entérocoques infectent les lésions cutanées : plaies chirurgicales, blessures, brûlure.

Les entérocoques sont souvent rencontrés en association avec d'autres bactéries (*Escherichia coli* et *Bacteroides fragilis*) (Le Minor et Veron, 1982).

Chapitre III :
La résistance aux antibiotiques

III.1.Historique

Sans aucun doute, les antibiotiques représentent actuellement l'un des groupes de médicaments les plus employés en médecine. Leur utilisation clinique, dès la fin de la moitié du XX^e siècle, a radicalement modifié le pronostic des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Depuis les découvertes de la Pénicilline en 1929 par Alexander Fleming, des sulfamides en 1932 par Gerhard Domagk et la streptomycine en 1944 par Selman Waksman, qui valurent à chacun de ces trois chercheurs le prix Nobel, de très nombreuses substances ayant une activité antibactérienne ont été isolées. Seulement, un petit nombre d'entre elles ont été retenues pour usage médical (Berche et al., 1988).

Les premières souches d'*Enterococcus faecalis* résistantes à de fortes concentrations d'aminoglycosides ont été isolées en France par Horodniceanu et al. en 1979. Par contre, ce type de résistance chez *E.faecium* a été décrit pour la première fois aux Etats-Unis en 1986 par Holiopoulos (Bryskier, 1999).

La première souche d'*Enterococcus faecalis* présentant une résistance de haut niveau aux glycopeptides a été décrite en France en 1987 (Subiros et al., 2016)). Par contre, *E. faecium* résistant à la vancomycine a été identifié en Angleterre et en France en 1988. Les mêmes souches résistantes à la vancomycine ont été isolées en USA en 1987 (O'Driscoll et Crank, 2015).

III.2.Définition

A l'origine, le mot « antibiotique » désigne tout produit microbien qui, même à des faibles concentrations, inhibe ou tue certains micro-organismes. Ce mot est employé maintenant dans un sens plus large qui inclut, en outre, toute substance synthétique ou semi-synthétique dotée de ces propriétés (Singleton, 2005).

Une souche bactérienne est dite « résistante » quand elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (MacGovan et Wise, 2001).

III.3. Critères de classification des antibiotiques

III.3.1 origine

Naturel : L'antibiotique est produit par des micro-organismes, soit par des champignons (*Penicillium*, *Cephalosporium*) ou bien par des bactéries (*Streptomycine*, *Chloramphenicol*).

Synthétique : Les antibiotiques sont obtenus par voie chimique (sulfamides, acides nalidixique).

Semi-synthétique : Les antibiotiques sont obtenus par un radical chimique greffé sur une fraction moléculaire naturelle (méthicilline) (Gaudy et Buxeraud, 2005).

III.3.2 Spectre d'activité

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

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

Les antibiotiques étroits : actifs uniquement sur certaines bactéries à Gram positif ou à Gram négatif (Gaudy et Buxeraud, 2005).

III.3.3 Mode d'action

Les antibiotiques agissent sur des cibles bactériennes 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 : inhibe la croissance bactérienne.

Bactéricide : provoque la mort de la bactérie.

III.3.4. Classification des antibiotiques

III.3.4.1 Les β - lactamines

Ces antibiotiques incluent les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, les clavames et les monobactames. Toutes ces molécules comprennent un cycle à quatre atomes dont l'azote, le noyau β -lactame. Les pénicillines et les céphalosporines sont principalement produites par des champignons. Les carbapénèmes, les clavames, les monobactames et les nocardicines sont produits par des bactéries.

Les β -lactamines agissent en perturbant la synthèse de l'enveloppe cellulaire dans les cellules en croissance. Ils inactivent les protéines fixatrices de pénicillines et donc inhibent la synthèse de peptidoglycane (Singleton, 2005).

La famille des β -lactamines regroupe :

-Les pénicillines : avec le chef de file la benzylpénicilline (pénicilline G) produite naturellement par *Penicillium notatum*. Ils n'ont que peu d'effet sur les bactéries à Gram négatif, parce qu'elles traversent difficilement la membrane externe. Leur activité est également faible ou nulle contre les bactéries Gram positives qui produisent des β -lactamases. Certaines pénicillines semi-synthétiques (comme la cloxacilline, la méthicilline, la nafcilline) résistent à toute une série de β -lactamases différentes, mais restent peu efficaces contre les bactéries à Gram négatives (Singleton, 2005).

-Les Céphalosporines : Tous les produits de cette série dérivent de la céphalosporine C, molécule naturelle élaborée par un champignon (*Cephalosporium acromurium*). Elle comporte un cycle β -lactame associé à un cycle de 2,3-dihydro-1,3-thiazin. L'usage, né avec l'apparition des céphalosporines injectables, a désormais consacré la classification en trois générations : première, deuxième et troisième génération (Gaudy et Buxeraud, 2005).

III.3.4.2 Les glycopeptides

Les glycopeptides constituent une famille originale d'antibiotique dont l'importance en thérapeutique s'est accrue ces dernières années compte tenu de l'augmentation des infections aux bactéries résistantes, en particulier les staphylocoques. Les deux seuls représentants actuellement commercialisés de cette famille sont la vancomycine et la teicoplanine. Bien qu'elles aient un mode d'action identique, ces molécules voisines se différencient principalement par leurs propriétés pharmaceutiques. Elles ont une activité dirigée contre les

bactéries à Gram positif, les aéro-anaérobies facultatives (*Enterococcus, Listeria, Bacillus...*) et les anaérobies strictes (*Clostridium, Peptostreptococcus...*) (Gaudy et Buxeraud, 2005).

-La vancomycine

La vancomycine a été disponible à partir de 1960. Elle est produite par une bactérie de la famille des actinomycètes (*Amicycolatopsis orientalis*). Elle est constituée d'une molécule unique à la différence de la teicoplanine. Ces antibiotiques agissant principalement sur la synthèse de la paroi par la formation d'un complexe avec le dipeptide terminal (D-alanyl-D-alanine) du peptidoglycane. Leur effet bactéricide se manifeste lentement donc ils doivent être donnés en association avec d'autres antibiotiques (fosfomycine, aminoside ou rifampicine) qui renforcent leur action (Gaudy et Buxeraud, 2005).

-La teicoplanine

La teicoplanine est un lipoglycopeptide constitué de six composants principaux nommés TA2-1, TA2-2, TA2-3, TA2-4, TA2-5 et TA3, élaborée par *Actinoplanes teichomycetus*. Ils sont des antibiotiques agissant principalement sur la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Ce sont des antibiotiques d'action bactéricide lente (Gaudy et Buxeraud, 2005).

III.3.4.3 Les aminoglycosides

Ces antibiotiques à large spectre, typiquement bactéricides, incluent l'amikacine, la gentamicine, la kanamycine, lanéomycine et la streptomycine. Ils sont actifs contre les bactéries Gram positives aussi bien que Gram négatives. Leur effet principal vient de leur fixation à la sous-unité 30S du ribosome, où ils interfèrent avec la synthèse des protéines (Singleton, 2005).

III.3.4.4. Les tétracyclines

Ces antibiotiques bactériostatiques, à large spectre inhibent la synthèse des protéines en se liant au ribosome et en inhibant la fixation des aminoacyl-ARNt au site A. On les utilise pour traiter des maladies humaines ou animales provoquées notamment par *Brucella, Chlamydia, Mycoplasma* et *Rickettsia* (Singleton, 2005).

III.3.4.5. Les macrolides et les chloramphénicols

Tous ces antibiotiques inhibent la synthèse des protéines, en se fixant à la sous-unité ribosomique 50S (Singleton, 2005).

-Macrolides

Le macrolide est une molécule composée d'un grand anneau lactone substitué par un ou plusieurs sucres ou sucres aminés, efficaces contre les bactéries Gram positives. Ils sont habituellement bactériostatiques.

-Chloramphénicol.

Originellement élaboré par *Streptomyces venezuelae*, est un antibiotique bactériostatique, à large spectre, mais son emploi reste limité, à cause de sa toxicité. Cette petite molécule inhibe la peptidyltransférase (Il inhibe la synthèse des protéines en se liant de façon réversible aux ribosomes 70S et en particulier aux sous-unités 50S).

III.3.4.6. Les Quinolones

Les quinolones sont des agents synthétiques, leurs cibles incluent la sous-unité A de la gyrase et la topoisomérase IV. Leur liaison à la gyrase, par exemple, inhibe l'activité normale de l'enzyme et la réplication de l'ADN.

Les quinolones de la première génération (cinoxacine, acide nalidixique, acide oxolinique et acide pipémidique) sont surtout actives sur les bactéries Gram négatives, bien qu'elles restent sans effet contre *Pseudomonas aeruginosa* (Singleton, 2005).

III.3.4.7. Les sulfamides

Les sulfamides sont habituellement bactériostatiques, utilisés pour traiter les infections du tractus uro-génital. Les molécules les plus fréquemment employées sont la sulfadiazine et la sulfamétazine (Singleton, 2005).

III.3.4.8. Autres antibiotiques

-Les polymyxines

Les polymyxines B et E (colistine) sont des antibiotiques polypeptidiques riches en radicaux hydrophiles et hydrophobes dont l'action ressemble à celle des détergents cationiques. Elles se fixent aux membranes et aux tissus riches en phosphatidyl-éthanolamine et ont un effet bactéricide sur les bactéries à Gram négatif. Ainsi, elles augmentent la perméabilité de la membrane cytoplasmique et endommagent la membrane externe (Singleton, 2005).

- Les Rifampicines

Les rifampicines appartiennent à la famille des ansamycines de type naphthalène, est un dérivé semi-synthétique de la rifamycine B. Elle est constituée d'une longue chaîne aliphatique reliant deux noyaux aromatique. La rifampicine est utilisée principalement dans le traitement des

infections à mycobactéries, en particulier la tuberculose. Ainsi, elle est active sur les staphylocoques et les streptocoques (Gaudy et Buxeraud, 2005).

III.4. Antibiorésistance chez les entérocoques

Les entérocoques sont responsables d'infection graves communautaires et hospitalières. 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 volontiers 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, l'apparition de 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 (utilisés en association avec les pénicillines et les glycopeptides) pose de réels problèmes en thérapeutique et à la recherche d'alternatives thérapeutiques (Courvalin et Leclercq, 2012).

Enterococcus faecalis a été signalé qu'il transfère des plasmides contenant des caractères de résistance aux antibiotiques à d'autres entérocoques et à *Listeria monocytogenes* dans les usines de traitement de l'eau (Marcinek et al., 1998).

III.5. Support génétique de la résistance bactérienne

La résistance aux antibiotiques chez les entérocoques peut être divisée en deux groupes :

III.5.1 Résistance naturelle (intrinsèque)

C'est une caractéristique propre à une espèce bactérienne, qui est partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique (faible affinité), ou à l'absence de la cible. Cette résistance est transmissible à la descendance lors de la division cellulaire (transmission verticale) (Willems et Bonten, 2008;Teixeira et al., 2011).

III.5.2 Résistance acquise

La résistance acquise est due à des mutations dans l'ADN chromosomique de la bactérie ou encore à l'acquisition des gènes de résistance portés sur des éléments mobiles (plasmides ou transposon). La reconnaissance de ces résistances acquises définit les phénotypes de résistance (Willems et Bonten, 2008; Teixeira et al., 2011).

Tableau II: Résistance intrinsèque aux antimicrobiens chez les entérocoques (Tremblay, 2012).

Antimicrobiens	Mécanismes de résistance intrinsèque
Bêta-lactamines	Surproduction de PLP de faible affinité et/ou diminution d'affinité pour la liaison des bêta-lactamines.
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).

III.6. 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 antibiotiques. Cette capacité est liée à un ou plusieurs mécanismes biochimiques, qui impliquent l'étude des interactions entre l'antibiotique et les voies métaboliques de la bactérie (Berche et al., 1988).

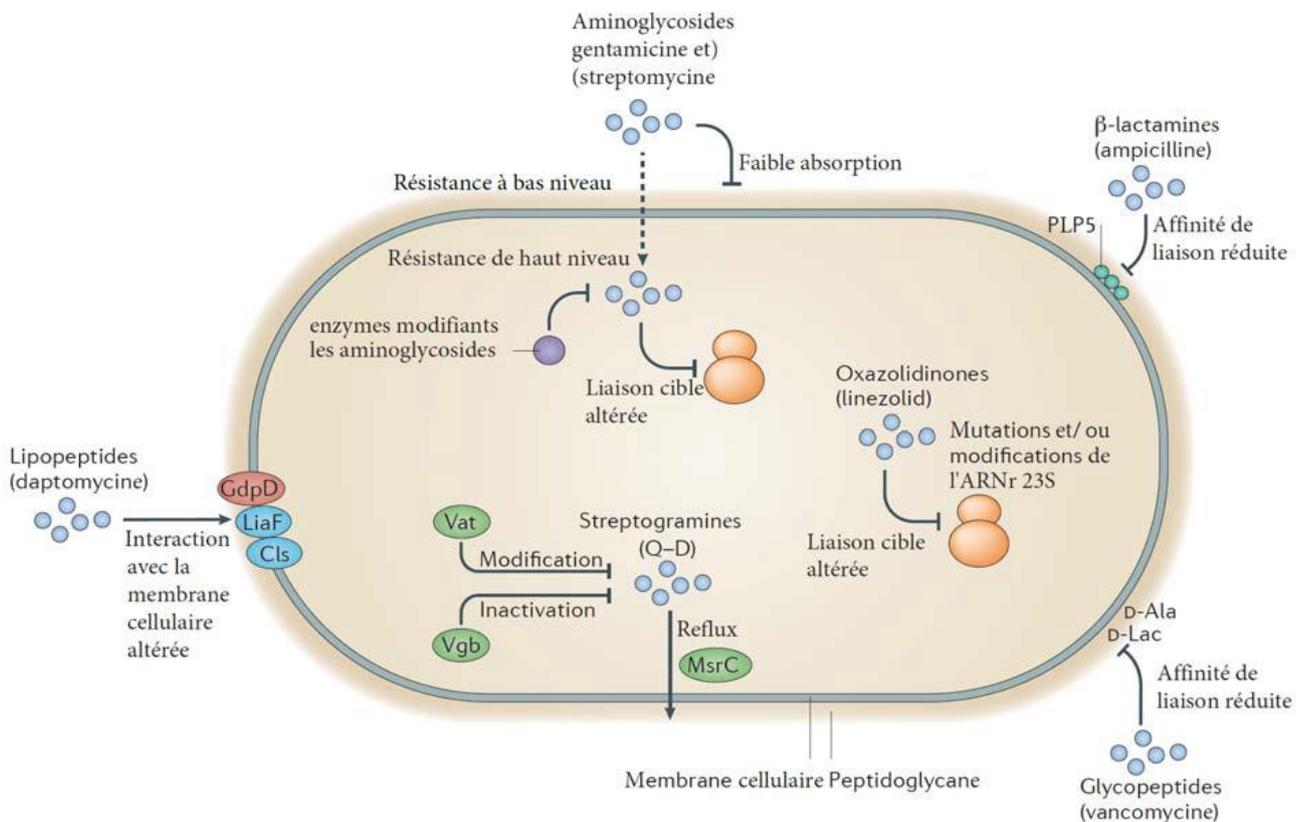


Figure 02 : Mécanismes essentiels de la résistance des entérocoques aux antibiotiques (Arias et Murray, 2012).

III.6.1. Résistance aux β-lactamines

Les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines inhibent la croissance des bactéries en servant de substrat de suicide pour la D,D-transpeptidase (également connu sous le nom de protéines 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).

La résistance naturelle des entérocoques aux β-lactamines est due à la présence d'une PLP5, naturellement de faible affinité pour la pénicilline G, est responsable de l'augmentation des valeurs de CMI. Cette diminution d'affinité au PLP5 est plus marquée pour *E. faecalis* que pour *E. faecium*. Les hauts niveaux de résistance aux β-lactamines sont rarement associés à une augmentation de l'expression de PLP5, mais plus communément à des mutations du gène de structure de la PLP5 (Courvalin et Leclercq, 2012). 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).

Un autre mécanisme de résistance est la production de pénicilline plasmidique transférable a été décrite aux USA, en Argentine et en Liban (Murray, 1990). Ce phénomène n'a pas été rapporté en Europe. Le gène responsable est identique à *blaZ* de la pénicilline de type A chez *S.aureus* (Murray et Zscheck, 1991). A l'inverse de *S.aureus*, l'expression de la pénicilline chez *E. faecalis* est constitutive. La CMI de la pénicilline G est comprise entre 4 et 8µg/ml et celle de l'ampicilline entre 2 et 4µg/ml (Courvalin et Leclercq, 2012).

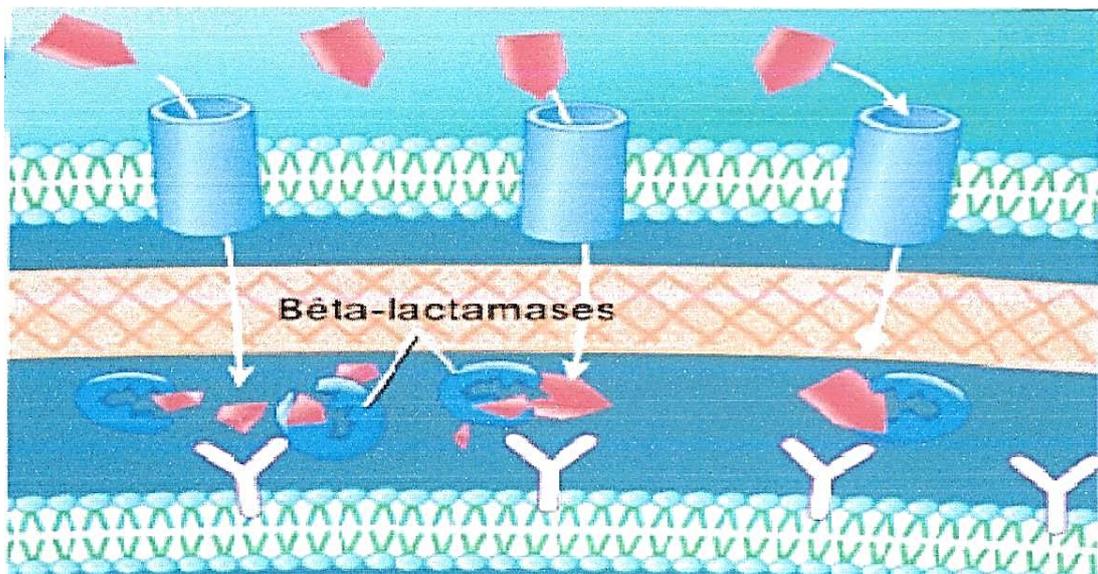


Figure 03 : Inactivation des antibiotiques par des β -lactamases (Lavigne, 2007).

III.6.2 Résistance aux aminosides

Les aminosides agissent en se liant à l'ARN 16S de la sous-unité ribosomique 30S et l'interfère avec la synthèse des protéines (Aslangul et al., 2006).

Les entérocoques sont des bactéries à métabolisme anaérobie tolérant l'oxygène, sont naturellement résistants à des basses concentrations d'aminosides (CMI de 4 à 64mg/l). Ce bas niveau de résistance s'explique par un transport actif inefficace à travers la membrane cytoplasmique lié à l'absence des enzymes de la chaîne respiratoire.

Certaines souches peuvent devenir hautement résistantes par une modification enzymatique (Courvalin et Leclercq, 2012).

- **Modification enzymatique** : Elle constitue le principal mécanisme de résistance acquise. La synthèse des enzymes est gouvernée par des gènes endogènes plasmidiques ou transposables (Miller et al., 1993). Chaque enzyme va reconnaître un certain nombre de substrat qu'elle modifie, ce qui va se traduire par un phénotype de résistance. Les enzymes sont constitutives et

intracellulaires ; l'aminoside n'est modifié qu'après sa pénétration dans la cellule bactérienne et cette modification empêche sa fixation sur le ribosome (Courvalin et Leclercq, 2012).

La recherche de haut niveau de la résistance s'impose chez les entérocoques lorsque ces bactéries sont responsables d'infection grave, car il est alors nécessaire d'utiliser une association bactéricide telle que l'amoxicilline ou un glycopeptide + un aminoside (Courvalin et Leclercq, 2012).

III.6.3 Résistance aux glycopeptides

Les glycopeptides tels que la vancomycine, la téicoplanine et leurs dérivés plus récents sont utilisés pour traiter les infections graves dues aux bactéries Gram positives résistantes. Les glycopeptides inhibent la croissance bactérienne en interférant avec la biosynthèse du peptidoglycane (Boussouar, 2017). Ils se lient par cinq liaisons d'hydrogène aux D-Ala-D-Ala terminaux des précurseurs pentapeptidiques avec une haute affinité, bloquant ainsi l'addition des précurseurs par transglycosylation à la chaîne de peptidoglycane naissant et prévenant les étapes ultérieures de polymérisation catalysée par des D, D-transpeptidases. Ceci, aboutit à l'accumulation cytoplasmique de précurseurs (Courvalin et Leclercq, 2012).

Le facteur de risque pour l'apparition de l'ERV chez les patients hospitalisés est l'utilisation intensive de la vancomycine, de céphalosporines de troisième génération et les lactames similaires (Edmond et al., 1995). Il est communément admis que l'utilisation de certains antibiotiques, tels que l'avoparcine en tant que promoteur de croissance chez les animaux d'alimentation a été impliqué pour l'émergence des entérocoques résistants à la vancomycine (Kariyama et al., 2000), également leur utilisation massive pour traiter les diarrhées à *Clostridium difficile* (Kariyama et al., 2000). Cette résistance réduit considérablement l'option thérapeutique pour les infections à entérocoque. De plus, le gène de résistance peut être transféré des entérocoques aux *Staphylococcus aureus*, ce qui constitue une menace pour la sécurité des patients (Ranotkar et al., 2014).

Neuf groupes de gènes conférant une résistance aux glycopeptides (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN) ont été décrit chez les entérocoques (Werner, 2012). Huit résultent d'une résistance acquise (VanA, B, D, E, G, L, M et N) et un (VanC) d'une résistance intrinsèque chez *E. gallinarum* et *E. casseliflavus* (Courvalin et Leclercq, 2012). Le type le prédominant de la résistance est VanA, il est hautement transférable à d'autres

pathogènes. Le gène VanA fait partie du dérivé de transposon Tn3 qui a été trouvé dans des plasmides conjugatif de différents familles (Frietas et al., 2013).

La résistance aux glycopeptides est due à la présence d'opérons qui spécifient des enzymes pour la synthèse de précurseurs de faible affinité dans lesquels la D-Ala C-terminal est remplacé par un D-lactate (D-Lac) (Arthur et al., 1996) ou une D-serine (D-Ser) (Reynolds et Courvalin, 2005).

Tableau III : Phénotype de résistance des entérocoques (Bryskier, 1999).

	Van A	Van B	Van C-1	VanC-2
Phénotype	Van A	Van B	Van C	Van C
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. duran</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. mundii</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>

III.6.4 Résistance aux lincosamides

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*, chez qui cette résistance naturelle est associée au gène *lsa* spécifique de l'espèce qui code pour une protéine apparentée à une pompe

d'efflux de type ABC transporteur. Ce type de résistance naturelle est également constaté pour d'autres espèces d'entérocoques comme *E.avium*, *E.gallinarum*, *E.casseliflavus*. Par contre, les espèces *E.faecium*, *E.durans* et *E.hirae* sont sensibles aux lincosamides (Courvalin et Leclercq, 2012).

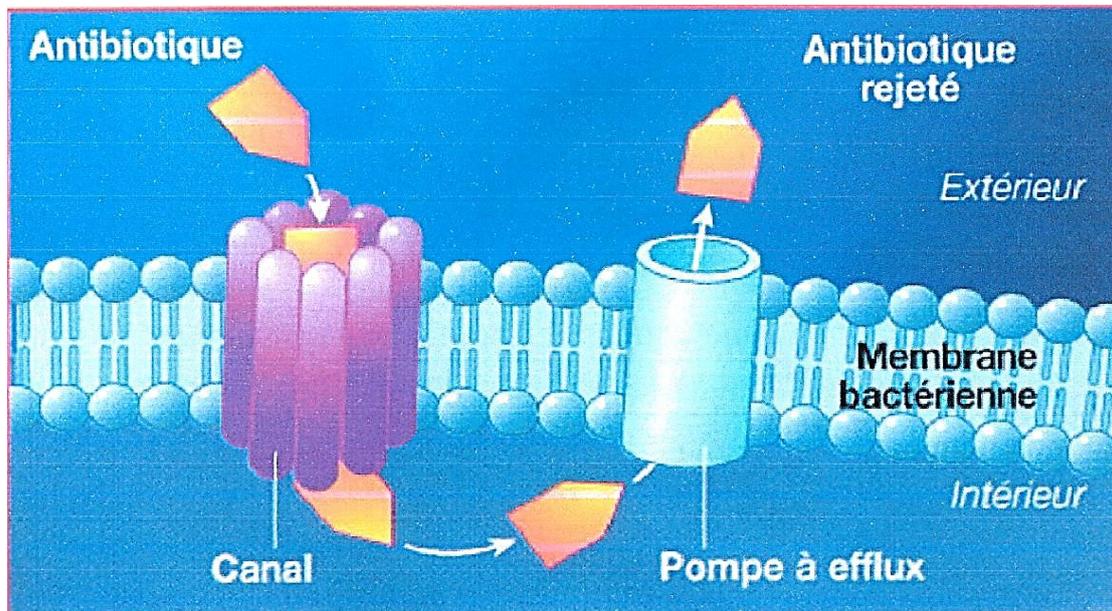


Figure 04 : Structure des systèmes d'efflux actif (Lavigne, 2007).

Partie expérimentale

Chapitre I :
Matériels et méthode

- **Objectifs**

L'objectif de cette étude est la caractérisation phénotypique des souches d'*Enterococcus* isolées à partir de produits alimentaires (viande hachée, pâtisserie, beurre et fromage) et ceci pour étudier la prévalence de ce germe et sa résistance vis-à-vis quelques molécules d'antibiotiques, utilisées en médecine humaine et vétérinaire, afin de prévoir l'existence de souches multirésistantes. Un autre objectif de cette étude, est de tester quelques isolats d'*Enterococcus* à l'encontre des souches pathogènes (*Listeria innocua*, *Listeria ivanovi*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*).

- **Matériels**

Verreries et outils : Boîtes de Pétri, tube à essai, pipette Pasteur, écouvillons, anse à boucle, micropipette, embouts (0,1 et 1 ml), spatule, pince, cuve de spectrophotomètre, lame pour microscope, flacon en verre, pipette (10 ml), éprouvette, bécher, filtres (0,22 µm), tubes pour la centrifugation.

Etuve (Mettler, Allemagne)

Vortex (Heidolph, Allemagne)

Bec Bunsen

Autoclave (PBI International, Italie)

Balance électronique (Denver Instrument, Etats unis)

Spectrophotomètre (Medline, Grande Bretagne)

Microscope optique (Ceti, Royaume-Uni)

Réfrigérateur (Maxipower, Algérie)

Bain-Marie (Mettler, Allemagne)

pH mètre (METROHM, Swiss)

Centrifugeuse (SiGMA, Germany)

Séchoir (Gerhardt, Germany)

- **Milieux de culture et réactifs**

Milieu Rothe (Conda Pronadisa, Spain)

Milieu de Litsky (Conda Pronadisa, Spain)

Milieu BEA (Biokar, France)

Milieu MH : Muller-Hinton (Biokar diagnostics, France)

Milieu BHIB : Bouillon cœur-cerveille (Biokar diagnostics, France)

Milieu EPT : Eau peptonée tamponnée (CondaPronadisa, Espagne)

Milieu TSYEA (Conda Pronadisa, Espagne)

Agar bactériologique (Biokar diagnostics, France)

Gélose à ADN (CondaPronadisa, Espagne)

Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Scharlau, Espagne)

Eau physiologique stérile et eau distillée stérile

Violet de Gentiane, Lugol, alcool, fushine

Huile de paraffine, glycérol

Disques d'antibiotique (Liofilchem, Italie), disques oxydases (HIMEDIA, Inde)

Solutions sucres (ribose, arabinose, amidon, mannitol, sorbitol, tréhalose, raffinose, lactose, milebiose), solution NaOH (1N, 2N)

Matériel biologique (souches de référence) : *Enterococcus faecalis* WDCM 00009, *Listeria innocua* CHPL 11, *Listeria ivanovi*00CHPL 2, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* LGA251, *Staphylococcus aureus* MU50 (récupérées au niveau de laboratoire en France).

La composition et la préparation des milieux de culture sont détaillées dans l'annexe 01

• **Durée et lieu d'étude**

Notre étude a été réalisée entre la période de février au mai 2018 au niveau du laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et de Biotechnologie (LABAB) de l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou.

• **Nature des échantillons et leurs sites de prélèvement**

Notre travail est effectué sur des souches isolées en 2015 et en 2017, à partir des échantillons prélevés dans différent point de vente de la wilaya de Tizi Ouzou. Ils sont répartis comme suit :

- 45 échantillons de viande hachée prélevés au niveau de 45 boucheries.
- 43 échantillons de pâtisseries prélevés de différents points de vente et des cafétérias.
- 4 échantillons de fromage au lait cru et 24 échantillons de beurre prélevés au niveau des crèmeries spécialisées dans la vente de produits laitiers traditionnels.

Les souches étudiées ont été conservées au préalable dans du glycérol+ BHIB et conservées à -20°C. Une revivification de ces souches s'est imposée pour leur identification biochimique et pour leur caractérisation phénotypique.

I.1. Isolement des entérocoques

L'isolement été réalisé en 2015 et 2017 selon les étapes suivantes :

I.1.1. Préparation de la suspension mère

10g de chaque échantillon sont mises dans 90 ml d'eau peptonée tamponnée. La suspension ainsi obtenue est agitée vigoureusement, puis laissée sur paillasse pendant quelques minutes pour permettre la revivification des germes.

I.1.2. Test de présomption

Ce test est réalisé sur milieu Rothe (S/C) à l'azide de sodium. Ce dernier inhibe la croissance des microorganismes à Gram négatif par son action bactériostatique et favorise la culture des entérocoques.

- **Mode opératoire**

Agiter le flacon contenant la solution mère et prélever 1 ml à l'aide d'une micropipette, puis ensemercer les tubes contenant le milieu Rothe (S/C) à partir de chaque suspension mère. Incuber à 37°C pendant 24 heures. Les tubes positifs qui présentent un trouble seront soumis au test confirmatif sur bouillon de Litsky (Dellaras, 2007).

I.1.3. Test de confirmation

Ce test est réalisé sur milieu Litsky. La sélectivité de milieu est due à la présence d'éthyl-violet et d'azide de sodium qui inhibe la croissance des bacilles à Gram négatif et des microorganismes sporulés à Gram positif contaminants.

- **Mode opératoire**

La confirmation à partir des tubes Rothe positifs est réalisée par repiquage sur milieu Litsky à l'aide d'une anse à boucle. L'incubation à 37°C pendant 24 heures, le résultat est révélé positif par l'apparition d'un trouble avec une pastille violette (Dellaras, 2007).

I.1.4. Isolement sur milieu BEA

Le milieu BEA permet la sélection des entérocoques par leurs capacités d'hydrolyser l'esculine. L'azoture de sodium favorise la culture des entérocoques, tout en inhibant la croissance des bactéries à Gram négatifs de tous les streptocoques sauf ceux du groupe D, et la

bile de bœuf inhibe la croissance des bactéries à Gram positifs. Un ensemencement de ce milieu est réalisé à partir des tubes positifs du milieu Litsky. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les colonies d'entérocoques sont apparues noir ou grisâtre avec un halo blanc.

I.1.5. Purification des souches isolées

La purification des souches d'entérocoques est réalisée sur milieu BEA ou TSYEA à partir des colonies caractéristiques. Plusieurs repiquages ont été effectués jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

I.2. Identification des isolats

L'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques.

I.2.1. L'étude microscopique

Elle a été effectuée sur un frottis bactérien, préparé à partir des colonies suspectées en culture pures, puis fixé et colorés par la méthode de Gram comme suit :

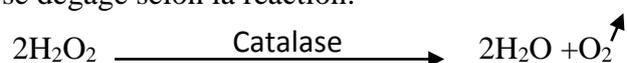
- Préparer un frottis bactérien avec une souche d'entérocoque
- Recouvrir le frottis avec le colorant primaire : le violet de gentiane. Laisser agir une minute
- Fixation du colorant avec le Lugol deux fois à 45s
- Décoloration à l'alcool pendant 30s. Rincer à l'eau courante
- Recouvrir le frottis avec la fuschine et laisser agir 1 minute
- Laver et sécher la lame
- Observation à l'immersion (G×1000)

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

I.2.2. Identifications biochimiques

I.2.2.1. Test de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et aéro-anaérobies facultatives. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) formé au cours des réactions d'oxydation. Cette enzyme catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage selon la réaction:



- **Mode opératoire :**

Sur une lame propre, une goutte d'eau oxygénée est déposée. Ensuite, une colonie pure, prélevée à l'anse à partir du milieu BEA, est mise en contact avec cette goutte. Le résultat négatif se traduit par l'absence de bulles d'oxygène, l' H_2O_2 n'est pas dégradé en H_2O et O_2 : La bactérie ne possède pas de catalase.

La souche est considéré comme catalase négative (Boussouar, 20017).

I.2.2.2. Test de l'oxydase

Le cytochrome oxydase est une enzyme qui permet à la bactérie d'utiliser pour sa croissance l'oxygène ambiant. Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif 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.

- **Mode opératoire**

Déposer sur une lame de verre propre un disque d'oxydase, ajouter une à deux colonies puis rajouter en dernier le réactif, le résultat négatif se traduit par l'absence de coloration rose violacée: Absence d'oxydation du réactif.

La souche est considérée comme oxydase négative (Boussouar,2017).

I.2.2.3. Croissance dans des conditions hostiles

Ce test donne des renseignements importants pour l'identification des entérocoques. Ces derniers sont capables de résister à une concentration de 6,5% de chlorure de sodium et à une température de 45°C. Les précultures à tester sont ensemencées sur des bouillons de BHIB additionné avec 6,5% de NaCl. Après une incubation pendant 24h à 45°C, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble bactérien.

I.2.2.4. Hydrolyse de l'esculine

L'hydrolyse de l'esculine est l'un des critères usuels de l'identification au sein de nombreux groupes bactériens. L'esculine est un hétéroside, son hydrolyse est catalysée par une β -Glucosidase et l'esculinase, libère du glucose et l'aglycone (l'esculétine). Ce dernier réagit 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 lequel un ensemencement en surface a été réalisé. Après 24 à 48h d'incubation à 37°C, un noircissement de la gélose apparaît se traduit par la dégradation de l'esculine par les souches d'entérocoques.

I.2.2.5. Fermentation des sucres

Ce test est très important, il permet de différencier les entérocoques en différents groupes appelés espèces, selon leur capacité à hydrolyser des sucres pour leurs développements. Le résultat se manifeste par un virage de l'indicateur coloré, le pourpre de bromochresol du violet au jaune (Boussouar, 2017).

- **Mode opératoire**

En zone stérile, 2 ml de chaque solution sucrée à 1% (Lactose, amidon, sorbitol, mannitol, arabinose, ribose, tréhalose, raffinose, milebiose) sont rajoutées à une série de milieu de fermentation BCP. Ensuite, ce milieu est ensemencé par la souche à tester. Une couche mince de l'huile de paraffine stérile est rajoutée et ceci pour créer les conditions d'anaérobiose. La culture est ainsi incubée à 37°C pendant 24 à 48 heures.

I.2.3. Caractérisation phénotypiques des souches isolées

I.2.3.1 Test de la désoxyribonucléase

Certaines bactéries élaborent une enzyme capable d'hydrolyser l'acide désoxyribonucléique (ADN) : la désoxyribonucléase (DNase).

- **Mode opératoire**

Des boîtes de Pétri contenant une gélose à ADN sont préparées. Ces dernières ont été ensemencées par quelques colonies sous forme d'un trait épais. L'incubation est réalisée à 37°C/24H. La mise en évidence de l'ADNase est faite par l'ajout du HCl à 2N au milieu après incubation. Le test est présumé positif lorsqu'il y a apparition d'une zone claire tout autour de la strie ensemencée.

I.2.3.3. Test de la gélatinase

La gélatinase est une enzyme qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides.

- **Mode opératoire**

Des boîtes BHI+ Gélatine (3% P/V) sont préparées. Des puits sont creusés dans cette gélose et sont ensuite remplis (50µl) des suspensions bactériennes préalablement préparées.

L'incubation des boîtes est réalisée à 37°C/24H. Le test est positif se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des puits, la souche est gélatinase positive.

I.4. Antibiorésistance des souches isolées

L'antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis un ou plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité a été testée par la méthode

de diffusion sur milieu Muller-Hinton. Les souches d'entérocoques isolées ont été soumises à une liste de molécules d'antibiotiques (Tableau 4). L'interprétation des résultats, a été faite selon le manuel du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CASFM, 2018) et selon les recommandations du CLSI (2014).

- **Technique de l'antibiogramme**

Les souches isolées d'entérocoque sont repiquées sur le milieu TSYEA, et incubées pendant 18 heures à 37°C, dans le but d'avoir des cultures jeunes. Des suspensions bactériennes ont été préparées par ensemencement des cultures jeunes dans de l'eau physiologique. La densité optique de la suspension bactérienne est ajustée à 0.08 et 0.1 à une longueur d'onde de $\lambda=625\text{nm}$. L'antibiogramme est réalisé par l'ensemencement de la suspension bactérienne sur les boites du milieu Muller-Hinton à l'aide des écouvillons, en appliquant des stries serrées sur toute la surface de la gélose. Ensuite, des disques d'antibiotiques sont appliqués à l'aide d'une pince stérile (10 molécules d'antibiotique sont utilisées qui sont citées dans le tableau IV). L'incubation des boites est réalisée à 37°C/24H. La lecture de l'antibiogramme se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne, qui a été formée autour des disques d'antibiotiques. Après lecture des zones d'inhibition, les souches sont classées en : souches sensibles, souches intermédiaires et souches résistantes (Voir l'annexe 5).

Tableau IV: Liste des antibiotiques testés

Famille	Antibiotique	Abréviation	Charge (µg)	Marque
B-lactamines	Pénicilline G	P	10	Liofilchem, Italie
	Ampicilline	AMP	10	Liofilchem, Italie
Glycopeptide	Vancomycine	VA	30	Liofilchem, Italie
	Téicoplanine	TEC	30	Liofilchem, Italie
Aminoglycosides	Gentamycine	GN	10	Liofilchem, Italie
Macrolides	Erythromycine	E	15	Liofilchem, Italie
Phénicol	Chloramphénicol	C	30	Liofilchem, Italie
Quinolones	Ofloxacin	OFX	5	Liofilchem, Italie
Inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique	Triméthoprime-Sulfaméthoxazole	SXT	25	Liofilchem, Italie
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30	Liofilchem, Italie

I.5. Activité antagoniste des entérocoques

Les bactéries lactiques peuvent produire des substances inhibitrices. Pour s'assurer de la présence de ces dernières, nous avons réalisé une culture d'entérocoque dans un bouillon BHIB à 37°C/24H, sous conditions d'anaérobiose (pour éviter la formation d'H₂O₂) par l'ajout de l'huile de paraffine. Après incubation, les tubes ont été centrifugés à 8000g/10min/4°C, et ceci afin de récupérer le surnageant de culture. Pour éliminer l'effet des acides organiques notamment des acides lactiques et acétiques, le surnageant a été neutralisé (pH=7) par l'ajout d'une solution de NaOH à 1N, puis stérilisé par des filtres de 0.2 µm de diamètre. Des précultures de souches pathogènes sont ensemencées sur un milieu TSYEA et incubées à 37°C pendant 18 heures. Après l'incubation, des inoculum ont été préparés par l'ensemencement de chaque souche pathogène dans de l'eau physiologique. L'inoculum est ensuite ajusté à une DO inférieure à 0.08 (0.06 à 0.07). Des boîtes BHI (10g/l d'agar) sont ensemencées par les souches pathogènes préalablement préparées à partir de chaque inoculum par des stries séries à l'aide d'un écouvillon. Des puits ont été creusés sur la gélose ensemencée, en utilisant la partie basale de la pipette Pasteur, ensuite ces derniers sont remplis avec 50µl de chaque surnageant d'*Enterococcus*. Les boîtes sont incubées à 37°C/48H.

I.6. Conservation des souches

La conservation des souches identifiées a été réalisée à -20°C dans un bouillon cœur cerveau (BHIB) additionné avec du glycérol (un volume de BHIB dans deux volumes de glycérol).

Chapitre II :
Résultats et discussions

I. Résultats

I.1. Prévalence des entérocoques dans les aliments analysés

Durant la période s'étalant du mois de février 2015 au mois mai 2017, 116 échantillons (viande hachée, pâtisserie, beurre et fromage) ont été prélevés et soumis à la recherche des entérocoques. Sur la totalité des échantillons analysés 36 échantillons sont suspectés d'être contaminés et 36 souches ont été isolés et conservées pour une identification biochimique ultérieure. Cette dernière a confirmé 26 souches comme étant des entérocoques avec une fréquence de 22,41%. La prévalence des souches d'entérocoques est variable en fonction du type de produit alimentaire. En effet, la viande hachée est le produit le plus contaminé par rapport aux pâtisseries avec une fréquence de 42,22% (tableau V), contrairement aux autres produits alimentaires analysés. Néanmoins, cette différence doit être prise avec précaution, étant donné que le nombre d'échantillons pour chaque matrice alimentaire est différent. Selon le tableau VI, la souche la plus fréquente dans la viande hachée est *E. faecalis* avec une fréquence de 34,61%. Les autres souches (*E. faecium*, *E. durans*, *E. dispar*,...) présentent des fréquences moins importantes dans tous les produits analysés.

Tableau V : Prévalence des souches d'entérocoques selon le type de produit.

Nature de produit	Nombre d'échantillons analysés	Nombre de souches d'entérocoques	Prévalences
Viandes hachées	45	19	42,22%
Pâtisseries	43	2	4,65%
Beurres	24	4	16,66%
Fromages	4	1	5%
Total	116	26	22,41 %

Tableau VI : Fréquence des espèces d'*Enterococcus* dans les aliments analysés.

Nature de produit	Nombre de souches identifiées	Type des souches identifiées et leurs prévalences							
		<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.durans</i>	<i>E.dispar</i>	<i>E.saccharolyticus</i>	<i>E.malodoratus</i>	<i>E.casseliflavus</i>	<i>E.sp</i>
Viandes hachées	19	9 (34,61%)	2 (7,69%)	1 (3,84%)	1 (3,84%)	2 (7,69%)	1 (3,84%)	2 (7,69%)	1 (3,84%)
Pâtisseries	2	1 (3,84%)	1 (3,84%)	-	-	-	-	-	-
Beurres	4	2 (7,69%)	-	1 (3,84%)	-	-	-	-	1 (3,84%)
Fromages	1	1 (3,84%)	-	-	-	-	-	-	-
Total	26	13 (50%)	3 (11,53%)	1 (3,84%)	1 (3,84%)	2 (7,69%)	1 (3,84%)	3 (11,53%)	2 (7,69%)

I.2. Résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques

Les souches identifiées comme étant des entérocoques ont été soumises à l'étude de leur résistance vis-à-vis 10 molécules d'antibiotiques. L'analyse des résultats obtenus a montré que globalement toutes les souches expriment une sensibilité vis-à-vis toutes les molécules d'antibiotiques testés. En revanche, de fortes résistances vis-à-vis la tétracycline et la gentamicine ont été observées, avec des valeurs de 73,07% et 88,46% respectivement. Des résistances relativement faibles ont été observées vis-à-vis l'érythromycine, la pénicilline, le Triméthoprime-sulfaméthoxazole, le chloramphénicol et l'ampicilline, avec des fréquences de 30,76%, 23,07%, 19,23%, 7,69%, 3,84%, respectivement. Aucune résistance n'a été révélée pour la vancomycine et la téicoplanine, ce qui écarte le risque associé à la présence de souches d'entérocoques résistants à la vancomycine.

Tableau VII : Résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques testés.

Antibiotiques	Sensibles	Intermédiaires	Résistantes
	Nombre (%)	Nombre (%)	Nombre (%)
TEC	25 (96,15%)	1 (3,84%)	0 (0%)
TE	7 (26,92%)	0 (0%)	19 (73,07%)
AMP	25 (96,15%)	0 (0%)	1 (3,84%)
P	20 (76,92%)	0 (0%)	6 (23,07%)
E	9 (34,61%)	9 (34,61%)	8 (30,76%)
C	24 (92,30%)	0 (0%)	2 (7,69%)
VA	26 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
OFX	17 (65,38%)	6 (23,07%)	3 (11,53%)
SXT	21 (80,77%)	0 (0%)	5 (19,23%)
GN	3 (11,53%)	0 (0%)	23 (88,46%)

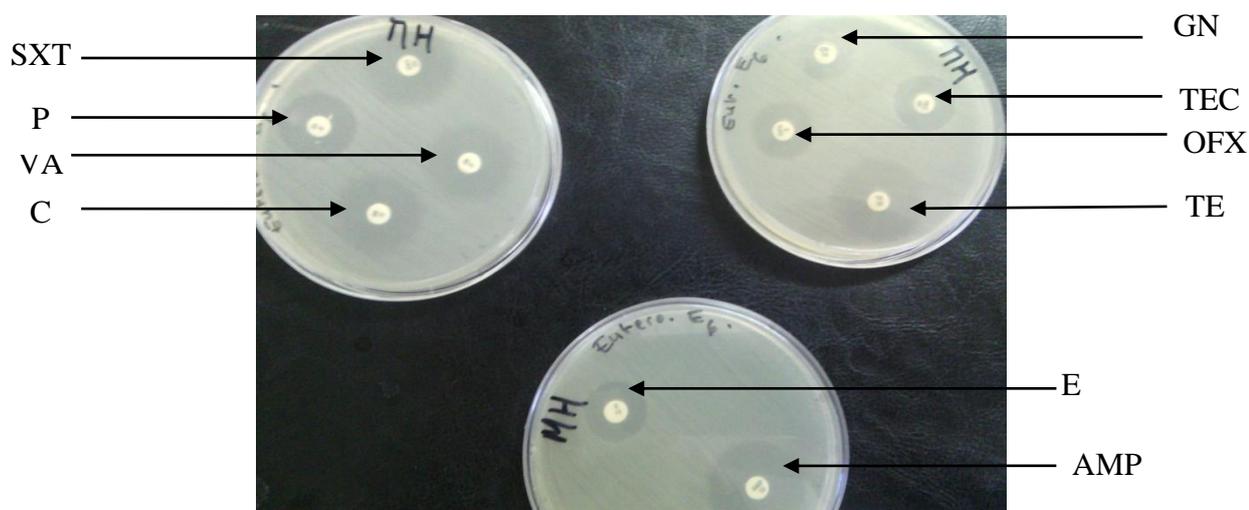


Figure 05 : Profil de résistance de la souche *d'Enterococcus faecalis* (E 6).

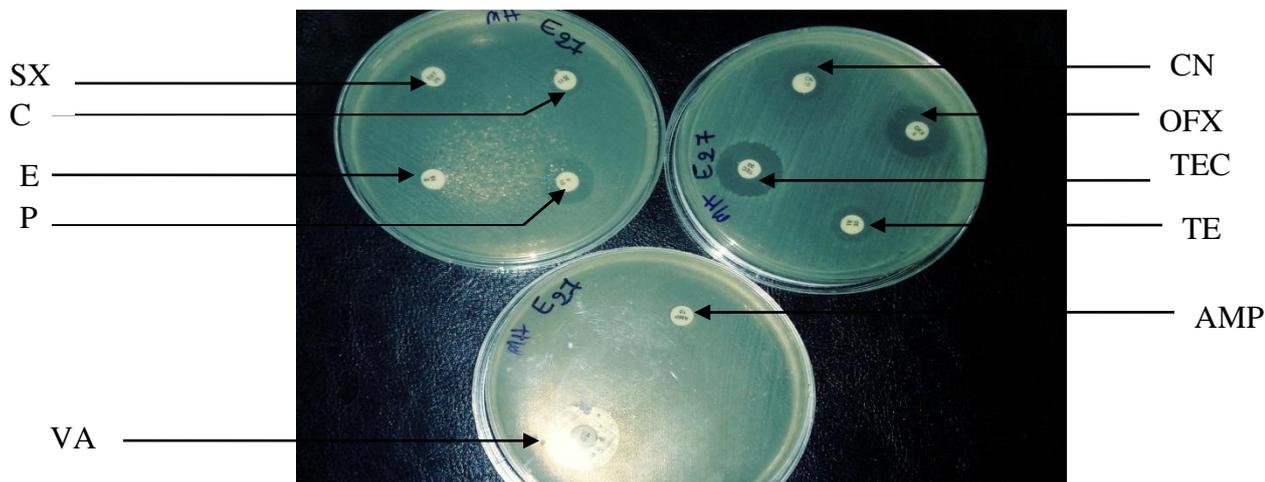


Figure 06: Profil de résistance de la souche *d'Enterococcus faecalis* (E 14).

II.3. Phénotypes de multirésistance

Huit phénotypes de multirésistance ont été observés. Deux souches portent le phénotype TE-P-GN, quatre souches portent le phénotype TE-E-GN. Tandis que, les autres souches portent les phénotypes suivants : TE-E-C-GN-SXT-OFX, TE-E-C-P-GN-SXT, AMP-E-P-GN, TE-GN-SXT, TE-P-GN-OFX, TE-E-P-GN-OFX. Ces résultats sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau VIII : Phénotypes de résistance des souches d'entérocoques isolées.

Souches	Profil de résistance	Souches	Profil de résistance
E1	GN	E15	TE- E-GN
E2	TE- E-C-GN-SXT-OFX	E16	TE-GN
E3	TE-GN	E17	TE-P-GN
E4	TE-GN	E18	TE- P-GN
E5	GN-SXT	E20	TE-E-P-GN-OFX
E6	---	E21	SXT
E7	TE-P-GN-OFX	E22	TE-GN
E9	TE- E-GN	E23	AMP -E-P-GN
E10	TE- E-GN	E25	---
E11	GN	E27	TE-E- C -P-GN-SXT
E12	TE-E-GN	E30	TE-GN
E13	TE-GN	E31	TE-GN
E14	TE-GN-SXT	E36	TE-GN

II.4. Caractérisation phénotypique des entérocoques

II.4.1. La recherche de la gélatinase

Les résultats de la recherche de la gélatinase dans notre étude montrent que la totalité des souches testées dégradent la gélatine, ce qui signifie que ces isolats possèdent le phénotype [GEL], une protéase (la gélatinase) capable d'hydrolyser la gélatine

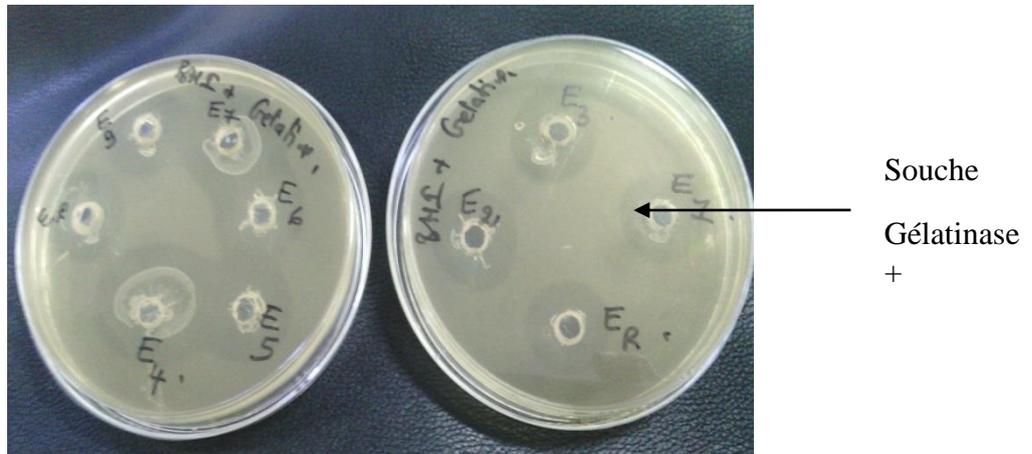


Figure 07: Résultat du test d'hydrolyse de la gélatine.

II.4.2. Recherche de l'ADNase

Ce test a révélé l'absence d'une zone claire autour des colonies bactériennes, ce qui explique l'absence de cette enzyme "ADNase" chez les souches testées.

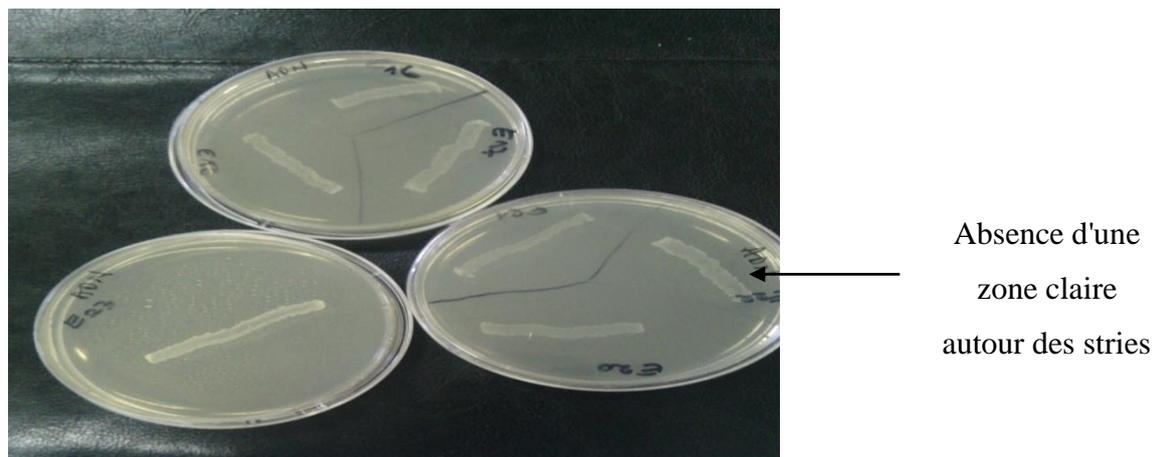


Figure 08: Résultat de la recherche de l'ADNase.

II.5. Activité antagoniste des souches d'entérocoques

Le deuxième objectif de cette étude est d'étudier la capacité de quelques souches d'entérocoques à produire des entérocoïnes, capable d'inhiber la croissance de quelques bactéries pathogènes. Pour cette raison, nous avons testé quelques souches d'*Enterococcus faecalis* et quelques souches d'*Enterococcus faecium* à l'encontre de quelques souches pathogènes, à savoir, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua* et *Listeria ivanovi*. Les résultats de ce test ont montrés l'absence des zones d'inhibitions, ce qui signifie que ces souches ne sont pas bactériocinogènes.

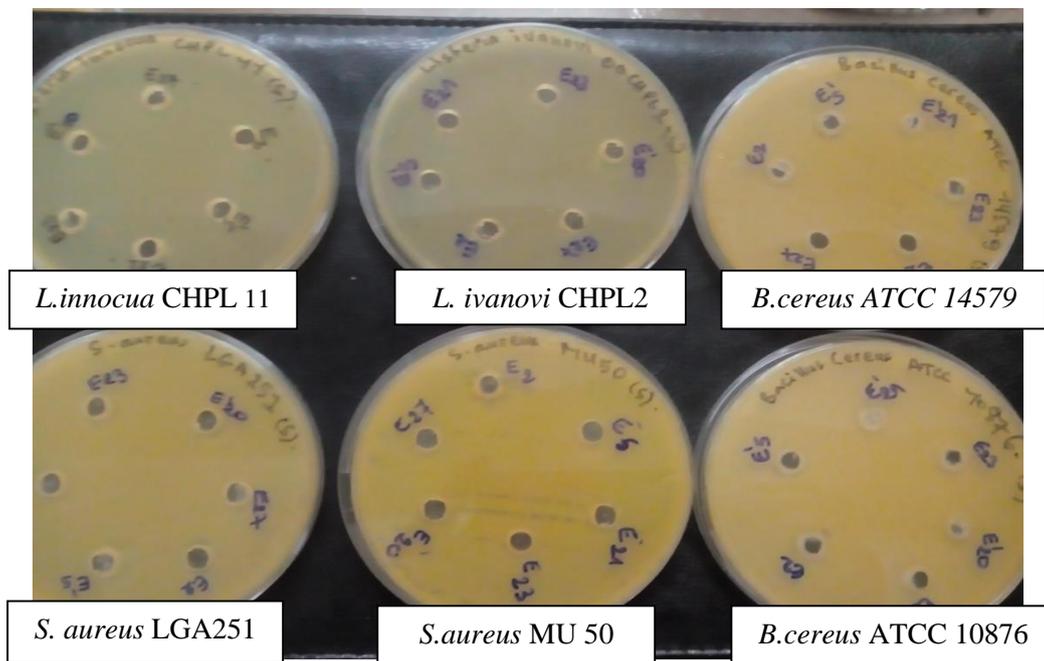


Figure 09 : Activité antagoniste des souches d'entérocoques contre les souches pathogènes.

II.2. Discussion

Cette étude avait comme premiers objectifs, l'isolement des souches d'*Enterococcus* à partir de produits alimentaires d'origine animale (viande hachée) et de produits alimentaires prêts à manger (fromage au lait cru, beurre, pâtisseries), la caractérisation des isolats sur le plan phénotypique et ceci par l'étude de la résistance des souches isolées vis-à-vis quelques molécules d'antibiotiques utilisées en médecine vétérinaire et en médecine humaine et la recherche de quelques facteurs de virulences (gélatinase, ADNase) impliquées dans la pathogénicité de ces souches.

La prévalence des entérocoques dans nos échantillons analysés semble moins importante. En effet, sur 116 échantillons examinés, 22.41% se sont contaminés. Néanmoins, la fréquence de contamination est variable selon le type de produit considéré. Nos résultats ne concordent pas avec ceux annoncés par plusieurs auteurs, qui soulignent l'importance de la contamination des diverses denrées alimentaires par les entérocoques (Rehaiem et al, 2016; Gomes et al, 2008; Hammad et al, 2014; Jamet et al, 2012; Klibi et al, 2013).

La contamination par les entérocoques était plus importante dans les échantillons de viande hachée et de fromage contrairement aux autres aliments. Nos résultats rejoignent ceux de Gomes et al (2008), qui ont annoncé que 52.5% des échantillons analysés étaient contaminés par les entérocoques, avec des hautes prévalences dans les fromages (83.3%) et dans les produits à base de viande (60%). D'autres fréquences plus élevées d'entérocoques ont été rapportées par d'autres auteurs dans la viande hachée (Hayer et al, 2003; Mc Gowan et al, 2006; Koluman et al, 2009). La présence des entérocoques dans les aliments d'origine animale indique généralement une contamination d'origine fécale ou bien que la denrée alimentaire est produite sous mauvaises conditions d'hygiène (Hammad et al, 2015). Néanmoins, des études antérieures ont souligné que les fromagers ainsi que l'équipement de leurs fabrications étaient les sources principales de contamination de ce produit par les entérocoques et que la contamination du lait cru par des entérocoques d'origine bovine est faible (Hammad et al, 2015). Des études récentes confirment la contamination par les entérocoques d'une large gamme de produits alimentaires, incluant les fromages, les saucisses, le lait et les céréales (Yilmaz et al, 2016). L'étude réalisée par Olsen et al (2012) a fourni des preuves solides que les entérocoques provenant des aliments d'origine animale ont un degré remarquable de similarité dans les facteurs de virulence comparativement aux isolats humains, rendant la viande comme source importante d'entérocoques virulents impliqués dans la colonisation.

Pour causer les différentes infections, les entérocoques doivent être capables de coloniser les tissus de l'organisme de l'hôte, résister aux mécanismes de défense immunitaire et causer des changements pathologiques. Pour cela, ils doivent avoir des facteurs de virulence (Hammad et al, 2015). En effet, toutes les souches isolées étaient dotées d'une gélatinase. Notre résultat rejoint ceux de Klibi et al (2013), concernant des souches isolées de viandes. Notons que la gélatinase est une enzyme capable d'hydrolyser le collagène et d'autres peptides bioactifs (Kanemitsu et al, 2001). Cette enzyme est codée par le gène *gel E*, situé sur le chromosome bactérien. La présence de ce gène est l'un des déterminants de virulence associé aux entérocoques, qui est trouvé chez des souches cliniques et celles isolées de la nourriture. Il se rencontre généralement chez *E. faecalis* et *E. faecium* (Chajęcka-Wierzchowska et al, 2017).

Sur l'ensemble des échantillons analysés, *E. faecalis* était l'espèce la plus détectée, suivie des autres espèces incluant *E. faecium*, *E. durans*, *E. dispar*, *E. saccharolyticus* et *E. malodoratus*, avec des faibles fréquences d'isolement. Concernant les échantillons de viande hachée, *E. faecalis* était le plus dominant par rapport aux autres espèces. Nos résultats ne concordent pas avec ceux annoncés par Gomes et al (2008) et Pesavento et al (2014), qui ont signalé qu'*E. faecium* était l'espèce dominante au sein des aliments analysés. Tandis que, Klibi et al (2013) et Yilmaz et al (2016) ont rapporté qu'*E. faecalis* était l'espèce la plus isolée dans les prélèvements de viande. Quant aux produits laitiers (fromage), nos résultats rejoignent ceux annoncés par Rehaïem et al (2016), qui ont signalé qu'*E. faecium* était l'espèce la plus observée dans les échantillons de produits laitiers analysés. La présence des entérocoques dans les produits transformés (pâtisseries) pourrait être due à leurs résistances à la chaleur ou à une contamination croisée.

La résistance aux antibiotiques est un problème de santé publique, il peut provoquer l'échec de traitement thérapeutique en cas d'infection entérococcique surtout chez les immunodéprimés (Kayser, 2003). L'étude de profil de résistance de nos différents isolats montre que les souches isolées présentent une résistance élevée à la gentamicine de l'ordre de 88.46%. Des résultats similaires ont été rapportés par Rehaïem et al (2016) et Hammad et al (2015), qui signalent de hautes résistances vis-à-vis cette molécule, concernant des souches isolées de produits fermentés tunisiens et de fromages au lait cru égyptien, respectivement. En revanche, de faibles résistances vis-à-vis la gentamicine ont été observées dans plusieurs études (Yilmaz et al, 2016 ; Klibi et al, 2013 ; Pesavento et al, 2016). Sachant que les entérocoques ont un niveau bas de résistance à l'encontre des aminoglycosides, en raison de leur faible capacité à pénétrer à travers la paroi bactérienne (Hammad et al, 2015).

Une forte résistance à l'encontre de la tétracycline a été aussi observée dans cette étude. Nos résultats sont en accord avec ceux de Hammad et al (2015), Klibi et al (2013) et Pesavento et al (2016). La résistance de nos souches vis-à-vis la tétracycline pourrait s'expliquer par le fait que cette molécule est fréquemment utilisée dans le domaine vétérinaire (Hammad et al, 2015 ; Rehaïem et al, 2016).

Les entérocoques sont considérés comme des germes ayant une résistance naturelle aux antibiotiques appartenant à la famille des β -lactames (Kak et Chow, 2002). En revanche, nos isolats étaient tous sensibles à la pénicilline G et à l'ampicilline. Nos résultats rejoignent ceux annoncés par certains auteurs (Klibi et al, 2013; Rehaïem et al, 2016). Une étude antérieure réalisée par Loper et al (2005) sur des souches cliniques et alimentaires, confirme que la résistance des entérocoques semble être associée à des souches cliniques qu'aux souches alimentaires. De nos jours, il est assez fréquent de détecter des souches d'*E. faecium*, avec un phénotype de résistance à l'ampicilline en raison de leur modification, de leur protéine de liaison à la pénicilline (PBP5). Bien que, cette résistance est fréquemment observée dans les isolats d'origine humaine que chez ceux d'origine animale (Klibi et al, 2013). En outre, de faibles résistances ont été observées vis-à-vis l'érythromycine et le chloramphénicol, avec des valeurs de l'ordre de 30.76% et 7.69% respectivement. Nos résultats rejoignent ceux de Sánchez Valenzuela et al (2008), qui ont obtenus des pourcentages de résistance à l'érythromycine et au chloramphénicol de 21.7% et 8.69%. Dans une autre étude sur des entérocoques isolés de viandes au Portugal, Poeta et al (2006) ont observé une forte proportion de souches (88%) qui sont résistantes à l'érythromycine. En revanche, une faible résistance a été enregistrée vis-à-vis les mêmes souches (Poeta et al, 2006). Les tétracyclines et les macrolides sont couramment utilisés dans les élevages, ce qui pourrait contribuer dans la résistance vis-à-vis ces agents (Klibi et al, 2013).

Aucune souche n'est résistante aux glycopeptides (vancomycine et teicoplanine). Nos résultats rejoignent ceux de plusieurs auteurs à travers plusieurs pays (Weledji, 2014 ; Barbosa et al, 2009 ; Rehaïem et al, 2016 ; Klibi et al, 2013 ; Jamet et al, 2012 ; Jahan et al, 2013 ; Hammad et al, 2014). En revanche, plusieurs études confirment l'émergence de souches d'entérocoques résistants à la vancomycine dans plusieurs types d'aliments (Koluman et al, 2009 ; Lopez et al, 2009 ; Robredo et al, 2000 ; Valenzuela et al, 2008 ; Yilmaz et al, 2016). L'émergence de la résistance des entérocoques aux glycopeptides, y' compris la vancomycine et la teicoplanine, dans de nombreux pays est attribué à la surutilisation de l'avoparcine, promoteur de croissance des animaux, ce qui conduit à la sélection des souches résistantes à la

vancomycine, qui sont ensuite transmises à l'homme via la chaîne alimentaire (Koluman et al, 2009). Etant donné que, l'avoparcine n'est pas utilisée en Algérie (Bourafa et al, 2016), ce qui pourrait expliquer l'absence de résistance à la vancomycine dans cette étude. La différence entre les taux de prévalence d'entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) est probablement due aux différentes politiques d'utilisation des antibiotiques chez les animaux (Klibi et al, 2013). L'utilisation intensive de la vancomycine, la transmission croisée et le transfert génétique des gènes de résistance de la vancomycine, sont les principales causes de la prévalence croissante de souches d'entérocoques résistants à la vancomycine (Bourafa et al, 2016).

Des études antérieures ont démontré quelques propriétés bénéfiques des entérocoques dans les produits alimentaires, y compris la production des bactériocines qui sont utilisées pour prolonger la durée de conservation des produits, pour exclure et inhiber les bactéries indésirables (Rohaiem et al., 2016). Ainsi, l'utilisation des entérocoques peuvent améliorer le profil de sécurité sanitaire des aliments, en particulier le contrôle de pathogènes tel que *L. monocytogenes* (Relery et Wertz, 2002; Galvez et Ben Omar, 2007). Dans ce contexte, le deuxième objectif de cette étude était la détermination de l'activité antagoniste de quelques isolats d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* vis-à-vis quelques souches pathogènes, à savoir, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua* et *Listeria ivanovi*. Aucune activité antagoniste n'est observée concernant les souches d'*Enterococcus* testées. Bien que, plusieurs auteurs ont montré la capacité des souches d'*Enterococcus* à sécréter des entérocoques, capables d'inhiber une gamme très large de microorganismes pathogènes. Une étude menée par Rivas et al (2012) montre que des souches d'*Enterococcus faecium* isolées du lait de brebis ont exercé un effet antagoniste vis-à-vis des souches de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*. Plusieurs études ont été réalisées dans ce contexte confirment l'activité antagoniste des souches d'*Enterococcus*, en particulier *E. faecalis* et *E. faecium*, vis-à-vis des microorganismes pathogènes (Ben Belkacem et al, 2010; Garcia-Cano et al, 2014; Huang et al, 2016; Aspri et al, 2016 ; Aspri et al, 2017; Rehaiem et al, 2016; Hwanhlem et al, 2017; Perumal et Venkatesan, 2017).

Ainsi à l'issue de nos résultats, l'insensibilité des bactéries cibles testées à ces molécules extracellulaires pourrait être due à leurs faibles concentrations dans le surnageant (Lazrak, 2017).

Conclusion

Conclusion

Les entérocoques sont des bactéries commensales de tube digestif humain et animal, les deux espèces principalement isolées cliniquement chez l'homme sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*.

Cette étude avait comme objectif essentiel une identification biochimique et une caractérisation phénotypique des entérocoques isolés à partir de différents produits alimentaires, et ceci pour mettre en évidence le risque sanitaire associé à la consommation de ce type de produits alimentaires. L'analyse microbiologique a révélé le niveau de contamination variable d'un type d'aliment à un autre et permet de regrouper les isolats en espèce (*E.faecalis*, *E.faecium*, *E.durans*, *E.dispar*, *E.saccharoyticus*, *E.malodoratus*, *E.casseliflavus*). L'étude de la sensibilité des souches isolées vis-à-vis quelques molécules d'antibiotiques a révélé l'existence de fortes résistances vis-à-vis la gentamicine et la tétracycline. De faibles résistances à l'encontre des autres antibiotiques (l'érythromycine, la pénicilline G, le Triméthoprime/sulfaméthoxazole, le chloramphénicol et l'ampicilline) ont été observées. En revanche, aucune souche résistante aux glycopeptides (vancomycine et téicoplanine) n'est enregistrée, ce qui écarte une éventuelle présence de souches ERV.

Ce travail indique la nécessité d'un contrôle constant des entérocoques au sein des denrées alimentaires, compte tenu de leur importance en tant que vecteur de transfert des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques via la chaîne alimentaire.

Pour finir, on peut dire que cette étude pourra avoir comme perspectives :

L'utilisation des techniques moléculaires pour identifier avec précision tous les isolats d'entérocoque ;

Caractériser les gènes de résistance et de virulence par la méthode moléculaire ;

Tester la pathogénicité des isolats virulents et résistants sur des modèles animale, et étudier la possibilité de transfert horizontale de ces déterminant génétiques entre des espèces microbiennes des origines différents ;

Tester l'activité antagoniste des entérocoques contre les germes pathogènes par l'étude de leurs cinétiques de croissance en présence et en absence d'entérocoque.

Références bibliographiques

- Aguilar Galvez, A., Dubois Dauphin, R., Destain, J., Campos, D., et Thonart, P., (2012). Les entérocoques : avantage et inconvénient en biotechnologie. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 16, (1), 67-76.
- Alborn, W. E. Jr., Allen, N. E., et Preston, D. A., (1991). Daptomycin disrupts membrane potential in growing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, (11), 2282–2287.
- Arias, M., (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*, 0, (4), 266–278.
- Arther, J., (1996). Glycopeptide resistance in *Enterococcus*. *Trends Microbiol*, 4, 401-407. In: Courvalin et Leclercq. *Antibiogramme*. 3^{ème} édition. Paris: ESKA, 2012, P157-159, 247-257, 327-340.
- Aslangul, K., (2006). Acquired gentamicin resistance by permeability impairment in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, (11), 3615–3621.
- Bellomo, G., Mangiagle, A., Nicastro, L., et Frigerio, G., (1980). A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhea in pediatrics. *Curr. Ther. Res*, 28, 927-936.
- Bennik, M., (1998). A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1373, 47-58.
- Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N. M. K., Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H., Perez Pulido, R., Martinez Canamero, M., et Galvez, A., (2004). Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 118– 130.
- Berche, P., Gaillard, J., Simonet, et M., *Bactériologie: Bactérie des infections humaines*. Paris: Flammarion, 1988, P. 576-592.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G S., et Hammerschmidt, S., (2004). Characterization of plasmin (ogen) binding to *Streptococcus pneumoniae*. *Indian J Med Res* 119 Suppl, 29-32.
- Bertolami, M. C., et Farnworth, E., (2008). The properties of *Enterococcus faecium* and the fermented milk product-Gaio®. In: Farnworth, E., ed. *Handbook of*

fermented functional foods. 2nd ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press Taylor et Francis Group, 59-75.

- Bhardwaj, A., Malik, R. K., et Chauhan, P., (2008). Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 317-325.
- Boussouar, N., *Technologique et sanitaire des entérocoques isolés à partir de lait de chamelle*. Thèse de doctorat, microbiologie, Tlemcen : Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, 2017, p. 18.
- Bryskier, A., *Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques*. Paris : Ellipses, 1999, P.101.
- Burdychova, R., et Komprda, T., (2007). Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol. Lett*, 276, 149-155.
- Buydens, P., et Debeuckelaere, S., (1996). Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. *Scand. J. Gastroenterol.*, 31, (9), 887-891.
- Champagne, C., et Møllgaard, H., (2008). Production of probiotic cultures and their addition in fermented foods. In: Farnworth, E., ed. *Handbook of fermented functional foods*. 2nd ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press Taylor et Francis Group, 71-88.
- Chandler, J. R., et Dunny, G. M., (2004). Enterococcal peptide sex pheromones. Synthesis and control of biological activity. *Peptides*, 25, 1377-1388.
- Chen, H., et Hoover, D., (2003). Bacteriocins and their food applications. *Compr Rev. Food Sci. Food Saf*, 2, 82-100.
- Chow, J., (1993). Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother*, 37, (11), 2474-2477.
- Cintas, L. M., Casaus, P. M. P., Herranz, C., Nes, I. F., et Hernandez, p. E., (2001). Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food. Science and technology international*, 7, 281- 305.
- Cleveland, J., Montville, T. J. I. F., et Hernandez, p. E., (2001). Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food. Science and technology international*, 7, 281- 305.

- Clewell, D. B., (1993). Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*, 73, 9-12.
- Cotter, p. D., Hill, C., et Ross, R.P., (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Microbiology Reviews*, 3, 777 -778.
- Courvalin et Leclercq. *Antibiogramme*. 3^{ème} édition. Paris : ESKA, 2012, P157-159, 247-257, 327-340.
- De Kwaadsteniet, M., Todorov, S., Knoetze, H., et Dicks, L., (2005). Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram+ and Gram- bacteria. *Int. J. Food Microbiol*, 105, 433-444.
- Del Papa, M., Hancock, L., Thomas, V., et Perego, M., (2007). Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *J. Bacteriol*, 189, (24), 8835-8843.
- Deollaras, C., *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Paris : Lavoisier, 2007, P. 387, 393, 394.
- Devriese, L. A., Hermans, K., Baele, M., et Haesebrouck, F., (2009). *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Microbiol*, 133, 206-7.
- Dortu, C., et Thonart, P., (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 13, 143-154
- Duh, R., Singh, K. V., Malathum, K., et Murray, B. E., (2001). In vitro activity of 19 antimicrobial agents against enterococci from healthy subjects and hospitalized patients and use of an ace gene probe from *Enterococcus faecalis* for species identification. *Microbial Drug Resistance*, 7, 39-06.
- Dunny, G. M., Leonard, B. A., et Hedberg, P. J., (1995). Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: Interbacterial and host e Parasite chemical communication. *Journal of Bacteriology*, 177, 871-876.
- FAO/WHO, 2006. *Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*. Roma: Estudio FAO Alimentación y Nutrición 85.

- Fernández, M., (1983). Olives. *In: Rehm, H., et Reed, G., eds. Biotechnology. Vol. 5. Food and feed production by microorganisms.* Weinheim, Deutschland: Verlag Chemie, 379-397.
- Fisher, K., et Phillips, C., (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155, 1749-1757.
- Flannagan, S. E., Chow, J. W., et Donabedian, S. M., (2003). *Antimicrob. Agents Chemother*, 47, 3954–3959.
- Foulquie Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., et De Vuyst, L., (2006). The role and application of Enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1–24.
- Franz, C., et Holzapfel, W., (2004). The genus *Enterococcus*: biotechnological and safety issues. *In: Salminen, S., Von Wright, A., et Ouwehand, A., eds. Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects.* 3rd ed. New York, USA: Marcel Dekker, Inc, 199-248.
- Franz, C. M., Holzapfel, W. H., and Stiles, M. E., (1999) Enterococci at the crossroads of food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 1–24.
- Franz, C. M. A. P., Muscholl-Silberhorn, A. B., Yousif, N. M. K., Vancanneyt, M., Swings, J., et Holzapfel, W. H., (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4385–4389.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A., (2000). Class II a bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS. Microbiol. Rev*, 24, 85-106.
- Franz, C.M.A.P., Van Belkum, M.J., Holzapfel, W. H., et Galvez, A., (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 293- 310.
- Gaudy et Buxeraud. *Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique.* Paris : Elsevier, 2005, P216-219, 232-233.
- Giraffa, G., (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol*, 88, 215-222.
- Gelsomino, R., (2002). Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Appl. Environ. Microbiol*, 68, (7), 3560-3565.

- Guiraud, P., *Microbiologie alimentaire*. Paris : Dunod, 2012, P. 90.
- Hallgren, O., Aits, S., Brest, P., Gustafsson, L., Mossberg, A.K., Wullt, B. et Svanborg, C., (2008). Apoptosis and tumor cell death in response to HAMLET. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 606, 217–240.
- Hamad, S., Dieng, M., Ehrmann, A., et Vogel, R., (1997). Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *J. Appl. Microbiol*, 83, 764-770
- Huebner, J., Quaas, A., Krueger, W. A., Goldmann, D. A., Pier, G. B., (2000). Prophylactic and therapeutic efficacy of antibodies to a capsular polysaccharide shared among vancomycin-sensitive and -resistant Enterococci. *Infection and Immunity*, 68, 4631–4636.
- Huebner, J., Wang, Y., Krueger, W. A., Madoff, L. C., Martirosian, G., Boisot, S., Goldmann, D. A., Kasper, D. L., Tzianabos, A. O., et Pier, G. B., (1999). Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity*, 67, 1213– 1219.
- Huycke, M., Spiegel, C., et Gilmore, M., (1991). Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 35, (8), 1626-1634.
- Jack, R. W., Tagg, J. R., Ray, B., (1995). Bacteriocine of gram- positive bacteria. *Microbiol. Rev*, 59, 171-200.
- Izquierdo, E., Marchioni, E., Aoude Werner, D., Hasselmann, C., Ennaha, S., (2009). Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 26, (1), 16-20.
- Jett, B., Huycke, M., et Gilmore, M., (1994). Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev*, 7, (4), 462-478.
- Jimenez, E., Ladero, V., Chico, I., Maldonado Barragan, A., Lopez, M., Martín, V., (2013). Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC Microbiology*, 13, 280- 288.
- Klaenhammer, T. R., (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, (3), 377-349.

- Kalina, A. P., (1970). The position of Enterococci in the system of microorganisms. *ZhMikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 47, 20–21.
- Kayaoglu, G., Qrstavik, D., (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis* : Relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15, (5), 308–320.
- Kayser, F., (2003). Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol*, 88, 255-262.
- Kawamoto, S., (2002). Biochemical and genetic characterization of Mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl. Environ. Microbiol*, 68, (8), 3830-3840.
- Klaenhammer, T. R., (1993). Genitic of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev*, 12, 39-86.
- 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.
- Lavinge (2007): Antibiotiques et résistance. Bacteriologie. Faculté de médecine de Montpellier.
- LeBlanc, D., (2006). *Enterococcus*. *Prokaryotes*, 4, 175-204.
- Leclerc, H., Devriese, L., et Mossel, D., (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol*, 81, 459-466.
- Le Jeune, R., callewaert, R., Crabbé, K., et De vugust, L., (1998). Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus anylovarus* DCE 471 in batch cultivation. *J. Appl. Bacteriol*, 84, 159- 168.
- Le Minor, L., Veron, M., Bactériologie médicale. 1^{ère} édition. Paris : Flammarion, 1982, P. 528, 529.
- Leroy, F., De vuyst, L., (2002). Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZSC5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. *Int. J. Food Microbiol*, 72, 115- 164.
- 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. *Infect. Immun*, 63, 703–706.

- Ludwig, W., Seewaldt, E., Kilpper Balz, R., Schleifer, K. H., Magrum, L., Woese, C. R., Fox, G. E., et Stackebrandt, E., (1985). The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus* J. Gen Microbiol, 131, 543-551.
- Lukasova, J., et Sustackova, A., (2003): *Enterococci and Antibiotic Resistance*. Acta Vet. Brno, 72, 315-323.
- Mac Govan et Wise, (2001). Establishing MIC breakpoint and the interpretation of in vitro susceptibility tests. J. Antimicrob. Chemother, 48, (1), 17-28.
- Marcinakova, M., Simonová, M., et Lauková, A., (2004). Probiotic properties of *Enterococcus faecium* EF9296 strain isolated from silage. Acta Vet. Brno, 73, 513-519.
- Matsumura, S., et Simor, A. E., (1998). Treatment of endocarditis due to vancomycinresistant *Enterococcus faecium* with quinupristin/dalfopristin, doxycycline, and rifampin: a synergistic drug combination. Clinical Infectious Diseases, 27, (6), 1554–1556.
- Murray, A., (1990). The life and times of the *Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev, 3, 46-65.
- Mustapha, A., Ariyapitium, T., et Clarke, A.D., (2002). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on vacuum- packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin. J. Food. Sci, 67, 262-267.
- Nallapareddy, S. R., Weinstock, G. M., Murray, B. E., (2003). Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strainspecific collagen binding mediated by Acm, a newmember of the MSCRAMM family. Mol Microbiol, 47, (6), 1733–1747.
- Nawal, M. Vancomycin-Resistant Enterococci in Fecal Samples from Hospitalized Patients and Non- Hospitalized Individuals in Gaza City. Thèse de doctorat, Microbiologie, gaza: université islamique Gaza, 2007, p. 23, 24.
- Oravcova, V., Hadelova, D., et Literak, I., (2015). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with vanA gene isolated for the first time from wildlife in Slovakia. Elsevier B.V. All rights reserved, 378-1135.
- Parente, E., Brinza, C., Ricciandi, A., et Addario, G., (1997). Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC 1146 in batch and continuous culture J. Ind Microbiol Biotechnol, 18, 62-67.

- Pesavento, G., Calonico, C., Ducci, B., Magnanini, A., et Lo Nostro, A., (2014). Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat, 41, 1-7.
- Qin, X., Singh, K. V., Weinstock, G. M., et Murray, B. E., (2000). Effects of *Enterococcus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun*, 68, (5), 2579–2586.
- Rehaïem, A., Ben Boubaker, I., et Boudabous, A., (2016). Prevalence, acquired antibiotic resistance and bacteriocin production of *Enterococcus* spp. isolated from tunisian fermented food products. Elsevier Ltd. All rights reserved, 63, 259-266.
- Reynolds et Courvalin, (2005). Vancomycine resistance in *Enterococcus* due to synthesis of precursors terminating Antimicrob. Agents Chemother, 49, 21-25. In: Courvalin et Leclercq. *Antibiogramme*. 3^{eme} édition. Paris : ESKA, 2012, P157-159, 247-257, 327-340.
- Rice, L. B., Carias, L., Rudin, S., Vael, C., Goossens, H., et 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, A., (2004). Impact of specific pbp5 mutations on expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 48, 3028-3032.
- Rich, R. L., Kreikemeyer, B., Owens, R. T., LaBrenz, S., Narayana, S. V., et Weinstock, G.M., (1999). Ace is a collagen binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem*, 274, (38), 26939–26945.
- Sakoulas, H., (2008). Failures in clinical treatment of *Staphylococcus aureus* infection with daptomycine are associated with alteration in surface charge, membrane phospholipid asymmetry and drug binding. *Antimicrob. Agents Chemother*, 52, 269-278. In: Courvalin et Leclercq. *Antibiogramme*. 3^{eme} édition. Paris : ESKA, 2012, P157-159, 247-257, 327-340.
- Sava, I. G., Heikens, E., et Huebner, J., (2010). Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 533-540.
- Schleifer, K. H., et Kilpper Bälz, R., (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 34, (1), 31 –34.

- Semedo, T., Santos, M. A., Lopes, M. F., Marques, J. J. F., Crespo, M. T., et 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 et Gilmore, (2002). Antibiotic-resistant Enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection*, 4, (2), 215–224.
- Silverman, J. A., Perlmutter, N. G., Shapiro, H. M., (2003). Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, (8), 2538–2544.
- Singleton, P., *Bactériologie*. 6^{ème} édition. Paris : Dunod, 2005, P. 115-125.
- Skurnik, D., Bourgeois Nicolaos, N., Andremont, A., (2008). Histoire naturelle de la résistance transférable aux Glycopeptides Chez les entérocoques. *Medecine-sciences*, 24, (3), 13-7.
- Stein, T., Heinzman, S., Dusterhus, S., Borchert, S., et Entian, K. D., (2005). Expression and functional analysis of the sublin immunity genes spaifegin the subtilin- sensitive host *Bacillus subtilis* M 01099. *J. Bacteriol*, 187, 822- 828.
- Strzelecki, J., Sadowy, E., et Hryniewicz, W., (2011). Enterococcal surface proteins responsible for interactions with host tissues. *Advanced Microbiology*, 50, 31-42.
- Svec, P., Devriese, L.A., (2009). The genus *Enterococcus* : in *Bergey's manual of Systematic bacteriology*, second edition; volume three (The firmicutes). P 594-623. In: Boussouar, N. *Technologique et sanitaire des Entérocoques isolés à partir de lait de chamelle*. Thèse de doctorat, microbiologie, Tlemcen : Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, 2017, p. 18.
- Tagg, J. R., Dadjani, A. S., et Wannamaker, L. W., (1996). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev*, 40, 722-756.
- Theilacker, C., Kaczynski, Z., Kropec, A., Sava, I., Ye, L., et Bychowska, A., (2011). Serodiversity of Opsonic Antibodies against *Enterococcus faecalis* -Glycans of the Cell Wall Revisited. *PLoS One*, 6, 17-839.
- Thomas, V. C., Hiromasa, Y., Harms, N., Thurlow, L., Tomich, J., et Hancock, L. E. A., (2009). Fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*, 72, (4), 1022– 1036.

- Todorov, S, (2005). An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4V isolated from soya beans. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 25, 508-513.
- Todorov, S., (2009). Evaluation of potential probiotic properties of *Enterococcus mundtii*, its survival in Boza and *in situ* bacteriocin production. *Food Technol. Biotechnol*, 47, (2), 178-191.
- Tremblay, z., (2012). Étude de la résistance aux antibiotiques des entérocoques d'origine animale du Québec. Thèse de doctorat. Inédite, GREMIP et CRIP. Département de pathologie et microbiologie. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal.
- Tu, L., Mustapha, A., (2002). Reduction of brochothrix thermosphacta and *Salmonella* serotype typhinurim on vacuum- packaged fresh beef treated with nisin and nisin combined with EDTA. *J. Food. Sci*, 67, 302- 306.
- Van Belkum, M., et Stiles, M., (2000). Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep*, 17, 323-335.
- Wicken, A. J., Elliott, S. D., Baddiley, J., (1963). The identity of streptococcal group D antigen with teichoic acid. *Microbiology*, 31, (2), 231–239.
- Wilaipun, P., (2002). Influence of physical factors and various complex media on growth and bacteriocin production of two-synergistic peptides with heat stable bacteriocin producer, *Enterococcus faecium* NKR-5-3, isolated from thai fermented fish. *Kasetsart J. Nat. Sci*, 36, 268-277.
- Yousif, N., (2005). Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from 'Hussuwa', an African fermented sorghum product. *J. Appl. Microbiol.*, 98, 216-228.
- Zendo, T., (2005). Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *J. Appl. Microbiol*, 99, 1181-1190.

Annexes

Annexes 01 : Milieux de culture utilisés et leur composition

Milieu de Rothe

Composition en g/l

Extrait de viande de bœuf.....	4,5
Tryptone.....	15
Glucose.....	7,5
Chlorure de sodium(NaCl).....	7,5
Azoture de sodium(NaN ₃).....	0,2
pH final 7,2 ±0,2 à 25°C	

Préparation:

Mettre en suspension 34,7 grammes du milieu dans un litre d'eau distillée. (69.4 grammes si l'on désire double concentration). Bien mélanger et faire dissoudre en chauffant tout en agitant fréquemment. Faire bouillir pendant une minute jusqu'à dissolution complète. Répartir dans des récipients adaptés et stériliser en l'autoclave à 118°C pendant 15 minutes.

Milieu de Litsky

Composition en g/l

Peptone.....	20
Glucose.....	5
Chlorure de sodium (NaCl).....	5
Phosphate monopotassique (KH ₂ PO ₄).....	2,7
Phosphate bipotassique (K ₂ HPO ₄).....	2,7
Azoture de sodium(NaN ₃).....	0,3
Ethyl-violet.....	0,4 mg
PH final 6,9 ±0,2 à 25°C	

Préparation:

Mettre en suspension 35,8 grammes de milieu dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger et faire bouillir en agitant fréquemment pendant une minute jusqu'à dissolution complète. Mettre en tube d'essais en quantités de 10 ml par tube. Stériliser à 120°C pendant 15 minutes. On recommande pour l'utilisation de ce milieu un grand "inoculum" car il est très sélectif et il est utilisé dans la 2ème phase de confirmation.

Prudence: Ce milieu est toxique si avalé. Inhalé ou entre le contact avec la peau. Utiliser des gants et protéger les yeux et la face.

Eau peptonée tamponnée

Composition en g/l

Tryptone.....10

Chlorure sodique.....5.0

PH du milieu prêt à l'emploi 7.2 +/- 0.2 à 25°C

Préparation : Mettre en suspension 15g du milieu dans 1 litre d'eau distillée. Faire dissoudre le milieu complètement. Répartir dans des récipients appropriés puis stériliser en autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

Gélose BHI (Brain Heart Infusion)

Composition en g/l

Peptone pancréatique de gélatine.....10

Chlorure de sodium.....5

Phosphate disodique.....2.5

Glucose.....2

PH du milieu prêt à l'emploi 7.4 +/- 0.2 à 25°C

Préparation : Mettre en solution 37g de milieu BHI déshydraté dans 1 litre d'eau distillée. Agiter lentement jusqu'à dissolution complète, répartir le milieu dans des flacons puis stériliser à l'autoclave pendant 15 minute à 120°C.

Pour l'obtention du milieu BHI on ajoute 15g d'agar bactériologique dans 1l de bouillon BHIB lors de sa préparation.

Milieu TSYEA

Composition en g/l

Tryptone.....17.0

Chlorure de sodium.....5.0

Peptone de soja.....3.0

Phosphate dipotassique.....	2.5
Glucose monohydrate.....	2.5
Extrait de levure.....	6.0
Agar bactériologique.....	15.0

PH du milieu prêt à l'emploi 7.3 +/- 0.2 à 25°C

Préparation : Mettre en suspension 51g dans 1 litre d'eau distillée. Bien mélanger chauffer légèrement si nécessaire jusqu'à dissolution. Répartir en flacons puis stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°C.

Gélose à ADN

Composition en g/l

Peptone de viande.....	20
Acide désoxyribonucléique.....	02
Chlorure de sodium.....	05
Agar.....	18

PH du milieu prêt à l'emploi 7.3 +/- 0.2 à 25°C

Préparation : Mettre en suspension 42 grammes du milieu dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger jusqu'à obtenir une suspension homogène. Chauffer en agitant fréquemment et faire bouillir pendant une minute. Stériliser en l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Laisser refroidir jusqu'à 45-50°C et verser dans des boites de pétri.

Milieu Mueller Hinton

Composition en g/l

Amidon.....	1.5
Infusion de bœuf.....	2.0
Agar bactériologique.....	17.0

Peptone de caséine acide.....17.5

PH du milieu prêt à l'emploi 7.4 +/- 0.2 à 25°C

Préparation : Mettre en suspension 38g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée. Bien agiter, faire bouillir pendant 1 minute puis stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°C. Laisser refroidir jusqu'à atteindre 40-45°C.

Milieu BEA (gélose bile-azide-esculine)

Composition en g/l

Peptone tryptique.....17g

Peptone pepsique de viande.....3g

Extrait de levure.....5g

Bile de bœuf déshydraté.....10g

Chlorure de sodium.....5g

Citrate de sodium.....1g

Esculine.....1g

Citrate de ferammoniacal.....0,5g

Gélose.....13g

PH du milieu prêt à l'emploi 7.1+/-0.2 à 25°C

Préparation :

Mettre en suspension 54,6 grammes de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Porter à ébullition lentement en agitant jusqu'à dissolution complète. Répartir en tubes ou en flacons. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

Milieu BCP

Composition en g/l

Peptone.....5

Extrait de viande.....0,5

Chlorure de sodium.....2,5

Pourpre de bromochresol.....0,007

Préparation:

Mettre en suspension tous ces ingrédients dans 500ml d'eau distillée. Agiter lentement jusqu'à dissolution complète, répartir le milieu dans des tubes (9ml) puis stériliser à l'autoclave pendant 15 minute à 120°C.

 **Solution NaOH**

Mettre en suspension 20g de NaOH dans 500 ml d'eau distillée. Agiter jusqu'à dissolution complète.

 **Solution de sucres :** (Amidon, tréhalose, arabinose, sorbitol, mannitol, raffinose)

Mettre en suspension 1g de chaque sucre dans 100 ml d'eau distillée. Agiter jusqu'à dissolution complète, stériliser à l'autoclave pendant 15 minute à 120°C.

Annexe 02 : Résultats biochimiques sur les souches isolées.

Echantillon	Esculine	Croissance à 45°C	Croissance à 16% de NaCl	Oxydase	DNase	Catalase	Gélatinase	Codex
Ech3 VH	+	+	+	-	-	-	+	E1
Ech11 VH	+	+	+	-	-	-	+	E4
Ech12 VH	+	+	+	-	-	-	+	E6
Ech13 VH	+	+	+	-	-	-	+	E2
Ech15 VH	+	+	+	-	-	-	+	E9
Ech16 VH	+	+	+	-	-	-	+	E5
Ech17 VH	+	+	+	-	-	-	+	E7
Ech20 VH	+	+	+	-	-	-	+	E11
Ech21 VH	+	+	+	-	-	-	+	E12
Ech23 VH	+	+	+	-	-	-	+	E10
Ech26 VH	+	+	+	-	-	-	+	E3
Ech28 VH	+	+	+	-	-	-	+	E13
Ech29 VH	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E8
Ech35 VH	+	+	+	-	-	-	+	E14
Ech36 VH	+	+	+	-	-	-	+	E15
Ech37 VH	+	+	+	-	-	-	+	E21
Ech39 VH	+	+	+	-	-	-	+	E19
Ech40 VH	+	+	+	-	-	-	+	E17
Ech42 VH	+	+	+	-	-	-	+	E18
Ech43 VH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E19
Ech45 VH	+	+	+	-	-	-	+	E20
Ech3 Gn	+	+	+	-	-	-	+	E23
Ech11 Gn	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E24
Ech19 Gn	+	+	+	-	-	-	+	E22
E2 Cr1	+	+	+	-	-	-	+	E25
E1 Cr1	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E26
E1 Cr3	+	+	+	-	-	-	+	E27
E2 Cr4	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E28
E2 Cr5	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E29
E1 Cr4	+	+	+	-	-	-	+	E30
E3 Cr5	+	+	+	-	-	-	+	E31
E1 Cr2	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E32
E1 Cr5	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E33
E2 Cr1	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E34
E3 Cr1	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E35
E3 Cr1	+	+	+	-	-	-	+	E36

(+) : test positif

VH : Viande hachée

(-) : test négatif

Gn : Génoise

(ND) : non déterminé

Cr : Crèmerie

Annexe 03 : Résultats de la fermentation des sucres par les souches isolées (testes biochimiques).

Echantillon	LAC	AMD	SOR	MANI	ARB	RIB	TREH	RAF	MIL	Code
Ech3 VH	+	+	+	+	-	+	+	+	-	E1
Ech11 VH	+	+	+	+	-	+	+	+	-	E4
Ech12 VH	+	+	+	+	-	+	+	+	-	E6
Ech13 VH	+	+	+	+	-	+	+	+	-	E2
Ech15 VH	+	+	+	+	-	+	+	+	-	E9
Ech16 VH	+	-	-	-	-	+	+	+	V	E5
Ech17 VH	+	+	-	+	+	+	+	+	+	E7
Ech20 VH	-	ND	+	+	-	+	+	+	+	E11
Ech21 VH	+	ND	+	+	-	+	+	+	+	E12
Ech23 VH	+	+	+	+	-	+	+	+	-	E10
Ech26 VH	+	+	-	+	+	+	+	+	+	E3
Ech28 VH	+	ND	+	+	-	+	+	+	+	E13
Ech29 VH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E8
Ech35 VH	-	+	-	-	-	+	+	+	-	E14
Ech36 VH	+	+	+	+	-	+	+	-	-	E15
Ech37 VH	+	-	-	-	-	+	+	-	-	E21
Ech39 VH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E19
Ech40 VH	+	-	-	-	-	+	+	-	-	E17
Ech42 VH	+	+	+	+	+	+	+	-	+	E18
Ech43 VH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E19
Ech45 VH	+	+	+	+	+	+	+	-	-	E20
Ech3 Gn	+	-	-	+	+	+	+	+	+	E23
Ech11 Gn	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E24
Ech19 Gn	+	-	+	+	-	+	+	-	-	E22
E2 Cr1	+	-	-	-	-	+	+	-	-	E25
E1 Cr1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E26
E1 Cr3	+	+	+	+	-	+	+	+	-	E27

E2 Cr4	ND	E28								
E2 Cr5	ND	E29								
E1 Cr4	+	-	+	+	-	+	+	+	-	E30
E3 Cr5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	E31
E1 Cr2	ND	E32								
E1 Cr5	ND	E33								
E2 Cr1	ND	E34								
E3 Cr1	ND	E35								
E3 Cr1	+	+	+	+	-	+	+	+	-	E36
<p>(+) : Test positif (-) : Test négatif (ND) : Non déterminé (V) : Variable VH : Viande hachée Gn : Génoise Cr : Crèmerie</p>										

Annexe 04: Testes biochimiques.



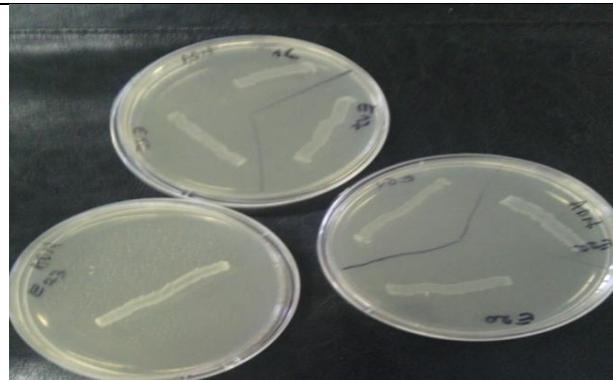
- Réduction de l'esculine



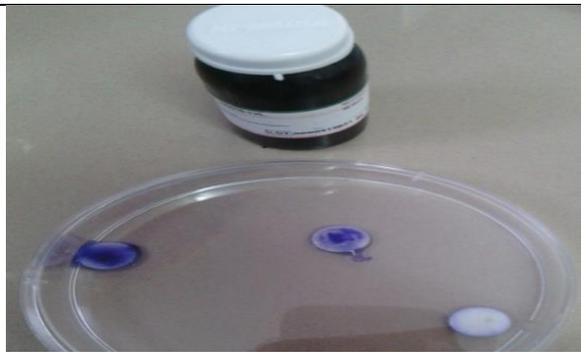
- Croissance à 45°C et 6.9% de NaCl



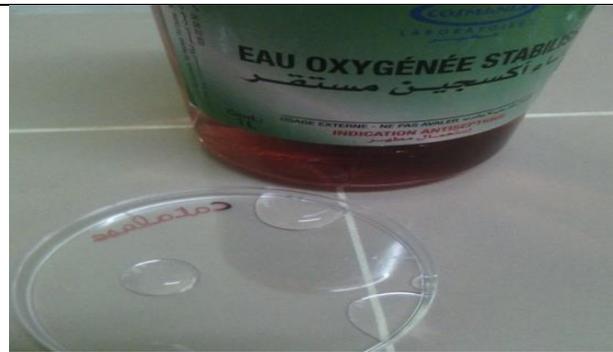
- Test de Gélatinase



- Test de DNase



- Test de l'oxydase



- Test de catalase



- La fermentation des sucres par *Enterococcus faecalis*



- La fermentation des sucres par *Enterococcus faecium*

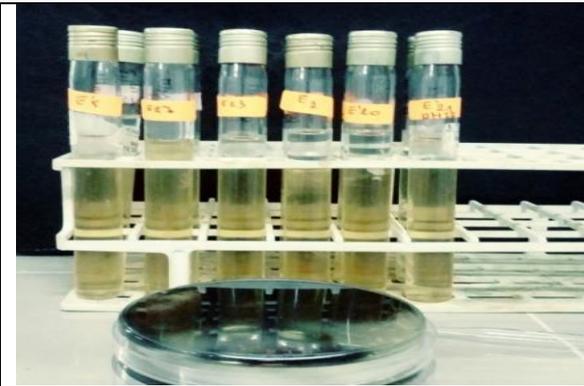
Annexe 05 : valeurs des diamètres de zone d'inhibition.

Antibiotiques	Diamètre critique			référence
	S	I	R	
Triméthopri- mésulfaméthoxazole	≥16	10-15	<10	CASFM 2014
Gentamicine	≥17	-	<17	CASFM 2014
Ofloxacin	≥17	13-16	≤12	CLSI 2017
Pénicilline	≥15	-	≤14	CLSI 2017
Ampicilline	≥17	-	≤16	CLSI 2017
Vancomycine	≥17	15-16	≤14	CLSI 2017
Erythromycine	≥23	14-22	≤13	CLSI 2017
Teicoplanine	≥14	11-13	≤10	CLSI 2017
Tétracycline	≥19	15-18	≤14	CLSI 2017
Chloramphénicol	≥18	13-17	≤12	CLSI 2017

Annexe 06: Résultats de la résistance des souches d'entérocoque isolées aux antibiotiques.

Code	Antibiotiques										Genre ESP
	TEC	TE	OF X	GN	AMP	E	C	VA	SXT	P	
E1	19	22	13	11	22	17	20	18	21	17	<i>E.faecalis</i>
E2	18	7	6	6	19	6	6	18	6	19	<i>E.faecalis</i>
E3	20	13	18	13	20	28	28	24	23	17	<i>E.faecium</i>
E4	18	11	15	7	21	18	19	17	23	17	<i>E.faecalis</i>
E5	20	27	19	10	21	26	25	22	6	19	<i>E.dispar</i>
E6	19	28	20	17	27	18	24	19	25	20	<i>E.faecalis</i>
E7	22	10	11	15	19	30	29	24	26	6	<i>E.faecium</i>
E9	18	8	13	14	25	6	21	18	20	18	<i>E.faecalis</i>
E10	17	7	13	7	21	6	19	17	19	16	<i>E.faecalis</i>
E11	20	27	17	12	24	22	27	18	27	19	<i>E.saccharoyiticus</i>
E12	18	11	15	12	24	6	26	18	23	19	<i>E.malodoratus</i>
E13	19	12	19	15	28	21	23	18	28	20	<i>E.malodoratus</i>
E14	21	8	23	8	23	27	23	22	6	18	<i>E.spp</i>
E15	19	11	21	11	26	6	27	18	22	19	<i>E.faecalis</i>
E16	18	11	18	14	21	15	26	20	25	16	<i>E.faecalis</i>
E17	21	9	22	11	21	25	24	22	28	12	<i>E.durans</i>
E18	18	10	18	15	20	20	25	18	22	11	<i>E.casseliflavus</i>
E20	19	9	6	6	23	6	27	19	28	12	<i>E.faecalis</i>
E21	25	26	24	19	29	29	24	24	6	24	<i>E.durans</i>
E22	20	12	19	29	23	18	26	18	24	16	<i>E.faecalis</i>
E23	18	27	18	9	16	11	24	24	24	6	<i>E.faecium</i>
E25	23	31	23	22	30	27	27	24	24	26	<i>E.durans</i>
E27	18	11	16	10	24	6	8	18	6	14	<i>E.faecalis</i>
E30	19	13	17	10	24	22	26	18	26	16	<i>E.faecalis</i>
E31	19	12	20	10	23	23	26	18	27	16	<i>E.sp</i>
E36	19	13	17	13	27	29	24	20	29	18	<i>E.faecalis</i>

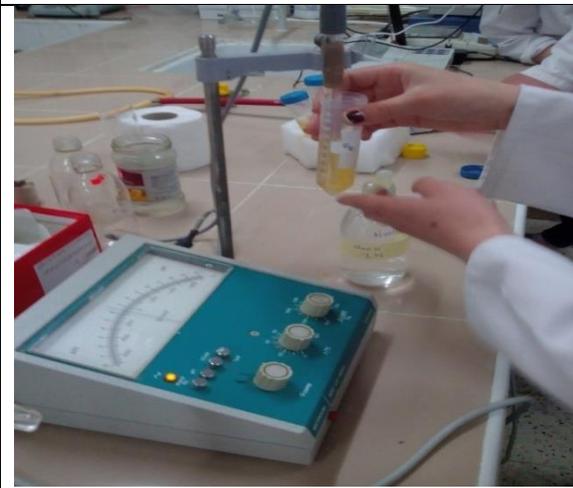
Annexe 07 : Activité antagoniste des entérocoques.



La préparation de l'inoculum par ensemencement des souches d'Entérocoques sur BHIB



Centrifugation d'inoculum après incubation



Neutralisation de l'inoculum après centrifugation



Le résultat de la neutralisation



Filtration du surnatant



Testé l'activité antagoniste d'Entérocoque contre *S. aureus*

